

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Análisis morfológico y molecular del cuerpo XY y
del Complejo Sinaptonémico en espermatoцитos de rata**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

ABRAHAN HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. GERARDO HEBERT VÁZQUEZ-NIN

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE, 2008

Carta de la coordinación al director general de admón..

Agradecimientos institucionales

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias, UNAM en colaboración con el laboratorio de Genética Molecular, Estructura de la Cromatina y Regulación Epigenética del Instituto de Fisiología Celular en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la tutoría del Dr. Gerardo-Hebert Vázquez-Nin.

Este trabajo fue apoyado por los donativos de CONACyT (81213) y DGAPA-PAPIIT (IN203308-3) para Gerardo Hebert Vázquez-Nin. Y CONACyT (58767) y DGAPA-UNAM (IN214407) para Félix Recillas-Targa.

Agradezco el apoyo recibido durante mis estudios doctorales al Posgrado en Ciencias Biológicas, mediante una beca de CONACyT (181375) y un complemento de beca por parte de la DGEP-UNAM

El comité tutorial que asesoró el desarrollo del presente trabajo, estuvo conformado por:

Dr. Gerardo Hebert Vázquez-Nin	Facultad de Ciencias
Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo	Centro de Ciencias de la Atmósfera
Dra. Teresa Fortul Van der Goes	Facultad de Medicina

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis, recibí una excelente asesoría y tutoría del Dr. Félix Recillas-Targa, del Dr. Héctor Rincón Arano, así como una valiosa asesoría técnica por parte de la Dra. Rosario Ortiz Hernández, de la Bióloga Georgina Guerrero Avendaño y de la Bióloga Ernestina Ubaldo

También se recibió el apoyo y asesoría de los doctores Ricardo Benavente y Manfred Alzheimer de la Universidad de Würzburg, Alemania.

Dedicada

A Elidia (Chapis), por todo su amor y apoyo que me ha ofrecido incondicionalmente

A mis hijos la idealista Esmeralda y el colega Enrique Abraham, la razón de superarme día a día y de esforzarme por ganar su admiración.

A la memoria de mi Madre Romana

A mi señor Padre que aunque lejos, siempre en mi corazón

A mi familia que siempre me ha apoyado

COGITO ERGO SUM

Agradecimientos

En primer lugar agradezco a la UNAM por todo lo que representa para mí y por todo lo que me ha dado. A la Facultad de Ciencias y al Instituto de Fisiología Celular, por ser los lugares donde se realizó y maduró este trabajo.

Al Dr. Gerardo Hebert Vázquez-Nin, por su apoyo y dirección, así como a su excelente apoyo académico y científico que me brindó durante el tiempo de la realización de este trabajo.

Al Dr. Félix Recillas-Targa, por los conocimientos que aportó a mi formación y sobretodo por el modelo que me inspiro a seguir y sus excelentes consejos académicos y personales.

A la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez, quien me apoyó en todos los aspectos durante la realización de este trabajo y por sus valiosos consejos para la correcta elaboración del escrito.

A la Dra. Rosario Ortiz, por su excelente apoyo académico, científico, personal y por su amistad.

A la Bióloga Georgina Guerrero Avendaño por su extraordinaria ayuda técnica y científica durante el desarrollo de mi trabajo doctoral.

A la Dra. Sandra Gómez Arroyo y a la Dra. Teresa Fortul Van der Goes, por aceptar ser parte de mi comité tutorial y por sus pertinentes correcciones y sugerencias cada semestre.

A mis amigos-compañeros de los laboratorios donde se realizó mi proyecto doctoral. A Héctor por su excelente ayuda, por sus consejos y por su amistad, que me ayudaron a despegar en mi proyecto doctoral. A Inti que además de un excelente amigo fue un gran crítico de mis acciones lo cual también me ayudó en mi desarrollo científico y personal. A Castro que siempre estuvo dispuesto a discutir y que me ayudó de manera incondicional en todos los aspectos

laborales y personales. A Soto y a Maya que despegaron a la par que yo y que me ayudaron a echarle ganas día a día. A Tzutzuy y Paul Schuster que me apoyaron en lugares donde me sentía como bicho raro. A Martin McFly con su buen humor que siempre hacía agradables los días más pesados de chamba. A los compañeros nuevos que me dieron más ánimos de salir adelante. Edgar, aunque odiado por muchos, muy buen amigo y compañero de trabajo. A Christian Arriaga, Erandi Ayala, Daniela Lujan, Andrea Casasola y Rosario que me hicieron recordar mis inicios y son parte del recambio generacional. A los miembros del laboratorio de Microscopía Electrónica por su compañía y ayuda crítica en mi desarrollo: Ernestina Ubaldo, Silvia Juárez, María Luisa Escobar, la maestra Martha Salcedo y al recambio generacional y compañero de tema Rafael Jaimes Chino.

A mi suegra que sabe más de fucho que la mayoría de mis cuates, al compadre Beto, a Male y a toda la familia que me rodeó en los momentos difíciles.

A mi Abue Esperanza, a Gloria y a mis hermanos el Magno, Anel y Shantal (número 4, 2 y 3, respectivamente), por siempre estar al pendiente de mí.

Índice.	páginas
1. Resumen	13
2. Abstract	15
3. Abreviaturas	16
4. Introducción	19
4.1. Reproducción sexual.....	19
4.1.1. Gametogénesis.....	19
4.1.2. Espermatogénesis.....	20
4.1.3. Ciclos y ondas espermatogénicas.....	20
4.2. Meiosis.....	21
4.2.1. Apareamiento de cromosomas homólogos, evento característico de la meiosis.....	22
4.2.2. Los gametos se producen por dos divisiones celulares meióticas.....	24
4.2.3. El apareamiento y recombinación de los cromosomas homólogos ocurre durante una extensa profase meiótica I.....	25
4.2.4. La variabilidad genética se produce por el entrecruzamiento entre cromátidas homólogas no hermanas.....	26
4.2.5. La interrelación de los dobles rompimientos de cadena con la sinapsis de los cromosomas homólogos.....	27
4.2.6. Los nódulos de recombinación.....	28
4.2.7. El quiasma de recombinación es importante para la segregación de los cromosomas homólogos durante la meiosis.....	30
4.2.8. El apareamiento de cromosomas sexuales asegura su segregación.....	31
4.3. Complejo sinaptonémico.....	32
4.3.1. Una estructura específica de la meiosis.....	32
4.3.2. Estructura del complejo sinaptonémico.....	33
4.4. Comportamiento de los cromosomas sexuales durante la meiosis.....	35
4.4.1. Meiosis en hembras.....	35
4.4.2. Meiosis en machos.....	36

4.5. Formación del cuerpo XY durante la profase meiótica I.....	36
4.6. Cuerpo XY.....	37
4.6.1. Estructura de la cromatina en el cuerpo XY.....	40
4.6.2. ARN en el cuerpo XY.....	42
4.7. Cromatina.....	43
4.7.1. Regulación epigenética.....	45
4.7.2. Modificaciones post-traduccionales de las histonas.....	45
4.7.3. Composición del genoma de los roedores.....	46
4.7.4. Secuencias repetidas.....	46
4.7.5. Secuencias repetidas en el genoma de roedores.....	47
4.8. Estructura de la cromatina durante la profase meiótica I.....	48
5. Justificación y planteamiento del problema.....	50
6. Hipótesis.....	51
7. Objetivo General.....	52
7.1. Objetivos particulares (complejo sinaptonémico).....	52
7.2. Objetivos particulares (cuerpo XY).....	52
8. Estrategias experimentales.....	53
9. Materiales y métodos.....	55
9.1. Procesamiento de material biológico para ensayos de biología molecular.....	55
9.1.1. Disgregación de células de testículo de rata.....	55
9.1.2. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	55
9.1.3. ChIP-ReChIP.....	56
9.1.4. Clonación y secuenciación de ADN.....	57
9.1.5. Análisis y secuenciación de clonas positivas.....	58
9.1.6. Análisis bioinformático de secuencias inmunoprecipitadas.....	58
9.1.7. Identificación y caracterización de secuencias.....	59
9.1.8. PCRs dúplex radioactivas.....	59
9.1.9. Análisis de la estructura primaria de las secuencias inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-SYCP3.....	60
9.2. Procesamiento de material biológico para microscopía óptica y epifluorescente.....	61
9.2.1. Tratamiento <i>in vivo</i> de las ratas con la droga Tricostatina-A.....	61
9.2.2. Procesamiento de ratas control y tratadas	

con la droga Tricostatina-A.....	62
9.2.2.1 Crio-fijaciones.....	62
9.2.3. Producción de sondas para hibridaciones <i>in situ</i>	62
9.2.3.1. Sondas de ADN.....	62
9.2.4. Inmunolocalización acoplada a hibridación <i>in situ</i> fluorescente.....	63
9.2.5. Producción y purificación de anti-SYCP1 y anti-SYCP3.....	63
9.2.6. Sonda de ARN.....	64
9.2.7. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente de ARNs	64
9.2.7.1. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente de ARNs totales.....	64
9.2.7.2. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente de ARN <i>Xist</i>	64
9.2.8. Inmunolocalizaciones citológicas.....	65
9.3. Técnicas histológicas.....	66
9.3.1. Fijación e inclusión.....	66
9.3.2. Tinción de Hematoxilina-Eosina.....	66
9.3.3. Ensayo para evaluar muerte celular.....	66
9.4. Procesamiento del material biológico para microscopía electrónica.....	67
9.4.1. Fijación en glutaraldehído.....	67
9.4.2. Fijación en paraformaldehído.....	67
9.4.3. Lavados y deshidratación.....	67
9.4.4. Preinclusión para resina epóxica.....	67
9.4.5. Inclusión.....	68
9.4.6. Corte.....	68
9.4.7. Contraste.....	68
9.4.8. Hibridación <i>in situ</i> ultraestructural.....	69
9.4.9. Amina de Osmio para contrastar ADN.....	69
10. Resultados.....	70
10.1. Complejo sinaptonémico.....	70
10.1.1 Secuencias de ADN altamente repetidas en el genoma de la rata se asocian a la proteína del elemento lateral SYCP3.....	70
10.1.2. Las secuencias repetidas asociadas al elemento lateral del complejo sinaptonémico se distribuyen	

ampliamente en el genoma de la rata.....	71
10.1.3. La cromatina inmunoprecipitada con anti-SYCP3 es específica de su asociación <i>in vivo</i>	74
10.1.4. Las secuencias repetidas inmunoprecipitadas con anti-SYCP3 están enriquecidas en el elemento lateral.....	75
10.1.5. Las secuencias repetidas están asociadas a los elementos laterales del complejo sinaptonémico.....	76
10.1.6. Análisis ultraestructural de la asociación de las secuencias repetidas con los elementos laterales.....	81
10.1.7. Modelo de anclaje de las secuencias repetidas al elemento lateral del complejo sinaptonémico	82
10.1.8. Incorporación de las LEARS (secuencias repetidas de asociación al elemento lateral) a los elementos laterales del complejo sinaptonémico	83
10.1.9. La incorporación de las LEARS al EL no depende de su estructura primaria	84
10.1.10. La cromatina de las LEARS tiene un perfil epigenético característico.....	84
10.1.11. La inhibición de las proteínas desacetilasas de histonas causa muerte a células paquiténicas.....	90
10.1.12. El perfil epigenético de las LEARS es importante para la estructura del complejo sinaptonémico.....	92
10.1.13. Pérdida de asociación de las LEARS en los elementos laterales del complejo sinaptonémico.....	98
10.1.14. La distribución de modificaciones post-traduccionales de histonas en las LEARS se afecta después del tratamiento con Tricostatina-A.....	101
10.1.15. Modelo de la estructura del complejo sinaptonémico.....	104
10.2. Cuerpo XY.....	108
10.2.1 El cuerpo XY está enriquecido en ARNs totales.....	108
10.2.2. El ARN <i>Xist</i> está presente en células en espermatogenesis pero ausente del cuerpo XY	109
10.2.3. La heterocromatina del cuerpo XY presenta un perfil epigenético característico.....	111

10.2.4. La heterocromatina asociada al cuerpo XY es importante para su formación y estructura.....	114
10.2.5. Pérdida de marcas de histonas en la masa de heterocromatina del cuerpo XY.....	115
10.2.6. Disociación de la heterocromatina del cuerpo XY.....	115
10.2.7. Formación anormal del cuerpo XY	117
10.2.8. Modelo de la heterocromatina del cuerpo XY.....	118
11. Discusión y conclusiones	121
11.1. La estructura cromatínica de secuencias genómicas particulares, permite el anclaje de los cromosomas al complejo sinaptonémico.....	122
11.2. Componentes estructurales del cuerpo XY y su papel en su formación y/o estructura.....	123
12. Perspectivas.....	126
13. Referencias.....	128
14. Apéndice 1: Protocolos.....	136
14.1. Disgregación de células de testículo de rata.....	136
14.2. ChIP (Inmunoprecipitación de cromatina).....	137
14.2.1 Para ensayos de ReChIP.....	141
14.3. Clonación y secuenciación de ADN.....	142
14.3.1. Ligación en vector de clonación pGEM-11zf-.....	143
14.3.2. Transformar ligación en células competentes DH5 α	143
14.3.3. Cuando la Mung Bean es de Invitrogen.....	144
14.3.4. Clonación en el vector pCR-Blunt II-TOPO.....	145
14.3.5. Transformación de vector en células competentes TOP10.....	145
14.4. Análisis de restricción de colonias positivas.....	145
14.4.1. Análisis de restricción por mini-preparaciones (Miniprep, método lisis alcalina).....	145
14.4.2. Digestión enzimática de plásmidos.....	147
14.4.3. PCR de colonia.....	147
14.5. PCRs radioactivas.....	148
14.6. Extracción de ADN genómico de rata a partir de un tejido.....	150
14.7. Producción de sondas para hibridaciones <i>in situ</i>	151

14.7.1. Sondas de ADN por “Nick-Transaltion”	151
14.8. Inmunofluorescencia acoplada a hibridación <i>in situ</i>	
para ADN (Inmuno-FISH ADN).....	153
14.8.1. Inmunolocalización (SYCP3).....	153
14.8.2. Fijación de la Inmunolocalización.....	153
14.8.3. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	154
14.8.3.1. Hibridación, variante 1.....	154
14.8.3.2. Hibridación, variante 2.....	155
14.8.3. Rondas de amplificación con	
el sistema “TSA Biotin System”.....	155
14.8.4. Detección fluorescente.....	156
14.9. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente de ARNs totales	
usando una sonda de ADN (ADN-ARN FISH).....	157
14.10. Sonda de ARN por transcripción <i>in vitro</i>	159
14.11. Hibridación ARN-ARN.....	161
14.12. TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling)	
para determinar muerte celular por Apoptosis.....	164
14.13. Producción y purificación de anticuerpos.....	165
14.13.1. Purificación de anticuerpos.....	166
14.13.2. Producción del cDNA de interés.....	166
14.13.3. Transformación de cDNA y producción de proteína.....	167
14.13.4. Purificación de proteínas.....	167
14.13.5. Precipitación de la proteína.....	169
14.13.6. Unión de la proteína a la	
columna de alta afinidad “HiTrap”.....	170
14.13.7. Purificación del anticuerpo.....	171
14.13.8. Diálisis del anticuerpo.....	171
14.14. Fijación e inclusión en parafina.....	172
15. Apéndice 2: Secuencias inmunoprecipitadas.....	174
16. Apéndice 3: Publicaciones.....	196

1. Resumen

La meiosis es el proceso celular y molecular que dió origen a la reproducción sexual, la cual presenta ventaja al producir variabilidad genética y ha sido adoptada por la gran mayoría de las plantas y animales, incluso muchos organismos procariontes y eucariontes unicelulares poseen la capacidad de reproducirse sexualmente. Durante la meiosis I se recombina el material genético y se separan los cromosomas homólogos mientras las cromátidas hermanas aún permanecen unidas, segregando así las muchas combinaciones de genes. Los eventos de apareamiento y recombinación de los cromosomas homólogos son mediados por el complejo sinaptonémico (CS) y se llevan a cabo durante una extensa profase I, la cual se divide en cinco etapas con base en la estructura de los cromosomas (leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis) (Alberts et al., 1996; Cooper, 2000). Sin embargo, en los mamíferos el género de los organismos se determina por los cromosomas sexuales X-Y que son heterólogos, los cuales durante la profase meiótica se heterocromatinizan y forman el cuerpo XY (Solari, 1974). En este trabajo empleamos técnicas de biología celular (como inmunofluorescencia, hibridaciones *in situ*, entre otras) y molecular (inmunoprecipitaciones de cromatina, PCR dúplex radioactivas, entre otras) para estudiar algunos de los aspectos moleculares y morfológicos del CS y del cuerpo, dos estructuras que son cruciales para la recombinación y la variabilidad genética, utilizando como modelo la meiosis de ratas machos.

De esta forma, encontramos que los cromosomas meióticos se anclan al CS mediante secuencias de ADN características, las cuales hemos denominado LEARS (Lateral Element Associated Repeat Sequences), dichas LEARS corresponden a secuencias de ADN del tipo de las repetidas; también encontramos que la incorporación de estas secuencias depende de la estructura de su cromatina, la cual se asocia a ciertas modificaciones post-traduccionales de las histonas (modificaciones epigenéticas). Esta estructura en la cromatina de las LEARS es importante para la incorporación de las secuencias de ADN al elemento lateral (EL) del CS, esto lo demostramos al inhibir parcialmente algunas de las modificaciones epigenéticas durante etapas iniciales de la profase meiótica I en espermatoцитos de rata.

Por otra parte hemos detallado la presencia de ARNs en el cuerpo XY y mediante la inhibición parcial de la formación de heterocromatina, también determinamos que la heterocromatinización de los cromosomas sexuales es importante para la formación, estructura del cuerpo XY y para evitar recombinaciones heterólogas entre ambos cromosomas sexuales no homólogos. Con estos resultados proponemos dos modelos de la estructura tanto del CS como del cuerpo XY.

2. Abstract

Meiosis is the cellular and molecular process that has given rise to the sexual reproduction, which produces variability and therefore advantages. It has been adopted by most of the plants and animals, even by prokaryotes and eukaryotes unicellular organisms. As the germinal cells, with their duplicated DNA, enter to meiosis I, the homologous chromosomes recognize, align, pair and exchange genetic material during an extensive meiotic prophase I. In mammals, the pairing and genetic exchange of homologous chromosomes is mediated by the synaptonemal complex (SC) (Alberts et al., 1996; Cooper, 2000). In male mammals, the gender is determined by the heterologous X-Y chromosomes that undergo a heterochromatinization process, forming the XY body, during the meiotic prophase I (Solari, 1974). In this work, by cellular (immunofluorescence, *in situ* hybridization) and molecular approaches (chromatin immunoprecipitation, radioactive duplex PCR), we have addressed some morphologic and molecular aspects of the SC and the XY body, two specific meiotic structures that are critical for genetic exchange and variability of the organisms.

Our results demonstrate that meiotic chromosomes anchor to the SC by specific repetitive DNA sequences, which we have called LEARS (Lateral Element Associated Repeat Sequences). Furthermore, we have showed that recruitment of these LEARS to the SC, depends on their chromatin structure that is due to histone post-translational modifications, during the meiotic prophase I in rat spermatocytes cells.

In addition, we have corroborated the RNA presence in the XY body, whereas the RNA Xist is absence. Most relevant, we found that the heterochromatin of the XY body is needed for its formation and structure and perhaps to avoid unspecific and heterologous genetic exchange. With these results in mind, we propose two models of either the SC and the XY body, attempting to understand the mechanisms of formation and/or structure of these critical structures of male mammalian meiotic prophase I

3. Abreviaturas

- μ l: microlitros
- **AAs**: Asociaciones interaxiales
- **ADN**: Ácido desoxiribonucleico
- **ARN**: Ácido ribonucleico
- **ARN *Tsix***: ARN antisentido del ARN *Xist*
- **ARN *Xist***: ARN derivado del gen *XIST*
- **BLAST**: Basic Local Alignment Search Tool
- **BLASTN**: Basic Local Alignment Search Tool for Nucleic acids
- **BLAT**: Basic Local Alignment Tool
- **CES**: Ciclo del epitelio seminífero
- **ChIP (Chromatin immunoprecipitation)**: Inmunoprecipitación de cromatina
- **ChIP-ReChIP**: Doble inmunoprecipitación de cromatina
- **CS**: Complejo sinaptonémico
- **DAPI**: 4',6-diamidino-2-phenylindole
- **DEPC**: Dietil-pirocarbonato
- **dHJ**: Uniones dobles de Holliday
- **DMSO**: Dimetil sulfoxido
- **DSB**: Doble rompimiento de cadena
- **EL**: Elemento lateral
- **ELs**: Elementos laterales
- **eN**: Envoltura nuclear
- **ENs**: Nódulos de recombinación tempranos
- **FITC**: Fluoresceína
- **H2AX γ** : Histona H2AX fosforilada
- **H3ac**: Histona H3 acetilada
- **H3K27me1**: Mono-metilación de la lisina 27 de la histona H3
- **H3K27me2**: Di-metilación de la lisina 27 de la histona H3
- **H3K27me3**: Tri-metilación de la lisina 27 de la histona H3
- **H3K9me1**: Mono-metilación de la lisina 9 de la histona H3
- **H3K9me2**: Di-metilación de la lisina 9 de la histona H3
- **H3K9me3**: Tri-metilación de la lisina 9 de la histona H3
- **H4K20me1**: Mono-metilación de la lisina 20 de la histona H4
- **H4K20me2**: Di-metilación de la lisina 20 de la histona H4

- **H4K20me3**: Tri-metilación de la lisina 20 de la histona H4
- **HDACs**: Desacetilasas de histonas
- **HISU**: Hibridaciones *in situ* ultraestructurales
- **InmunoFISH**: Inmunolocalización acoplada a hibridación *in situ* fluorescente
- **IPs**: Inmuprecipitaciones
- **LEARS (Lateral Element Associated Repeat Sequences)**: Secuencias repetidas de asociación a los elementos laterales
- **LINE**: Long interspersed nuclear elements
- **LNs**: Nódulos de recombinación tardíos
- **LTR**: Long Terminal repeats
- **min**: minutos
- **mM**: milimolar
- **MSCI (Meiotic Sex Chromosomes Inactivation)**: Inactivación de los cromosomas sexuales meióticos
- **MSUD (Meiotic Sileced Unpaired DNA)**: ADN no apareado silenciado meióticamente
- **NI**: Nucleolo
- **nm**: nanómetros
- **NRs**: Nódulos de recombinación
- **O/N (Over Night)**: Toda la noche
- **pA**: Placa de adhesión
- **PAR**: Región pseudoautosómica
- **pb**: pares de base
- **PBS (Phosphate buffered saline)**: Solución salina amortiguadora fosfatada
- **PCR (Polymerase chain reaction)**: Reacción en cadena de la polimerasa
- **pmol**: picomoles
- **RB**: Ricardo Benavente
- **RC**: Región central
- **RNA pol II**: RNA polimerasa II
- **RNA-FISH**: Hibridación *in situ* fluorescente de ARNs
- **RNPs**: Ribonucleoproteínas
- **RT-PCR (Reverse transcriptasa coupled to Polymerase chain reaction)**: Reverso-transcriptasa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa
- **ScRNA**: Small cytoplasmic RNA repeat DNA sequence

- **SEIs**: Invasiones de extremos sencillos de ADN
- **SFB**: Suero fetal bovino
- **SINE**: Short interdispersed nuclear elements
- **siRNA**: ARN de interferencia
- **TA**: Temperatura ambiente
- **TE**: Solución Tris-EDTA
- **TJ**: Thomas Jenuwein
- **TSA**: Tricostatina-A
- **TUNEL**: terminal dUTP nick-end labeling
- **TXR**: Rojo texas
- **VT**: Volumen total
- **XIST**: X-inactivation specific transcript

4. Introducción

Desde el comienzo del universo hasta la era contemporánea, sólo el origen de la vida y de la variabilidad genética, han definido a la vida como se concibe actualmente. El origen y evolución de la reproducción sexual son un tema de gran importancia en la biología contemporánea, siendo la **meiosis** el proceso celular y molecular que dió origen a la reproducción sexual, la cual presenta ventaja al producir variabilidad genética y ha sido adoptada por la mayoría de las plantas y animales, incluso muchos organismos procariontes y eucariontes unicelulares han desarrollado la capacidad de reproducirse sexualmente (Alberts et al., 1996).

4.1. Reproducción sexual

La reproducción sexual ha sido favorecida por la evolución, debido a que la recombinación azarosa de información genética mejora las probabilidades de producir al menos una descendencia que sobrevivirá a un ambiente variable impredecible. El ciclo reproductivo sexual implica una alternancia de estadios haploide y diploide. Mediante el proceso de meiosis las células diploides se dividen originando células haploides, después un par de células haploides de dos individuos se fusionan para fertilizarse originando así nuevas células diploides. Durante el proceso, los genomas de las células haploides recombinan para producir individuos que heredan nuevas combinatorias de genes. Durante el ciclo de vida en plantas y animales superiores, la mayoría del tiempo transcurre en la fase diploide; sólo una pequeña porción de las células diploides (aquellas en la línea germinal) sufren meiosis para producir células haploides (los gametos sexuales) y la fase haploide es muy breve (Alberts et al., 2002).

4.1.1. Gametogénesis

Los gametos, originados por el proceso de división meiótica, se conocen como espermatozoides y ovogonias dependiendo el género del organismo. Dichos gametos se unen y forman un nuevo organismo, el cual ha completado su juego cromosómico diploide por la aportación equilibrada de cromosomas de cada uno de los gametos. En organismos que producen espermatozoides, las células germinales entran en un proceso de espermatogénesis, durante el cual

se dividen por meiosis y después se diferencian por un proceso de espermiogénesis. Estos procesos se llevan a cabo en órganos altamente especializados de los organismos, en los mamíferos se conocen como testículos.

4.1.2. Espermatogénesis

Las paredes del túbulo seminífero en el testículo contienen a las células germinales inmaduras, denominadas espermatogonias, que descansan sobre el borde de los túbulos seminíferos junto a la membrana basal, son células diploides que proliferan por medio de una mitosis ordinaria. Cada espermatogonia incrementa su tamaño y se diferencia en espermatocito primario, el cual sufre la primera división meiótica produciendo espermatocitos secundarios, los dos espermatocitos secundarios sufren la segunda división meiótica originando cuatro espermátidas, cada una conteniendo un número haploide de cromosomas. Una espermátida puede contener todos los cromosomas que heredó de su madre o aquellos que fueron heredados de su padre o la combinación de ambos. Sin más divisiones las espermátidas son transformadas en espermatozoides maduros (Alberts et al., 1996).

4.1.3. Ciclos y ondas espermatogénicas

La espermatogénesis comienza en una célula del tallo germinal o espermatogonia del tipo A, que proporciona el punto de partida de una serie espermatogénica. La cinética de la espermatogénesis se caracteriza por tres fenómenos notables: 1) en cualquier segmento dado el túbulo seminífero, las células del tallo germinal inician una serie de divisiones mitóticas que preceden a la meiosis en intervalos extremadamente regulares (en la rata este intervalo es de 12 días, en el ratón de 8.6 días), 2) una vez que las células del tallo germinal han iniciado el proceso de multiplicación y diferenciación, cada paso de la espermatogénesis tiene una duración fija y constante; 3) en cualquier área del epitelio seminífero, antes de que la producción haya logrado la formación de los espermatozoides, varias series nuevas de células del tallo germinal inician su desarrollo que transcurre simultáneamente (Austin y Short, 1982).

Estos tres factores explican la alineación típica de las células germinales a lo largo del epitelio seminífero, en la mayoría de los mamíferos, exceptuando al hombre. El epitelio seminífero está compuesto por capas concéntricas de células germinales que se encuentran en fases de desarrollo progresivamente más avanzadas partiendo desde la periferia hacia el centro del túbulo. Cada capa está compuesta por células que se encuentran exactamente en la misma fase, y las diferentes generaciones celulares o fases de desarrollo están relacionadas entre sí en un orden constante y bien definido. Por lo tanto, cada capa constituye una generación de células germinales que se desarrollan sincrónicamente y en una correlación fija con las otras generaciones. En la rata, por ejemplo, las espermátidas maduras (las que se encuentran en el paso 19 de la espermiogénesis), que se localizan en el centro del túbulo, siempre se encuentran con los espermatoцитos primarios a la mitad del paquiteno, con espermatoцитos en el pre-leptoteno y con espermatogonios tipo A, en las diferentes capas (Austin y Short, 1982).

4.2. Meiosis

Las primeras observaciones de que los gametos sexuales son haploides, fueron hechas casi al mismo tiempo que se sugería que los cromosomas son los responsables de contener la información genética de los organismos. En 1883, se observó que mientras los huevos fertilizados de los gusanos redondos tenían cuatro cromosomas, el núcleo del huevo y los espermatozoides sólo contenían dos cromosomas. Por lo tanto, la teoría cromosómica de la herencia explicaba la paradoja de que el fenotipo de la progenie es aportado por contribuciones similares entre el genoma materno y paterno, a pesar de la enorme diferencia de tamaños entre el ovocito y el espermatozoide (Alberts et al., 2002). La observación también implicaba que las células germinales deberían ser formadas por un tipo especial de división nuclear, en la cual los cromosomas fueran precisamente divididos en dos. Este tipo de división es llamado meiosis, palabra de origen griego que denota disminución. El comportamiento de los cromosomas durante la meiosis resultó más complicado de lo esperado. Fue hasta 1930 y como resultado de la aplicación de técnicas citológicas y estudios de genética que se establecieron los eventos esenciales de la meiosis (Alberts et al., 2002). Actualmente, con herramientas como la

biología molecular, la bioinformática y la biología celular se están estudiando las interacciones moleculares finas que regulan la correcta progresión de la meiosis.

4.2.1. Apareamiento de cromosomas homólogos, evento característico de la meiosis

El juego de cromosomas de un organismo con reproducción sexual consiste de autosomas, los cuales son comunes para todos los miembros de la especie y los cromosomas sexuales, los cuales están diferencialmente segregados de acuerdo al sexo del individuo. Un núcleo diploide contiene dos versiones muy similares de cada cromosoma. Por cada par cromosómico autosómico, uno corresponde al cromosoma paterno mientras que el otro al materno. Las dos versiones son muy similares pero no idénticas en secuencia de ADN y se conocen como cromosomas homólogos.

Una vez que los cromosomas se duplican, las copias idénticas se mantienen unidas a lo largo de toda la longitud del cromosoma y se conocen como cromátidas hermanas. En el proceso de mitosis, las cromátidas hermanas se alinean al ecuador del huso mitótico y con sus cinetocoros apuntando hacia polos opuestos, para que en la etapa de anafase las cromátidas hermanas se separen, entonces cada célula hija hereda la misma carga genética de la célula progenitora (Figura 1; Alberts et al., 2002).

En la meiosis este proceso difiere de tal forma que los cromosomas reconocen a su homólogo y se aparean permitiendo el intercambio de material genético. En la primera división meiótica, los cromosomas homólogos se separan y se origina una célula haploide con dos copias de cada cromosoma, pero con los cromosomas homólogos segregados. Es hasta la segunda división meiótica que las cromátidas hermanas se separan y generan células haploides con una copia de cada cromosoma (Figura 1). Estas células son conocidas como células sexuales o gametos, que mediante la fusión con otro gameto de diferente género producen un nuevo organismo diploide, nuevamente con un juego de cromosomas homólogos, cada uno proveniente de los progenitores.

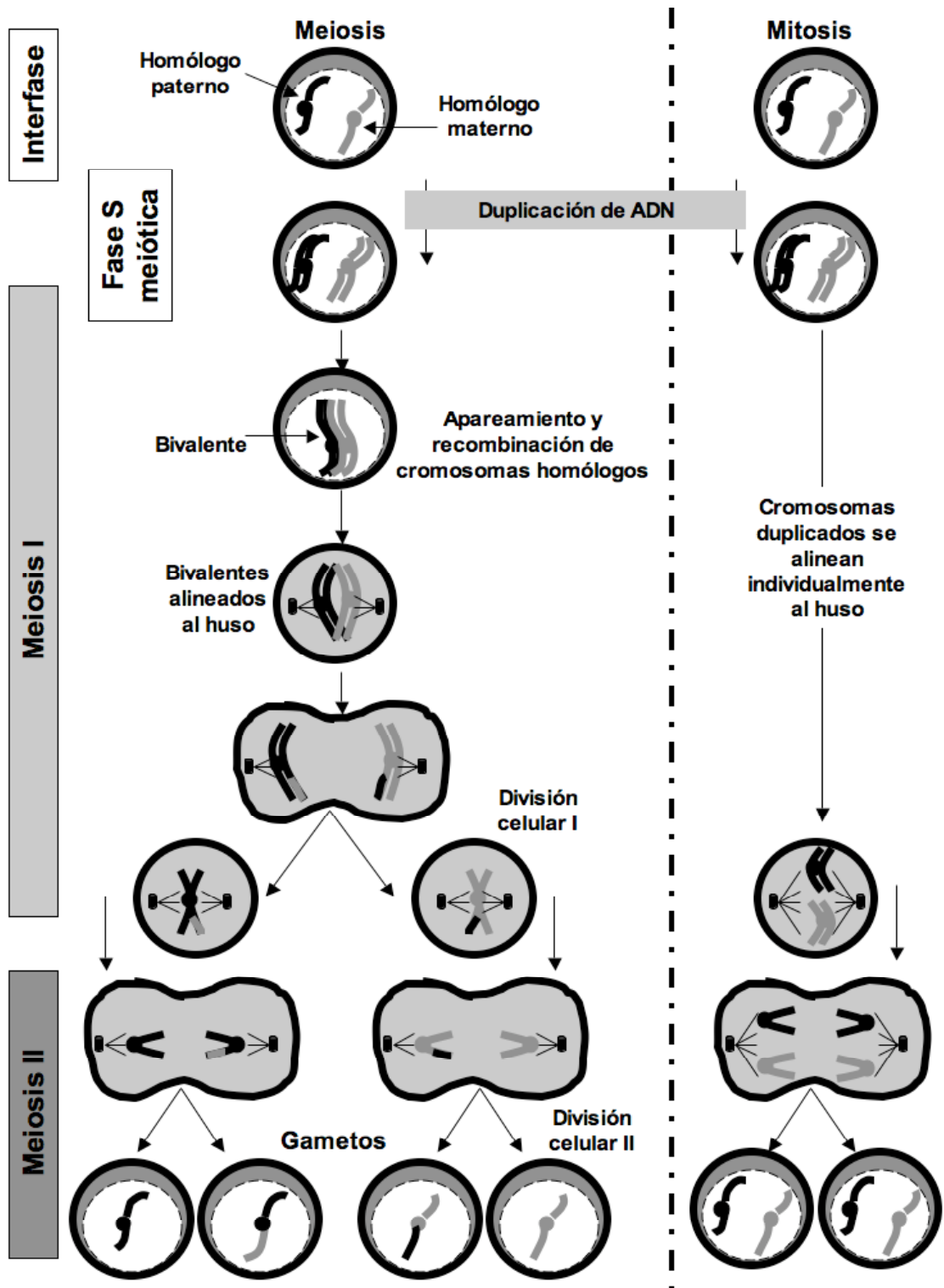


Figura 1: Comparación entre la división meiótica y mitótica. EL ADN de los cromosomas se duplica durante una fase S. En la meiosis, después de la duplicación del ADN, se requiere de dos divisiones celulares para dar origen a los gametos haploides. Por lo tanto, cada célula diploide que entra a la meiosis produce cuatro células haploides diferentes genéticamente, mientras que cada célula diploide que se divide por mitosis produce dos células diploides genéticamente idénticas.

Previo al apareamiento de los cromosomas homólogos, cada cromosoma de la célula diploide, se duplica para producir dos cromátidas hermanas, al igual que en una división mitótica. Se ha propuesto que sólo hasta después de la duplicación del ADN aparecen las características especiales de la meiosis (Alberts et al., 2002). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que dichas características especiales, aparecen incluso antes de la duplicación del ADN, ya que se han observado características estructurales en los núcleos de células antes de que su ADN se duplique. Dichas características estructurales sugieren el reconocimiento de homología a larga distancia entre los cromosomas homólogos (Hernández-Hernández et al., 2008b). Posteriormente, cada cromosoma duplicado se aparea con su homólogo también duplicado, formando una estructura llamada bivalente, la cual contiene a las cuatro cromátidas hermanas (Figura 1). El apareamiento ocurre durante una extensa profase meiótica I que puede variar desde unos días hasta algunos años.

4.2.2. Los gametos se producen por dos divisiones celulares meióticas

La meiosis, a diferencia de la mitosis, se produce por dos divisiones meióticas consecutivas. Durante la primera división meiótica, no se producen células con una carga haploide de ADN. Debido a que las cromátidas hermanas se comportan como una unidad, cada célula hija de esta división hereda dos copias de uno de los dos cromosomas homólogos. Las dos copias son idénticas, excepto donde se llevó a cabo la recombinación meiótica; por lo tanto, las dos células hijas contienen un número haploide de cromosomas pero una carga diploide de ADN. Consecuentemente, estas células generadas son diferentes de células diploides normales en dos puntos: primero, las dos copias de ADN de cada cromosoma provienen únicamente de uno de los dos cromosomas homólogos en la célula progenitora (excepto por los puntos intercambiados por recombinación genética). Segundo, estas dos copias de ADN se heredan como cromátidas hermanas unidas (Figura 1).

Durante la segunda división meiótica se forma el núcleo gamético. Los cromosomas duplicados se alinean a un segundo huso mitótico y las cromátidas hermanas se separan para producir células con un contenido

haploide de ADN. Por lo tanto, la meiosis consiste en una fase de duplicación de ADN, seguida por dos divisiones celulares. Cada célula que entra a meiosis produce cuatro células haploides que han recombinado material genético entre los cromosomas homólogos (Figura 1; Kleckner, 1996; Alberts et al., 2002).

Algunas veces, durante la meiosis, ocurren problemas de segregación de los cromosomas en las cuatro células haploides en un fenómeno conocido como no disyunción. En estas divisiones meióticas anormales, algunas de las células haploides producidas, carecen de un cromosoma, mientras que otras tienen más de una copia. Los gametos resultantes forman embriones anormales, la mayoría de los cuales mueren. Sin embargo, algunos sobreviven, por ejemplo en humanos el *síndrome de Down* es causado por una copia adicional del cromosoma 21, resultando de la no disyunción durante la división meiótica I o II. La gran mayoría de dichos errores de segregación ocurren durante la meiosis en hembras y la tasa de error incrementa con la edad avanzada materna (Alberts et al., 2002).

4.2.3. El apareamiento y recombinación de los cromosomas homólogos ocurre durante una extensa profase meiótica I

Durante la profase meiótica ocurren una serie de eventos como son el apareamiento de los cromosomas homólogos duplicados, se inicia la recombinación genética entre cromátidas homólogas, no hermanas y cada par de homólogos duplicados se ensamblan en un andamiaje proteico conocido como el **complejo sinaptonémico (CS)**. En algunos organismos la recombinación genética comienza antes del ensamblaje del CS y es requerida para su correcta formación. Sin embargo, en otros organismos el CS se puede formar en ausencia de recombinación (Page y Hawley, 2004), pero en todos los organismos el proceso de recombinación se completa mientras el ADN está asociado al CS (Alberts et al., 2002).

La profase meiótica I se divide en cinco etapas secuenciales: leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis, las cuales se definen por los cambios morfológicos asociados con el ensamblaje (sinapsis) y desensamblaje del CS (Figura 2). En este contexto, la profase meiótica se inicia en el

leptoteno, cuando los cromosomas homólogos duplicados y apareados se empiezan a condensar. En el zigoteno se comienza a formar el CS entre los dos juegos de cromátidas hermanas en cada bivalente. El paquiteno inicia cuando la sinapsis se completa, y generalmente persiste por días, hasta que ocurre el desensamblaje en la etapa de diploteno, donde el quiasma de recombinación es observable (Figura 2; Zicker, 1999; Alberts et al., 2002).

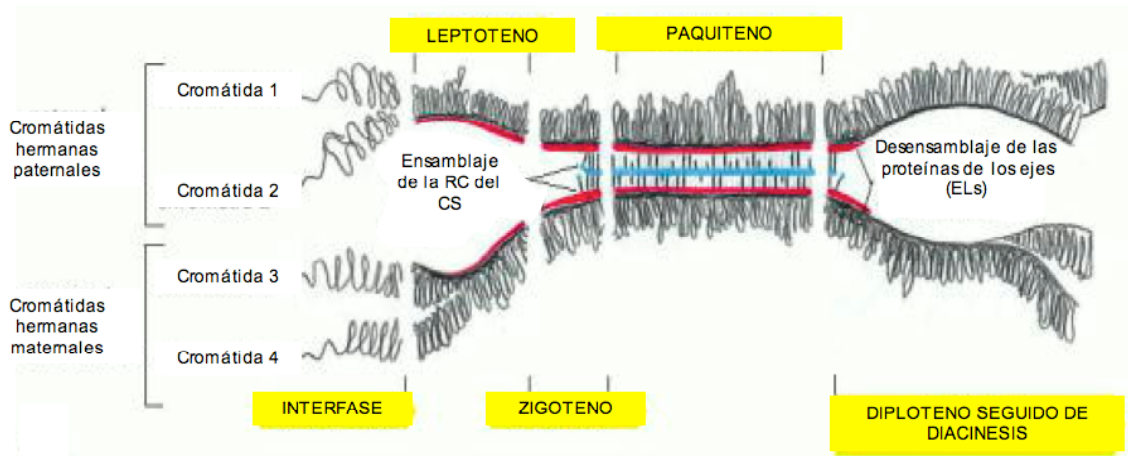


Figura 2: Ensamblaje y desensamblaje de los cromosomas homólogos en el complejo sinaptonémico (CS), durante las diferentes etapas de la profase meiótica I. Los cromosomas homólogos duplicados y alineados con su respectivo homólogo, entran a la primera etapa de la profase meiótica I, el leptoteno, donde empiezan a compactarse y a formar elementos axiales (líneas rojas), para en el zigoteno iniciar el ensamblaje de la región central (RC) entre los dos elementos axiales, formando los elementos laterales (ELs). En la etapa de paquiteno, el CS se ha ensamblado a lo largo de todo el par de homólogos. Al llegar a la etapa de diploteno, la mayoría de las proteínas del CS comienzan a disociarse y el CS se desensambla (Tomado y modificado de Alberts et al., 2002).

4.2.4. La variabilidad genética se produce por el entrecruzamiento entre cromátidas homólogas no hermanas

La variabilidad genética está dada por el genotipo de cada individuo, de esta forma y debido a la recombinación genética durante la meiosis, ningún individuo, incluso concebidos por los mismos progenitores, tiene la misma carga genética. Una de las causas de variabilidad se da por la segregación azarosa de los cromosomas homólogos maternos y paternos entre las células hijas durante la división meiótica I; por lo tanto, cada gameto adquiere una combinatoria diferente de cromosomas maternos y paternos. Sólo este proceso, en principio, resulta en la producción de gametos 2^n genéticamente diferentes, donde “n” es el número haploide de cromosomas. Así en humanos, cada individuo puede producir al menos $2^{23} = 8.4 \times 10^6$ gametos genéticamente

diferentes. Sin embargo, el número verdadero de variantes es mucho mayor que el predicho, debido a una segunda causa de variabilidad, llamada entrecruzamiento cromosómico, que ocurre durante la profase meiótica I y donde fragmentos de cromosomas son intercambiados entre los homólogos. En promedio, en cada par de cromosomas homólogos de humanos, ocurren de dos a tres eventos de entrecruzamiento (Alberts et al., 2002).

4.2.5. La interrelación de los dobles rompimientos de cadena con la sinapsis de los cromosomas homólogos

Durante el entrecruzamiento cromosómico, la doble hélice de ADN se fragmenta, proceso conocido como doble rompimiento de cadena (DSB), tanto en la cromátida materna como en la cromátida homóloga paterna, de tal forma que ocurre el intercambio de fragmentos cromosómicos entre dos cromátidas no hermanas de forma recíproca por un proceso conocido como recombinación genética (Alberts et al., 2002).

En levaduras, la creación de DSBs por la endonucleasa específica de la meiosis Spo11 se requiere para la iniciación de la recombinación y la sinapsis (Giroux et al., 1989; Keeney et al., 1997). En ausencia de la proteína funcional Spo11, la sinapsis puede ser restaurada si los DSBs son inducidos por otros mecanismos, como se ha demostrado en organismos de *Coprinus* y ratones mutantes para la proteína Spo11 (Celerin et al., 2000; Romanienko y Camerini-Otero, 2000). Se ha sugerido que la consecuente reparación de los DSB se requiere para la correcta sinapsis de los homólogos (Zickler y Kleckner, 1999; Burgess, 2002; Storlazzi et al., 2008). También se ha observado que el reconocimiento de homología y las secuencias homólogas alineadas no son suficientes para la sinapsis adecuada, ya que las proteínas de las levaduras Hop2p y Mnd1p son requeridas para asegurar la sinapsis entre secuencias homólogas y previenen la recombinación entre cromosomas no homólogos (Tsubouchi y Roeder, 2002).

La sinapsis ocurre normalmente en ausencia de DSBs en *Caenorhabditis elegans* y en hembras de *Drosophila*. En *Caenorhabditis elegans* los cromosomas aún no apareados, entran a la meiosis e

inmediatamente se alinean y se aparean (sinapsis) en ausencia del inicio de la recombinación. Por otra parte, la sinapsis de los cromosomas en hembras de *Drosophila* puede depender de un previo apareamiento somático de los cromosomas. En ambos casos, la sinapsis se produce en ausencia de DSBs, lo cual indica que existen estrategias diferentes para formar el CS. Sin embargo, lo que sucede en estos organismos no es fácilmente distinguible de lo que ocurre en la sinapsis dependiente de los DSBs, a pesar de usar diversos mecanismos para producir la sinapsis de los homólogos, el ensamblado y la estructura del CS (Page y Hawley, 2004).

En la sinapsis dependiente de los DSBs, la formación del CS se inicia en las asociaciones interaxiales (AAs) que corresponden a los sitios en los cuales la producción de DSBs se ha comprometido con un proceso de reparación del ADN que resulta en la producción de entrecruzamientos recíprocos. Estos sitios se pueden observar citológicamente en la etapa de zigoteno temprano como núdulos de recombinación tempranos, en diferentes organismos (Page y Hawley, 2004).

4.2.6. Los núdulos de recombinación

Los núdulos de recombinación (NRs) fueron originalmente identificados como estructuras ovoides altamente contrastadas asociadas con el CS (Carpenter, 1975). Investigaciones posteriores, identificaron dos tipos de núdulos de recombinación, núdulos tempranos y núdulos tardíos. Los núdulos tempranos (ENs) son esféricos de 100 nm de diámetro o estructuras elípticas asociadas con los elementos axiales en leptoteno temprano y al CS en el paquiteno medio. Los núdulos tardíos (LNs) son variables en forma y aparecen durante el paquiteno y en menor número que los ENs (Zickler y Kleckner, 1999; Moens et al., 2002). El tiempo y la localización de la aparición de los ENs durante la meiosis, han sugerido que están involucrados en las interacciones de recombinación temprana, posiblemente en el apareamiento de cromosomas homólogos (Page y Hawley, 2004). Las comparaciones citológicas y genéticas establecen una fuerte correlación entre los LNs y los entrecruzamientos o quiasmas (Carpenter, 1975; Zickler y Kleckner, 1999).

En efecto, muchas evidencias sugieren que los LNs marcan los sitios de aquellos DSBs que serán madurados en eventos de entrecruzamiento. Primero, el número y distribución de los LNs son similares al número y distribución de los entrecruzamientos observados genéticamente tanto en meiosis de tipo silvestre como en meiosis en la cual el nivel o la distribución de intercambios ha sido perturbada. Segundo, estudios diversos en levaduras sugieren que el grupo de proteínas involucradas específicamente en el proceso de maduración del entrecruzamiento (pero no en la conversión génica), nombradas Zip1p, Zip2p, Zip3p, Msh4p y Msh5p, son componentes de los LNs (Fung et al., 2004). De la misma forma, se ha demostrado que la proteína MLH1 es un componente de los LNs de mamíferos (Moens et al., 2002). Tercero, los LNs en levaduras presentan interferencia, como ocurre en los entrecruzamientos meióticos (Fung et al., 2004). Por lo tanto, la reparación de los DSB se observa como ENs y algunos de estos EN maduran hacia LNs que se observa como quiasmas de recombinación entre cromosomas homólogos apareados por el CS. El mecanismo para seleccionar y madurar los EN hacia LN, es aún desconocido. Debido a la participación de maquinaria de reparación sobre los DSB podría sugerirse alguna de estas proteínas de reparación como responsables de marcar a los EN que maduraran a LN. Otras evidencias sugieren que son las proteínas de la RC del CS las que reconocen los EN y los marcan para que estos maduren a LN en el contexto del CS maduro. La ausencia de la proteína TEX12, específica de la RC del CS, evita la presencia de LNs pero no de ENs (Hamer et al., 2008); por lo tanto, esta proteína podría ser la que marca los ENs y convertirlos en LNs. Sin embargo, se necesitan más estudios para elucidar el mecanismo molecular de esta relaciones.

Los quiasmas, que son expresiones citológicas de la recombinación recíproca, sólo son visibles hasta después de que se han efectuado dichas recombinaciones. Una expresión morfológica más cercana, cronológicamente, son los nódulos de recombinación tardíos. El número de nódulos tardíos por núcleo de espermatozoides humano es en promedio de 45, muy parecido al número de quiasmas. La distribución de estos nódulos a lo largo de cada bivalente humano presenta una similitud significativa con la distribución de los quiasmas en los respectivos bivalentes, con una muy baja frecuencia cerca de

los centrómeros y una frecuencia elevada en las regiones terminales (cercanas a los telómeros). Se ha comprobado que sobre los nódulos de recombinación se localiza, preferencialmente un tipo de síntesis reparativa del ADN, específica para la etapa de paquiteno. Los nódulos de recombinación tardía son la expresión morfológica de un complejo de proteínas, concentrado en la región donde ocurre un fenómeno de recombinación genética (Solari, 1999).

El CS maduro está involucrado en la maduración de los intermediarios de la recombinación para los eventos de entrecruzamiento. La maduración de las invasiones de extremos sencillos (SEIs) hacia las uniones dobles de Holliday (dHJ) ocurre en el contexto del CS (durante el paquiteno) y la maduración final de las dHJ hacia entrecruzamientos ocurre al final del paquiteno, relacionado a la disociación del CS. Por lo tanto, el CS funciona como estabilizador del apareamiento meiótico (Page y Hawley, 2004). Aunque el CS es reconocido como una característica universal de la meiosis, este está ausente en la meiosis de varios organismos, incluyendo: *S. Pombe*, *A. nidulans* y machos de *D. melanogaster* (Page y Hawley, 2004).

4.2.7. El quiasma de recombinación es importante para la segregación de los cromosomas homólogos durante la meiosis

En la mayoría de los organismos, el entrecruzamiento cromosómico es crucial para la correcta segregación de los dos cromosomas homólogos duplicados en las células hijas. Dicho entrecruzamiento, produce un quiasma de recombinación, el cual mantiene unidos a los homólogos paternos y maternos hasta que son separados en la anafase I por el huso mitótico. Antes de la anafase I, los dos polos del huso mitótico, tiran de los homólogos duplicados en direcciones opuestas. El quiasma resiste esta fuerza mecánica. En organismos mutantes, que tienen una baja frecuencia de entrecruzamiento meiótico entre homólogos, algunos de los pares de cromosomas carecen de quiasma, lo cual produce alteraciones en su segregación y por lo tanto, las células hijas tienen o muchos o pocos cromosomas homólogos. En la división meiótica II, al igual que en una división mitótica, los cinetocoros de cada cromátida hermana están anclados a los microtúbulos del cinetocoro, orientados en sentidos opuestos, de tal forma que las cromátidas son segregadas en diferentes células hijas

durante la anafase (Figura 1). Por lo contrario, en la división meiótica I los cinetocoros en ambas cromátidas hermanas se comportan como una unidad funcional, la cual se encuentra orientada hacia la misma dirección, de forma que las cromátidas hermanas permanecen juntas al tiempo que los cromosomas homólogos se separan (Alberts et al., 2002).

4.2.8. El apareamiento de cromosomas sexuales asegura su segregación

Los cromosomas homólogos se aparean y forman un quiasma de recombinación que permite que se segreguen correctamente durante la primera división meiótica. Sin embargo, los cromosomas sexuales no son homólogos cuando el organismo es X-Y. En los mamíferos, las hembras tienen dos cromosomas homólogos X, los cuales se aparean y segregan como el resto de los cromosomas homólogos. Pero los machos tienen un cromosoma X y un Y, que no son homólogos. Aún así, estos cromosomas heterólogos se deben de aparear y entrecruzar material genético para su correcta segregación. Los entrecruzamientos son posibles debido a una pequeña región de homología entre los cromosomas X-Y, ubicada en uno de los extremos de los cromosomas y conocida como región pseudoautosómica (PAR) (Solari, 1999; Alberts et al., 2002). Los dos cromosomas se aparean y recombinan en esta zona durante la profase meiótica I. El quiasma resultante de esta recombinación mantiene unidos al X e Y en el huso mitótico, de esta forma se segregan correctamente y sólo se producen dos tipos de espermatozoides: espermatozoides que contienen un cromosoma Y los cuales dan origen a embriones de sexo masculino y espermatozoides que contienen al cromosoma X que dan origen a embriones del sexo femenino (Alberts et al., 2002). Como se ha mencionado anteriormente, sólo la PAR es la región homóloga entre los cromosomas X e Y, sin embargo el resto no homólogo de los cromosomas sufre un proceso de heterocromatinización; por lo cual, a diferencia del resto de los homólogos, estos cromosomas forman un masa de heterocromatina facultativa, conocida como el **cuerpo XY**.

Así, durante la división meiótica de una célula, los cromosomas homólogos se reconocen, alinean y aparean mediante el CS, mientras que los cromosomas sexuales heterólogos se reconocen, se alinean pero no realizan

sinapsis, a excepción de la región PAR, formando el cuerpo XY. Por lo tanto, el estudio de los mecanismos de reconocimiento de homología, alineamiento y sinapsis se pueden estudiar en dos estructuras distintas pero producidas por los mismos mecanismos.

4.3. Complejo sinaptonémico

4.3.1. Una estructura específica de la meiosis

El CS fue descubierto en la década de los 50s por Moses (1956) y Fawcett (1956). Esta estructura se encuentra ampliamente conservada a lo largo de la evolución, siendo un componente estrictamente meiótico. El CS mantiene una estructura tripartita, con sus componentes en forma de cintas que se constituyen entre los cromosomas homólogos durante la profase meiótica I (Figura 3; Moses, 1968; Wettstein y Sotelo, 1971; Westergaard y von Wettstein, 1972; von Wettstein et al., 1984). El CS es un pre-requisito para el entrecruzamiento recíproco (crossing over) y por lo tanto asegura indirectamente la disyunción correcta de los cromosomas homólogos.

El CS se forma por el alineamiento paralelo o sinapsis de los elementos axiales de los cromosomas homólogos. La primera manifestación de sinapsis entre los cromosomas homólogos es la conformación de un espacio de exclusión, posteriormente este espacio es ocupado por filamentos transversales entre los ejes que aún se encuentran a una distancia de 300 nm, tres veces mayor que la distancia final. Esto sucede en uno o más lugares a lo largo del eje y en la cercanía a la envoltura nuclear (Moens et al., 1998). El ancho del complejo es de 210 nm, con dos elementos laterales (ELs) de aproximadamente 60 nm de grosor y una región central (RC) de alrededor de 100 nm (Solari, 1999). Los ELs están constituidos por un material amorfo y muy afín a las tinciones de plata y al ácido fosfotúngstico (pH 5-7), característica que depende de su contenido en proteínas básicas. En algunas especies cada EL puede mostrar componentes lineales, sin embargo esta subdivisión en filamentos (2 o más) no es permanente y, en especial, no se encuentra durante el diploteno ni durante el zigoteno, cuando los ejes están vinculados con los desplazamientos cromosómicos. Los ELs conforman el espacio donde las dos

cromátidas de un cromosoma se asocian y se abren en amplios lazos de cromatina, que se encuentran dispuestos como un halo alrededor de los elementos laterales. Estos elementos laterales están constituidos por proteínas, aunque existe ADN central en la base de los lazos de cromatina (Solari, 1999) y finos filamentos de ADN atravesando la parte medial del EL en forma de asas, los cuales tienen ARN asociado antes de su incorporación al EL (Ortiz et al., 2002).

La RC del CS está constituida por elementos fibrilares de muy pequeño diámetro (1.6-2 nm), los filamentos transversales, los cuales se ha sugerido que corresponden a una estructura formada por dos α -hélices proteínicas entrelazadas. Estos filamentos son rectos e insensibles a la DNasa, pero digeribles por la tripsina, atraviesan el espacio entre el EL y la RC, y por lo menos algunos de ellos se superponen con otros filamentos que provienen del otro EL. En medio del espacio central estas fibrillas se asocian con otro material, de tipo globular, y con filamentos del mismo diámetro pero dispuestos longitudinalmente, que son los que componen la RC (Solari, 1999).

4.3.2. Estructura del complejo sinaptonémico

El CS conserva una estructura muy general a lo largo de la evolución. La morfología básica del CS en un corte longitudinal es la misma para plantas y animales y está formado por tres elementos peptídicos paralelos (Figura 3) (Schmekel y Daneholt, 1995). El espesor del complejo es de 210 nm con dos ELs de aproximadamente 60 nm de ancho y una RC de aproximadamente 100 nm de grosor (Solari, 1999). Los ELs del CS están compuestos por proteínas específicas y por filamentos de ADN en la parte central de los ELs. La RC del CS está formada por elementos fibrilares de diámetro pequeño (1.6-2 nm), en forma de filamentos transversales, los cuales están constituidos por proteínas específicas de la meiosis, como la SYCP1 y sus parálogos en otros organismos (Page y Hawley, 2004), así como de las proteínas SYCE1, SYCE2, TEX11 y TEX12 que se asocian a la RC (Meuwissen et al., 1992; Costa et al., 2005; Hamer et al., 2006; Yang et al., 2008). Mientras que los ELs se componen de proteínas específicas como los son SYCP2, SYCP3 y sus parálogos en otros organismos (Page y Hawley, 2004). Los ELs también contienen componentes

cohesínicos como lo son SMC1, SMC3 y STAG3, los cuales se asocian a la proteína REC8 (Figura 3; Eijpe, 2003).

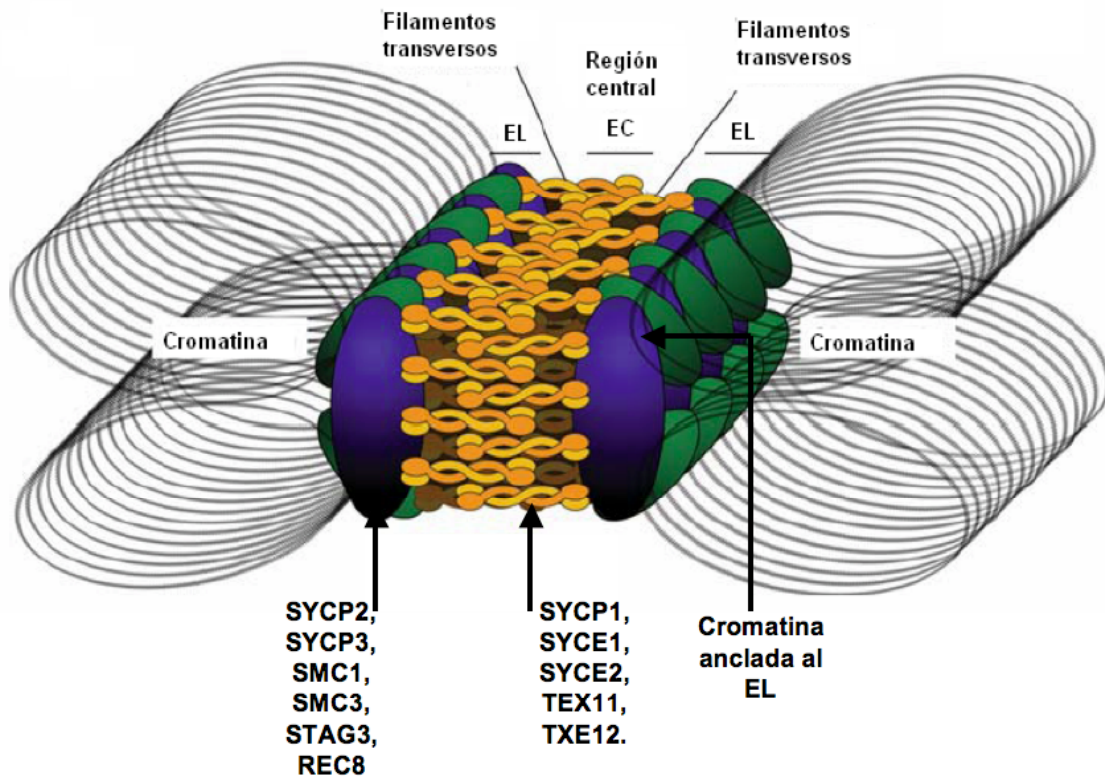


Figura 3: Estructura tripartita del CS, las asas de cromatina se anclan a los ELs mientras que la RC o elemento central (EC) mantienen unidos a los dos ELs. Los ELs están compuestos por proteínas específicas de la meiosis (SYCP2, SYCP3) y por componentes cohesínicos (SMC1, SMC3, STAG3 y REC8), mientras que la región central está compuesta por proteínas específicas de la meiosis (SYCP1, SYCE1, SYCE2, TEX11 y TXE12) (Tomado y modificado de Page y Hawley 2004).

La mayoría de los estudios y por lo tanto la comprensión de la sinapsis y la recombinación provienen de organismos como el gusano *C. elegans*, la mosca *D. melanogaster* y la levadura *S. cerevisiae*. En estos organismos, la identificación de genes involucrados en ciertas etapas de la meiosis se ha facilitado debido al amplio desarrollo de metodologías genéticas y métodos bioquímicos que han permitido definir sus funciones. Una característica notable es la conservación de los motivos estructurales de las proteínas del CS a pesar de la dificultad de identificar su conservación a nivel de genoma o proteína. Lo cual es contrastante con las proteínas de reparación del ADN, las cuales pueden ser reconocidas a nivel de secuencia en una amplia variedad de especies. Sin embargo, los sistemas de estudio en mamíferos presentan

ventajas a pesar de sus altos costos, su lentitud en estudios de genética y la carencia de sistemas de cultivo que permitirían el uso de herramientas como siRNA (RNA de interferencia). Sus genomas y por tanto sus cromosomas son más grandes que los de levaduras y moscas, esto facilita un estudio inmunocitoquímico más eficaz que en muchos otros organismos. La genética en roedores en combinación con estudios citológicos han proporcionado un método efectivo para el estudio de fenotipos meióticos producidos como resultado de mutagénesis dirigida en células madre del embrión (stem cells). Recientemente se está haciendo un esfuerzo por producir ratones mutantes condicionales (condicional knockout) de todos los genes, con el fin de profundizar en el estudio de la meiosis.

Las mutaciones o alteraciones en cualquiera de las proteínas del CS, causan fallas en su formación y/o estructura, indicando la importancia de cada una en la compleja estructura del CS, el cual a su vez, permite el intercambio de material genético entre los cromosomas homólogos durante la división meiótica de las células en la línea germinal. Dichas fallas en la formación y/o estructura del CS son la causa de problemas de infertilidad en los progenitores o enfermedades genéticas en la descendencia. La participación de tantas proteínas en una intrincada y aún no detallada asociación permite la correcta progresión de la meiosis. Por estas razones, se justifica el amplio énfasis que se le ha dado al estudio de la meiosis, no solo en los cromosomas homólogos, sino también en los cromosomas heterólogos, como los son el X y el Y.

4.4. Comportamiento de los cromosomas sexuales durante la meiosis

4.4.1. Meiosis en hembras

En las ovogonias de hembras mamíferos, así como en células somáticas, un cromosoma X sufre inactivación transcripcional y heterocromatinización con fines de compensación de dosis y el segundo cromosoma X permanece activo. Sin embargo, en las células germinales, durante la profase meiótica, la cromatina del cromosoma X se reactiva por lo que, a diferencia de todas las otras células del cuerpo, los ovocitos tienen dos cromosomas X activos transcripcionalmente (Mckee y Handel, 1993; Peters et al., 1997).

4.4.2. Meiosis en machos

El comportamiento de los cromosomas sexuales durante la meiosis se ha estudiado intensamente. En 1891 Henking observó el proceder del cromosoma X, siete años después Lenhossek observó un cuerpo grande y densamente teñido en el núcleo de espermatozoides de mamíferos durante la profase meiótica (paquiteno). Esta estructura recibió diferentes nombres, por ejemplo cuerpo intranuclear por Lenhossek en 1898; nucleolo cromático por Painter en 1924, heterocariosoma por Minouchi en 1928, y vesícula X por Makino en 1941. Fue descrito con detalle en muestras incluidas en parafina y en cortes histológicos de algunas especies de mamíferos (Solari, 1974). Regaud (1910) describió con detalle la evolución de este cuerpo durante la primera profase meiótica en espermatozoides de rata e hizo una clara distinción entre el cuerpo de Lenhossek y el verdadero nucleolo. Posteriormente, Guthertz (1922) describió este cuerpo en espermatozoides de ratón y notó la asociación con el nucleolo (Solari, 1974). Actualmente la estructura del cuerpo XY sigue bajo intenso estudio ya que no se ha podido determinar todos sus componentes proteicos y menos aún su proceso de formación.

4.5. Formación del cuerpo XY durante la profase meiótica I

A pesar de que se ha obtenido mucha información de la interrelación X-Y en la primera metafase meiótica en diferentes mamíferos, hasta el momento existe poca información acerca de la etapa de condensación de los cromosomas X-Y en espermatozoides de mamíferos (Solari, 1974). Un estudio ultraestructural reciente, demuestra que la heterocromatina del cuerpo XY comienza a distinguirse desde la etapa de leptoteno, cuando los ejes cromosómicos a la altura de la PAR, en ambos cromosomas, se encuentran separados a una distancia de aproximadamente 200 nm, por lo cual, se sugiere que la condensación de los cromosomas sexuales comienza después de que se ha reconocido su región homóloga y antes de que se aparee (Hernández-Hernández, 2003).

Los cromosomas X-Y pueden no estar completamente unidos uno al otro durante el zigoteno (Solari, 1974), pero ya se aprecia la heterocromatina que rodea a sus ejes cromosómicos (Hernández-Hernández, 2003). Durante el

paquiteno, la estructura del cuerpo XY es evidente al igual que en diploteno (Figura 4). Se ha demostrado que existe una relación entre el cuerpo XY y el nucleolo de espermatocitos de ratones, sin embargo estudios estructurales y ultraestructurales en espermatocitos de humanos, ratas y ratones demuestran que no siempre existe una relación entre el cuerpo XY y el nucleolo, dicha relación, cuando la hay, puede ser de dos tipos, dependiendo de la localización del organizador nucleolar en los cromosomas sexuales, como en el ratón (Solari, 1974), o en los autosomas, como en el hombre (Solari, 1974). En el primer caso (organizador nucleolar en los cromosomas sexuales), una cercana asociación es siempre desarrollada entre el nucleolo y el cuerpo XY (Figura 4C). En el segundo caso (organizador nucleolar en autosomas) el nucleolo y el cuerpo XY se asocian ocasionalmente en algunas células; la primera asociación está restringida a pocas especies, mientras que la segunda asociación se encuentra más comúnmente (Solari, 1974). Sin embargo, cuando existe esta relación, ambas estructuras están separadas por un claro y estrecho espacio ocasionalmente atravesado por finas fibras, el cuerpo XY y el nucleolo no comparten estructuras ribonucleoproteicas (RNP) y la cromatina del cuerpo XY no penetra en el nucleolo (Figura 4C; Echeverría et al., 2003). Las finas fibras que atraviesan el espacio entre ambas estructuras son probablemente finos filamentos de proteínas, lo que sugiere que la relación espacial entre el cuerpo XY y el nucleolo es únicamente una yuxtaposición la cual aparece muy frecuentemente en ratas y cobayos (Echeverría et al., 2003).

4.6. Cuerpo XY

Estudios citoquímicos clásicos revelan que el cuerpo XY es positivo a la tinción de Feulgen (específica para ADN), pero en algunas especies la tinción no es muy homogénea mostrando una diferencia en las intensidades de tinción, lo que corresponde a una condensación diferencial de los cromosomas XY. El cromosoma X es periférico en el cuerpo XY, y en algunas etapas el cromosoma X puede estar menos condensado que el interior del cuerpo XY que es el cromosoma Y (Solari, 1974).

Las descripciones de la ultraestructura del cuerpo XY muestran que está formado por dos componentes: (1) cromatina fibrilar, de menos de 0.1 nm de

ancho, la cual tiene diferentes grados de compactación en distintas especies, posiblemente debido a la participación de diferentes proteínas en la estructura de este cuerpo; (2) filamentos o ejes, los que se acomodan en un patrón fijo dentro de la masa formada por la cromatina fibrilar. La masa principal del cuerpo XY, constituida de cromatina fibrilar, contiene ADN, por otra parte existe evidencia de que el CS y los ejes cromosómicos contienen ARN (Echeverría et al., 2003) además de la sustancia de construcción proteica (Solari, 1974). Estudios realizados con la tinción específica de uranilo-EDTA-plomo han sugerido que los ELs y los ejes están compuestos de ribonucleoproteínas (RNPs) en espermatoцитos de ratas (Figura 4C; Esponda y Jiménez-Martin, 1973; Solari, 1974; Vázquez-Nin y Echeverría, 1976), que desaparecen con el tratamiento de ARNasas y la técnica preferencial para ADN corrobora esta evidencia (Vázquez-Nin y Echeverría, 1976). En etapas tempranas de la profase meiótica I, pocas estructuras ribonucleoproteicas se localizan en la periferia del cuerpo sexual, sin embargo, en paquiteno tardío y diploteno inicial numerosas fibras ribonucleoproteicas aparecen rodeándolo (Echeverría et al., 2003).

El cuerpo XY mantiene una interrelación cercana con la envoltura nuclear (eN) (Figura 4). Como todos los bivalentes, el par XY está anclado a la envoltura nuclear por sus extremos finales (Solari, 1974), el anclaje del cuerpo XY a la eN se da mediante la unión de los telómeros de los ejes cromosómicos X e Y a ella, por lo que los ejes adquieren una forma de arco, de manera que los extremos finales de los ejes permanecen perpendiculares con respecto al interior de la eN (Figura 4C y D). Este reacomodo de los ejes durante el zigoteno permite que una amplia superficie se ancle. Los ejes dentro del cuerpo XY sufren una serie de cambios desde el zigoteno temprano hasta la primera metafase. Durante el paquiteno tardío los dos componentes de los ejes nuevamente se acercan y se tornan rectos (Solari, 1974). Se observan dos ejes dentro del cuerpo XY (Figura 4D). El tamaño, la morfología y el patrón espacial de estos dos ejes son constantes en etapas específicas de la profase. En el ratón el eje largo corresponde al cromosoma X y tiene una longitud aproximada de 8.9 μm , mientras que el eje corto, corresponde al cromosoma Y que tiene una longitud aproximada de 3.5 μm . Los dos ejes siempre muestran cuatro

extremos anclados a la eN; dos se encuentran muy cercanos debido a que tienen una zona de homología donde se aparean formando un extremo común, y los otros dos son los extremos finales. Esta zona de homología se aparea originando un CS, en el cual cada EL corresponde a un eje (Figura 4D). En el ratón la longitud de este CS se va acortando progresivamente de 1.9 μm en el zigoteno a 0.25 μm en el diploteno. La formación del CS en la zona de homología es una característica constante del cuerpo XY en ratones, humanos y ratas (Solari, 1974); además de este acortamiento ocurre un segundo cambio en el CS, el cual empieza en paquiteno tardío y continúa durante el diploteno; este consiste en la disociación de la RC y de las fibras transversales que ocupan el espacio central de dicho complejo. Entonces se puede observar una zona densa, donde antes se encontraba el CS, lo cual se asemeja a la prueba morfológica de la recombinación en los autosomas (quiasma de recombinación) (Solari, 1974).

Como ya se ha mencionado, los telómeros de los cromosomas sexuales permanecen anclados a la eN, pero eso no explica por qué una gran parte de la heterocromatina del cuerpo XY también se asocia directamente con la eN (Figura 4C). Por lo tanto, esta asociación tiene implicaciones funcionales en la estructura del cuerpo XY, probablemente en la permanencia de un estado de heterocromatina y participando en el silenciamiento transcripcional de la mayoría de los genes codificados en los cromosomas X-Y. A pesar del silenciamiento de los genes codificados en los cromosomas X-Y, existen genes específicos de la meiosis que están codificados en el cromosoma X, los cuales son críticos en la progresión de la meiosis. Por ejemplo, la proteína TEX11 es un componente indispensable para la formación de la RC del CS (Yang et al., 2008). Dicha proteína está codificada en el cromosoma X el cual, en meiosis de machos, se silencia y heterocromatiniza. Por lo tanto, se sugieren dos posibilidades: 1) Las proteínas específicas de la meiosis se transcriben antes de que el cromosoma X se heterocromatinice o 2) estos genes escapan al silenciamiento de los cromosomas sexuales. Debido a que la heterocromatinización de los cromosomas sexuales comienza desde etapas pre-paquiténicas (Hernández-Hernández, 2003) y a que los ARN mensajeros de la mayoría de las proteínas son de una vida promedio corta, se favorece la

segunda opción. Por lo tanto, se sugiere de un mecanismo de escape al silenciamiento de genes específicos para la meiosis.

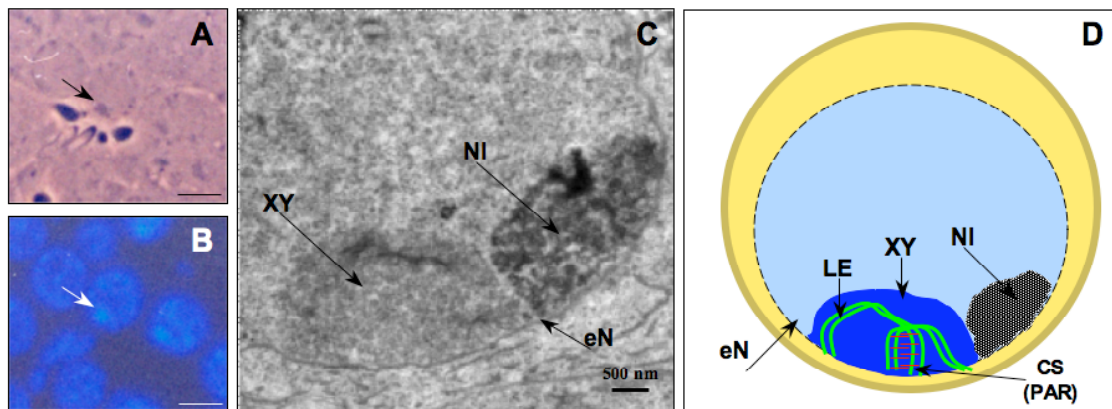


Figura 4: Cuerpo XY. Los cromosomas sexuales de machos mamíferos se condensan durante la profase meiótica I, formando el cuerpo XY en etapa de paquiteno. **A)** Se aprecia como una masa altamente contrastada con tinciones generales (flecha). **B)** Se observa como un cuerpo brillante con la tinción de DAPI (flecha) y en cercanía a la envoltura nuclear. **C)** Mediante micrografías electrónicas se observa como una estructura altamente contrastada (XY) que se encuentra en cercanía al nucleolo (NI) y a la envoltura nuclear (eN). **D)** Los elementos laterales (EL) de los cromosomas sexuales se encuentran dentro de la masa de heterocromatina del cuerpo XY, los cuales se aparean en una pequeña región de homología, conocida como región pseudoautosómica (CS en PAR).

4.6.1. Estructura de la cromatina en el cuerpo XY

Mediante estudios de autoradiografía sobre la incorporación de precursores de ARN (Uridina acoplada a tritio, ^3H -Uridina) en el núcleo de espermatoцитos en paquiteno, se ha demostrado que los cromosomas X-Y son transcripcionalmente inactivos. Sin embargo, aún se desconoce si esta represión de la transcripción se debe a alguna característica especial de la meiosis. Los estudios que se han dedicado a esta característica de los cromosomas sexuales en el cuerpo XY, han evidenciado que este fenómeno de inactivación es exclusivamente meiótico y no está relacionado con la inactivación del cromosoma X por compensación de dosis, ni con algún requerimiento de proteínas codificadas por los cromosomas X-Y. En el hongo *Neurospora crassa*, la introducción de secuencias de ADN exógenas y únicas en el genoma, propicia que éstas se silencien, en un proceso conocido como inactivación meiótica de ADN no apareado (MSUD). Por lo tanto, este proceso podría ser un mecanismo de protección para que algún punto de revisión (Check point) meiótico no detenga la meiosis debido a ADN no apareado.

Además de la inactivación transcripcional, la característica más visible del cuerpo XY es la estructura de su cromatina, la cual es diferente a la de la cromatina autosómica que se puede ver, incluso a nivel de microscopía óptica (Handel, 2004). Las proteínas, que hasta ahora se han encontrado asociadas a la cromatina del cuerpo XY, poseen distintas actividades que van desde variantes de histonas modificadas, proteínas asociadas con la reparación a daños en el ADN (Tabla 1) hasta proteínas aún no caracterizadas. Mientras otras proteínas que no colocalizan en el cuerpo XY, también aportan información relevante, como la ausencia de factores de procesamiento del ARN (factores de splicing) o la ausencia de la RNA polimerasa, como es de esperarse debido al silenciamiento transcripcional del cuerpo XY. Pero es muy probable que la función exacta de esta localización de proteínas en el cuerpo XY se desconozca hasta que se tenga más información acerca de la inactivación de los cromosomas sexuales durante la meiosis (MSCI) y la formación del cuerpo XY. Sin embargo, las proteínas asociadas al cuerpo XY, comparten una característica en común y es que están involucradas con procesos de represión transcripcional y/o formación de heterocromatina (Hoyer-Fender, 2003; Handel, 2004). Durante el proceso de aparición y disociación de la heterocromatina del cuerpo XY, se ha identificado una dinámica en la desacetilación y metilación de histonas (Khalil et al., 2004), por lo tanto, se deduce que la acción de proteínas desacetilasas y metilasas de histonas es importante para la formación de este cuerpo de heterocromatina. Con estos antecedentes, se infiere que el cuerpo XY se forma por un proceso epigenético, el cual implica un nivel de regulación en la estructura de la cromatina y en su transcripción, a nivel de procesos no codificados en el genoma pero si heredables.

Por otra parte, la presencia de proteínas relacionadas a los DSBs y a los precursores iniciales de su reparación, que en el resto de los cromosomas no son más visibles (Handel, 2004), hacen suponer que esta heterocromatina evita la recombinación de secuencias heterólogas entre los cromosomas sexuales no homólogos. Sin embargo, hasta ahora aún se desconoce la función de esta heterocromatinización de los cromosomas sexuales, por lo que aún se necesita profundizar más en este campo.

Tabla 1. Proteínas asociadas al cuerpo XY

Proteínas asociadas al cuerpo XY	Categoría
Macro H2A1.2	Variantes de histonas y modificaciones post-traduccionales de histonas.
H2AXγ (H2AX fosforilada)	
H3K9me (metilación de lisina 9 de histona H3)	
uH2A (forma ubiquitinada de histona H2A)	
Suv39h2	Variante de las metiltransferasas de histonas, específica de la meiosis
CBX1 (proteína con cromodominio 1, normalmente conocido como M31 y HP1 β)	Ortólogos de proteínas con cromodominios.
CBX3 (normalmente conocida como HP1 γ)	
NR6A1 (normalmente conocida como GCNF)	Receptor de Orfano, factor nuclear específico de células germinales
MRE11 y RAD51	Proteínas relacionadas con reparación de ADN y recombinación
BRCA1	Producto del gen supresor de tumores BRC1
XMR	Otras proteínas con funciones aún no descritas en el cuerpo XY
ATR	
XY40	
P51	
XY77	
XY bp (proteínas con dedos de zinc)	
Proteína Meiosis específica	
Proteína MW 51 000	
NIMA	
ASY (Asinaptina)	

4.6.2. ARN en el cuerpo XY

En células somáticas de hembras mamíferos, uno de los dos cromosomas sexuales X es silenciado y heterocromatinizado, mediante un mecanismo de compensación de dosis para evitar la sobre expresión de ambos cromosomas X homólogos, este proceso de inactivación-heterocromatinización requiere de una molécula de ARN, que actúa de forma *cis* sobre el cromosoma X que se inactivará y que se conoce como ARN *Xist* (X-inactive specific transcript; Erwin y Lee, 2008). En células de machos esto no ocurre, debido a la presencia de un solo cromosoma X, el cual no se inactiva en células somáticas, en células de la línea germinal, permanece inactivo y heterocromatinizado junto con el

cromosoma Y. Sin embargo, hasta ahora se desconoce el mecanismo exacto de este proceso de inactivación-heterocromatinización. Estudios pioneros en este área, propusieron al ARN *Xist* como molécula encargada de la formación del cuerpo XY, debido a la presencia de este transcrito en ambos cromosomas del cuerpo XY (Ayoub et al., 1997). Inesperadamente la eliminación de este gen en células germinales de machos, no evita la formación del cuerpo XY, por lo cual se concluyó que el proceso de formación del cuerpo XY era independiente de ARN *Xist* (Turner et al., 2002). Sorprendentemente, la presencia de ARNs dentro del cuerpo XY en estructuras específicas y en los ejes cromosómicos de los cromosomas sexuales (Echeverría et al., 2003; Marcon et al., 2008), además de la presencia de componentes de la maquinaria de RNA de interferencia (Costa et al., 2006), apuntan a que el cuerpo XY se forma debido a la contribución estructural y/o reguladora de ARNs aún no identificados, los cuales no necesariamente provienen del gen *XIST*. Por lo tanto, aún son necesarios estudios que ayuden a clarificar el proceso de formación del cuerpo XY en espermatoцитos de machos de mamíferos.

4.7. Cromatina

El genoma de los organismos eucariontes se encuentra organizado en cromatina, siendo el nucleosoma la unidad mínima de estructuración y de compactación del ADN. Los cambios en la estructura de la cromatina son necesarios para lograr una correcta regulación de los diversos procesos celulares, entre ellos la activación y el silenciamiento de genes, la reparación del ADN, la segregación cromosómica durante la mitosis y la meiosis, la inactivación del cromosoma X de hembras de mamíferos, la compactación de la cromatina durante la muerte celular por apoptosis, etc.

Una célula de vertebrados posee alrededor de 2 a 4 metros de ADN en forma lineal, el cual está contenido dentro del núcleo celular de apenas unos 10 μm de diámetro. Para contener esta molécula tan larga, el ADN se compacta y estructura en cromatina, la cual consiste en la asociación de la molécula de ADN con un conjunto de proteínas denominadas histonas. Las histonas se oligomerizan en octámeros, constituyendo el nucleosoma, en el cual se enrolla la molécula de ADN. Un nucleosoma individual, entonces, está compuesto de 2

moléculas de cada histonas H2A, H2B, H3 y H4 y de 146 pares de bases (pb) de ADN de doble cadena (Felsenfeld y Groudine, 2003).

El nucleosoma representa el nivel primario de organización del genoma, compactándolo alrededor de 6 veces. Cada nucleosoma está asociado al nucleosoma contiguo por una región internucleosomal de unas 40-60 pb de ADN, formando la fibra de 11 nm. El siguiente nivel de organización se constituye por la asociación de 6 nucleosomas formando una estructura de 30 nm de diámetro y conocida como solenoide. Esta última asociación de nucleosomas es estabilizada por una quinta histona, que no forma parte del nucleosoma, conocida como histona H1. La fibra de 30 nm se organiza y estructura favoreciendo la formación de asas de cromatina abarcando áreas genómicas de incluso cientos de kilobases (kb), las cuales pudieran constituir dominios génicos. Posteriormente, múltiples niveles de compactación más complejos contribuyen a la formación de una fibra de 240 nm, la cual puede ser identificada como la base para la formación de los cromosomas metafísicos (Felsenfeld y Groudine, 2003).

Desde el punto de vista funcional, la cromatina ha sido dividida en eucromatina y heterocromatina. La eucromatina corresponde a regiones que poseen genes transcripcionalmente activos (o potencialmente) con una estructura de la cromatina más relajada en el núcleo interfásico. Las secuencias reguladoras en estas regiones, son accesibles al corte por las nucleasas, las islas CpG suelen no estar metiladas y las histonas H3 y H4 están hiperacetiladas, finalmente la eucromatina es de duplicación temprana, al inicio de la fase S del ciclo celular. Por el otro lado, la heterocromatina se refiere a regiones transcripcionalmente inactivas, con una estructura altamente condensada, el dinucleótido CpG está metilado e hipoacetilación de las histonas. A su vez, la heterocromatina puede dividirse en constitutiva y facultativa. La primera presenta un bajo contenido en genes y un alto número de secuencias repetidas, se replica tardíamente en la fase S, las histonas H3 y H4 suelen estar metiladas en los residuos de aminoácidos de la lisina 9 (K9) y K20 respectivamente (Alberts et al., 2002). La dinámica de la cromatina se logra mediante la acción de numerosos factores de unión y/o enzimas

modificadoras que inducen modificaciones covalentes en los residuos de aminoácidos de las histonas. Las modificaciones covalentes de las histonas (modificaciones post-traduccionales de las histonas) constituyen señales reguladoras altamente específicas afectando el control epigenético de la expresión génica a través de la estructura de la cromatina (Felsenfeld y Groudine, 2003).

4.7.1. Regulación epigenética

La regulación epigenética gira en torno a la estructuración del genoma en la cromatina y su efecto regulador sobre la expresión de los genes mediante la estructura de la cromatina. Se considera procesos de regulación epigenéticos, todos aquellos que influyen tanto de manera normal como anormal en la expresión heredable de los genes si que ocurran cambios en la secuencias del ADN. Esto es, la información genética que viene codificada en la molécula de ADN no se ve afectada y se transmite su información sin problema alguno.

Los elementos que participan en la regulación epigenética responsables de permitir que la expresión génica tenga un vínculo muy estrecho con la estructura de la cromatina son básicamente siete: 1) las modificaciones post-traduccionales de las histonas, 2) las variantes de histonas, 3) la metilación del ADN, 4) los complejo de remodelaje ATP-dependientes, 5) los complejos originalmente descritos en *D. melanogaster*, la fruta de la mosca, llamados Polycom y Trithorax (PcG y trxG), 6) los transcritos intergénicos y 7) la dinámica nuclear (Recillas-Targa y Escamilla Del Arenal, 2004).

4.7.2. Modificaciones post-traduccionales de las histonas

Existen diferentes tipos de modificaciones post-traduccionales de las histonas, entre ellas la metilación de residuos de arginina (R); la metilación, acetilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación y sumorilación de residuos de lisina (K); y la fosforilación de residuos de serina y treonina (Li et al., 2007). Estas modificaciones decoran el octámero de histonas (H3, H4, H2A y H2B), así como a las variantes de histonas (H3.1, H3.2, H2A.Z, entre otras) en sus extremos amino y carboxilo terminales, así como en el dominio globular (Li et al., 2007; Kouzarides, 2007): Con la excepción de la metilación, todas las

modificaciones de las histonas resultan en un cambio en la carga neta de los nucleosomas, lo que puede generar la pérdida de interacciones inter- o intranucleosomales del ADN con las histonas (Kouzarides, 2007). Las histonas se sintetizan en el citoplasma de las células y posteriormente se ensamblan en los nucleosomas, entonces las modificaciones de sus residuos de aminoácidos son adicionadas o removidas por enzimas específicas dentro del núcleo; por ejemplo, los grupos acetilo se adicionan a las extremos de las histonas por las acetil transferasas de histonas (HATs) y removidas por las desacetilasas de histonas (HDACs) (Alberts et al., 2002)

Existen diferentes evidencias de que la acetilación se encuentra relacionada a la activación transcripcional y la sumorilación a la represión, principalmente mediante un impedimento estérico. Por otro lado, la metilación y la ubiquitinación tienen diferentes efectos dependiendo del residuo modificado y el contexto en que se encuentra. Como ejemplo, la ubiquitinación del extremo Terminal de las histonas H2A y H2B correlacionan con activación y represión, respectivamente (Berger, 2007). Sin embargo el descubrimiento de modificaciones centroméricas y el requerimiento de la di-metilación de H3K9 en la elongación nos indica que algunos patrones de modificaciones simplemente parecen carecer de interpretaciones globales (Sullivan y Karpen, 2004)

4.7.3. Composición del genoma de los roedores

La estructura de los genomas de los mamíferos es más compleja a la de los organismos unicelulares o invertebrados, debido a una acumulación de elementos repetidos y secuencias no codificantes. En el ratón las secuencias repetidas comprenden el 44% del total del genoma, las secuencias no codificantes el 52% y sólo el 4% corresponde a secuencias que codifican para funciones proteicas (Martens et al., 2005).

4.7.4. Secuencias repetidas

La característica más persistente de los genomas de los mamíferos son sus secuencias repetidas, la mayoría de las cuales corresponden a repetidas interdispersas y que representan fósiles de elementos transponibles. Los elementos transponibles son la fuerza principal de la reestructuración de los

genomas (Waterston et al., 2002). Todos los mamíferos tienen esencialmente las mismas cuatro clases de elementos transponibles: 1) los elementos nucleotídicos interdispersos largos (LINE); 2) los elementos nucleotídicos interdispersos cortos (SINE); los elementos similares a retrovirus con repetidas terminales largas (LTRs); y 4) ADN transponible. Las primeras tres clases son originadas de la transcripción reversa de un intermediario de ARN (retroposición), mientras que el ADN transponible se mueve por un mecanismo de cortado y pegado de secuencias de ADN (Waterston et al., 2002). Una segunda clase de secuencias repetidas son las secuencias repetidas simples (SSR), las cuales están dispersas a lo largo del genoma de todos los mamíferos y son repetidas en tandem perfectas que derivan de un deslizamiento durante la duplicación del ADN (Waterston et al., 2002). Dentro de las secuencias repetidas simples encontramos al ADN de las repetidas satelitales, el cual se encuentra en arreglos en tandem acumulados más comúnmente en la heterocromatina centromérica de los cromosomas. (Boyle et al., 1990)

4.7.5. Secuencias repetidas en el genoma de roedores

Los cromosomas de ratón son acrocéntricos y contienen heterocromatina alrededor de sus centrómeros. La heterocromatina constitutiva se subdivide en dominios de secuencias satelitales mayores en tandem ricas en A/T que se localizan en las regiones pericentroméricas mientras que las secuencias satelitales menores se encuentran en la heterocromatina centromérica. Estas secuencias comprenden aproximadamente el 3.5% del genoma

Los elementos LINE L1 y los SINE B1, B2 ocupan posiciones discretas en los cromosomas metafásicos de ratón, los cuales corresponden a las bandas G y a las R respectivamente (Boyle et al., 1990). Las secuencias SINE (Alu) residen principalmente en las bandas R y las secuencias LINE en las bandas G. Las bandas G las cuales son teñidas de oscuro con el colorante de Giemsa contienen el DNA de duplicación tardía y son más ricas en A-T y las bandas R (p.e. bandas G reversa) se duplican tempranamente y son ricas en G-C (Boyle et al., 1990). Estas secuencias, además de las LTRs comprenden

el 25% del genoma de roedores, mientras que el 1% corresponde a ADN transponible (Martens et al., 2005)

4.8. Estructura de la cromatina durante la profase meiótica I

Al inicio de la profase meiótica I la cromatina se encuentra en el estado más relajado de toda la meiosis. Los elementos repetidos, que normalmente se encuentran estructurados en cromatina compacta presentan cambios en su estructura, permitiendo una adecuada síntesis de ADN durante la fase S pre-meiótica. Una vez que las células entran a la etapa de leptoteno, ocurre una demetilación a escala de todo el genoma y la proteína Rad6 ubiquitina la histone H2B (uH2B), permitiendo al metilación de H3K4 por Set1 y por lo tanto la apertura de la cromatina en las secuencias con alta frecuencia de recombinación (hotspots), mucho de los cuales se encuentran en secuencias repetidas. Posteriormente, la proteína Spo11 produce los DSBs y en respuesta a este proceso, se recluta la variante histónica H2AX fosforilada (γ H2AX), favoreciendo el reclutamiento de las proteínas reparadoras de los errores meióticos (MMRP) a los DSBs. Durante la reparación del ADN en respuesta a los DSBs, Spo11 no se remueve de los hotspots de recombinación, evidencia que es favorecida por la presencia de Spo11 en los ELs del CS cuando este se aprecia en paquiteno y sugiere una función de Spo11 en marcar hotspots para ser reclutados al EL del CS. Después del doble rompimiento de cadena, los extremos fragmentados de la molécula de ADN refragmentados por una actividad exonucleotídica 5'-3' de las proteínas reparadoras RAD50 y MRE11 resultando en un extremo de ADN de cadena sencilla (ssDNA), que mediante la acción de Rad51 y Dmc1 invade una cadena doble de ADN intacta ya sea de la cromátida hermana o del cromosoma homólogo y la ocupa como molde para reparar el daño. Al mismo tiempo Mre11 atrae complejos de cecinas que mantienen unidas a las cromatinas y a los cromosomas homólogos permitiendo una reparación de adecuada de la molécula de ADN y evitando su disociación debido a los DSBs. Por lo tanto es interesante la idea de que los hotspots son reclutados a los ELs del CS mediante la interacción de proteínas del EL y la estructura de la cromatina de estas secuencias, la cual es mediada por diferentes marcas post-traduccionales de las histonas (Hernández-Hernández et al., 2008b). Existe evidencia que sugiere que ciertos componentes del CS

pueden estar involucrados en el anclaje de la cromatina los EL. Análisis de las secuencias proteicas de los principales componentes del CS predicen la existencia de potenciales motivos de unión a ADN en SYCP1 y SYCP2. Estudios recientes sugieren que son las cohesinas las encargadas del anclaje de la cromatina al EL del CS. Ratones mutantes para la cohesina SMC1 β específica del EL, presentan alteraciones en la cromatina asociada al EL y el doble de tamaño de las asas de cromatina ancladas al EL en comparación con ratones no mutados. Además, se ha demostrado que la cohesinas pueden unirse a SYCP2, que a su vez interactúa con SYCP3, por tanto, estamos ante la presencia de una compleja red de interacciones proteicas y de ácidos nucleicos (ADN y ARN) que pueden mediar el anclaje de los cromosomas homólogos a los CS (Hernández-Hernández et al., 2008b).

5. Justificación y planteamiento del problema

La variabilidad genética involucra la participación de una maquinaria particular de las células en un proceso conocido como meiosis, durante la cual los cromosomas homólogos se duplican, reconocen, aparean y recombinan. Estos dos últimos procesos son mediados por el CS, el cual es una estructura multiproteica que mantiene unidos a los cromosomas homólogos mientras se lleva a cabo la recombinación meiótica. Para que esto suceda, los cromosomas se tienen que asociar al CS de alguna forma. Los cromosomas homólogos, duplicados durante la fase S meiótica, entran a la profase meiótica I donde se anclan a los ELs del CS a lo largo de toda su longitud. Por lo tanto, se observa a los cromosomas homólogos en forma de asas de cromatina ancladas a los ELs. Diversos grupos de trabajo han sugerido que el ADN asociado al CS pertenece a secuencias repetidas (Karpova et al., 1989, 1995; Pearlman et al., 1992; Dadashev et al., 2005). Sin embargo, aún se desconoce como se anclan los cromosomas a los ELs y que características tiene el ADN y la cromatina que se ancla a los ELs del CS. En el presente trabajo, nos interesamos en investigar algunos de los aspectos fisiológicos y moleculares que permiten a los cromosomas homólogos anclarse al andamiaje proteico del CS. Además de las características que estos anclajes tienen para ser incorporados a los ELs y de esta forma conservar a los cromosomas homólogos anclados al CS durante el intercambio de material genético entre estos.

Por otra parte, en la reproducción sexual se necesita de dos progenitores sexualmente diferentes, el género masculino en organismos mamíferos, se determina por la presencia de cromosomas heterólogos, conocidos como cromosomas sexuales X e Y. Estos cromosomas se aparean y recombinan en una región homóloga específica entre los dos, mientras que las regiones no homólogas sufren un proceso de heterocromatinización formando el cuerpo XY; sin embargo, no se sabe con exactitud si la formación de esta masa de heterocromatina facultativa sea necesaria para evitar el apareamiento y recombinación entre secuencias no homólogas, mas aún no se conoce el mecanismo por el cual este cuerpo se forma. Por lo tanto, este trabajo pretende estudiar los componentes estructurales del cuerpo XY, lo que permitirá elucidar los mecanismos de formación de este cuerpo.

6. Hipótesis

Los cromosomas meióticos se anclan a los EL del CS para finalizar el entrecruzamiento de material genético entre secuencias homólogas; por lo tanto, la cromatina de los anclajes del cromosoma al EL tiene que estar compuesta por secuencias de ADN particulares, las cuales a su vez, tienen que compartir características que les permitan incorporarse a los ELs del CS. Aislar y caracterizar dichas secuencias de ADN, nos permitirá elucidar sus características que les permiten ser parte del EL. Además, al interferir con dichas características, podremos determinar su importancia para la estructura de los cromosomas meióticos en el CS.

Por otra parte, los cromosomas sexuales X-Y se heterocromatinizan durante la profase meiótica I formando el cuerpo XY; por lo tanto, esta heterocromatina tiene que estar asociada a componentes epigenéticos (como ARNs y/o modificaciones post-transcripcionales de las histonas) los cuales tienen que estar presentes cuando se observa el cuerpo XY. Analizar los componentes epigenéticos del cuerpo XY e interferir con la formación de heterocromatina durante la profase meiótica I, nos permitirá determinar si la heterocromatinización de los cromosomas sexuales durante la profase meiótica I es importante para la formación y/o estructura del cuerpo XY.

7. Objetivo General

Identificar las secuencias de ADN asociadas a los EL del CS, así como las características que les permiten ser parte del andamiaje proteico del CS. Además, detallar los componentes epigenéticos del cuerpo XY y su importancia en la formación y/o estructura de dicho cuerpo.

7.1. Objetivos particulares para complejo sinaptonémico

- Aislar y caracterizar el tipo de secuencias de ADN asociadas al elemento lateral del complejo sinaptonémico.
- Localizar *in situ* las secuencias de ADN asociadas al elemento lateral del complejo sinaptonémico.
- Analizar las estructuras primaria y secundaria de las secuencias de ADN asociadas al EL del CS.
- Evaluar si las características de dichas secuencias de ADN son relevantes para su asociación al CS.

7.2. Objetivos Particulares para cuerpo XY- Analizar la presencia del ARN *Xist* y/o ARNs totales en la heterocromatina del cuerpo XY.

- Determinar si el establecimiento de heterocromatina es necesario para la formación y/o estructura del cuerpo XY.

8. Estrategias experimentales

Con el fin de cumplir nuestros objetivos utilizamos células germinales en meiosis de testículos de rata (meiocitos). Para lo cual, usamos ratas machos de la cepa Wistar.

Para aislar y caracterizar las secuencias de ADN asociadas a los ELs del CS, usamos 3 ratas de 22 a 23 días de edad, las cuales fueron anestesiadas, se extrajeron los túbulos seminíferos y se disociaron los meiocitos, los cuales fueron sometidos a una inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), usando un anticuerpo anti-SYCP3 para inmunoprecipitar las secuencias de ADN asociadas a los ELs del CS. Las secuencias aisladas fueron caracterizadas mediante análisis de alineamientos múltiples con las bases de datos donde se encuentra almacenada la secuencia del genoma de la rata. La especificidad de la inmunoprecipitación fue corroborada mediante ChIPs con anticuerpo para proteínas que no se asocian al EL del CS. Además para corroborar el enriquecimiento de las secuencias repetidas asociadas a los ELs del CS, realizamos PCRs dúplex radiactivas en las cuales se puede cuantificar enriquecimientos de secuencias de ADN asociadas a las proteínas contra las que se realiza el ChIP.

Para localizar de manera *in situ* a las secuencias de ADN repetidas asociadas al EL del CS (LEARS), realizamos hibridaciones *in situ* fluorescentes y ultraestructurales usando como sondas de hibridación a dos de las secuencias LEARS y como sonda control a una secuencia de ADN repetida no asociada al EL del CS.

La estructura primaria de las LEARS fue analizada mediante algoritmos bioinformáticos para determinar la presencia de secuencias consenso entre las LEARS. Mientras que la estructura secundaria de las LEARS fue determinada mediante dobles inmunolocalizaciones de las modificaciones post-traduccionales de las histonas (las cuales dictan la estructura secundaria de las secuencias repetidas) y de una de las principales proteínas del EL del CS (SYCP3).

Con el fin de interferir con la estructura secundaria de las LEARS, utilizamos un inhibidor de las proteínas desacetilasas de histonas, dicho inhibidor fue inyectado en la ingle de las ratas durante 9 días y los túbulos seminíferos fueron extraídos al 10mo día. De esta forma, los paquitenos encontrados, son células que han sido tratadas con la droga desde que eran células en estadios de pre-leptoteno. Una vez hecho el tratamiento, realizamos ensayos de inmunolocalizaciones de los componentes del CS para determinar alteraciones en su estructura, así como de las modificaciones post-traduccionales de las histonas (marcas epigenéticas de histonas) asociadas a la cromatina de los ELs. Por otra parte, mediante ensayo de ChIP, evaluamos la pérdida del enriquecimiento de las LEARS en los EL. La asociación de las modificaciones post-traduccionales de las histonas con las LEARS en paquitenos de ratas tratadas y ratas no tratadas fue determinada con ensayo de ChIP-ReChIP. Se usó el anticuerpo a anti-SYCP3 para inmunoprecipitar a las LEARS, seguido de un segundo ChIP, usando anticuerpos para las diferentes marcas de histonas y de esta forma determinar la asociación de las LEARS con las diferentes modificaciones epigenéticas en los EL de los CSs, mediante ensayos de PCR dúplex radioactivas.

Para analizar la presencia de ARN *Xist* se realizaron hibridaciones *in situ* fluorescentes contra este transcrito en células en espermatogénesis. Mientras que para localizar ARNs totales se realizaron hibridaciones *in situ* fluorescentes y ultraestructurales en células paquiténicas. Las modificaciones post-traduccionales de las histonas asociadas al cuerpo XY, se analizaron por inmunolocalizaciones de dichas marcas epigenéticas.

Para determinar si la heterocromatinización de los cromosomas sexuales es importante para la formación y estructura del cuerpo XY, usamos el inhibidor de las proteínas desacetilasas de histonas (como arriba mencionado) y evaluamos las alteraciones en la estructura del cuerpo XY, mediante inmunolocalizaciones de sus componentes como perfil epigenético, formación de heterocromatina, estructura de los ELs y de los apareamientos entre regiones homólogas.

9. Materiales y métodos

9.1. Procesamiento de material biológico para ensayos de biología molecular

9.1.1. Disgregación de células de testículo de rata

Se utilizaron ratas Wistar de 22-23 días de edad, que es en donde hay abundancia de células en etapa de paquiteno y ratas adultas de tres meses de edad. Las ratas fueron anestesiadas, se extrajeron los testículos, se rompió la túnica albugínea y se obtuvieron los túbulos seminíferos para disgregar los meiocitos mediante un proceso de tripsinación (Steiberger en Hardman y O'Malley, 1975) con adecuaciones para nuestro sistema. Las células meióticas se disgregaron en una solución de tripsina al 0.01% en PBS libre de calcio y magnesio en tubos falcon de 15 ml, se agitó vigorosamente durante un minuto (min) y posteriormente se incubó durante 15 min a 31°C o a temperatura ambiente (TA). Después de la incubación, se dejaron reposar los túbulos hasta que se precipitaron. Una vez sedimentados, se transfirió el sobrenadante a un tubo falcon nuevo y se inactivó la acción de la tripsina adicionando suero fetal bovino (SFB) a una concentración final al 2%. A los túbulos seminíferos sedimentados se les repitió dos veces el paso de tripsinación. Mientras que el sobrenadante se centrifugó a 500 g por 10 min para precipitar los meiocitos. El botón de células resultantes se resuspendió en PBS (si las células se usaban inmediatamente) o en medio de cultivo DMEM suplementado con BSA al 10% (si las células se almacenaban por 4 horas como máximo). Se juntaron los botones celulares de los tres pasos de tripsinación en un volumen final de 50 ml de PBS o medio de cultivo DMEM adicionado con 10% de BSA. Después se contaron las células en un hematocitómetro bajo un microscopio con un objetivo de 40X. Se usaron 20 millones de células por cada anticuerpo a usar.

9.1.2. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Las células obtenidas de la disgregación se centrifugaron para precipitarlas y se lavaron dos veces con PBS, centrifugando nuevamente entre cada paso de lavado. Se resuspendió el botón celular en PBS y se realizó el entrecruzamiento de proteínas-ADN con formaldehído al 1%. A los 5 min se

detuvo la reacción añadiendo glicina a una concentración final de 125 milimolar (mM). Después se centrifugaron nuevamente las células y se lavaron dos veces con PBS (suplementado con los inhibidores de proteasas)(Apéndice 1). En el último lavado, se resuspendió el botón celular en 3 ml de solución de lisis (adicionado con los inhibidores de proteasas) (0.5 ml de solución de lisis por cada 20 millones de células). Se incubó la suspensión en hielo, por 10 min para lisar las células. Después de la lisis celular se procedió a fragmentar la cromatina mediante fuerza mecánica con un sonicador, hasta obtener fragmentos de ADN entre 200 y 600 pares de bases. Una vez fragmentado el ADN, en la solución de lisis, se diluyó 10 veces con la solución de dilución (adicionado con los inhibidores de proteasas), se agregaron 100 μ l de proteínas A/G sefarosa (agente de inmunoprecipitación) pre-absorbidas (Apéndice 1) y se incubó durante 1 hora a 4°C en agitación; esto fue con el fin de disminuir las uniones inespecíficas entre la cromatina y las proteínas A/G sefarosa. Posteriormente, se precipitaron las proteínas A/G mediante una centrifugación a 800 g por 2 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo cuidando de no coleccionar las proteínas A/G (perlas o esferas) y se tomaron alícuotas de 5 ml. Entonces a cada alícuota de 5 ml se le añadieron 5 μ g de los anticuerpos (Tabla 2) y se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se adicionó 50 μ l de proteínas A/G sefarosa (pre-absorbidas) a cada muestra con anticuerpo, se incubó por 4-6 horas a 4°C y se precipitaron las esferas de sefarosa por centrifugación, las cuales se lavaron con las soluciones de lavado (amortiguador Paro I, II y III, adicionados con los inhibidores de proteasas), seguido de dos lavados con solución TE y finalmente se incubaron las perlas en 150 μ l de la solución de extracción a 65°C toda la noche y al otro día se purificó el ADN mediante columnas de purificación de ADN (Minelute PCR purification kit, QIAGEN), al final se recuperó el ADN en 50 μ l de agua desionizada. Este ADN purificado se usó para dos diferentes procedimientos: 1) Clonación y secuenciación de ADN y 2) PCRs radiactivas.

9.1.3. ChIP-ReChIP

Para el ChIP-ReChIP se siguieron los mismos pasos que para el ChIP pero antes de agregar el amortiguador de extracción a los inmunocomplejos, se

incubaron con un ditiotreitól (DTT) para disociar la unión del primer anticuerpo y de las esferas de sefarosa, sin revertir el entrecruzamiento entre proteínas y ADN. Posteriormente, se lavaron las esferas y se recuperó el complejo proteína-ADN el cual se incubó con un segundo anticuerpo (anticuerpos para distintas modificaciones post-traduccionales de las histonas) y con una nueva alícuota de esferas A/G sefarosa y se continuó con los lavados y extracción como en el caso de ChIP (Furlan-Magaril et al., 2008).

Tabla 2: Anticuerpos utilizados en los procedimientos realizados.

Anticuerpo	Diluciones para inmunolocalizaciones	Inmuno-precipitaciones (IPs)	Procedencia
Anti-SYCP3 (en suero)	1:200	5 μ l	Donado por Ricardo Benavente (RB)
Anti-SYCP3 (purificado)	1:100 (5 ng/ μ l)	5 μ g	Propio
Anti-SYCP1	1:100 (5 ng/ μ l)	-----	Propio
Anti-RNAPol II	-----	5 μ g	COVANCE
Anti-ZDNA	-----	5 μ g	Abcam
IgGs (ab inespecífico)	-----	5 μ g	Santa Cruz
Anti-H3K9 monometilada	1:100 (5 ng/ μ l)	5 μ g	Donado por Thomas Jenuwein (TJ)
Anti-H3K9 dimetilada	1:100 (5 ng/ μ l)	5 μ g	Donado por TJ
Anti-H3K9 trimetilada	1:100 (5 ng/ μ l)	5 μ g	Abcam
Anti-H3K27 monometilada	1:100 (5 ng/ μ l)	5 μ g	Donado por TJ
Anti-H3K27 dimetilada	1:100 (5 ng/ μ l)	5 μ g	Donado por TJ
Anti-H3K27 trimetilada	1:100 (5 ng/ μ l)	5 μ g	Abcam
Anti-H4K20 monometilada	1:100 (5 ng/ μ l)	5 μ g	Donado por TJ
Anti-H4K20 dimetilada	1:100 (5 ng/ μ l)	5 μ g	Donado por TJ
Anti-H4K20 trimetilada	1:100 (5 ng/ μ l)	5 μ g	Abcam
Anti-H3 acetilada	1:100 (5 ng/ μ l)	5 μ g	Abcam

9.1.4. Clonación y secuenciación de ADN

El ADN inmunoprecipitado y purificado se clonó en los vectores de clonación pGEM-11zf- (Promega) y pCR-Blunt II-TOPO (Zero Blunt TOPO PCR Cloning

Kit, Invitrogen). Una vez ligado el ADN a los vectores de clonación, se transformaron en células competentes por choque térmico (Heat shock) y se cultivaron en placas con agar y medio de cultivo adicionadas con antibiótico. Cuando el vector de clonación es pGEM-11zf-, las clonas positivas crecen con un color blanco, mientras que las clonas con el vector sin inserto y recircularizado crecen con un color azul. Cuando se usa el vector pCR-Blunt II-TOPO, todas las clonas que crecen son positivas debido a que una recircularización del plásmido activa un gen letal para las células, sin embargo hay que analizar por análisis de restricción si las clonas son positivas ya que la eficiencia de ligación y transformación no es 100% efectiva.

9.1.5. Análisis y secuenciación de clonas positivas

Las clonas positivas se analizaron de dos formas: 1) análisis de patrones de digestión a enzimas de restricción y 2) PCR de colonia. Para el análisis de restricción, cada clona fue cultivada de manera independiente en 3 ml de medio LB con el fin de amplificar el ADN. Una vez amplificado el ADN, se aisló el vector de clonación y se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII para el vector pGEM-11zf- y con EcoRI para el vector pCR-Blunt II-TOPO zero blunt. Las clonas positivas, que liberan al vector de clonación y que contienen una secuencia clonada fueron cultivadas nuevamente, el plásmido fue purificado y enviado a secuenciar con los oligonucleótidos universales para la mayoría de los vectores de clonación. Cuando se analizó por PCR de colonia, se preparó la reacción para la PCR; cada clona fue aislada con la punta de una pipeta y con la misma se resuspendió la reacción de PCR. Las clonas positivas fueron cultivadas nuevamente y el plásmido fue purificado y enviado a secuenciar usando los oligonucleótidos propios del vector de clonación pCR-Blunt II-TOPO zero blunt.

9.1.6. Análisis bioinformático de secuencias inmunoprecipitadas

Todas las secuencias aisladas fueron designadas como "M" y numeradas en el orden que fueron secuenciadas. Una vez secuenciados los fragmentos de ADN inmunoprecipitados con los diversos anticuerpos, se identificaron y caracterizaron en bases de datos y se analizaron mediante la aplicación de

diferentes algoritmos bioinformáticos. Las secuencias aisladas (n=100) y sus características se encuentra en el Apéndice 2.

9.1.7. Identificación y caracterización de secuencias

Para este fin se utilizaron las bases de datos en donde se encuentra depositado el genoma completo de la rata: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway> (BLAT program en UCSC Genome Bioinformatics, Santa cruz, Universidad de California), www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ (BLAST en National Center for Biotechnology Information) y www.repeatmasker.org/ (Repeat Masking).

9.1.8. PCRs dúplex radioactivas

El ADN inmunoprecipitado con los diversos anticuerpos fue purificado y resuspendido en 50 μ l de H₂O desionizada estéril y se usó 1 μ l para cada reacción de PCR. Se diseñaron un par de oligonucleótidos para cada secuencia representativa de las diferentes clases de secuencias repetidas inmunoprecipitadas, y un par de oligonucleótidos para una secuencia codificante como control para la PCR dúplex. Posteriormente las condiciones de PCR y las concentraciones de oligonucleótidos se estandarizaron de manera que el cociente del producto de amplificación de la secuencia repetida con la secuencia codificante fuera cercano a 1 (Tabla 3 muestra la secuencia y las concentraciones utilizadas de oligonucleótidos), usando como templado ADN genómico (Cromatina Input). Una vez obtenidas las PCRs se separaron los productos en un gel de acrilamida al 6% y la imagen se digitalizó empleando un “scanner” de fósforo radiactivo (Typhoon scanner 8600), mientras que la cuantificación de las bandas se realizó en el programa ImageQuant.

Tabla 3: Secuencias de oligonucleótidos y concentraciones para PCRs dúplex.

Producto amplificado	Secuencias de oligonucleótidos	Tamaño (pb)	Concentración para PCR dúplex (pmol)
Secuencia LINE-M44 (Familia L1)	L1: 5'-3': GGCTAGAAAACAATTTAAAGGAATC L1rev: 5'-3': GGCTCACCATTTGATACTACATAAC	108	1.5
Secuencia-M9 (Familia <i>Alu</i>)	S1: 5'-3': GCAATGGTGGTGCATGCCTTTAATC S1rev: 5'-3': CAAGGATTCTCTATGTAGCTCTGGT	119	2.5
Secuencia LTR-M157	LTR: 5'-3': CCCTTAACCAAATGAGCATGAGTCA LTRrev: 5'-3': GGGAGGACATGTGATATTGGAGAGA	210	2.5
Secuencia Satelital-M68	Sat: 5'-3': GGGACATGCTTGTATGAGTTTGCTT Satrev: 5'- 3': GGGAACCTACTGAATTCACCATGAT	89	0.5
Actina (Intrón-exón 2, intrón-exón 3)	Act: 5'-3': GGCCCTGTGTTCACTTTGTATTTTCG Actrev: 5'- 3': CCATCACTAGCCACTTCTGCTTCCTC	353	3.5 (con oligos de LINE y LTR) 2.5 (con oligos de SINE) 4.5 (con oligos de Satelital)
Repetida ScRNA (Small Cytoplasmic RNA)	ScRNA: 5'-3': GGGGTTGGGGATTTAGCTCA ScRNArev: 5'- 3': CCGGAGCTGGGGACCGAACC	93	

9.1.9. Análisis de la estructura primaria de las secuencias inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-SYCP3

Para la búsqueda de secuencias consenso entre las secuencias inmunoprecipitadas se usó el algoritmo bioinformático de ClustalW (Chena et al., 2003) y para la identificación de segmentos compartidos (High-scoring Segment Pair, HSP) se utilizó el programa de BLASTN (Bedell et al., 2003). Se construyó una base de datos interna con las 100 secuencias inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-SYCP3. Dicha base de datos fue

formateada para crear una matriz de alineamiento empleando tamaños de ventana de 6 y de 9 pares de bases, respectivamente. Después se ejecutó el algoritmo del programa BLASTN comparando las 100 secuencias inmunoprecipitadas contra la base de datos interna.

9.2. Procesamiento de material biológico para microscopía óptica y epifluorescente

9.2.1. Tratamiento *in vivo* de las ratas con la droga Tricostatina-A

Para este tratamiento se usaron ratas de 2 meses, las cuales se dividieron en tres grupos: grupo A: 3 ratas para tratamiento con la droga inhibidora de desacetilasas de histonas (HDACs), Tricostatina-A (TSA, SIGMA); grupo B: 3 ratas control tratadas sólo con el vehículo donde se disolvió el TSA, dimetil sulfoxido (DMSO, SIGMA); grupo C: 3 ratas sin tratar, como grupo control de viabilidad (Figura 5).

La droga TSA fue resuspendida en DMSO a una concentración final de 20 mg/ml y fue administrada a una dosis 2.4 mg/kg en PBS; la dosis fue elegida de acuerdo a previos reportes de tratamiento de ratones con la misma droga, afectando las células paquiténicas de los testículos (Fenic et al., 2004; 2008). De acuerdo a la duración de la onda espermatogénica de la rata (Adler, 1996) el tratamiento duró 9 días. Los 2 meses de edad de las ratas fueron considerados como el día 0 del inicio de una onda espermatogénica, al día 10 aparecen las células pre-leptoténicas de nuestra onda espermatogénica y al día 19 las células paquiténicas. Por lo tanto, el tratamiento empezó al día 10 con células pre-leptoténicas y se detuvo en el día 19 con células paquiténicas y administración diaria de la droga. De esta forma, las células paquiténicas del día 19 corresponden a células pre-leptoténicas que han sido tratadas diariamente con TSA, hasta que progresaron a paquitenos (Figura 5). Al noveno día de tratamiento, los testículos fueron extraídos quirúrgicamente y se procesaron para su observación a los niveles de microscopía óptica, de fluorescencia y electrónica, así como para técnicas de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP y ChIP-ReChIP).

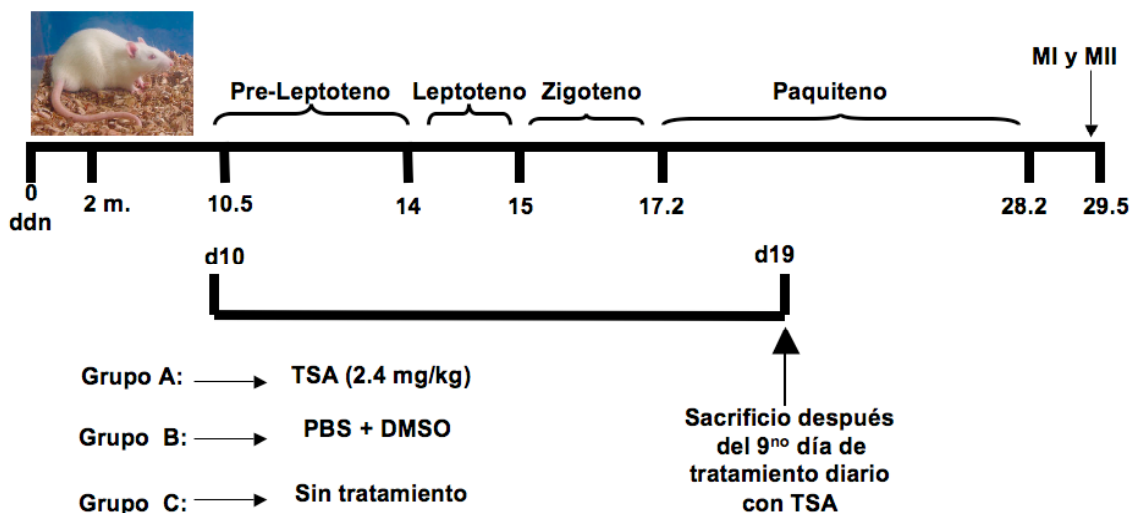


Figura 5: Esquema que muestra el protocolo de tratamiento de las ratas con la droga TSA. El ciclo del epitelio seminífero dura 29.5 días. Al día 10.5 se observan células en etapa de pre-leptoteno, las cuales alcanzan la etapa de paquiteno al día 19 del ciclo del epitelio seminífero. Por lo tanto, si se inyecta diariamente a una ratona durante 9 días y se sacrifica, las células en etapa de paquiteno en ese momento, son células que provienen de etapas pre-leptotónicas y que han sido tratadas diariamente con TSA. Ratonas de dos meses de nacidas (2mdn) se dividieron en tres grupos: Grupo A, se trataron con 2.4 mg/kg de TSA. Grupo B fueron tratadas con el vehículo de dilución (PBS+DMSO). Grupo C no se trataron. MI y MII indican el término de la meiosis I y II.

9.2.2. Procesamiento de ratas control y tratadas con la droga Tricostatina-A

9.2.2.1 Crio-fijaciones

Las ratas fueron anestesiadas con éter (SIGMA), se extrajeron los testículos, se cortaron en pequeños fragmentos e inmediatamente se crio-fijaron en isopentano (SIGMA) (almacenado a -80°C) sumergido en nitrógeno líquido durante 40 segundos. Posteriormente los fragmentos de tejidos crio-fijados se cortaron en un criostato a -20°C (LEICA CM1850), se montaron en portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina (SIGMA) y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

9.2.3. Producción de sondas para hibridaciones *in situ*

9.2.3.1. Sondas de ADN

Para la producción de sondas biotiniladas de las secuencias repetidas, se eligieron secuencias representativas de las distintas familias de secuencias

inmunoprecipitadas (Apéndice 2). Los vectores de clonación, con la secuencia insertada, fueron introducidos en bacterias competentes para su sobre expresión y se realizó una MIDIprep para obtener grandes cantidades de vector con inserto (de acuerdo a las instrucciones del proveedor, QIAGEN). Para marcar la sonda se usó el método de “nick-translation” (BioNick Labeling system, Invitrogen) (Apéndice 1). Por otra parte, se preparó una sonda de ADN total con el fin de hibridar con ARNs totales (ver protocolo de hibridación ADN-ARN), para ello se empleó como templado ADN genómico (Apéndice 1) el cual fue marcado por el método de “nick-translation”.

9.2.4. Inmunolocalización acoplada a hibridación *in situ* fluorescente

Para el Inmuno-FISH, se utilizaron crio-cortes de 3 micrómetros de grosor, los cuales se fijaron con paraformaldehído al 1%, se bloquearon con glicina y se incubaron con el anticuerpo primario anti-SYCP3 (generado en cobayo), este anticuerpo se usó tanto en suero como purificado y posteriormente con el anticuerpo secundario anti-cobayo acoplado a Fluoresceína (FITC) o a Rojo Texas (TXR). Una vez realizada la inmunodetección se llevó a cabo una post-fijación con paraformaldehído al 4%. Las laminillas se trataron con RNasa para degradar el ARN y con peróxido de hidrógeno para eliminar la peroxidasa endógena. El ADN de las laminillas se desnaturalizó con NaOH pH 12±0.01 M por 2 min. Este paso de desnaturalización no afecta la inmunodetección (Brown, 2002). Posteriormente se adicionó la sonda de hibridación, previamente desnaturalizada, se cubrió con un cubreobjetos, se selló e incubó a 65°C toda la noche. Al día siguiente se lavó la sonda y se realizaron dos rondas de amplificación con el “kit TSA biotin system” (PerkinElmer) y se inmunodetectó la biotina con un anticuerpo secundario estreptavidina acoplado a FITC ó TXR.

9.2.5. Producción y purificación de anti-SYCP1 y anti-SYCP3

Para este fin, se produjeron y purificaron anticuerpos para las proteínas específicas de la meiosis: SYCP1 y SYCP3, durante una estancia de investigación en la universidad de Würzburg, Alemania, bajo la dirección del Dr. Ricardo Benavente (RB). Se sintetizaron proteínas para inmunizar animales y

el suero de estos animales fue utilizado para purificar los anticuerpos por columnas de alta afinidad (detalles en Apéndice 1)

9.2.6. Sonda de ARN

Para realizar la sonda que reconoce al ARN *Xist*, primero se identificó la secuencia de ADN que codifica al ARN *Xist* en rata, ya que sólo está reportada en ratón. Posteriormente, se diseñaron un par de oligonucleótidos dentro de la secuencia más conservada entre el gen *XIST* de ratón y de rata (Figura 6A) y se amplificó usando como templado ADN genómico de rata. Una vez amplificado el fragmento de ADN, se ligó en el vector de clonación pGEMt-easy (Promega; de acuerdo a las instrucciones del fabricante) (Figura 6B) y se realizó una transcripción *in vitro* para obtener una sonda marcada con nucleótidos acoplados a digoxigenina, mediante el “kit de DIG RNA Labeling (SP6/T7)” (ROCHE) (Figura 6C, D) (Apéndice 1)

9.2.7. Hibridación *in situ* fluorescente de ARNs

Debido a la inestabilidad de los ARNs todas las soluciones fueron preparadas con agua pre-tratada con Dietil-pirocarbonato (DEPC) al 0.1%. Para estas hibridaciones se usaron crio-cortes

9.2.7.1. Hibridación *in situ* fluorescente de ARNs totales

Para realizar una hibridación *in situ* entre una sonda de ADN y ARNs totales de la célula, se siguió el mismo fundamento que la hibridación *in situ* con ADNs, con la diferencia de no desnaturalizar el ADN de las células para evitar hibridación ADN-ADN y favorecer la hibridación ADN-ARN. Los crio-cortes se fijaron con paraformaldehído al 1% en PBS-DEPC y se hibridaron a 37°C toda la noche con la sonda de ADN previamente desnaturalizada. La detección de la sonda se realizó usando un anticuerpo acoplado a TXR que reconoce las marcas de biotina de las sondas de ADN.

9.2.7.2. Hibridación *in situ* fluorescente de ARN *Xist*

Para esta hibridación se emplearon cortes de túbulos seminíferos fijados en paraformaldehído al 4% e incluidos en parafina. Las muestras se bloquearon con glicina 100 mM y se permeabilizaron con tritón al 0.3% en PBS-DEPC y

con proteinasa K. Las muestras se post-fijaron en paraformaldehído al 4% y posteriormente se acetilaron. Inmediatamente se incubaron con 10 ng/μl de ribosonda y se hibridaron a 42°C toda la noche, al día siguiente se lavaron las muestras y la digoxigenina de la ribosonda fue detectada con un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a FITC (Apéndice 1).

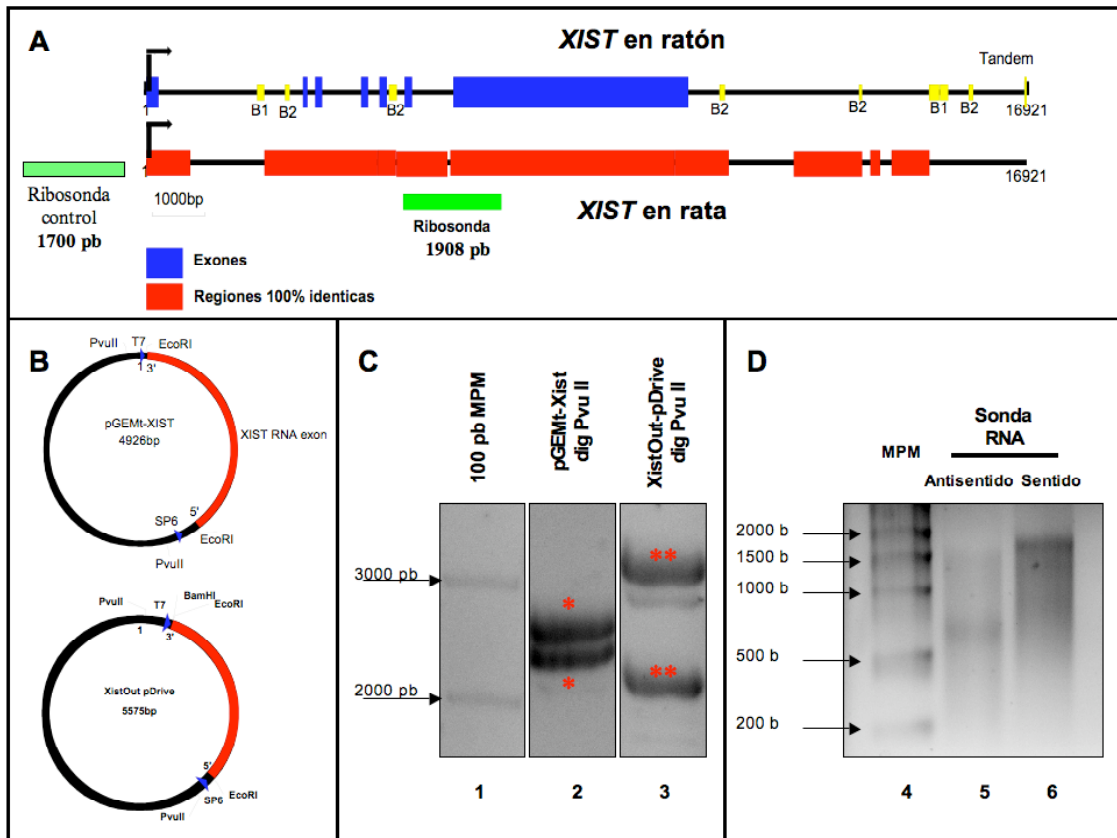


Figura 6: **A)** Identificación del gen *XIST* que codifica para el transcrito ARN *Xist* en rata a partir de su secuencia en ratón y diseño de sondas para experimentos de hibridación *in situ*. Los cuadros en azul indican los exones del gen *XIST*, mientras que los rojos indican las regiones 100% homólogas en el gen de ratón y rata. **B)** clonación de fragmentos de ADN amplificados en vectores con los promotores SP6 y T7 para la transcripción *in vitro*. **C)** Digestión enzimática con la enzima PvuII, que libera los fragmentos de ADN con los promotores para la transcripción *in vitro*. **D)** transcritos sentido y anti-sentido del gen *XIST* como resultado de la transcripción *in vitro*.

9.2.8. Inmunolocalizaciones citológicas

Para las inmunolocalizaciones citológicas se utilizaron crio-cortes, los cuales se fijaron con paraformaldehído al 1%, 2% y 4%. Se bloquearon con glicina 100 mM y se incubaron 1 hora a TA con el anticuerpo primario y 1 hora a TA con el anticuerpo secundario. Para dobles inmunolocalizaciones, se incubaron al mismo tiempo los dos anticuerpos primarios y los dos secundarios, siempre y

cuando estos estén generados en diferentes especies. Posteriormente, se lavaron con PBS y se montaron en un medio de montaje adicionado con DAPI 5 µg/ml (VECTASHELD, Santa Cruz). Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su observación. El análisis se realizó en un microscopio de epifluorescencia (Nikon) y en un microscopio con sistema APOTOME (Carl Zeiss).

9.3. Técnicas histológicas

9.3.1. Fijación e inclusión

Los ratas controles y tratadas con TSA fueron anestesiadas con cloroformo, se extirparon los testículos, se fragmentaron en pequeñas piezas, las cuales se fijaron con paraformaldehído al 4% (Baker) y con agente fijador de Bouin (Polysciences, Ing.). Después los fragmentos de túbulos seminíferos se deshidrataron e incluyeron en bloques de parafina (SIGMA).

9.3.2. Tinción de Hematoxilina-Eosina

Se utilizaron cortes de testículo fijadas con Bouin e incluidas en parafina. Los cortes se desparafinaron y se hidrataron en alcoholes graduales hasta llevarlos a agua destilada y se tiñeron con hematoxilina durante 5 minutos, se lavaron al chorro de agua corriente (las sales del agua corriente sirven para virar de color la hematoxilina). Posteriormente se deshidrataron hasta alcohol al 70% y se tiñeron con Eosina alcohólica durante 1 minuto, se continuó con la deshidratación, se aclararon las muestras en xilol, se montaron con resina sintética de entellan y se observaron en un microscopio óptico provisto con una cámara digital.

9.3.3. Ensayo para evaluar muerte celular

Para evaluar la muerte celular por apoptosis se realizó un ensayo de TUNEL (terminal dUTP nick-end labeling). Para lo cual, se desparafinaron las muestras de testículo incluidas en parafina y se pre-trataron con una solución de proteinasa K, posteriormente se incubaron con el amortiguador de equilibrio y luego con la enzima deoxinucleotidil terminal transferasa (TdT), que añade catalíticamente trifosfatos marcados a los extremos 3'-OH terminales de las

cadena dobles o sencillas del ADN, producidas por la reacción de muerte celular por apoptosis. Posteriormente, mediante una inmunolocalización se detectaron a los trifosfatos marcados y añadidos *in vitro* (Apéndice 1). Las preparaciones se observaron en un microscopio epifluorescente.

9.4. Procesamiento del material biológico para microscopía electrónica

Se utilizaron testículos de ratas machos controles y tratadas con TSA. Se anestesiaron con cloroformo y se extirparon los testículos, los cuales se descapsularon, se cortaron fragmentos de aproximadamente 1 mm³ de tamaño y se procesaron para diferentes fijaciones.

9.4.1. Fijación en glutaraldehido

Se colocaron las muestras de testículos en una gota de glutaraldehido al 2.5% sobre una placa de cera y se seccionaron en fragmentos de 1 mm³, posteriormente se pasaron a frascos con glutaraldehido al 2.5 % en amortiguador de fosfatos pH 7.3 a una concentración 0.2 M durante una hora y media a TA (Vázquez-Nin y Echeverría, 2000).

9.4.2. Fijación en paraformaldehido

Algunas de las muestras de testículos se fijaron en paraformaldehido al 4% durante una hora a temperatura ambiente (Vázquez-Nin y Echeverría, 2000).

9.4.3. Lavados y deshidratación

Después de fijadas las muestras se lavaron con amortiguador de fosfatos, tres veces durante 10 minutos cada lavado. En este paso las muestras se separaron en dos, para inclusión en resina epóxica y en resinas acrílicas.

9.4.4. Preinclusión para resina epóxica

Las muestras se deshidrataron con alcoholes etílicos hasta llegar al alcohol absoluto seguido de óxido de propileno como paso para preinclusión (Vázquez-Nin y Echeverría, 2000). Posteriormente se pasaron a una mezcla del agente intermediario (óxido de propileno) con la resina epóxica de inclusión y posteriormente se cambiaron las muestras hacia resina pura (Vázquez-Nin y Echeverría, 2000).

Nota: el óxido de propileno es el agente intermediario que permite una deshidratación más completa a la vez que es disolvente de la resina, lo que permite la sustitución del agua por la resina de inclusión en los espacios intermoleculares (Vázquez-Nin y Echeverría, 2000).

9.4.5. Inclusión

La inclusión se realizó en resina epóxica, las muestras se colocaron en moldes llenos de la misma y se polimerizaron en una estufa a 60°C durante 48 horas (Vázquez-Nin y Echeverría, 2000).

9.4.6. Corte

Una vez polimerizados los bloques se realizaron cortes semifinos (microtomo, Leica Ultracut R) de 400 a 600 nm, los cuales se colocaron en un portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina-bórax y después se observaron en el microscopio óptico con el fin de localizar las etapas con las células deseadas, es decir, en pre-paquiteno y paquiteno (etapas III a XIII de la onda espermatogénica; Austin y Short, 1982). Una vez identificada la etapa adecuada se devastó el bloque en forma de pirámide con la muestra en la punta para poder realizar cortes ultrafinos en el microtomo de aproximadamente 60 nm (Vázquez-Nin y Echeverría, 2000). Se obtuvieron cortes ultrafinos seriados los cuales se recogieron en una rejilla de cobre con una ranura en el centro, la cual posteriormente se colocó sobre una membrana de formvar; además se obtuvieron cortes aislados que se recogieron en una rejilla de cobre con múltiples barrotes previamente cubierta con membrana de formvar. Todas las rejillas se contrastaron (Vázquez-Nin y Echeverría, 2000).

9.4.7. Contraste

Después de obtener los cortes ultrafinos colocados sobre las rejillas de cobre se procedió al contraste con compuestos químicos de elevado número atómico, como el acetato de uranilo y el citrato de plomo. Esta tinción es general y contrasta proteínas y ácidos nucleicos (Vázquez-Nin y Echeverría, 2000). Posteriormente, las muestras colocadas sobre rejillas de cobre se observaron con un microscopio electrónico de transmisión (Jeol 1010) y se tomaron micrografías para la interpretación de los resultados.

9.4.8. Hibridación *in situ* ultraestructural

Los cortes se montaron en una rejilla de níquel cubierta con formvar, se trataron con un solución de RNasa a 37°C por 1 hora y se enjuagaron 2 veces con 2XSSC. El ADN de la muestra fue desnaturalizado con NaOH, pH 12 por 30 min. Después las rejillas se enjuagaron tres veces con PBS. La sonda representativa de las secuencias repetidas (LINE-M8) se colocó sobre las rejillas y la hibridación se realizó a 40°C toda la noche en una cámara húmeda. Para la detección de la sonda, se incubaron las rejillas con estreptavidina acoplada a oro coloidal de 10 nm (SIGMA) a 37°C por 30 min. Finalmente las rejillas se contrastaron con acetato de uranilo por 10 min. seguido de citrato de plomo por 5 min. Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión (Jeol 1010).

9.4.9. Amina de Osmio para contrastar ADN

Para el contraste específico de ADN, se usó el procedimiento de amina de osmio (Cogliati y Gautier, 1973). Brevemente, los cortes se recogieron en una rejilla de oro sin membrana, a los cuales se dió un tratamiento con HCl 5N durante 45 minutos para hidrolizar el ADN de las muestras y se contrastó con una solución de amina de osmio durante toda la noche.

Nota: Detalles de los procedimientos usados en este trabajo se encuentran en apéndice I.

10. Resultados

10.1 Complejo sinaptonémico

En estudios bioquímicos previos se aislaron 4 secuencias de ADN repetidas asociadas al CS de ratones (Pearlman et al., 1992). Por otra parte, nuestro grupo ha reportado la presencia de ADN dentro del espesor de los ELs del CS (Vázquez-Nin et al., 1993; Ortiz et al., 2002); estas observaciones sugieren que secuencias de ADN interactúan con los componentes del CS. Por lo tanto, la caracterización sistemática de estas secuencias permite un mejor entendimiento de la organización de los cromosomas meióticos.

10.1.1 Secuencias de ADN altamente repetidas en el genoma de la rata se asocian a la proteína del elemento lateral SYCP3

Con la finalidad de aislar y caracterizar las secuencias de ADN asociadas al CS, se adecuó la técnica de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) previamente reportada (Tomada y modificada de Spencer et al., 2003). El ADN aislado de esta forma fue purificado, clonado y mandado a secuenciar. Se obtuvieron 100 secuencias independientes de ADN (Apéndice 2), cuya característica principal es que corresponden únicamente a secuencias del tipo de las repetidas, presentes en el genoma de los eucariontes (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). La mayoría de estas secuencias corresponden a secuencias repetidas derivadas de elementos transponibles, de las cuales 39 son elementos interdispersos largos (LINE) (39%), 20 son elementos interdispersos cortos (SINE) (20%), 22 son repetidas directas terminales largas (LTRs) (22%) y 6 corresponden a elementos de ADN transponible (6%). También, se encontraron secuencias repetidas simples representadas por 3 repetidas satelitales (3%) y por 10 repetidas simples (SSR) (10%) (Tabla 4 y Figura 7). Es importante resaltar que en nuestro universo de 100 secuencias no se encontraron secuencias codificantes (0%) ni secuencias no-codificantes únicas (0%) (Figura 7A y B). Una de las secuencias caracterizadas en este trabajo corresponde a una de las secuencias previamente reportadas por el grupo de Peter Moens (Pearlman et al., 1992), la cual fue aislada mediante una estrategia experimental y que reporta ADN asociado a CS (Secuencia M2 en Apéndice 2).

Tabla 4: Clasificación de secuencias repetidas asociadas a SYCP3 (de acuerdo a International Human Genome Sequencing Consortium, 2001) y distribución en el genoma de la rata (de acuerdo a las bases de datos)

Clase y familia de secuencias repetidas IPs		Frecuencia en ChIP con anti-SYCP3 (n=100)	Distribución en el genoma de rata
Secuencias repetidas derivadas de elementos transponibles			
LINE	Familia L1	39	Ampliamente distribuida, en regiones intergénicas
SINE	Familia <i>Alu</i>	8	Ampliamente distribuida, en regiones intergénicas e intrónicas
	Familia ID	1	Ampliamente distribuida, en regiones intergénicas e intrónicas
	Familia MIR	4	Ampliamente distribuida, en regiones intergénicas e intrónicas
	Familia B1-B4	7	Ampliamente distribuida, en regiones intergénicas e intrónicas
LTR		22	Ampliamente distribuida, en regiones intergénicas
ADN transponible		6	Distribución media
Secuencias repetidas simples (SSR)			
Repetidas satelitales		3	Distribución centromérica y sub-telomérica
Repetidas simples		10	Distribución media

10.1.2. Las secuencias repetidas asociadas al elemento lateral del complejo sinaptonémico se distribuyen ampliamente en el genoma de la rata

Para que un cromosoma se asocie a la estructura proteica del CS, es necesario que tenga varios sitios de anclaje en toda su longitud; por lo tanto, mediante el uso de bases de datos, se buscó la distribución que tienen las secuencias repetidas aisladas con el anticuerpo anti-SYCP3 en el genoma de la rata. Para este análisis decidimos mapear una secuencia repetida representativa de cada una de las principales secuencias repetidas asociadas al EL del CS. Así, la secuencia repetida LINE-M8 se encuentra en regiones intergénicas y frecuentemente enmarcando a grupos de genes en todos los cromosomas de

la rata, por ejemplo; en un fragmento de 5 mega pares de bases del cromosoma 5, LINE-M8 se encuentra enmarcando a un grupo de genes (Figura 8A). Mientras que la secuencia SINE-M9 se encuentra en regiones intergénicas pero también en secuencias intrónicas de varios genes, como lo es en el caso del intrón del gen Cspg4 en el cromosoma 8 del genoma de la rata (Figura 8B). Por otra parte los LTRs se distribuyen de la misma forma que las secuencias LINE, es decir, en regiones intergénicas. En un fragmento del cromosoma 1, la secuencia LTR-M53 se localiza enmarcando genes y grupos de genes (Figura 8C). Las secuencias repetidas satelitales, se encuentran confinadas a regiones centroméricas y sub-teloméricas, como lo es el caso de la secuencia satelital M-68, que se localiza en la región centromérica del cromosoma 6 (Figura 8D). La distribución y alta frecuencia de estos elementos repetidos asociados al EL del CS, concuerda con la idea que propone que este tipo de secuencias representan los sitios de anclaje del cromosoma al EL del CS (Figuras 8E y 14).

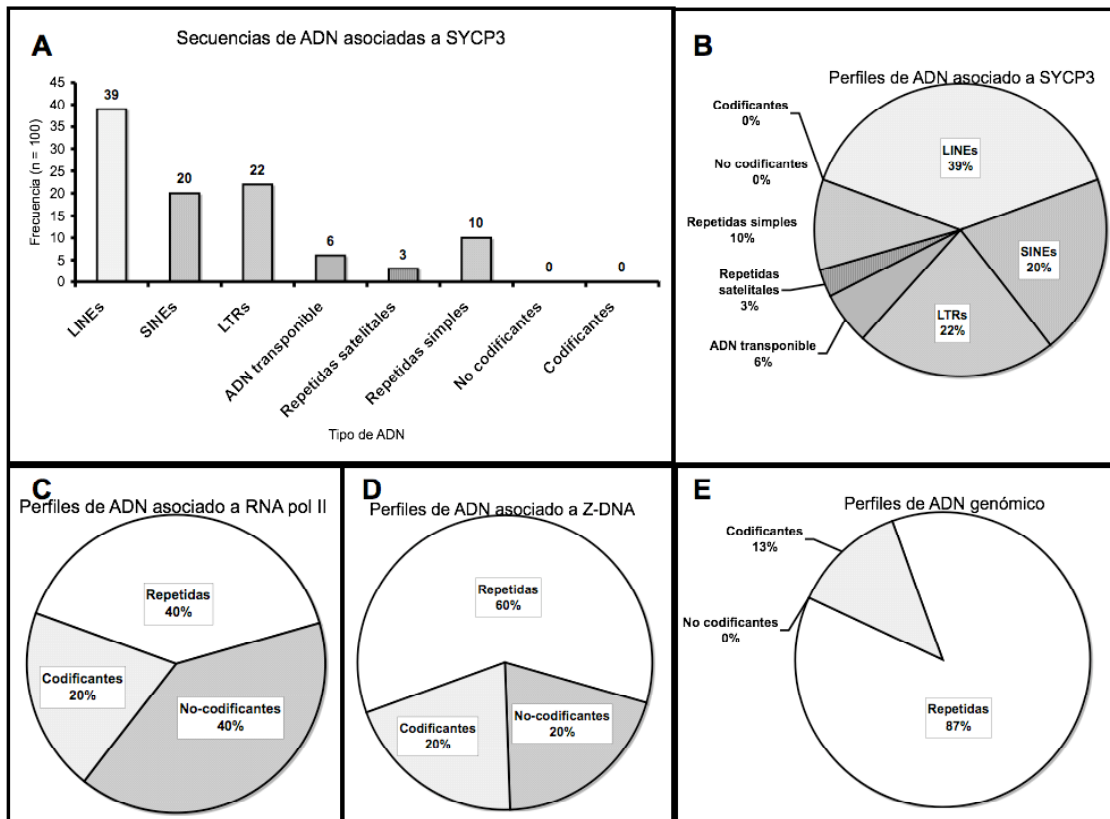


Figura 7: A) El análisis bioinformático reveló que las secuencias asociadas a los ELs son únicamente del tipo de las repetidas en el genoma de los roedores. De 100 secuencias analizadas, 39 son LINE, 20 son SINE, 22 son LTR, 6 son elementos de ADN transponible, 3 son repetidas satelitales y 10 son repetidas simples. No hay secuencias codificantes, ni

secuencias no-codificantes únicas asociadas a SYCP3. **B)** Perfiles de secuencias asociadas a los ELs de los CSs. **C)** Perfiles de secuencias inmunoprecipitadas con anti-RNA polimerasa II. **D)** Perfiles de secuencias inmunoprecipitadas con anti-Z-DNA. E, perfiles de secuencias en la “cromatina Input” correspondiente a ADN genómico.

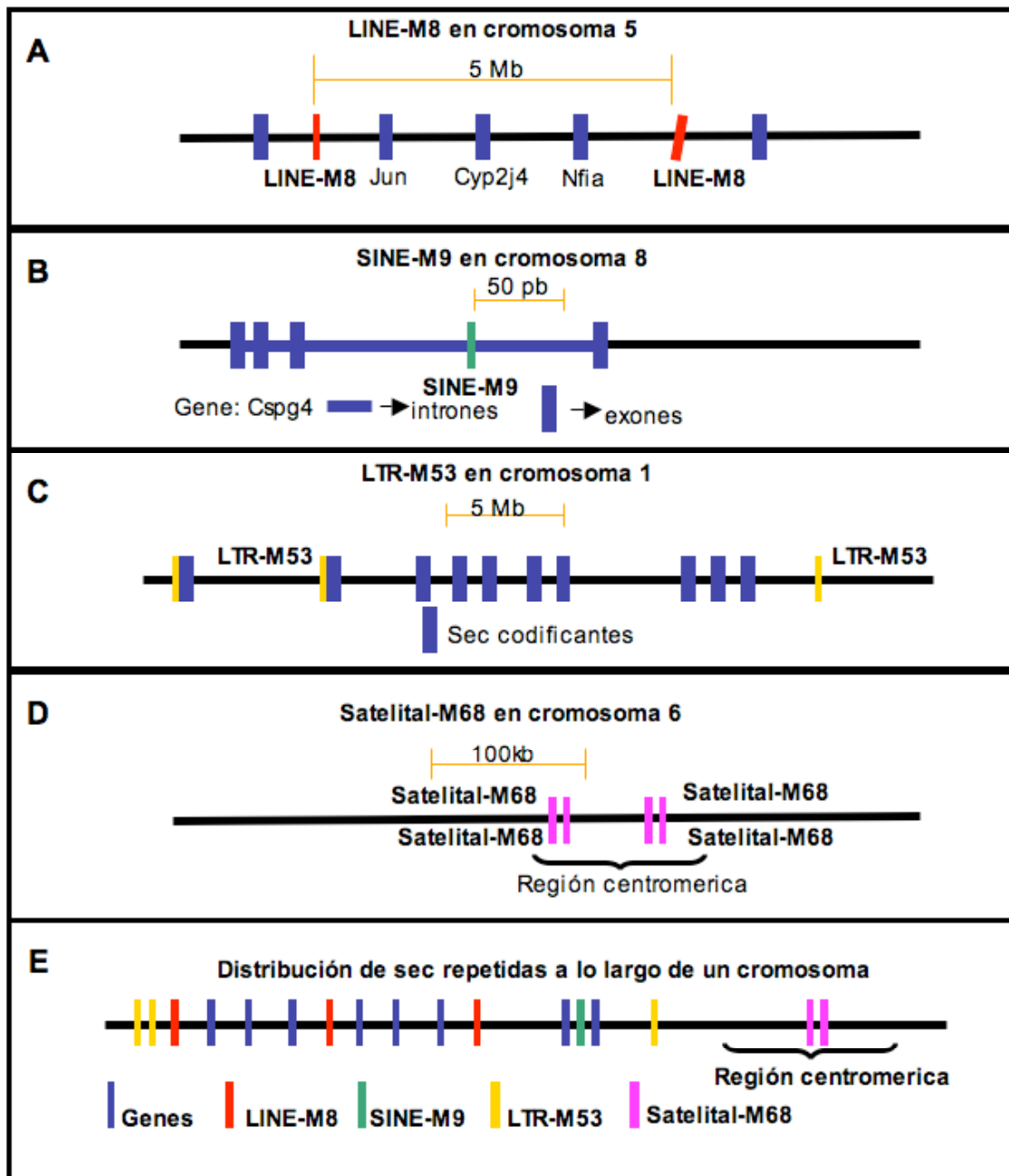


Figura 8: Esquemas indicando la localización de secuencias repetidas representativas, en los cromosomas mediante un BLAT en el genoma de rata, usando la base datos de Santa Cruz en la Universidad de California (UCSC) (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) y mediante un BLAST en el Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). **A)** Uno de los elementos correspondientes a la secuencia LINE-M8 se localiza en regiones intergénicas y enmarcando secuencias codificantes, como en el cromosoma 5, en donde la secuencia repetida enmarca una región de 5 megabases (Mb) que contiene 3 genes. **B)** Algunos de los elementos correspondientes a la secuencia aislada SINE-M9 se encuentran en regiones intergénicas así como en intrones; por ejemplo un elemento de la secuencia SINE-M9 se encuentra en el intrón del gen proteoglicano condroitín-sulfato 4. **C)** Elementos de la secuencia LTR-M53 están en regiones intergénicas y enmarcando secuencias codificantes. **D)** Los elementos

correspondientes a la secuencia satelital M-68 están confinados a los dominios centroméricos y sub-teloméricos. E) Distribución de las secuencias repetidas identificadas a lo largo de un cromosoma.

10.1.3. La cromatina inmunoprecipitada con anti-SYCP3 es específica de su asociación *in vivo*

Debido a que las secuencias repetidas de roedores representan el 44% del total de su genoma (Martens et al., 2005), la inmunoprecipitación de secuencias repetidas en nuestro sistema de estudio, puede deberse a su enriquecimiento en el genoma de la rata. Por lo tanto, cualquier anticuerpo usado para las IPs tiene la misma probabilidad de recuperar secuencias repetidas. Para validar nuestro sistema de ChIP, realizamos inmunoprecipitaciones de cromatina usando un anticuerpo que reconoce a la RNA polimerasa II (RNA pol II), por lo tanto ADN en transcripción y un anticuerpo que reconoce la conformación Z del ADN (Z-DNA), esta estructura es característica del ADN recién transcrito (Cerna et al., 2004). El ADN inmunoprecipitado con estos anticuerpos y el ADN de la cromatina inicial (Input) fue clonado y secuenciado. De esta forma, se obtuvieron los perfiles del ADN asociado a los diferentes anticuerpos controles y a la cromatina "Input" sin inmunoprecipitar (ADN genómico). Los análisis de las secuencias asociadas a los diferentes anticuerpos reflejan la presencia de todos los tipos de ADN presentes en el genoma, así para la cromatina asociada a RNA pol II los perfiles demuestran que el 20% son secuencias codificantes, 40% secuencias repetidas y el 40% restante son secuencias no-codificantes únicas. Para el ADN en conformación Z, el 20% corresponde a secuencias codificantes, el 60% a secuencias repetidas y el 20% restante a secuencias no codificantes únicas (Figura 7C, D, respectivamente). Estos perfiles indican que la inmunoprecipitación de secuencias específicas con los diferentes anticuerpos, se debe a la asociación ADN-proteína y no a un efecto producido por los porcentajes de secuencias en el genoma, de ser así, las secuencias repetidas estarían enriquecidas con el uso de cualquier anticuerpo. Estos controles reflejan la especificidad de la asociación de secuencias repetidas con la proteína SYCP3 presente en los ELs del CS. Por otra parte, los perfiles obtenidos de la secuenciación de fragmentos de cromatina obtenidos sin alguna especificidad (ADN genómico o Input), indican que el 13% son

secuencias codificantes y el 67% restante son secuencias repetidas (Figura 7E). El enriquecimiento de secuencias repetidas en este control, indica que el secuenciar ADN al azar, produce enriquecimientos debidos a las altas concentraciones de ADN repetido en el genoma. Estos controles validan nuestro ensayo de ChIP y apoyan el resultado de que el ADN asociado a la proteína específica de la meiosis SYCP3, presente en los ELs del CS, pertenece únicamente a secuencias repetidas.

10.1.4. Las secuencias repetidas inmunoprecipitadas con anti-SYCP3 están enriquecidas en el elemento lateral

Para comprobar el enriquecimiento de secuencias repetidas asociadas a los ELs, las cuales hemos nombrado LEARS (por sus siglas en inglés: Lateral Elements Associated Repeat Sequences), fue necesario realizar una corroboración semi-cuantitativa. Para lo cual se diseñaron oligonucleótidos con el objetivo de amplificar de manera específica las LEARS (LINE-, SINE- LTR- y Satelitales) y como control una secuencia codificante (Actina). Se analizó el enriquecimiento de las LEARS en los ELs mediante PCRs radioactivas dúplex, que permiten cuantificar el enriquecimiento de las LEARS en la cromatina inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-SYCP3.

Para realizar una correcta semi-cuantificación de los productos de PCR, fue necesario demostrar en la misma reacción de PCR el enriquecimiento de LEARS con respecto a la secuencia codificante. Para lo cual, se diseñó la reacción de PCR de tal forma que la relación del producto de la LEARS y de la secuencia codificante fuera cercano a uno, usando ADN genómico como templado (Figura 9). Una vez estandarizadas las concentraciones de oligonucleótidos, se realizaron las PCRs dúplex radioactivas usando como templados la cromatina IP con el anticuerpo anti-SYCP3 y con un anticuerpo que reconoce IgGs, como un anticuerpo inespecífico. La amplificación de las secuencias repetidas representativas y la secuencia codificante fue realizada dentro del rango lineal de amplificación de las mismas, para evitar saturaciones de producto en las reacciones de PCR (columnas 1-4 en geles de Figura 10). El enriquecimiento de las secuencias repetidas en la cromatina asociada a la proteína SYCP3 de los ELs, se normalizó dividiendo el cociente de la relación

repetida/codificante en la fracción SYCP3 entre el cociente de la misma relación pero en la fracción unida al anticuerpo inespecífico (IgG). Por lo tanto, un valor normalizado por encima de 1 indica un enriquecimiento significativo. De esta forma, la secuencia repetida LINE-M44 está 1.23 veces enriquecida en la cromatina asociada a la proteína SYCP3, mientras que las secuencias SINE-M9, LTR-M157 y satelital M-68 están enriquecidas a razón de 1.24, 1.24 y 1.65, respectivamente (gráfica en Figura 10). Por lo tanto, estos resultados semi-cuantitativos demuestran que las LEARS están enriquecidas en el EL del CS, sin embargo estos datos no nos dan indicios de la relación estructural que mantienen estas secuencias con los componentes del CS.

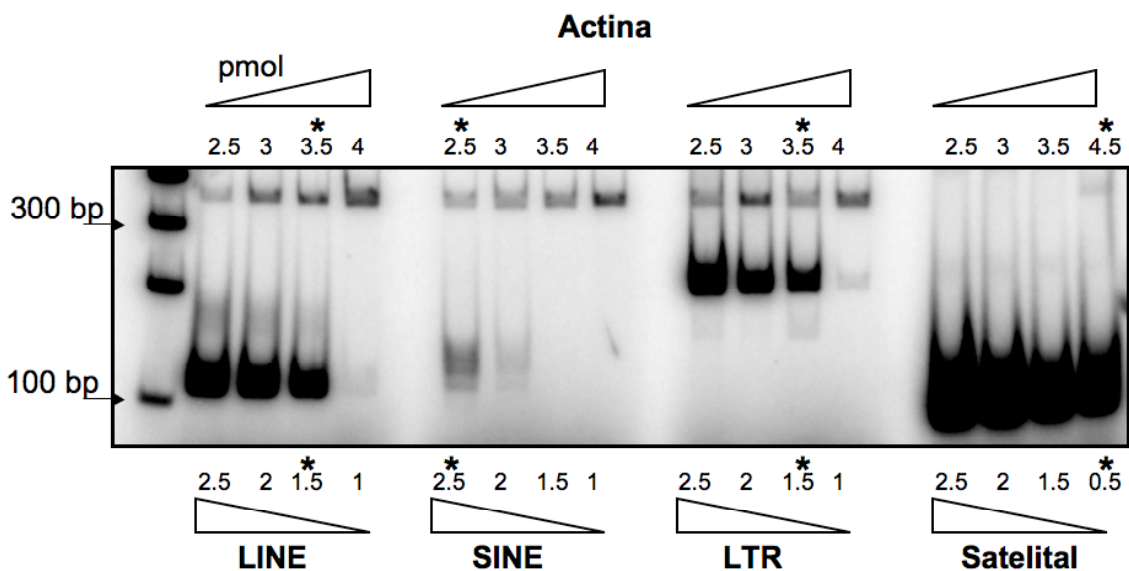


Figura 9: Establecimiento de las condiciones óptimas para la realización de las PCRs dúplex radioactivas. Las reacciones se estandarizaron de tal forma que la relación entre los productos de amplificación de las secuencias repetidas y la secuencia codificante fuera cercana a 1. Los asteriscos muestran la concentraciones de los oligonucleótidos, en picomoles (pmol), que fueron usadas en los ensayos de PCRs.

10.1.5. Las secuencias repetidas están asociadas a los elementos laterales del complejo sinaptonémico

Con el fin de analizar la relación que guardan las secuencias repetidas con respecto a los CSs, se realizaron hibridaciones *in situ* fluorescentes acopladas a inmunolocalizaciones (Inmuno-FISH) e hibridaciones *in situ* ultraestructurales (HISU), usando como sondas algunas de las secuencias aisladas. De esta forma, se analizó la distribución de las secuencias repetidas con respecto a los

CSs (Figura 11) y a los ELs (Figura 13). Para la detección de los CSs, se empleó el anticuerpo que reconoce a la proteína SYCP3 y elegimos a las secuencias SINE-M9 y LINE-M8 como sondas representativas para las hibridaciones *in situ*. Como sonda control utilizamos una secuencia repetida, que no fue aislada mediante nuestros ensayos de IP, pero que se encuentra igualmente enriquecida en el genoma de la rata. Dicha secuencia repetida, se llama RNA pequeño citoplasmático (ScRNA) y se obtuvo de las bases de datos del genoma de rata (www.genome.ucsc.edu/).

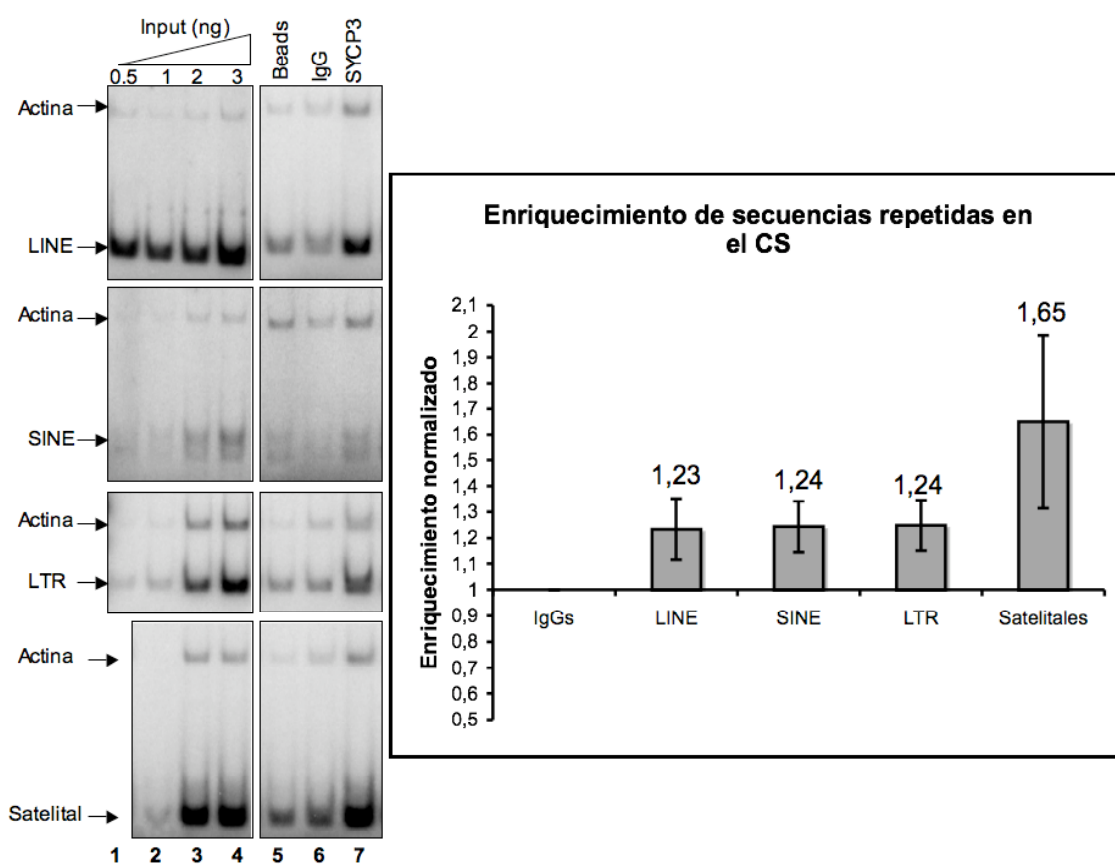


Figura 10: PCRs dúplex radioactivas y su cuantificación. Con el fin de obtener el rango lineal de amplificación se realizaron PCRs dúplex de las secuencias repetidas (LINE-, SINE-, LTR- y Satelitales) con la secuencia codificante (Actina) usando como templado diferentes concentraciones de ADN genómico (Input) (columnas 1-4). Una vez obtenido el rango lineal, las PCRs dúplex se realizaron usando como templado la cromatina IP con anti-SYCP3 (columna 7), un anticuerpo inespecífico (IgG, columna 6) y con el agente de inmunoprecipitación (Beads, columna 5). El enriquecimiento de las secuencias repetidas en la cromatina unida a SYCP3 se normalizó dividiendo el cociente de la relación repetida/codificante en la fracción SYCP3 entre el cociente de la misma relación pero en la fracción unida al anticuerpo inespecífico (IgG). Por lo tanto, un valor normalizado por encima de 1 es enriquecimiento significativo. El eje de las X está trazado en el valor de 1, por encima de este eje, es un valor significativo. Las PCRs se realizaron por triplicado y de tres diferentes ensayos de CHIP. Las barras de error estándar se muestran en la gráfica.

Una vez marcadas las sondas, se realizaron los ensayos de Inmuno-FISH, los cuales se observaron en un microscopio de epifluorescencia y en un microscopio epifluorescente con sistema APOTOME para realizar cortes ópticos y definir posibles co-localizaciones. Al utilizar las sondas LINE-M8 y SINE-M9, la señal se observó en forma de estructuras parecidas a cintas, en la gran mayoría de los núcleos paquiténicos (Flechas en Figura 11D, G), dichas estructuras corresponden a los CSs ya que fueron teñidas con el anticuerpo anti-SYCP3 (Flechas en Figura 11F e I). También se observó señal de hibridación en la cromatina que rodea a los CSs (cabezas de flecha en Figura 11F e I). Por el contrario, la sonda de la secuencia ScRNA no colocaliza con la señal de SYCP3 (Figura 11J-O). Por otra parte, en células pre-paquiténicas, cuando apenas se distinguen pequeños puntos asociados a SYCP3, la sonda SINE-M9 presenta un patrón difuso en todo el núcleo y no se observa en estructura en forma de cintas (Figura 11A-C).

Debido a que las secuencias repetidas, usadas para generar las sondas para la hibridación, se encuentran dentro de un vector de clonación y este podría producir una señal inespecífica; se usó como control adicional al vector de clonación vacío como sonda y sólo se detectó una ligera señal, que representa el ruido de fondo producido de manera inespecífica (Figura 12A-C). Por otra parte, para descartar la posibilidad de un escape de señal del filtro verde al filtro rojo, se utilizó un núcleo marcado con anti-SYCP3-FITC (sin sondas de hibridación) y se capturaron imágenes tanto en el filtro verde como en el rojo, con las mismas condiciones de exposición que las usadas en los ensayos de Inmuno-FISH. Con la realización de estos controles, concluimos que la señal de hibridación de las sondas LINE-M8 y SINE-M9 es específica y no debido a un traslape de señales en los filtros del microscopio (Figura 12D-F).

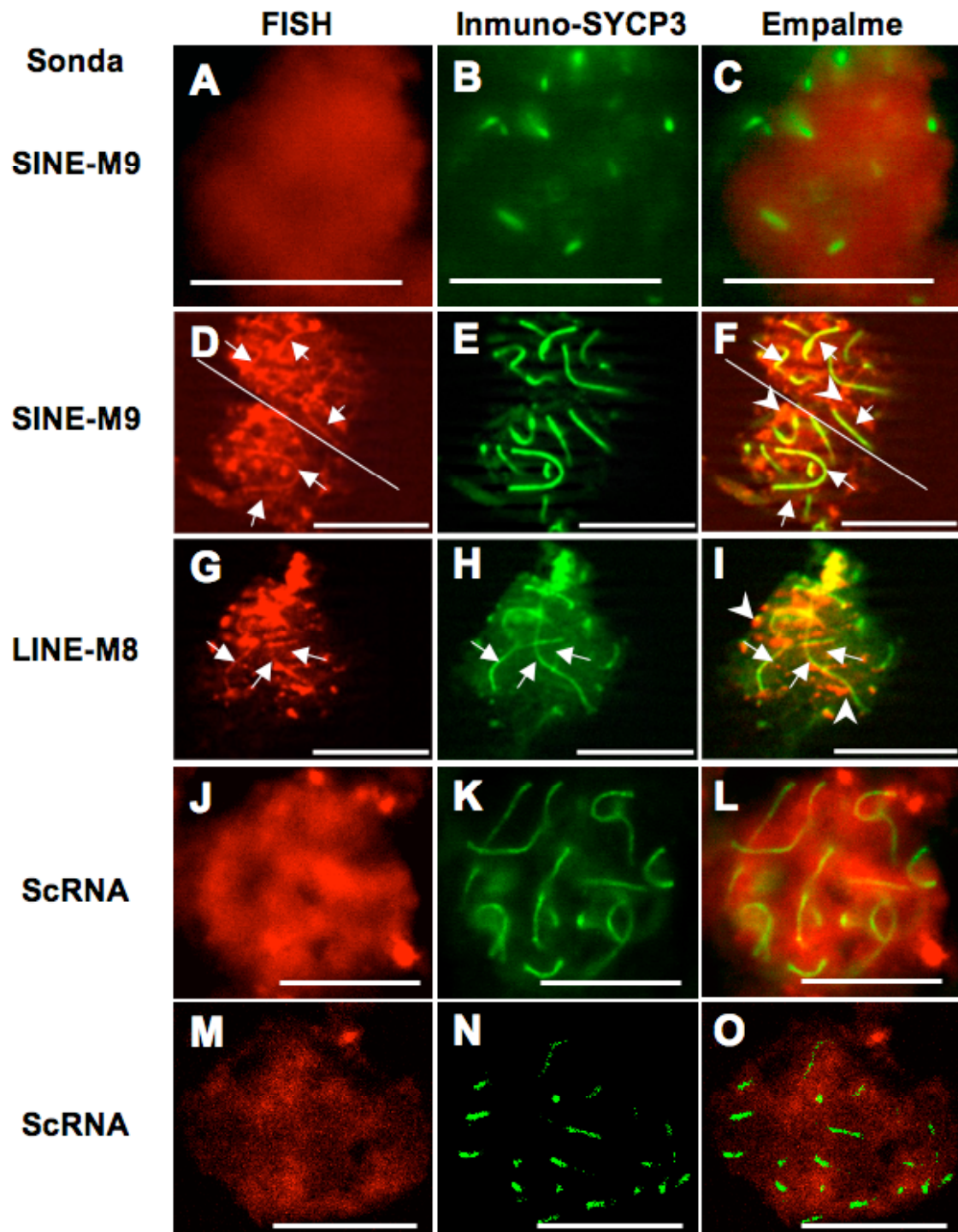


Figura 11: Imágenes epifluorescentes y cortes ópticos del Inmuno-FISH realizado en células paquiténicas de rata. Como sondas de hibridación se usaron las secuencias aisladas SINE-M9, LINE-M8 y como control negativo la secuencia repetida ScRNA (rojo). Los ELs de los CSs fueron marcados con el anticuerpo anti-SYCP3 (verde). **A-C)** Imágenes epifluorescentes de una célula pre-paquitética usando la sonda SINE-M9, la señal es difusa y no se observan estructuras en forma de cintas. **D-F)** La sonda SINE-M9 se asocia con estructuras lineares en forma de hilos (flechas en D) las cuales corresponden a las estructuras teñidas con el anticuerpo anti-SYCP3 (flechas en E) y al realizar un empalme se observa una colocación de ambas señales (flechas en F). **G-I)** la sonda LINE-M8 también se encuentra colocación con las estructuras que corresponden a los CSs, teñidos con el anticuerpo anti-SYCP3 (flechas en I). Tanto las secuencias LINE como las SINE se asocian con la cromatina que rodea los CSs, como es evidenciado por la señal roja difusa (cabezas de flecha en F, I). **J-L)** imágenes epifluorescentes de la células paquiténicas hibridadas con la sonda ScRNA, donde se observa

la señal de hibridación rodeando los ELs de los CSs, pero no colocalizando con ellos. **M-O)** en un corte óptico de esta hibridación se observa que no hay señal de la sonda ScRNA que colocalice con los CSs. Las barras blancas en cada imagen representan una escala de 10 μm .

Estos resultados demuestran que la secuencias repetidas se asocian de manera altamente específica a las estructuras en forma de cinta en la etapa de paquiteno, al tiempo que se aprecia el CS y que las secuencias repetidas son reclutadas en el CS y una porción de estas secuencias permanecen difusamente distribuida en todo el núcleo, sugiriendo un mecanismo de reclutamiento de sólo algunas, y no todas, las secuencias repetidas distribuidas a lo largo del genoma.

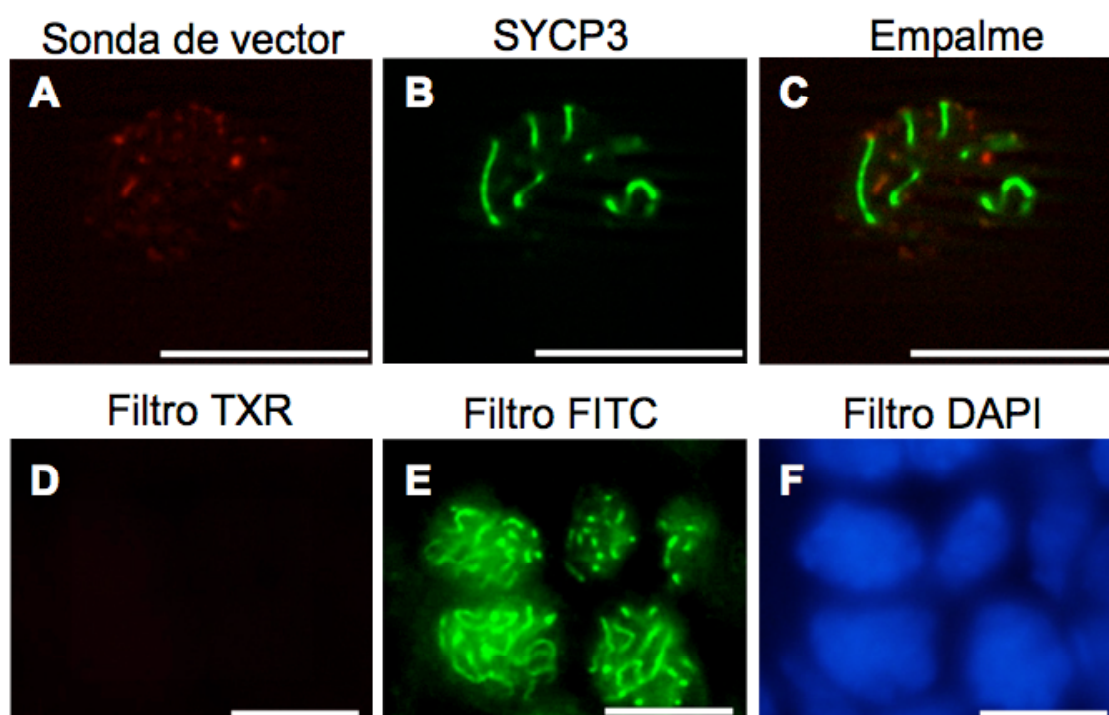


Figura 12: Controles de fluorescencia. **A-C)** como control negativo se usó una sonda del vector de clonación vacío y se hibridó en células paquiténicas. **D-F)** para eliminar una posible difusión de la longitud de onda del fluoróforo FITC (verde) en el filtro del fluoróforo TXR (rojo), se realizó una inmunolocalización de la proteína SYCP3, la cual fue fotografiada tanto en el filtro FITC como en el filtro TXR, bajo las mismas condiciones de exposición que en A-C y no se observó ninguna difusión de señales. Las barras blancas en cada imagen representan una escala de 10 μm .

10.1.6. Análisis ultraestructural de la asociación de las secuencias repetidas con los elementos laterales

Para analizar de manera estructural la asociación de las secuencias repetidas con los componentes del CS, se realizó una hibridación *in situ* ultraestructural (HISU), usando la secuencia LINE-M8 como sonda. La señal de hibridación

colocaliza con los ELs del CS (flechas en Figura 13A-C). La señal de hibridación es más evidente sobre los ELs, en un corte transversal de éstos, debido a una mayor accesibilidad del ADN asociado a los ELs en la superficie del corte (Figura 13E y F). Estos resultados son consistentes con el hecho de que las secuencias repetidas están involucradas en el anclaje de los cromosomas al EL del CS.

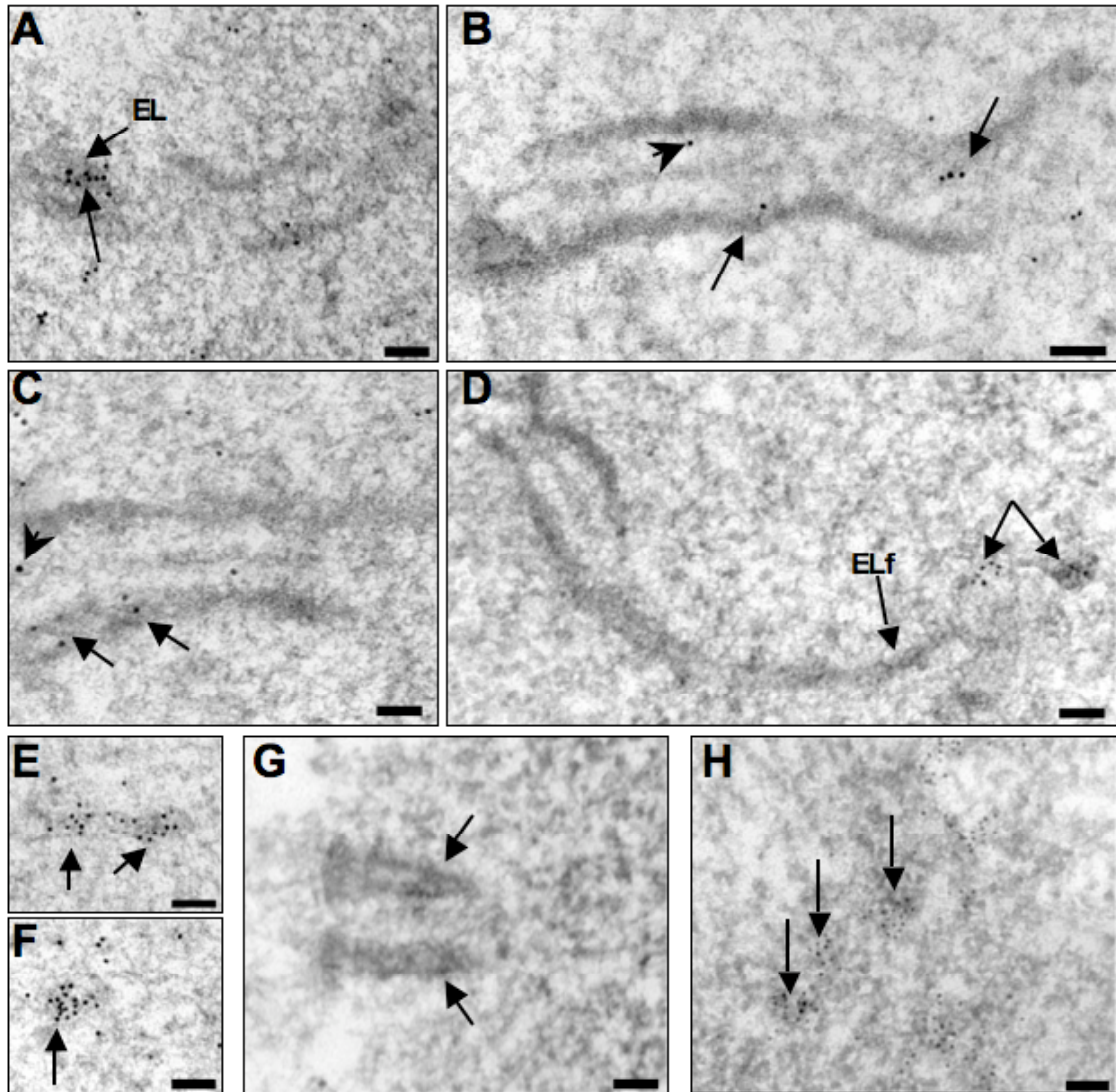


Figura 13: Micrografías electrónicas de hibridaciones *in situ* ultraestructurales. Como sonda se usó la secuencia LINE-M8 acoplada a oro coloidal de 10 nm de diámetro. **A-C)** La señal se observa sobre los ELs del CS (flechas). Algunas señales de hibridación se asocian a asas de cromatina que invaden la región central del CS desde los ELs (cabezas de flecha en B, C). **D)** La marca de hibridación también se encuentra asociada a los ELs en formación (flechas). **E-F)** Cortes transversales de ELs, los cuales están densamente marcados con oro coloidal. **G)** Cuando se usó al vector de clonación vacío como sonda de hibridación, no se observó señal en los componentes del CS (flechas). **H)** Las partículas de oro también se encuentran en cúmulos de heterocromatina en células pre-paquiténicas. Las barras representan una escala de 100nm.

Una de las observaciones más contundentes, fue la distribución de las partículas de oro las cuales se encuentran sobre estructuras menos contrastadas en contacto con los altamente contrastados ELs, en etapas donde los ELs se están formando (flechas en Figura 13D). Además se observó la señal de hibridación en asas de cromatina que invaden la región central del CS desde los ELs (cabezas de flecha en Figura 13B y C); por lo tanto, estas secuencias podrían tener funciones diferentes a la de anclar la cromatina al EL. Las secuencias repetidas de roedores se encuentran en forma de heterocromatina (Martens et al., 2005), lo cual es consistente con la presencia de señal de hibridación en grumos de heterocromatina en células prepaquiténicas (Figura 13H). En el control de hibridación no se detectó marca en ninguno de los componentes del CS (Figura 13G). Estos resultados demuestran que las LEARS se asocian al EL, probablemente anclando los cromosomas al andamiaje proteico del CS. Pero además estas secuencias se encuentran en asas de cromatina que invaden la región central del CS, lo que nos hace pensar en una función en la recombinación meiótica, que tiene lugar en los nódulos de recombinación.

10.1.7. Modelo de anclaje de las secuencias repetidas al elemento lateral del complejo sinaptonémico

Tomando en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento, proponemos un modelo para entender el andamiaje ADN-proteína del CS. (Figura 14). En este modelo, las secuencias repetidas que se encuentran distribuidas ampliamente a lo largo del genoma de rata, se agrupan justo al inicio de la etapa paquiténica, para de alguna forma aún no clara, incorporarse a los ELs del CS al tiempo de su constitución. De esta manera un sub-grupo de secuencias repetidas (LEARS) están funcionando como puntos de anclaje de los cromosomas al CS. Es importante mencionar que algunas de estas secuencias se observan en pequeñas asas que se extienden hacia la región central del CS, lo cual sugiere una segunda función relacionada con la recombinación meiótica producida por entrecruzamientos. Por lo tanto y como contribución original de este trabajo, proponemos que las secuencias repetidas LEARS tienen la función de estructurar a los cromosomas sobre el andamiaje proteico del CS. Además, consideramos que algunas de estas secuencias

están participando en la recombinación meiótica y en el entrecruzamiento de material genético (Figura 14).

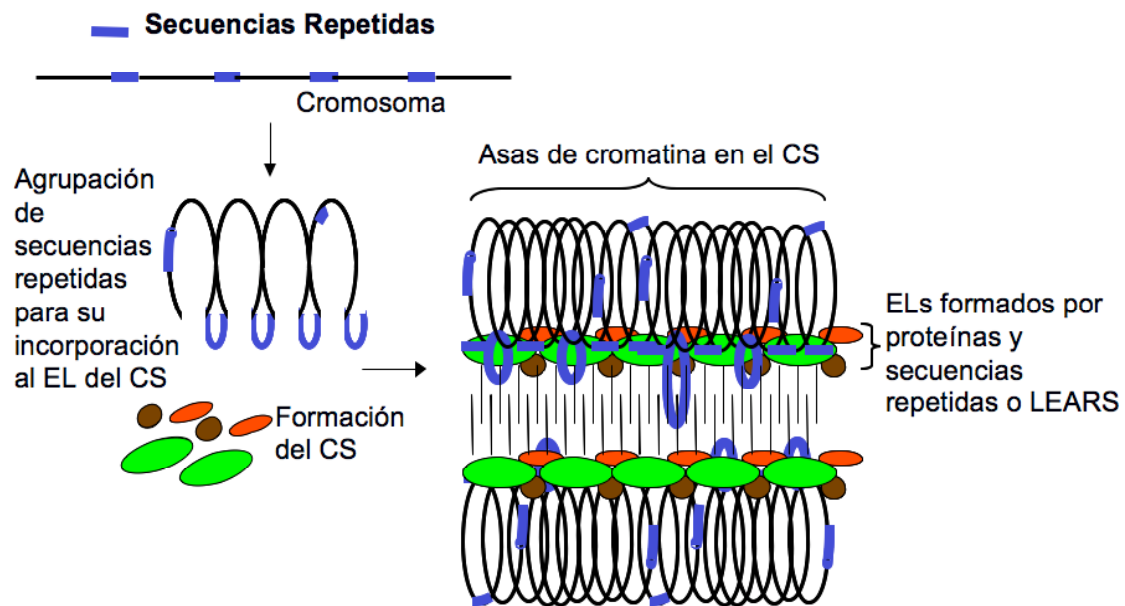


Figura 14: Modelo del andamiaje proteína-ADN del CS en espermatocitos paquiténicos de rata. Las secuencias repetidas (representadas por líneas azules) se encuentran ampliamente distribuidas a través del genoma de la rata, algunas de las cuales (LEARS, "Lateral Element Associated Repeat Sequences") son reclutadas a los ELs donde se asocian a los componentes estructurales de dichos elementos (círculos verdes, cafés y rojos). Pequeñas asas de cromatina conteniendo estas secuencias invaden la región central del CS.

10.1.8. Incorporación de las LEARS (secuencias repetidas de asociación al elemento lateral) a los elementos laterales del complejo sinaptonémico

Las LEARS están enriquecidas en los ELs del CS; sin embargo, la señal de hibridación también se observó en el resto de la cromatina que no está anclada al CS. Es decir, las secuencias repetidas requieren de un mecanismo de selección para que las LEARS se incorporen al EL del CS, mientras que el resto de las secuencias repetidas no se incorporan. Dicho mecanismo de reclutamiento, puede involucrar características en la estructura primaria y/o secundaria de las secuencias repetidas. Por esta razón, en este trabajo también decidimos analizar características en las estructuras primaria y secundaria de las LEARS.

10.1.9. La incorporación de las LEARS al EL no depende de su estructura primaria

Como primera aproximación, se realizó un análisis bioinformático, para determinar si las 100 secuencias aisladas en este trabajo, comparten secuencias consenso que pudieran ser reconocidas por alguna proteína del CS y de esta forma ser incorporadas a los ELs. Para el análisis se utilizó el programa de BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool para ácidos nucleicos); para lo cual, de nuestras 100 secuencias obtuvimos la orientación 5'-3' en el genoma de la rata, disponible en la pagina de Santa Cruz de la Universidad de California (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>). Después, realizamos una base de datos con nuestras 100 secuencias, la cual se formateó para obtener matrices de alineamiento. Posteriormente se realizó el BLASTN usando las 100 secuencias para alimentar el algoritmo y la base de datos para alinear todas las secuencias entre ellas mismas. De esta forma demostramos que no hay secuencias consenso que coincidan entre las 100 secuencias. Para corroborar el resultado del BLASTN, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias usando el programa Clustal W (Chenna et al., 2003). El resultado de ambos análisis revela una vez más que no hay secuencias consenso que surjan a partir de las 100 secuencias aisladas en este experimento, por lo cual la incorporación de las secuencias repetidas a los ELs de los CSs no depende de una estructura primaria compartida entre las LEARS.

10.1.10. La cromatina de las LEARS tiene un perfil epigenético característico

Nuestros resultados anteriores revelan que el ADN asociado a los ELs del CS corresponde a secuencias específicas, las cuales hemos nombrado LEARS. Estas secuencias repetidas se encuentran en estructuras de cromatina compacta en la mayoría de las células, dichas estructuras presentan determinadas características en las histonas (modificaciones epigenéticas) (Martens et al., 2005). Durante la profase meiótica I, existe una alta dinámica en la organización del núcleo meiótico, la cual está determinada por cambios en la estructura de la cromatina (Hernández-Hernández et al., 2008b). Por lo tanto, la cromatina asociada a los ELs del CS y su perfil epigenético parecen

tener un papel importante en la estructura del CS. Para abordar esta propuesta se realizaron inmunolocalizaciones para determinar el perfil epigenético de las LEARS. Se utilizaron anticuerpos que reconocen modificaciones post-traduccionales de las histonas, tanto para cromatina abierta como para cromatina compacta. De esta forma, la mono-metilación de los residuos de lisinas 9 y 27 de la histona H3 (H3K9me1 y H3K27me1, respectivamente); así como la mono-metilación de la lisina 20 en la histona H4 (H4K20me1) son modificaciones epigenéticas presentes en cromatina laxa o abierta (Barski et al., 2007), mientras que las di-metilaciones de los mismos residuos de aminoácidos (H3K9me2, H3K27me2 y H4K20me2) están asociadas a heterocromatina facultativa. Por otra parte, los estados tri-metilados (H3K9me3, H3K27me3 y H4K20me3) de estos residuos se han encontrado en heterocromatina constitutiva y en la mayoría de las secuencias repetidas (Martens et al., 2005; Barski, 2007).

Cuando se realizó la inmunolocalización con los anticuerpos que reconocen H3K9me1, H3K9me2 y H3K9me3, se encontró que H3K9me1 y H3K9me2 están distribuidas homogéneamente en etapas pre-paquiténicas, cuando SYCP3 aún no es detectable, (Figura 15B, C, J, K) y estas marcas se redistribuyen alrededor de la cromatina que rodea al CS cuando éste aparece (Figura 15F, G, N, O); sin embargo, no se observan co-localizaciones de las marcas epigenéticas con el CS (Figura 15H y P). Además, la marca de H3K9me2 se relocaliza a la cromatina de los cromosomas sexuales cuando el cuerpo XY aparece (Figura 31). La señal de H3K9me3 se localizó hacia la periferia del núcleo pre-paquiténico, en forma de puntos (Figura 15R, S), cuando la señal de SYCP3 aparece en células paquiténicas (Figura 15V y W), la marca epigenética co-localiza en los extremos de los CS, donde se observa la marca de SYCP3 en forma de puntos más brillantes que en el resto del CS (Figura 15X), estos puntos más brillantes de SYCP3 corresponden a los telómeros anclados a la placa de adhesión (pA) en la envoltura nuclear (eN) (Viera et al., 2003).

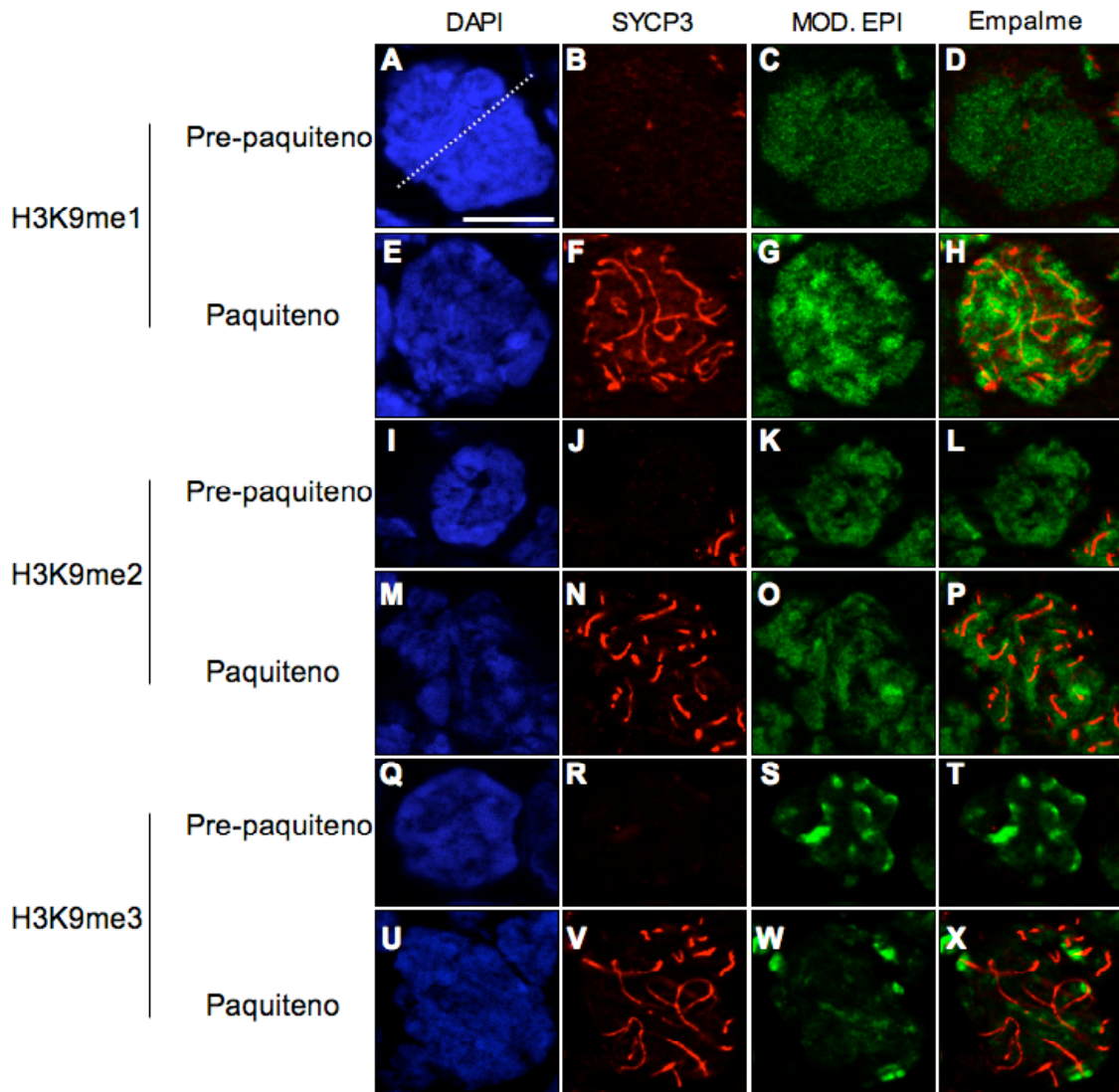


Figura 15: Secciones ópticas de inmunolocalizaciones: Se utilizaron anticuerpos específicos para las modificaciones post-traduccionales de las histonas H3K9me1, H3K9me2 y H3K9me3 (MOD. EPI. en verde) en células pre-paquiténicas y paquiténicas. Los CSs fueron marcados por la inmunolocalización de SYCP3 (rojo). **A-D)** Inmunolocalización de la proteína SYCP3 (rojo) y H3K9me1 (verde) en una célula en etapa de pre-paquiteno. **E-H)** Inmunolocalización de la proteína SYCP3 (rojo) y H3K9me1 (verde) en una célula en etapa de paquiteno. **I-L)** Inmunolocalización de la proteína SYCP3 (rojo) y H3K9me2 (verde) en una célula en etapa de pre-paquiteno. **M-P)** Inmunolocalización de la proteína SYCP3 (rojo) y H3K9me2 (verde) en una célula en etapa de paquiteno. **Q-T)** Inmunolocalización de la proteína SYCP3 (rojo) y H3K9me3 (verde) en una célula en etapa de pre-paquiteno. **U-X)** Inmunolocalización de la proteína SYCP3 (rojo) y H3K9me3 (verde) en una célula en etapa de paquiteno. La barra blanca dentro de la primera imagen, representa una escala de 10 μm para todas las imágenes.

Para la marca epigenética correspondiente a H3K27me2 el patrón de fluorescencia fue el mismo que para la H3K9me1, siendo su distribución homogénea en células pre-paquiténicas y redistribuyéndose en la cromatina que rodea a los CS en células paquiténicas (Figura 16J, K, N, O). Mientras que para H3K27me1, la marca está presente en todo el nucleoplasma cuando la

señal para SYCP3 aún no es evidente (Figura 16A-D); cuando los CSs aparecen, la señal de esta modificación epigenética se relocaliza hacia la periferia nuclear, pero no colocaliza, ni con los CS, ni con la cromatina que los rodea (Figura 16E-H). La dinámica de las modificaciones epigenéticas más notable, con respecto al CS, fue la correspondiente a la H3K27me3, la cual no se observa en células pre-paquiténicas (Figura 16R-T), pero aparece en el momento que se forma el CS. Lo más relevante es que co-localiza en varios puntos a lo largo del CS (Figura 16V-X). Por otra parte, la marca correspondiente a H4K20me1 se aprecia hasta la etapa de paquiteno en la cromatina que rodea a los CS (Figura 17A-H), mientras que la marca de H4K20me2 es escasa en pre-paquiteno así como en paquiteno (Figura 17A-H). Por otra parte, H4K20me3 es visible sólo hasta la etapa de paquiteno y se observa en los telómeros de los cromosomas anclados al CS y a la envoltura nuclear (eN) (Figura 17Q-X).

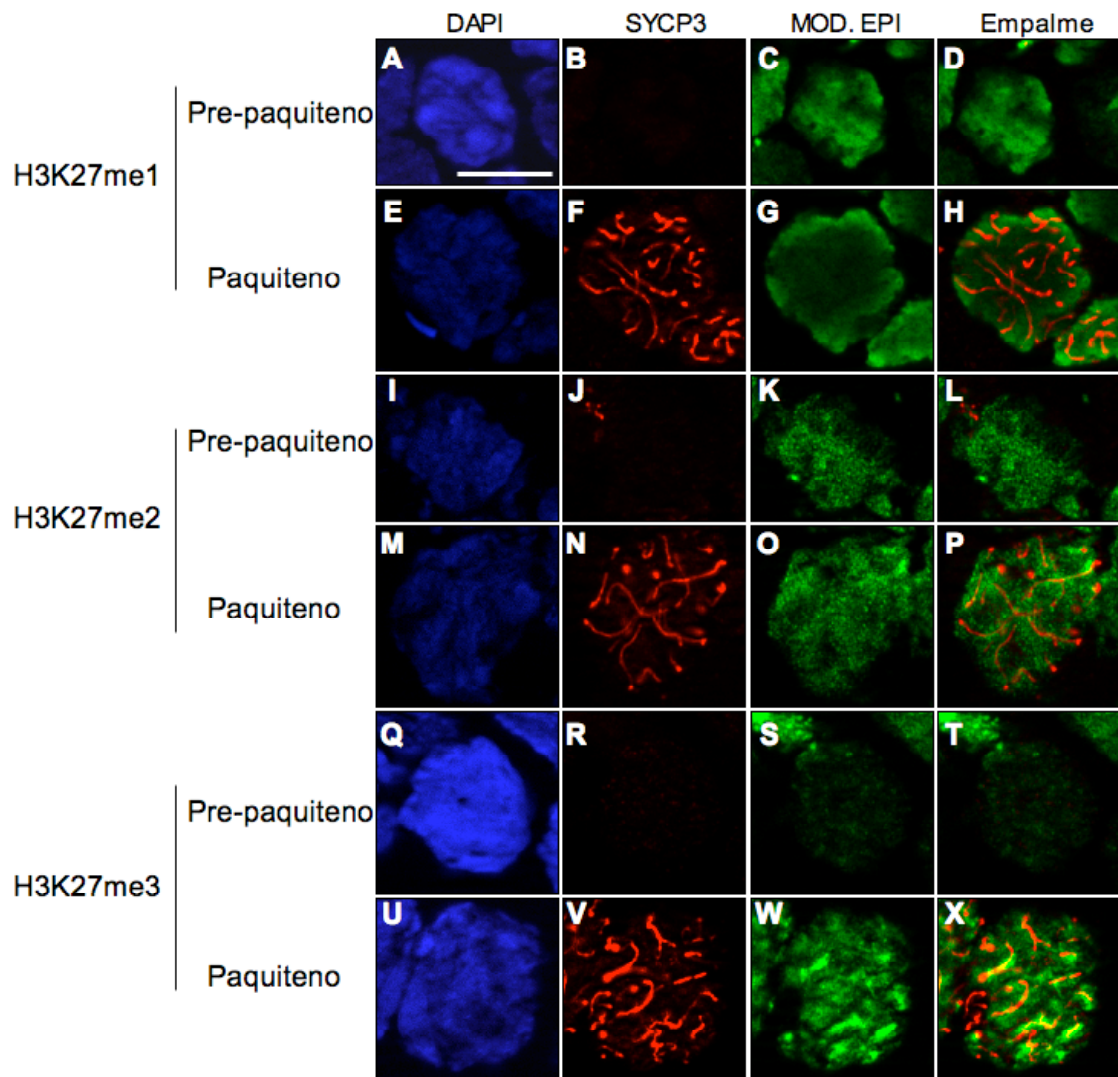


Figura 16: Secciones ópticas de inmunolocalizaciones: Se utilizaron anticuerpos específicos para las modificaciones post-traduccionales de las histonas H3K27me1, H3K27me2 y H3K27me3 (MOD. EPI. en verde) en células pre-paquiténicas y paquiténicas. Los CSs fueron marcados por la inmunolocalización de SYCP3 (rojo). **A-D)** Inmunolocalización de la proteína SYCP3 (rojo) y H3K27me1 (verde) en una célula en etapa de pre-paquiteno. **E-H)** Inmunolocalización de la proteína SYCP3 (rojo) y H3K27me1 (verde) en una célula en etapa de paquiteno. **I-L)** Inmunolocalización de la proteína SYCP3 (rojo) y H3K27me2 (verde) en una célula en etapa de pre-paquiteno. **M-P)** Inmunolocalización de la proteína SYCP3 (rojo) y H3K27me2 (verde) en una célula en etapa de paquiteno. **Q-T)** Inmunolocalización de la proteína SYCP3 (rojo) y H3K27me3 (verde) en una célula en etapa de pre-paquiteno. **U-X)** Inmunolocalización de la proteína SYCP3 (rojo) y H3K27me3 (verde) en una célula en etapa de paquiteno. La barra blanca dentro de la primera imagen, representa una escala de 10 μm para todas las imágenes.

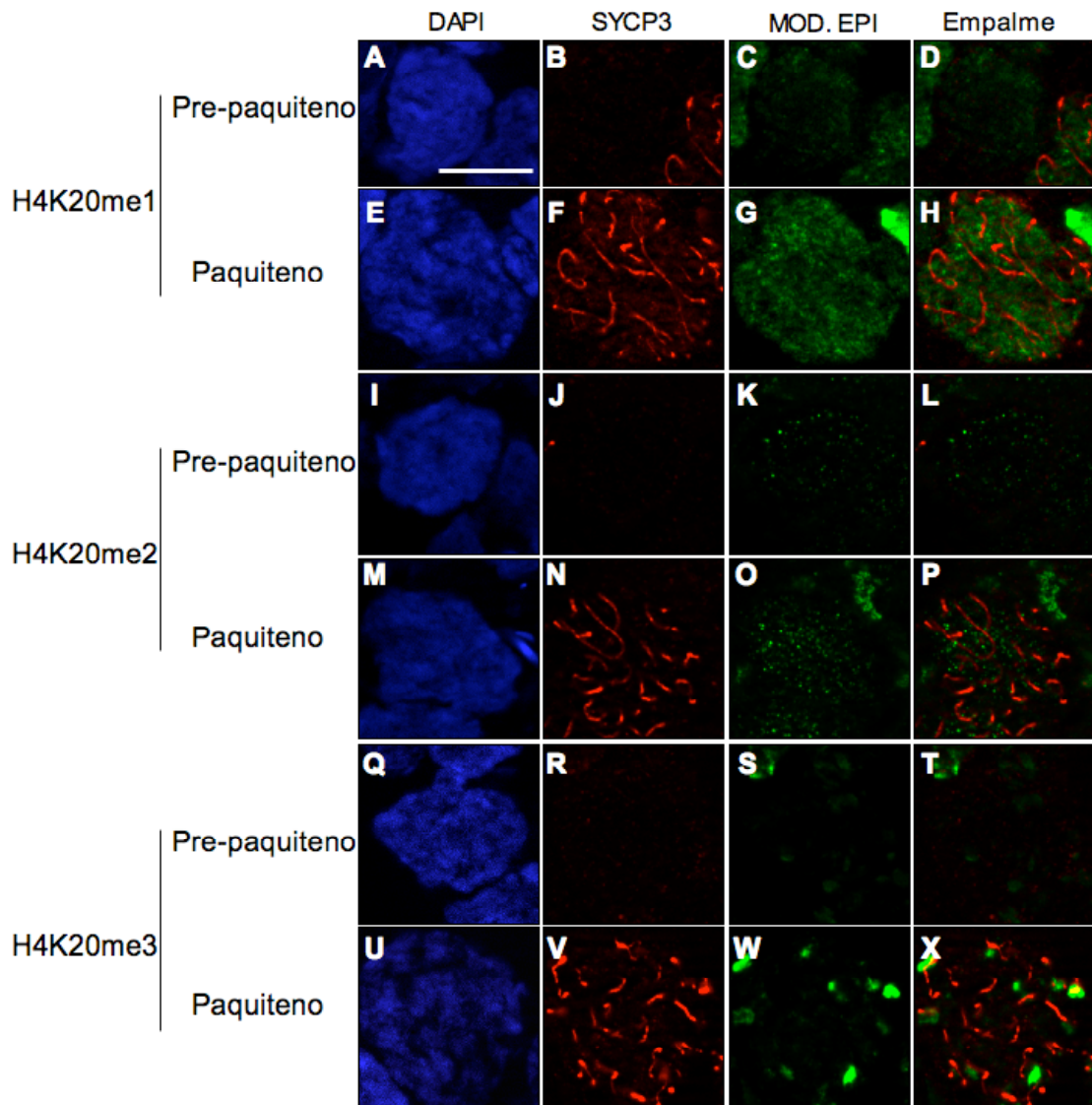


Figura 17: Secciones ópticas de inmunolocalizaciones: Se utilizaron anticuerpos específicos para las modificaciones post-traduccionales de las histonas H4K20me1, H4K20me2 y H4K20me3 (MOD. EPI. en verde) en células pre-paquiténicas y paquiténicas. Los CSs fueron marcados por la inmunolocalización de SYCP3 (rojo). **A-D)** Inmunolocalización de la proteína SYCP3 (rojo) y H4K20me1 (verde) en una célula en etapa de pre-paquiteno. **E-H)** Inmunolocalización de la proteína SYCP3 (rojo) y H4K20me1 (verde) en una célula en etapa de paquiteno. **I-L)** Inmunolocalización de la proteína SYCP3 (rojo) y H4K20me2 (verde) en una célula en etapa de pre-paquiteno. **M-P)** Inmunolocalización de la proteína SYCP3 (rojo) y H4K20me2 (verde) en una célula en etapa de paquiteno. **Q-T)** Inmunolocalización de la proteína SYCP3 (rojo) y H4K20me3 (verde) en una célula en etapa de pre-paquiteno. **U-X)** Inmunolocalización de la proteína SYCP3 (rojo) y H4K20me3 (verde) en una célula en etapa de paquiteno. La barra blanca dentro de la primera imagen, representa una escala de 10 μm para todas las imágenes.

Con estos resultados, se obtuvo el perfil epigenético parcial de las LEARS del CS (Figura 27A): H3K9me1, H3K9me2, H3K27me2, H4K20me1 y H4K20me2 son marcas post-traduccionales de las histonas asociadas a la cromatina que rodea a los CS, mientras que H3K9me3 y H4K20me3 se

localizan en la porción telomérica de los cromosomas anclados al CS y a la eN por la placa de adhesión (Figura 27A). Mientras que H3K27me3 que no se encuentra hasta la aparición del CS, colocaliza con segmentos del CS, sugiriendo un papel de estas tres marcas en la formación y/o estabilidad del CS.

10.1.11. La inhibición de las proteínas desacetilasas de histonas causa muerte a células paquiténicas

Se ha demostrado que la inhibición de las HDACs produce infertilidad y defectos en la meiosis de roedores en células paquiténicas (Fenic et al., 2004; 2008). Este tratamiento no afecta a genes específicos de la meiosis durante la profase meiótica I (Fenic et al., 2004; 2008). Por lo tanto, se sugiere que la desregulación que lleva a la muerte celular de las células paquiténicas ocurre a nivel de secuencias reguladoras, cuya actividad podría estar modulada epigenéticamente y que dependen de las HDACs. La inhibición de las HDACs evitan la desacetilación de los residuos de histonas y por lo tanto su metilación y la consecuente formación de heterocromatina (Ekwall et al., 1997). Para determinar si la inhibición de las HDACs afecta la incorporación de las secuencias repetidas a los ELs del CS, se trató a los testículos de ratas de forma *in vivo* con TSA, que es una droga inhibidora de las HDACs. Para ello se utilizaron dosis reportadas previamente (Fenic et al., 2004; 2008) y se analizó el efecto de la droga sobre células meióticas y sobre el CS.

Para evaluar si el tratamiento con la droga TSA funciona como lo anteriormente reportado (Fenic et al., 2004; 2008), se determinó la muerte celular de meiocitos por la técnica de TUNEL. De esta forma y de manera esperada, se encontró que la muerte celular en túbulos seminíferos de ratas tratadas con TSA fue mayor que en túbulos seminíferos de ratas tratadas sólo con el vehículo de dilución de la droga (Figura 18). Para identificar que tipo celular es el que está sufriendo la muerte celular, se analizaron los túbulos seminíferos de ratas a nivel histológico y la identificación de las etapas celulares se realizó de acuerdo a las asociaciones celulares presentes a lo largo del ciclo del epitelio seminífero (CES) (Clermont, 1972). De esta forma, durante la etapa III del CES, se observaron paquitenos iniciales y espermátidas

en las etapas 3 y 16 de elongación, en túbulos seminíferos tanto de ratas tratadas como de ratas control (Figura 19A y D). En la etapa IX del CES se encontraron células en proceso de muerte celular, evidenciadas por su morfología característica; en esta etapa del CES se encuentran paquitenos medios y espermátidas en etapa 9 de la espermiogénesis (Figura 19B y E). Las células en proceso de muerte celular corresponden, por lo tanto, a paquitenos que no han avanzado hacia paquitenos medio (asteriscos en la Figura 19E). Mientras que en la etapa XIII del CES no se encontraron células afectadas (Figura 19C y F). Estos resultados corroboran que el tratamiento con TSA afecta células paquiténicas, como previamente reportó el grupo de Steger (Fenic et al., 2004; 2008).

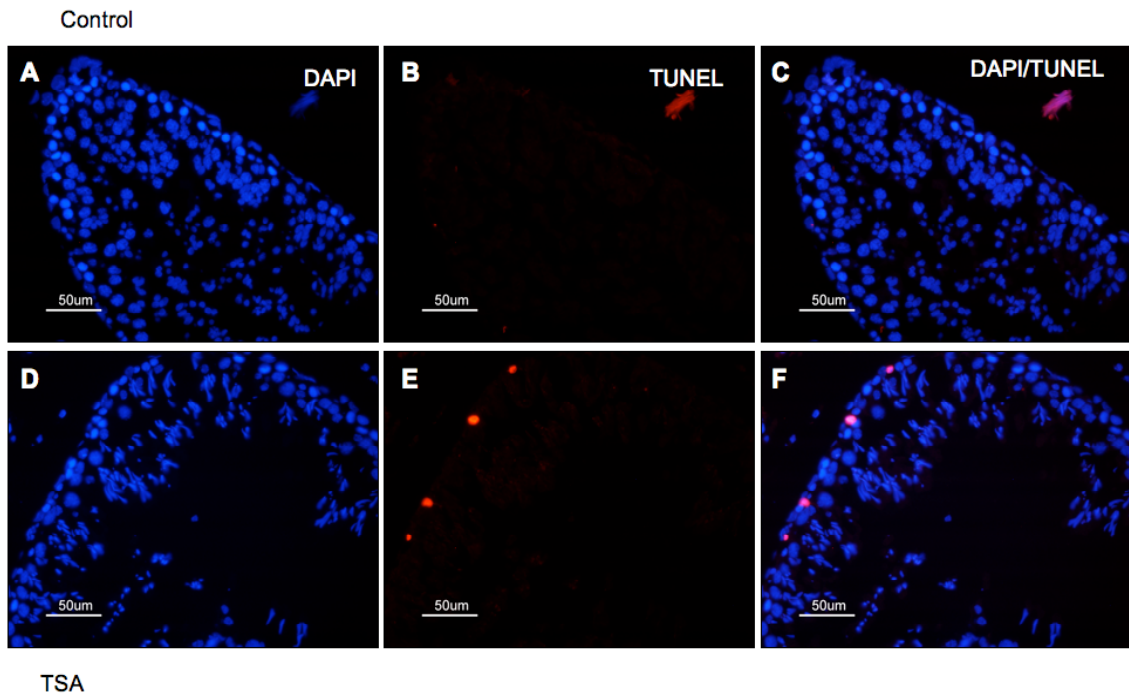


Figura 18: Ensayo de TUNEL, para detectar muerte celular por apoptosis en células meióticas. **A)** Túbulos seminíferos de ratas control marcadas con DAPI; **B)** con el ensayo de TUNEL y **C)** empalme de DAPI y TUNEL. **D)** Túbulos seminíferos de ratas tratadas con TSA y marcadas con DAPI; **E)** con el ensayo de TUNEL y **F)** empalme de DAPI y TUNEL. Las barras representan una escala de 50 μm .

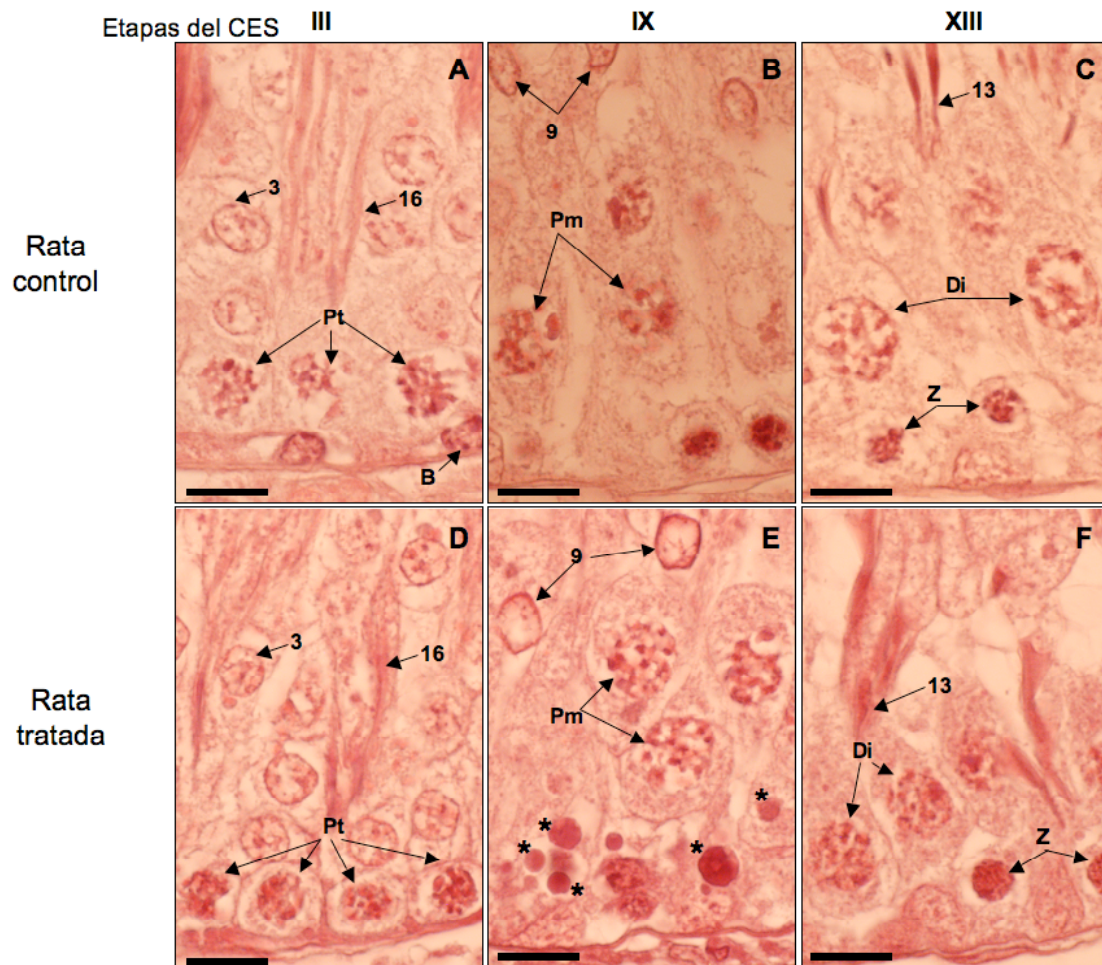


Figura 19: Tinción histológica de Hematoxilina-Eosina en diferentes etapas del ciclo del epitelio seminífero (CES). **A-C)** Imágenes de túbulos seminíferos en la etapa III, IX y XII del CES en ratas control. **D-F)** Imágenes de túbulos seminíferos en la etapa III, IX y XII del CES en ratas tratadas con TSA. Abreviaturas: B, espermatogonia tipo B; Pt, paquiteno temprano; Pm, paquiteno medio; Di, diploteno; Z, zigoteno; etapas de la espermiogénesis 3, 9, 13, 16. Los asteriscos indican las células en proceso de muerte celular mientras que las barras negras dentro de las imágenes representan una escala de 10 μ m.

10.1.12. El perfil epigenético de las LEARS es importante para la estructura del complejo sinaptonémico

Las LEARS se asocian al EL del CS y están relacionadas a modificaciones post-traduccionales de sus histonas, principalmente H3K9me3, H3K27me3 y H4K20me3. La inhibición de las HDACs evita la desacetilación de residuos de aminoácidos de las histonas, incrementando los niveles de acetilación en las histonas H3 y H4, sin afectar la expresión de los genes requeridos para la meiosis (Fenic et al., 2008), por lo tanto, el tratamiento con TSA puede estar afectando otras regiones genómicas como lo son elementos reguladores y/o estructurales, dentro de los cuales se encuentran las secuencias repetidas;

entonces las LEARS podrían afectarse con el tratamiento de TSA. Después del tratamiento de las ratas con TSA, se observó que las células en etapa de paquiteno son las más afectadas. Para analizar la posible alteración del CS al evitar modificaciones post-traduccionales características de las LEARS, se realizaron inmunolocalizaciones de dos proteínas que indican la presencia de EL y de la RC de los CSs (SYCP3 y SYCP1, respectivamente) en túbulos seminíferos de ratas control y tratadas con TSA. Con esta doble inmunolocalización, es posible resaltar en detalle a los componentes del CS. La morfología de los túbulos seminíferos en ratas control fue normal, con el estrato de células paquiténicas cerca de la lámina basal (Figura 20A-D). Contrariamente a lo que se observa en ratas tratadas con TSA (Figura 20-O), donde se apreció alteración en la morfología de los túbulos seminíferos (Figura 20L-O) y frecuentemente se observó la presencia de células paquiténicas en el lumen del túbulo en la mayoría de los túbulos en etapas IX-XI del CES (asteriscos en Figura 20L-O), probablemente debido a la muerte y eliminación de células paquiténicas. Cuando se analizó con mayor detalle a los CS observamos que en células paquiténicas de ratas control las señales de SYCP3 y de SYCP1 colocalizan a todo lo largo de las estructuras correspondientes a los CSs (Figura 20E-K, flechas en I-K) indicando un correcto ensamblaje del mismo. Mientras que los CS de células paquiténicas en ratas tratadas, presentan discontinuidades en la señal de SYCP1 (cabezas de flecha en Figura 20T-V) en donde SYCP3 siempre fue continuo (flechas en Figura 20T-V), indicando alteraciones en la estructura de la RC del CS.

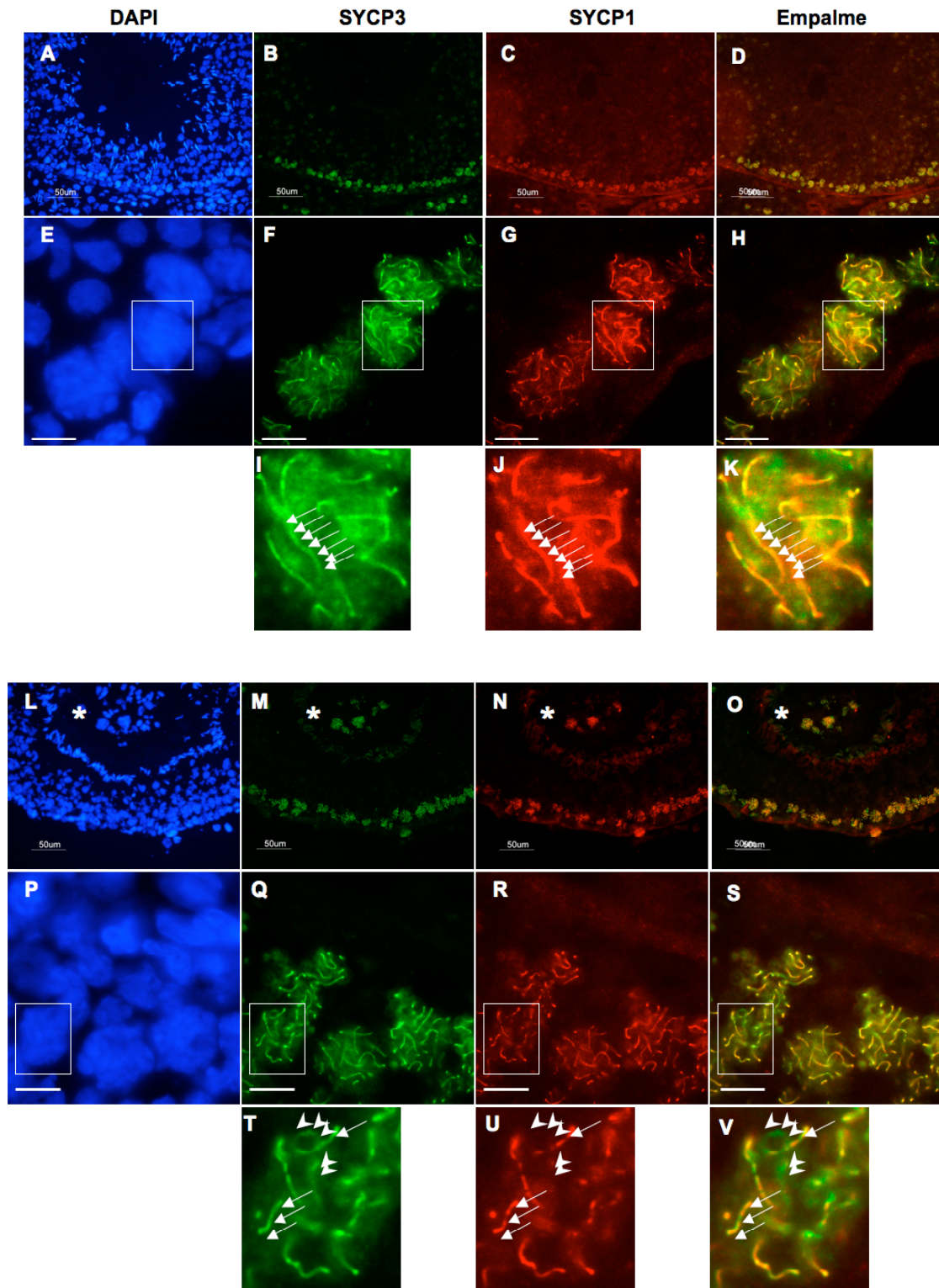


Figura 20: Imágenes de la detección inmunofluorescente de las proteínas SYCP3 y SYCP1 en ratas control y tratadas con TSA. **A-K)** Túbulos seminíferos de ratas control; **L-V)** túbulos seminíferos de ratas tratadas con TSA. **A-D)** Morfología normal de los túbulos seminíferos en ratas control. **E-H)** El ADN de las células paquítenicas es evidenciado por la fluorescencia de DAPI (azul) mientras que los componentes de los CSs son evidenciados por la inmunodetección de la proteína SYCP3 (verde) y SYCP1 (rojo). Cuando estas dos últimas señales co-localizan, se observa un color amarillo en el empalme de ambas imágenes. **I-K)** Aumentos digitales de recuadros en F-H, donde se observa la señal continua de SYCP3 y SYCP1 además de su co-localización (flechas). Barras en E-H representan una escala de 10 μm . **L-O)** Morfología alterada de los túbulos seminíferos de ratas tratadas con TSA. **P-S)** El ADN de las células

paquiténicas es evidenciado por la fluorescencia DAPI mientras que los componentes de los CSs son mostrados por la inmunodetección de la proteína SYCP3 (verde) y SYCP1 (rojo). Cuando estas dos últimas señales co-localizan, se presenta un color amarillo en el empalme de ambas imágenes. **T-V)** aumentos digitales de recuadros en Q-S, donde se observa la señal continua de SYCP3 y SYCP1 además de su co-localización (flechas) y las discontinuidades en la señal de SYCP1 (cabezas de flecha). Barras en P-S representan una escala de 10 μm .

De manera inesperada, cuando realizamos cortes ópticos de estas mismas inmunolocalizaciones, observamos tres diferentes tipos de alteraciones en los CSs en paquitenos de ratas tratadas con TSA. La morfología de los CSs en paquitenos de ratas control se observa como lo descrito anteriormente, es decir, los ELs del CS son evidenciados por la tinción de la proteína SYCP3, mientras que la RC del CS observa con la señal de la proteína SYCP1 y la señal de estas dos siempre co-localiza, indicando una correcta sinapsis entre los ELs (flechas en Figura 21A-C). Sin embargo, en paquitenos de ratas tratadas con TSA, se observaron tres diferentes morfologías de los CSs: 1) Una correcta morfología de los ELs del CS y una adecuada sinapsis entre estos (flechas en Figura 21D-F) como en las ratas control (flechas en Figura 21A-C), 2) se observó la correcta morfología de los ELs pero una sinapsis parcial entre estos (flechas en Figura 21G-I) y 3) se evidenció la presencia de defectos en la formación de los ELs (flechas en Figura 21J) y por lo tanto, no hay sinapsis entre los ELs discontinuos (flechas en Figura 21K). Un dato interesante, es que los ELs de los cromosomas sexuales se encuentran alterados en su continuidad, pero realizan sinapsis entre éstos (cabezas de flecha en Figura 21J-L), indicando una alteración en la estructura del cuerpo XY y sinapsis anormal entre los ELs de los cromosomas sexuales (dato discutido en la parte correspondiente a cuerpo XY).

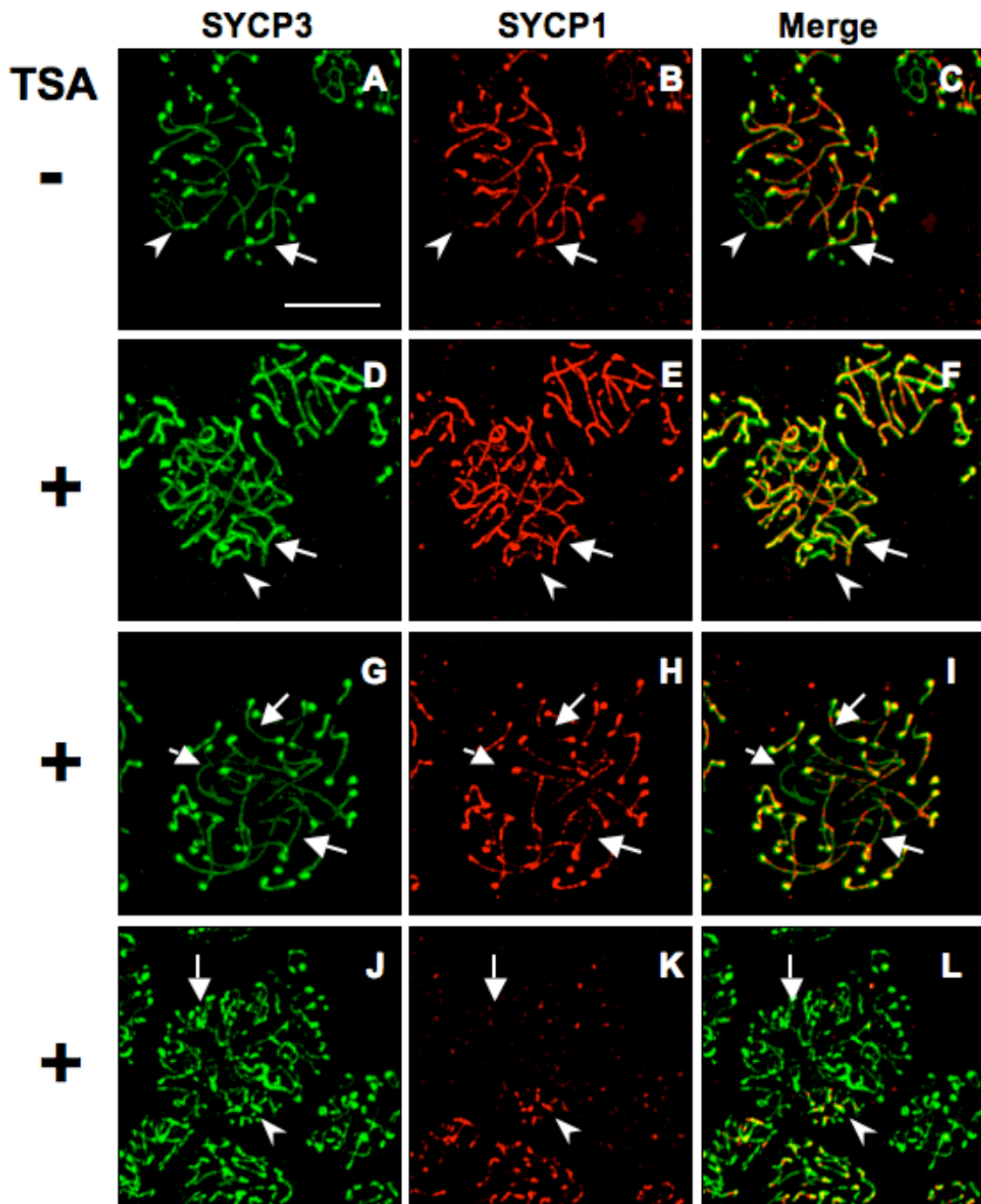


Figura 21: Superposición de cortes ópticos en el eje geométrico Z para la reconstrucción de paquitenos. **A-C)** Los complejos sinaptonémicos de las ratas control son evidenciados por la tinción de los ELs con anti-SYCP3 (verde), mientras que la región central (RC) es teñida por anti-SYCP1 (rojo). Todas las estructuras en forma de filamentos (que corresponden a los CSs) son marcadas con ambos anticuerpos (flechas), como se observa en la imagen empalmada (flechas); a excepción de los cromosomas sexuales, donde los ELs no hacen sinapsis y no forman una RC (cabezas de flecha). Cuando se observaron los túbulos seminíferos de ratas tratadas con TSA, se distinguen tres diferentes morfologías de los paquitenos de acuerdo a sus CSs. **D-F)** Todos los ELs (verde) se encuentran en sinapsis con su EL homólogo formando una RC (rojo), a excepción de los cromosomas sexuales los cuales no se aparean y por tanto no forma RC entre sus ELs (cabezas de flecha). **G-I)** la mayoría de los ELs presentan regiones sin sinapsis (flechas). **J-L)** Los ELs presentan discontinuidades (flechas) y no existe sinapsis entre ELs (flechas), a excepción de los cromosomas sexuales, donde se observa un apareamiento entre los ELs (cabezas de flecha). Barra en imagen A, representa una escala de 10 μm para todas las imágenes.

De acuerdo a los resultados, se determinó que la estructura del CS se altera después de la inhibición de las HDACs. Por tal motivo se analizó con más detalle la estructura de los elementos del CS mediante reconstrucciones tri-dimensionales a nivel de microscopía electrónica (3D-ME). Se observó la estructura de los CSs en células en etapa de paquiteno inicial, debido a que en paquitenos medios las células ya se encuentran en proceso de muerte celular y la estructura de los CSs podría estar afectada por el proceso de muerte y no por el tratamiento con el TSA. En las células en etapa de paquiteno medio, la estructura de los CSs está totalmente alterada, observándose solo fragmentos de ELs no apareados e incompletos (datos no mostrados). Sin embargo en células en etapa de paquiteno inicial los CSs se observaron con alteraciones causadas por el tratamiento con la droga TSA. De esta forma, mediante cortes seriados observamos que la mayoría de los CSs de túbulos seminíferos en etapas IX-XI del CES presentan alteraciones. En la Figura 22 se observa una serie de cortes, donde aparece un fragmento de CS en el primer corte (flechas en s1 y r1 de Figura 22), en el segundo corte se aprecia la continuación del CS y que los ELs del CS se separan y se anclan a la envoltura nuclear (flechas en s2 y r2 de Figura 22) lo que sugiere la pérdida de la estructura de la RC, datos que son consistentes con las inmunolocalizaciones de la proteína SYCP1 en la RC, en experimentos de inmunofluorescencias (Figuras 19 y 20). Del corte 3 al 7 se aprecia el resto del CS que se ancla por su otro extremo a la envoltura nuclear (flechas en s3-7 y r3-7 de Figura 22). Al realizar la reconstrucción tri-dimensional de los cortes seriados, observamos claramente la alteración del CS y la falla en el ensamblado, principalmente en la pérdida de la RC (3D en Figura 22). Estos resultados, apoyan las evidencias citológicas de la pérdida de tinción en la RC la cual, a nivel de microscopía electrónica, se distingue como una separación en los ELs del CS cerca de su anclaje a la eN. Por lo tanto, al alterar la cromatina con el tratamiento de TSA, se afecta la estructura del CS.

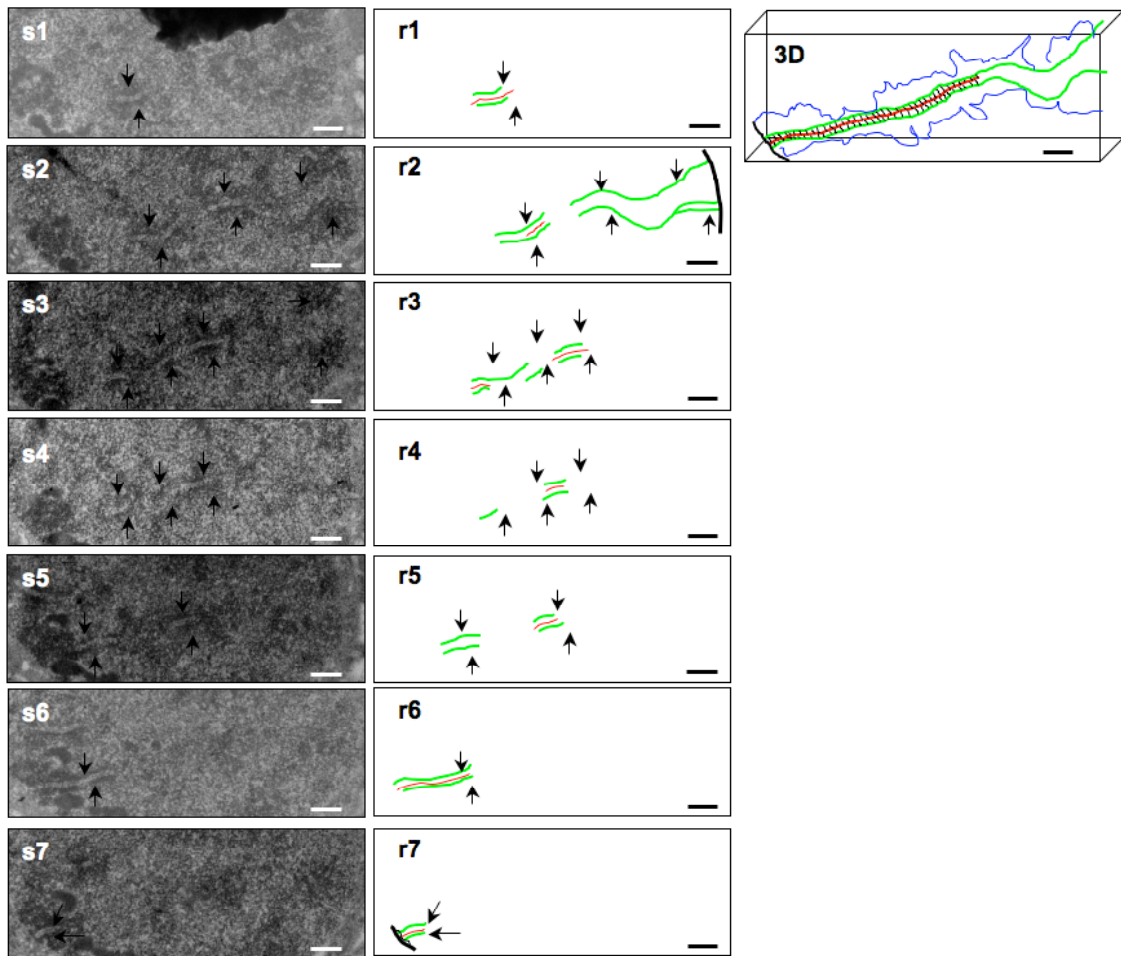


Figura 22: Cortes seriados 1-7 (s1-s7). micrografías electrónicas de cortes seriados de un CS en una célula paquítena de rata tratada con TSA. Las flechas señalan al CS en los diferentes cortes seriados. r1-r7, esquemas del CS (flechas) en los mismos. Los elementos laterales están delineados en verde, mientras que la región central en rojo. Los esquemas en r1-r7 se superponen para dar origen a una reconstrucción tridimensional (3D) del CS alterado en una de sus extremidades cerca de la envoltura nuclear. La barra representa una escala de 500 nm.

10.1.13. Pérdida de asociación de las LEARS en los elementos laterales del complejo sinaptonémico

Para determinar si la asociación de las LEARS con los ELs del CS se alteró por el tratamiento con el TSA, se realizaron ensayos de ChIP en ratas control y tratadas con TSA. De esta forma, se realizaron PCRs dúplex radioactivas usando cromatinas IP con el anticuerpo anti-SYCP3 en ratas control y tratadas con TSA, con la finalidad de obtener un dato semi-cuantitativo y comparable entre las distintas muestras.

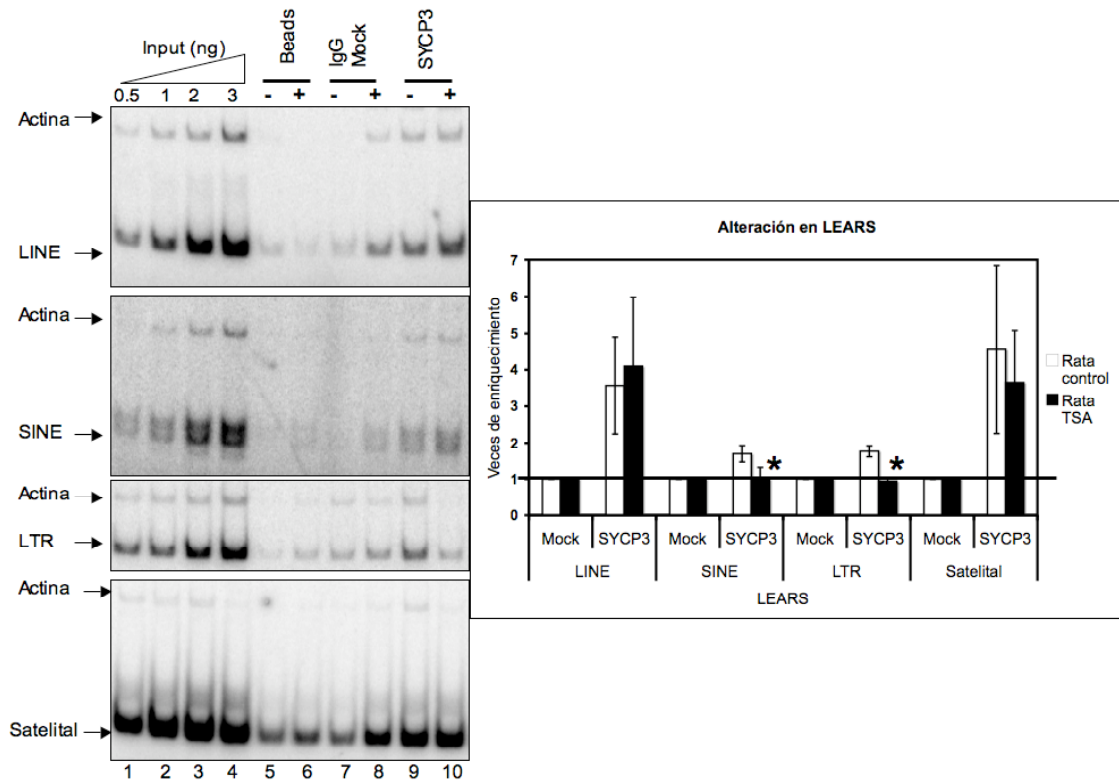


Figura 23: PCRs radioactivas dúplex y cuantificación de las inmunoprecipitaciones de cromatina de meiocitos de ratas control y tratadas con TSA. El rango lineal de amplificación se determinó amplificando las secuencias repetidas (LINE, SINE, LTR y Satelitales, respectivamente) y la secuencia codificante (Actina), usando concentraciones crecientes de ADN genómico (input) (líneas 1-4). Posteriormente, se realizaron las PCRs dúplex usando como templados las cromatinas IPs con anti-SYCP3 en ratas control (línea 9) y en ratas tratadas con TSA (línea 10), la cromatina IP con anti-IgG (mock) (líneas 7 y 8) y con la cromatina IP con el agente de inmunoprecipitación (beads) (líneas 5 y 6). Para determinar el enriquecimiento de secuencias repetidas, se dividió el cociente de la razón repetida/codificante en la cromatina IP con el anticuerpo anti-SYCP3 entre la razón de repetida/codificante en la cromatina IP con el agente de inmunoprecipitación. La cuantificación de este enriquecimiento fue graficada. El eje de las Y tiene una línea que cruza perpendicularmente en el valor de 1, por lo tanto cualquier valor por encima de esta línea significa enriquecimiento. Las barras del error estándar fueron determinadas a partir de tres ensayos diferentes de PCR y de tres IPs independientes. Los asteriscos señalan reducciones significativas en el enriquecimiento de secuencias repetidas asociadas a SYCP3 después del tratamiento con TSA.

Como parte de las LEARS se encuentran las secuencias repetidas tipo LINEs, SINEs, LTRs y Satelitales. Al analizar el enriquecimiento de estas secuencias en los EL de las ratas normales, se observó el mismo enriquecimiento que el reportado previamente (Hernández-Hernández et al., 2008). Al cuantificar el enriquecimiento de las LEARS en ratas tratadas con la droga TSA notamos que la asociación al EL de las secuencias SINEs y LTRs se afectó (barras negras y blancas en la gráfica de Figura 23, respectivamente), mientras que la asociación de las LINEs y Satelitales no

fueron afectadas significativamente con respecto a las ratas control (barras negras y blancas en la gráfica de Figura 23, respectivamente). Esta pérdida parcial de secuencias LEARS, sugiere que no todo el ADN asociado al EL se disocia, por lo tanto decidimos observar la disociación del ADN en los ELs del CS. Esto se realizó a nivel de microscopía electrónica; con la tinción específica para ADN llamada Amina de Osmio (Cogliati y Gautier, 1973). Se observó, en escala de grises, una especie de red altamente contrastada (flechas en Figura 24A y C), la cual corresponde al ADN en el espesor de los EL (líneas en Figura 24A, C), en células paquiténicas de ratas control. Mientras que en las células paquiténicas de ratas tratadas con el TSA, la red en el interior de los ELs se observa desvanecida en algunos segmentos del CS (cabeza de flecha en Figura 24B, D), pero no en todo el CS (Flechas en Figura 24D). Estos resultados sugieren la disociación parcial de ADN en los ELs del CS, dicha disociación no se observó en todo lo largo del EL ni en todos los CS, estos datos son apoyados por los resultados de los ensayos de ChIP donde no todas las secuencias de las LEARS pierden su enriquecimiento en el EL, es decir, su asociación al EL.

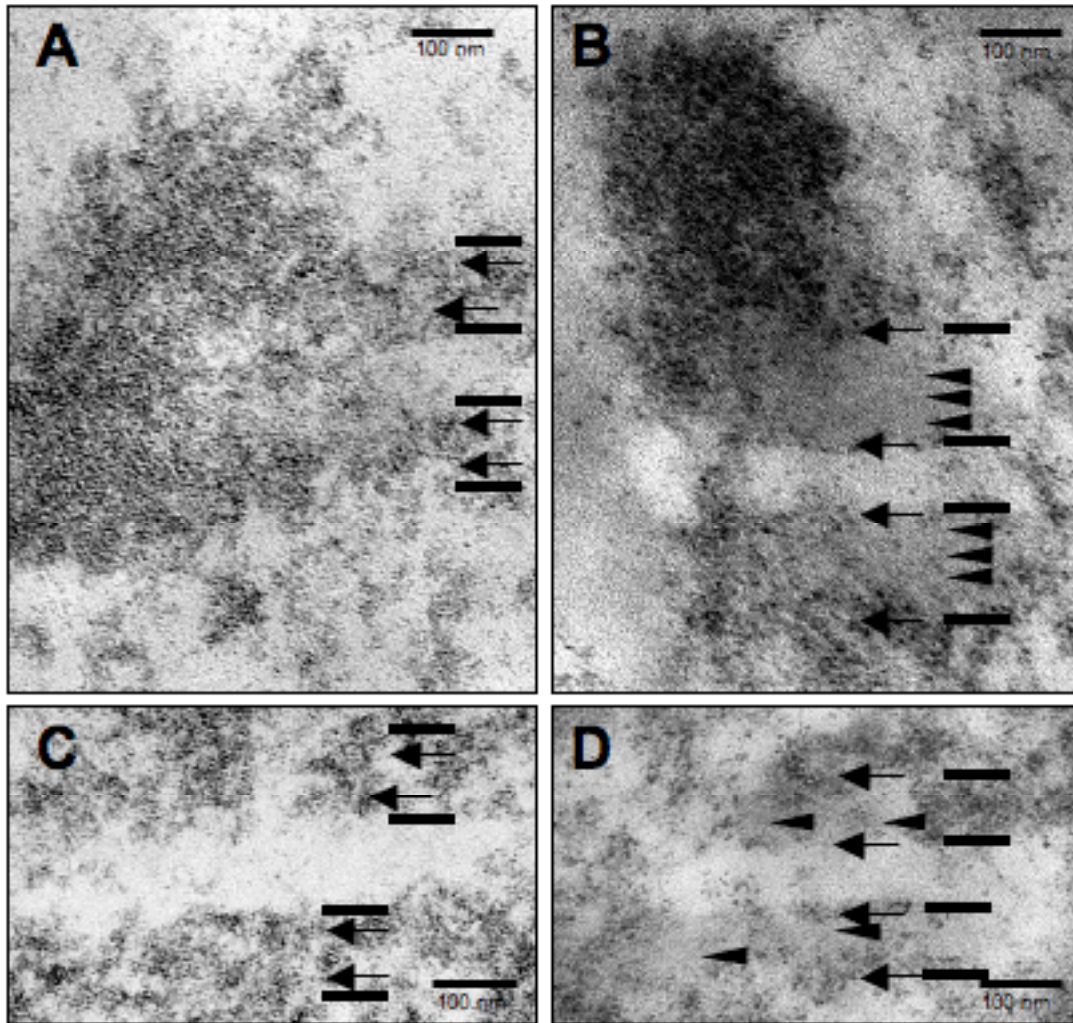


Figura 24: Micrografías electrónicas de los CSs con una técnica de tinción preferencial para ADN. **A y C)** El ADN de los CSs de las ratas control, se observa con una apariencia de una red filamentosa (flechas) en el espesor del EL (indicado por líneas paralelas). **B y D)** en el espesor de los ELs de ratas tratadas con TSA, se observa una disminución en la red altamente contrastada, que corresponde al ADN asociado a los ELs (cabezas de flecha). La barra representa una escala de 100 nm.

10.1.14. La distribución de modificaciones post-traduccionales de histonas en las LEARS se afecta después del tratamiento con Tricostatina-A

El tratamiento con TSA fue planteado con la finalidad de afectar parcialmente la estructura de heterocromatina propia de las secuencias repetidas, muchas de las cuales se asocian a los ELs de los CSs. En nuestros experimentos de inmunolocalizaciones observamos que ciertas marcas epigenéticas colocalizan con los CS y corresponden a las que generalmente están asociadas a estructura de cromatina compacta o heterocromatina; por lo tanto, al inhibir la desacetilación de histonas, parcialmente se afectó la organización de

estructuras de cromatina compacta o heterocromatina que es la conformación de las LEARS y que forman la cromatina de los EL. Por lo cual, se evaluó mediante inmunolocalizaciones si las marcas epigenéticas asociadas al CS se afectan después del tratamiento con TSA.

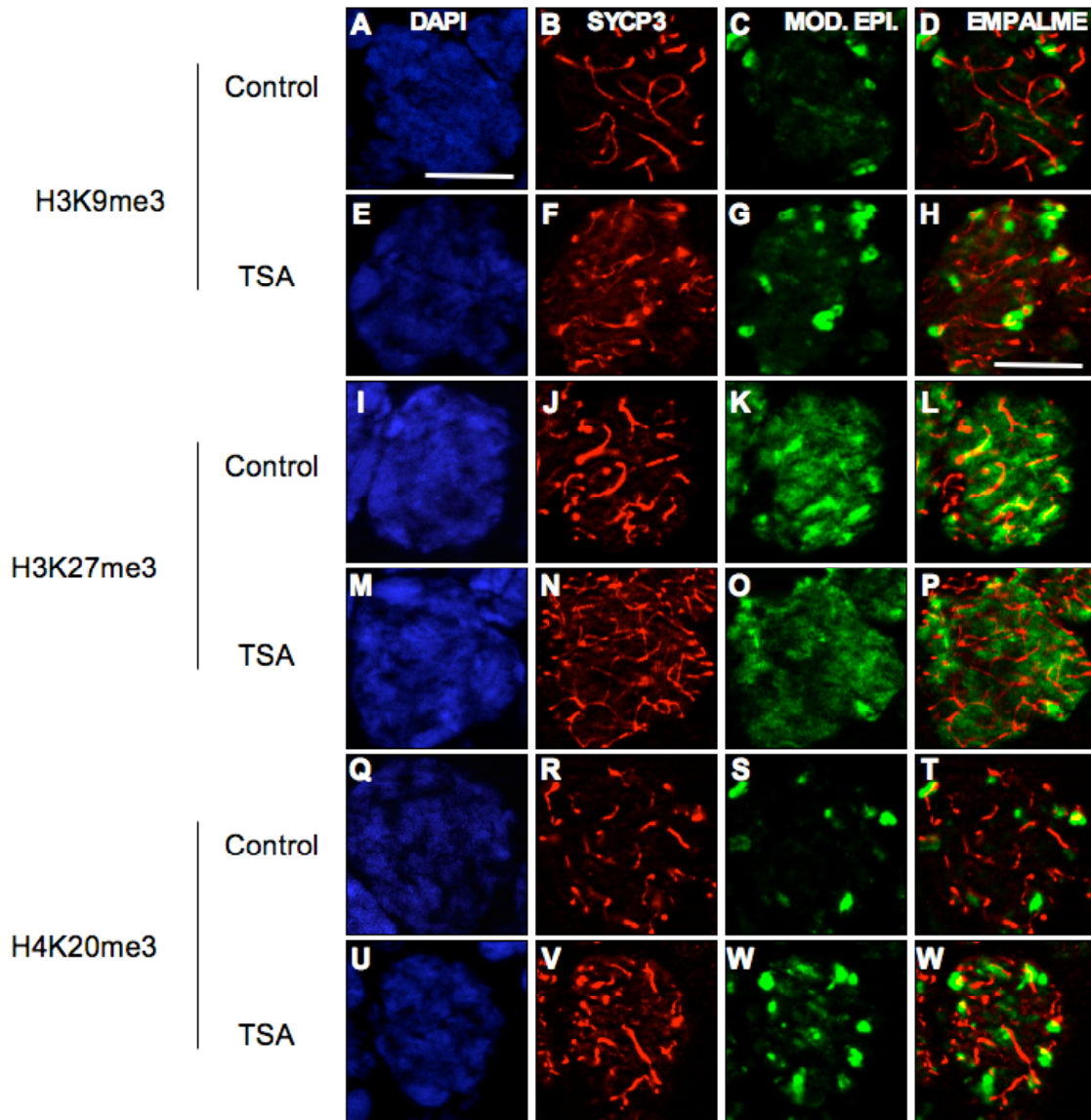


Figura 25: Secciones ópticas de inmunofluorescencias usando anticuerpos que reconocen modificaciones post-traduccionales de las histonas asociadas a los ELs de los CSs. **A-D)** Inmunolocalización de la histona H3K9me3 en células paquiténicas de ratas control. **E-H)** Inmunolocalización de la histona H3K9me3 en células paquiténicas de ratas tratadas con TSA. **I-L)** Inmunolocalización de la histona H3K27me3 en células paquiténicas de ratas control. **M-P)** Inmunolocalización de la histona H3K27me3 en células paquiténicas de ratas tratadas con TSA. **Q-T)** Inmunolocalización de la histona H4K20me3 en células paquiténicas de ratas control. **U-W)** Inmunolocalización de la histona H4K20me3 en células paquiténicas de ratas tratadas con TSA. La barra representa una escala de 10 μ m.

La distribución de marcas epigenéticas correspondientes a H3K9me3 y H4K20me3 que se asocian a los extremos de los CSs no se ven afectadas después del tratamiento con TSA (Figura 25D, H, T y W). Sin embargo, la distribución más alterada correspondió a la histona H3K27me3, la cual se encuentra co-localizando con segmentos de CSs en paquitenos de ratas control (Figura 25L); mientras que en ratas tratadas con TSA, la distribución de la histona H3K27me3 está totalmente afectada y pierde su colocalización con los CSs (Figura 25P). Estos resultados indican, de manera indirecta, que hay un cambio en el perfil epigenético de la cromatina asociada al CS, observable a nivel de microscopía epifluorescente.

Para evaluar de forma semi-cuantitativa las modificaciones epigenéticas de las histonas, que co-localizan con los CSs y verificar si se encuentran enriquecidas en la cromatina de las LEARS, además de analizar cómo se afectan después de inhibir parcialmente sus modificaciones post-traduccionales, decidimos emplear un ensayo de ChIP-ReChIP. Este ensayo consiste en realizar una doble IP usando dos anticuerpos diferentes de forma secuencial para reconocer dos proteínas que se suponen están co-localizando con las secuencias específicas de ADN, en este caso la asociación que se espera esté co-localizando es SYCP3 con marca epigenética en las LEARS. De tal manera que la cromatina IP mediante ChIP-ReChIP se usó como templado en PCRs dúplex radioactivas y se evaluó el enriquecimiento de las LEARS en los sitios donde las dos proteínas colocalizan con las LEARS.

Como primer anticuerpo para el ChIP-ReChIP se utilizó anti-SYCP3, para inmunoprecipitar a las LEARS y sus proteínas asociadas. Como segundos anticuerpos se usaron aquellos que reconocen a las diversas modificaciones post-traduccionales en las histonas: H3K9me3, H3K27me3, H4K20me3 que colocalizan con los ELs de los CSs (Figura 25) y H3ac (Histona H3 acetilada) que no co-localiza con los ELs de los CSs. De esta forma se demostró que las secuencias LINE están enriquecidas en SYCP3/H4K20me3, las secuencias SINEs y los LTRs en SYCP3/H3K27me3, mientras que las repetidas satelitales están enriquecidas en SYCP3/H3K9me3 y en SYCP3/H4K20me3 (asteriscos de barras blancas en gráfica de Figura 26, respectivamente). Después del

tratamiento con TSA se observó que las secuencias LINE pierden su enriquecimiento en SYCP3/H4K20me₃, lo mismo que las satelitales en SYCP3/H3K9me₃ y en SYCP3/H4K20me₃, mientras que las SINEs y LTRs pierden su enriquecimiento en SYCP3/H3K27me₃ (Asteriscos de barras negras en la grafica de Figura 26, respectivamente). Estos datos apoyan los resultados de inmunolocalizaciones donde se observa una alteración en el patrón de señal de la marca de cromatina compacta para la histona H3K27me₃ en los CSs y fortalece los datos de IPs, donde las secuencias SINE y LTR pierden su asociación a los EL del CS, probablemente debido a los cambios ligados a la marca H3K27me₃ vinculada a estas secuencias.

10.1.15. Modelo de la estructura del complejo sinaptonémico

Con base en los resultados encontrados, hemos propuesto un modelo que pretende explicar cómo se organiza la cromatina asociada a los ELs del CS (Figura 27). La cromatina de los cromosomas homólogos se ancla al EL del CS, mediante ADN característico, es decir, por secuencias de ADN del tipo de las altamente repetidas en el genoma, sin embargo no todas las secuencias repetidas del genoma se incorporan al EL. Las secuencias repetidas asociadas al EL (LEARS) se anclan al andamiaje proteico del CS por un mecanismo que depende posiblemente de la estructura secundaria de estas secuencias (Figura 27A). Las marcas post-traduccionales de las histonas H3K9me₃ y H4K20me₃ se encuentran asociadas a los extremos de los CS, que corresponden a los telómeros de los cromosomas anclados al CS y a la eN mediante la placa de adhesión (Figura 27A). Mientras que las histonas enriquecidas en H3K27me₃ se encuentran asociadas a segmentos del CS (Figura 27A). Las SINE y LTR de las LEARS se enriquecen en SYCP3/H3K27me₃ y al afectar la estructura de la cromatina, la histona H3K27me₃ pierde su patrón de colocación con el CS y las secuencias SINE y LTR, se disocian parcialmente de los ELs del CS (Figura 27B), lo cual se puede observar como ausencia de ADN en los EL del CS (Figura 24B y D). Sin embargo, las secuencias LINE y satelitales no pierden su asociación a los EL del CS, a pesar de presentar cambios drásticos en las modificaciones post-traduccionales asociadas con las histonas H3K9me₃ y H4K20me₃. Por lo tanto, pensamos que la presencia de la histona H3K27me₃ en las secuencias repetidas SINE y LTR representa una marca epigenética

importante para su asociación a los EL del CS. Al perturbarse el patrón de las modificaciones epigenéticas de las secuencias repetidas LINE y Satelitales, sin afectar su anclaje a los EL del CS, se alude a un código de marcas epigenéticas que al menos sea importante para incorporar estas secuencias al EL; por lo tanto, no todo el EL de un CS está desprovisto de ADN (Figura 24D). Por otra parte, la RC está afectada en ratas tratadas con TSA; por lo tanto, es necesario un estudio donde se demuestre que la disociación de ADN en los EL co-relaciona con la pérdida de la RC. Una observación adicional es que los ELs al perder la RC se separan y se anclan a la eN separados, lo cual se puede apreciar en inmunolocalizaciones donde el extremo del CS se ancla a la eN y se aprecia en forma de “Y” (Figura 27G) lo que sugiere una separación de los EL, corroborada por las reconstrucciones tri-dimensionales a nivel de microscopía electrónica (3D-EM) (Figura 27H). En resumen, la asociación de la cromatina con los ELs del CS depende del enriquecimiento de modificaciones post-traduccionales de las histonas en las LEARS. Además cada clase de secuencias repetidas, de las LEARS, depende de diferentes marcas de histonas para co-localizar con los ELs del CS, constituyendo así un código epigenético de las LEARS para asociarse al CS en espermatoцитos en etapa de paquiteno.

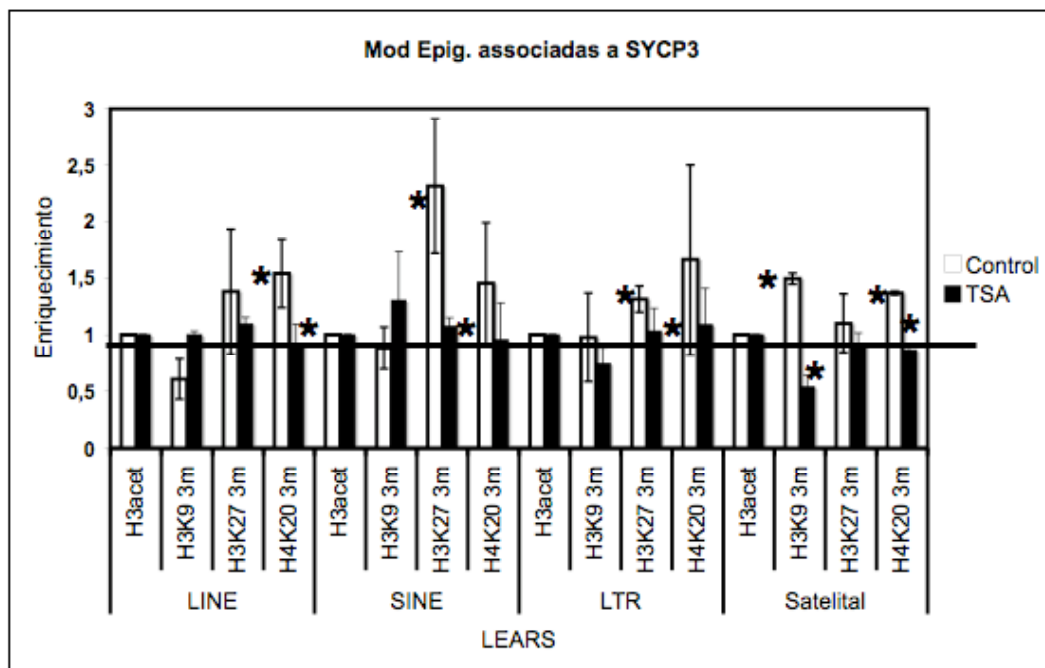
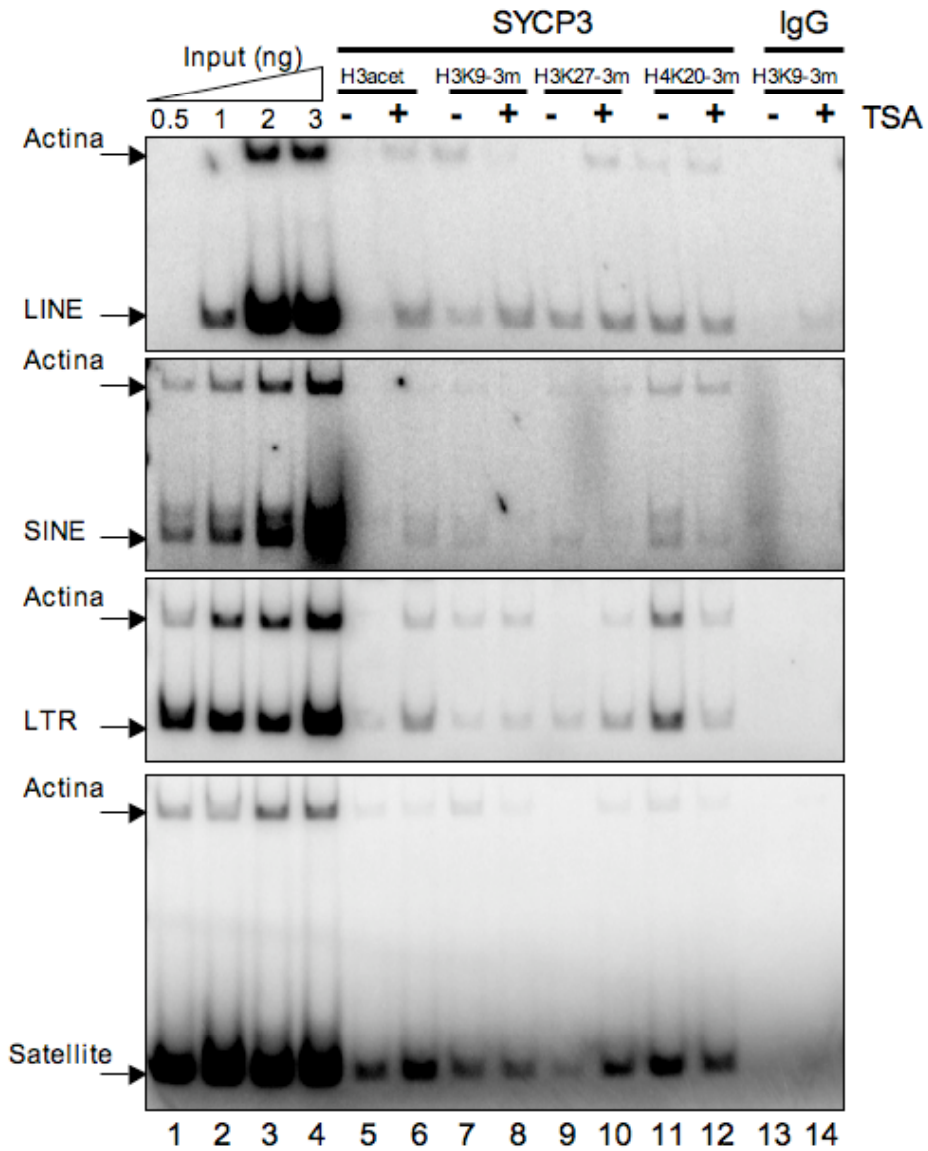


Figura 26: PCRs dúplex radioactivas y cuantificación de los ensayos de CHIP-ReChIP en ratas controles y tratadas con TSA. Se obtuvo el rango lineal de amplificación de las secuencias repetidas (LINE, SINE, LTR y Satelitales, respectivamente) y de la secuencia codificante actina (líneas 1-4). Después se realizaron las PCRs dúplex, usando como templado la cromatina de los ensayos de CHIP-ReChIP. La cuantificación de los productos de PCRs se graficó y los enriquecimientos de las secuencias repetidas se determinan con un valor mayor a 1. El eje de las Y, tiene una línea que cruza perpendicularmente en el valor de 1, cualquier valor por encima de esta línea significa enriquecimiento. Las barras del error estándar fueron determinadas a partir de tres ensayos diferentes de PCR y de tres ensayos independientes de CHIP-ReChIP. Los asteriscos en las barras blancas indican asociación significativa entre LEARS/SYCP3/marca de histona respectiva. Mientras que los asteriscos en las barras negras indican reducción significativa entre LEARS/SYCP3/marca de histona respectiva, después del tratamiento con TSA.

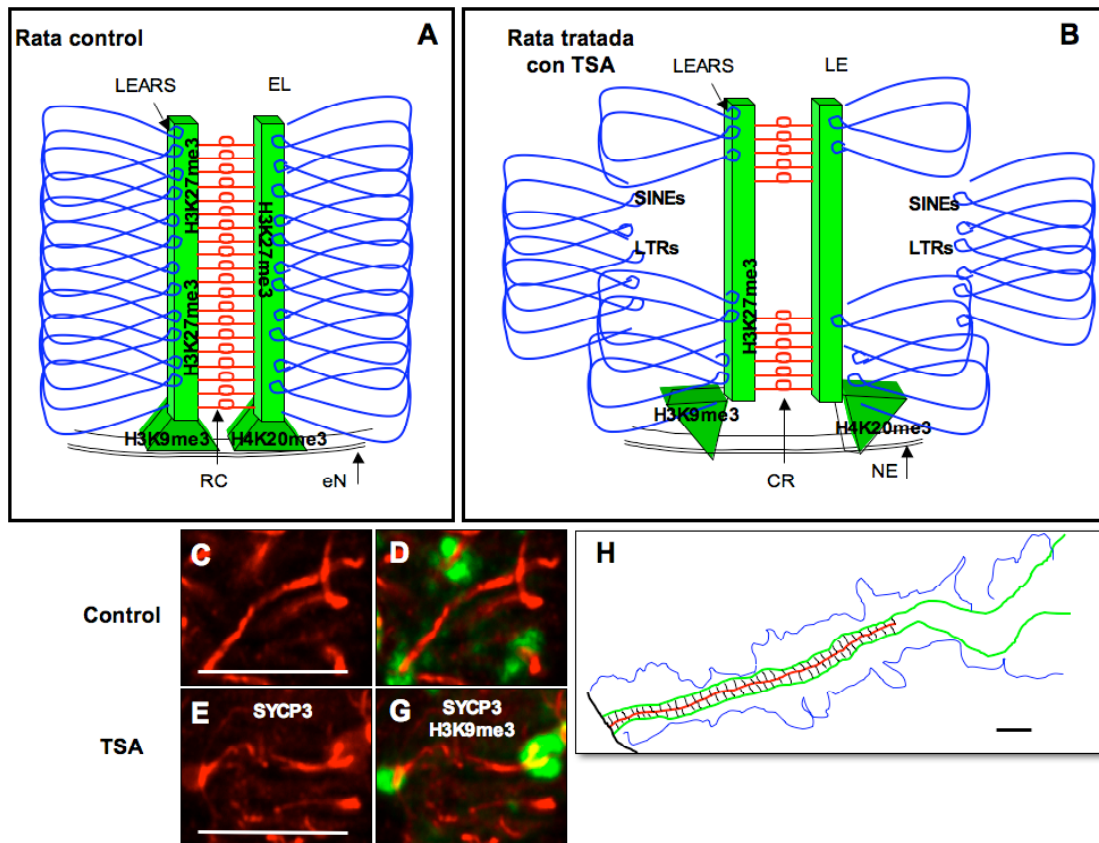


Figura 27: Modelo de la estructura del CS en células paquítenas de ratas control y tratadas con TSA. **A)** CS de rata control. La cromatina de los cromosomas homólogos se ancla a los ELs del CS mediante las LEARS, las cuales tienen una estructura en su cromatina determinada por modificaciones post-traduccionales de las histonas, como los son H3K9me3 y H4K20me3 en los CSs anclados a la envoltura nuclear (eN) y H3K27me3 sobre los ELs del CS. **B)** Después de la inhibición de las desacetilasas de histonas, la alteración más dramática ocurrió en la asociación de H3K27me3 con los ELs y con las secuencias repetidas SINEs y LTRs, además de la pérdida de estas secuencias en los ELs de los CSs. **C-H)** Se observa una separación de los ELs cerca de la eN y la pérdida de fragmentos de la región central (RC) entre los ELs de los CSs.

10.2. Cuerpo XY

Una estructura evidente e importante durante la etapa de paquiteno es el cuerpo XY. Se ha postulado que se forma por un mecanismo diferente al empleado durante la inactivación del cromosoma X en organismos XX de mamíferos, mediante un proceso de compensación de dosis. En estos organismos, el ARN transcrito del gen *XIST* (ARN *Xist*) es el principal elemento regulador de dicho proceso. Sin embargo, aún no queda claro la presencia del transcrito del gen *XIST* en el cuerpo XY. Otro dato poco estudiado, es el de la formación de la heterocromatina para evitar la recombinación heteróloga de los cromosomas sexuales X e Y. Por lo tanto, en este trabajo nos enfocamos a dos objetivos que permitirán entender en detalle la formación del cuerpo XY durante la profase meiótica I (descritos en la sección de objetivos), lo cual permitirá entender parte de los problemas de infertilidad y/o enfermedades genéticas asociadas a defectos en la recombinación o segregación de los cromosomas sexuales en organismos mamíferos machos incluyendo el humano.

10.2.1 El cuerpo XY está enriquecido en ARNs totales

La presencia de ARN en el cuerpo XY ha sido sugerida previamente (Ayoub et al., 1997; Echeverría et al., 2003); sin embargo, no se ha realizado un estudio detallado de la presencia de ARNs dentro del cuerpo XY, los cuales puedan estar involucrados en la formación de este cuerpo. En este trabajo, se analizó la presencia de ARN en el cuerpo XY a nivel de microscopía óptica y electrónica. Para lo cual, se utilizó una sonda de ADN genómico marcada con digoxigenina que se hibridó con el ARN de las preparaciones de túbulos seminíferos en laminillas, evitando desnaturalizar el ADN de dichas muestras y descartar hibridación ADN-ADN. Con esta metodología se observó señal de hibridación en el cuerpo XY (Figura 28A-C). Para un mayor detalle de la señal de hibridación se realizaron cortes ópticos, en los cuales se localizó la señal de hibridación en la masa de heterocromatina del cuerpo XY (Figura 28D-F). Al trazar una línea a lo largo de la masa de heterocromatina del cuerpo XY y graficar la intensidad de la señal sobre esta línea, observamos que la señal es más fuerte en dos puntos comparados con el resto de la marca dentro del cuerpo sexual (Figura 28D'-F' y G), lo cual indica la presencia de ARNs dentro del cuerpo XY, aparentemente concentrada en dos regiones de la masa de

heterocromatina del cuerpo. Para corroborar que la hibridación sonda-ARN es específica, se realizó un tratamiento con RNasa sobre las muestras, de esta forma al repetir la hibridación, observamos que la señal ha desaparecido, confirmando así la especificidad de la hibridación (Figura 28H-J). Para alcanzar un mayor límite de resolución que confirme la presencia de ARN dentro del cuerpo XY, se realizó una hibridación *in situ* con la misma sonda, pero acoplada a granos de oro coloidal, para poder analizar los cuerpos XY a nivel de microscopía electrónica. De esta forma, constatamos que la marca de hibridación se encuentra tanto en la heterocromatina del cuerpo XY (Figura 28K) como en los ejes cromosómicos de los cromosomas sexuales con una mayor concentración en estos últimos (Figura 28L). Estos datos nos permiten demostrar la presencia de ARN vinculado con el cuerpo XY y acumulado de manera específica a lo largo de los ejes cromosómicos.

10.2.2. El ARN *Xist* está presente en células en espermatogenesis pero ausente del cuerpo XY

La presencia de ARN *Xist* en el cuerpo XY sólo se ha detectado por RT-PCR *in situ* (Ayoub et al., 1997). Además, por ensayos de RT-PCR *in vitro*, se ha demostrado que el transcrito *Xist* se encuentra presente en etapas tempranas de la onda espermatogénica de ratones y humanos, desde espermatogonias tipo A hasta paquiteno (Salido et al., 1992). Sin embargo, debido a la falta de una hibridación *in situ* de este transcrito, no se sabe en que etapa de la espermatogénesis es evidente. Por lo tanto, se diseñó una sonda de ARN complementaria al ARN *Xist* para realizar una hibridación *in situ* de este transcrito (Figura 6). El transcrito de ARN *Xist* se observó en espermatogonias tipo A y en ningún otro tipo celular (Figura 29A-E y 30A), estando ausente del cuerpo XY en etapa de paquiteno (Figura 29A y F). La sonda control, diseñada en el extremo 5' del gen *XIST*, también mostró señal de hibridación en espermatogonias tipo A (Figura 30B), debido a que la sonda control se ubica en el promotor del gen *XIST* y dicho promotor presenta transcripción basal en células madre embrionarias XX, donde se recapitula la inactivación del cromosoma X por compensación de dosis (Owaga et al., 2008). Por otra parte, los transcritos del *Tsix* RNA (RNA antisentido del ARN *Xist*) no se observan en ningún tipo celular de la onda espermatogénica (Figura 30C-D). A partir de

estas hibridaciones *in situ* se concluye que a pesar de encontrarse ARN dentro del cuerpo XY, el ARN *Xist* no está presente en este cuerpo. Por otra parte, el ARN *Xist* se encontró en células del tipo espermatogonias A, probablemente participando en un proceso aún no descrito.

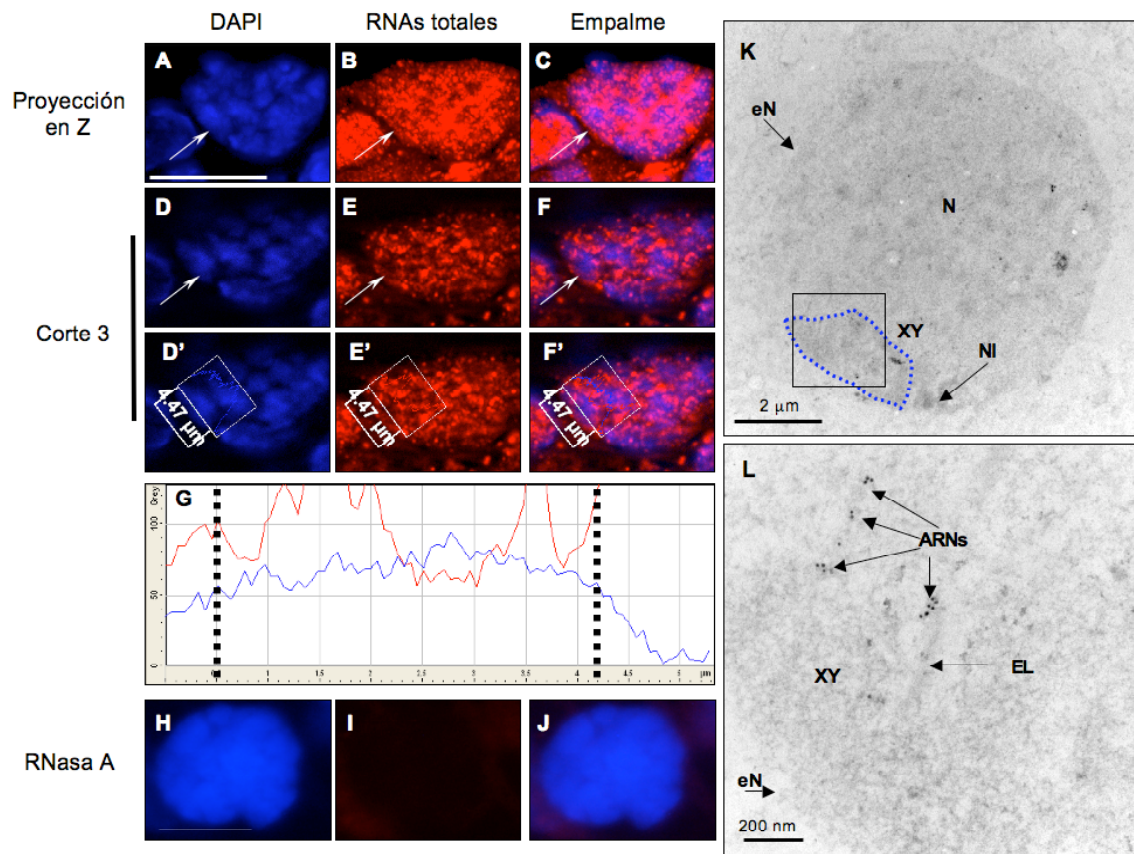


Figura 28: Hibridación *in situ* de ARNs totales sobre el cuerpo XY, usando una sonda de ADN genómico. **A-C)** Proyecciones en el plano focal “Z” de cortes ópticos de una célula paquiténica, donde se observa la masa de heterocromatina en DAPI, correspondiente al cuerpo XY, la cual también presenta señal de hibridación de ARNs. **D-F)** Corte óptico 3 de 8, de la misma célula paquiténica, donde se aprecia claramente la masa de heterocromatina del cuerpo XY así como la presencia de ARNs en este cuerpo. **D’-F’)** Histograma de fluorescencia sobre la masa de heterocromatina del cuerpo XY en el corte óptico 3. **G)** Gráfica del histograma de fluorescencia donde se observa que dentro de la curva de fluorescencia del DAPI (azul), delimitada por líneas punteadas, se aprecian dos grandes picos de fluorescencia de ARNs (rojo). **H-J)** hibridación ARNs sobre una célula paquiténica previamente tratada con RNasa. Barras representan una escala de 10 µm. **K)** Hibridación *in situ* ultraestructural, donde se aprecia una célula paquiténica inicial, con un cuerpo XY (punteado en azul). **L)** Aumento del cuerpo XY del recuadro negro en K, donde se observa la marca dentro del cuerpo XY y en estructuras altamente contrastadas, las cuales corresponden a los elementos laterales de los cromosomas sexuales. Abreviaturas: eN, envoltura nuclear; N, núcleo; NI, nucleolo; XY, cuerpo XY; EL, elemento lateral.

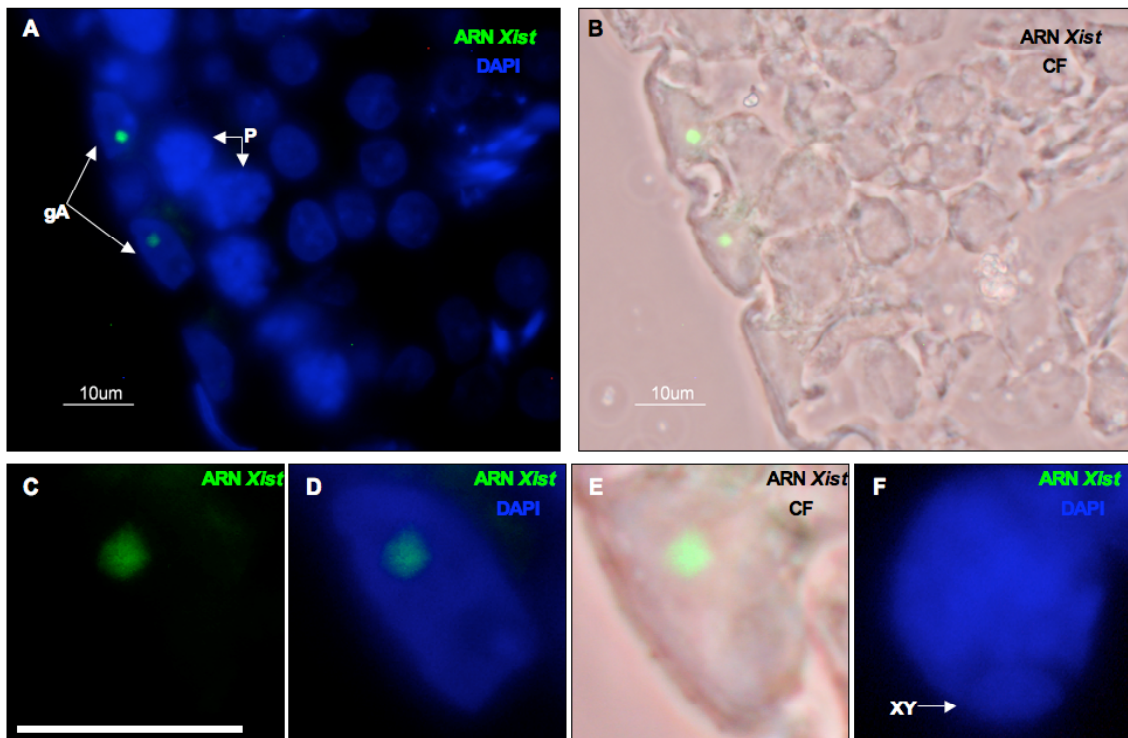


Figura 29: Hibridación *in situ* de ARN *Xist* en túbulos seminíferos de ratas. **A)** Hibridación *in situ* para el ARN *Xist* (verde), la marca aparece sólo en espermatogonias tipo A (gA). **B)** Contraste de fases de la imagen en A, empalmado con el ARN *Xist* (verde). **C-E)** Aumento de una espermatogonia tipo A de la imagen A. **F)** Aumento de un paquiteno de la imagen A. Barras representan una escala de 10 μm .

10.2.3. La heterocromatina del cuerpo XY presenta un perfil epigenético característico

La cromatina del cuerpo XY está enriquecida en proteínas y modificaciones post-traduccionales en las histonas asociadas a heterocromatina (Hoyer-Fender, 2003; Handel, 2004), sin embargo no se ha detallado el perfil epigenético que caracteriza a este cuerpo de heterocromatina. Por lo tanto, se analizó un sub-grupo de marcas de histonas que, por su relación con la formación de heterocromatina, se podrían encontrar involucradas con la heterocromatina del cuerpo XY.

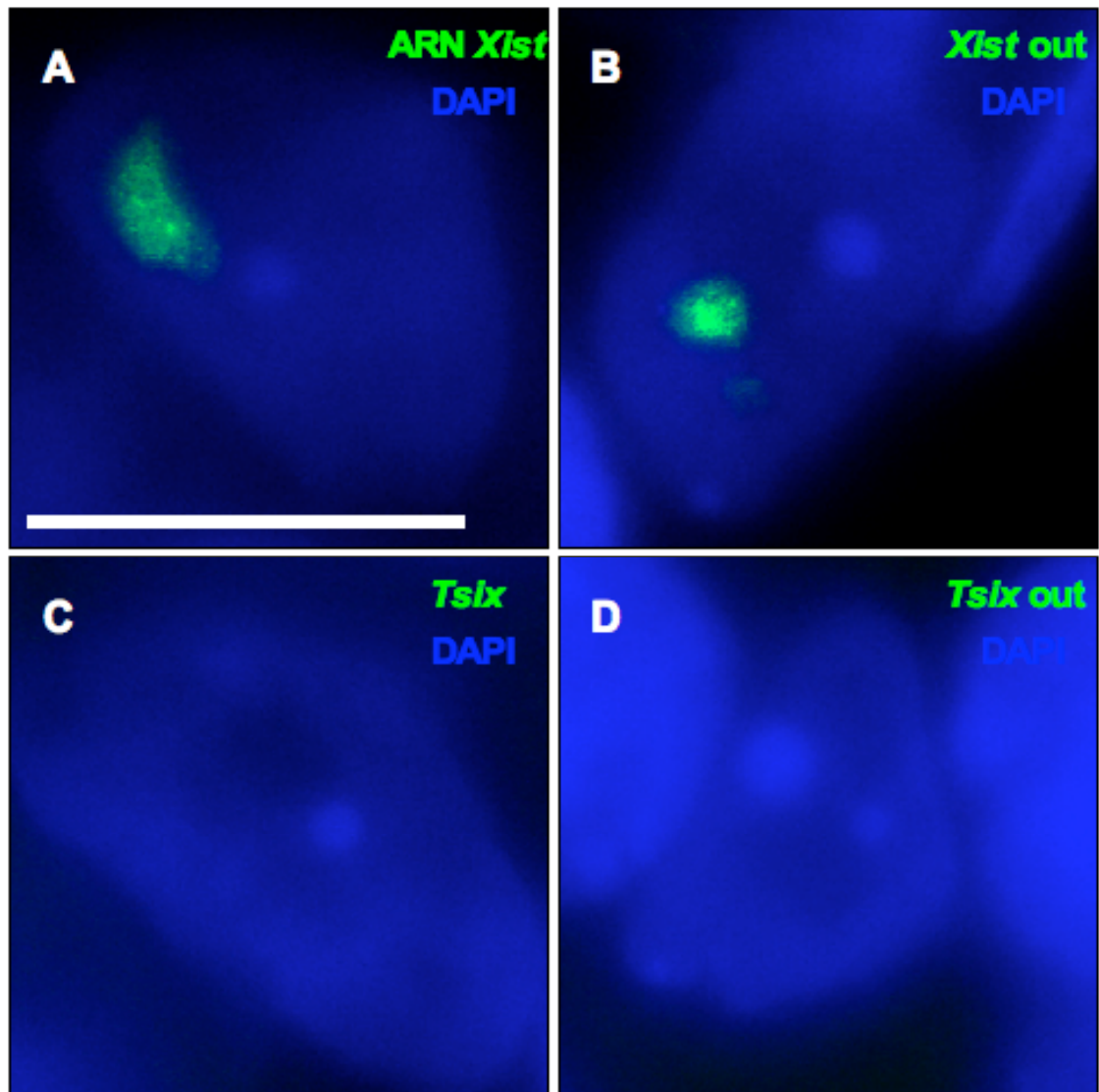


Figura 30: Hibridación *in situ* de ARN *Xist*, *Tsix* y sondas control (*Xist out* y *Tsix out*) en espermatogonias tipo A. **A)** Hibridación *in situ*, usando la sonda que reconoce al ARN *Xist* (verde) en una espermatogonia tipo A. **B)** Hibridación *in situ*, usando la sonda que reconoce una región fuera del inicio del transcrito ARN *Xist* (verde) en una espermatogonia tipo A. **C-D)** Hibridación *in situ*, usando la sonda que reconoce al transcrito anti-sentido del gen *XIST*, es decir al transcrito *Tsix* en una espermatogonia tipo A. Las barras representan una escala de 10 μm .

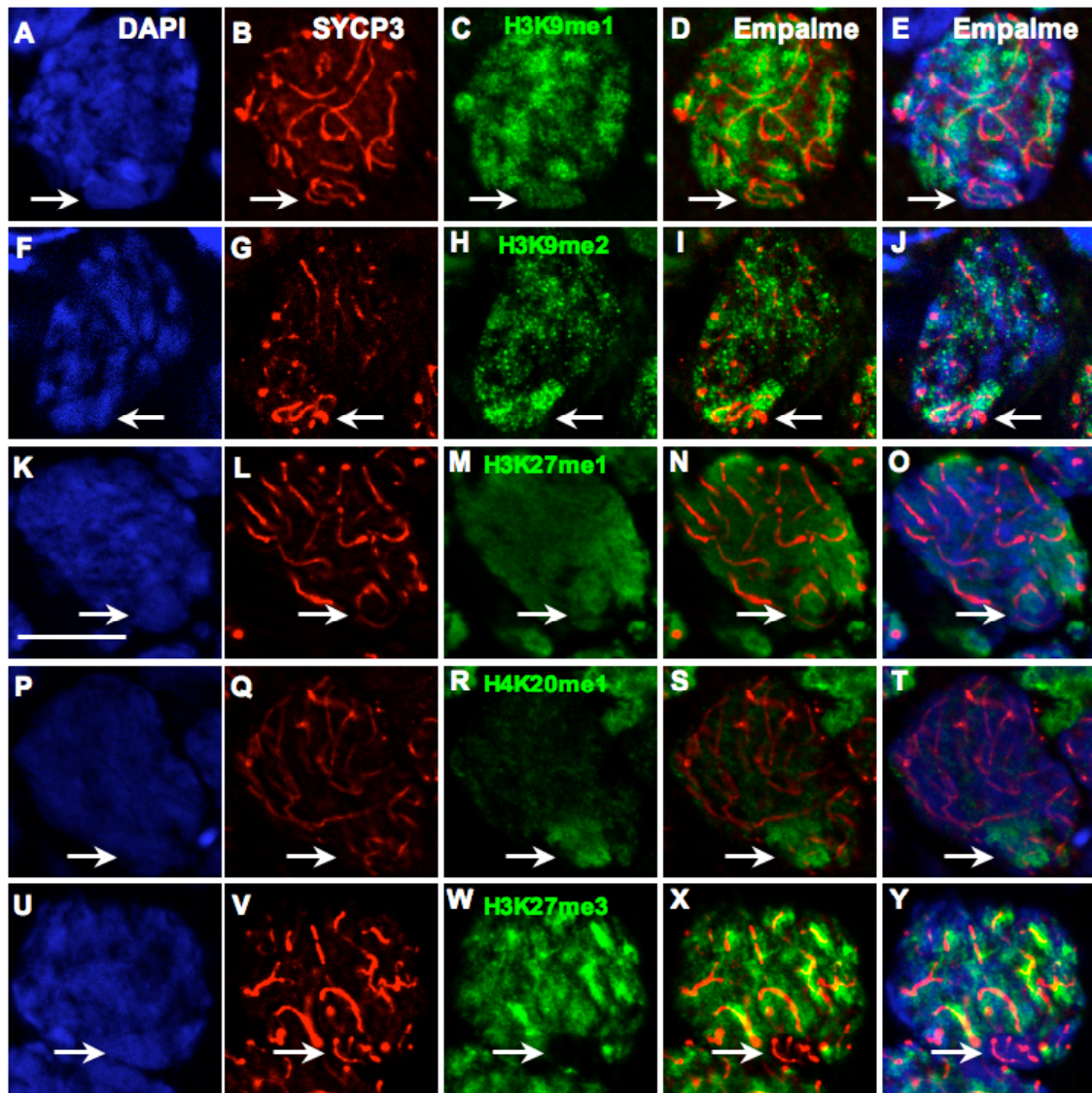


Figura 31: Secciones ópticas de dobles inmunolocalizaciones mostrando el cuerpo XY (DAPI, azul), sus elementos laterales (SYCP3, rojo) y su perfil epigenético (MOD EPI en verde). **A-E)** Inmunolocalización de SYCP3 (rojo) y H3K9me1 (verde) en la heterocromatina del cuerpo XY (azul) (flecha). **F-J)** Inmunolocalización de SYCP3 (rojo) y H3K9me2 (verde) en la heterocromatina del cuerpo XY (azul y flecha). **K-O)** Inmunolocalización de SYCP3 (rojo) y H3K27me1 (verde) en la heterocromatina del cuerpo XY (azul y flecha). **P-T)** Inmunolocalización de SYCP3 (rojo) y H4K20me1 (verde) en la heterocromatina del cuerpo XY (azul) (flecha). **U-Y)** Inmunolocalización de SYCP3 (rojo) y H3K27me3 (verde) en la heterocromatina del cuerpo XY (azul y flecha). Las barras representan una escala de 10 μm .

Para identificar los ejes cromosómicos de los cromosomas sexuales, se realizó una inmunolocalización de la proteína SYCP3, mientras que la heterocromatina del cuerpo XY es evidenciada mediante la incorporación de DAPI. Las modificaciones post-transcripcionales de las histonas son detectadas con sus anticuerpos respectivos. De esta forma, hemos encontrado modificaciones post-traduccionales de las histonas asociadas al cuerpo XY,

como lo son: H3K9me1, H3K9me2 y H3K27me1, las cuales también se distribuyen en otras regiones de cromatina (Figura 31A-O). Mientras que H4K20me1 es una marca post-traducciona de la histona H4 asociada preferencialmente a la organización cromatínica del cuerpo XY (Figura 31P-T). Mientras que la marca de histona asociada a la H3K27me3 se encuentra excluida de la cromatina del cuerpo XY (Figura 31U-Y). Las marcas de histonas asociadas al cuerpo XY corresponden a marcas que definen tanto una cromatina laxa como una heterocromatina facultativa (Figura 35). Por lo tanto, la asociación de estas marcas de histonas a la heterocromatina del cuerpo XY, parece ser importante para la estructura de este cuerpo. Para determinar, de manera funcional, si la presencia de estas marcas de histonas es relevante para la estructura y/o formación del cuerpo XY, interrumpimos la vía de metilación de los residuos de histonas mediante el inhibidor de las HDACs y analizamos el perfil epigenético, la formación y la estructura del cuerpo XY.

10.2.4. La heterocromatina asociada al cuerpo XY es importante para su formación y estructura

En este trabajo hemos identificado marcas de histonas características de la heterocromatina del cuerpo XY (Figuras 30 y 34), las cuales corresponden a la metilación de residuos de lisinas en los extremos amino-terminal de las histonas. La mayoría de estas marcas de histonas se asocian a cromatina laxa y a heterocromatina facultativa (Martens et al., 2005; Barski, 2007). Por lo tanto, proponemos que la presencia de estas modificaciones de histonas juega un papel en la formación y/o estructura del cuerpo XY. Para corroborar esta hipótesis, decidimos inhibir la acción de las desacetilasas de histonas HDACs mediante el uso del TSA (Figura 5), para evitar parcialmente la metilación de los residuos de histonas y analizar su efecto en la formación del cuerpo XY en etapas de paquiteno. Al analizar los efectos de la inhibición parcial de los residuos de lisinas en las histonas en la formación del cuerpo XY, observamos tres fenómenos: 1) pérdida de marcas de histonas en la masa de heterocromatina del cuerpo XY, 2) disociación de la heterocromatina del cuerpo XY y presencia de los cromosomas sexuales en diferentes regiones del núcleo paquiténico, por lo tanto no hay sinapsis entre éstos y 3) formación incorrecta del cuerpo XY a nivel de sinapsis inadecuadas entre los ejes cromosómicos de

los cromosomas sexuales. Por lo tanto, estos datos muestran que la presencia de heterocromatina es importante para la formación y la estructura del cuerpo XY.

10.2.5. Pérdida de marcas de histonas en la masa de heterocromatina del cuerpo XY

Después de la interrupción parcial de la formación de heterocromatina con el TSA, se llevó a cabo un análisis de las alteraciones en las marcas post-traduccionales de las histonas asociadas al cuerpo XY. Las marcas de histonas H3K9me1 y H3K9me2 asociadas a la heterocromatina del cuerpo XY en paquítenos de ratas control (Figura 32A-B, E-F), pierden su distribución a lo largo del cuerpo XY después del tratamiento con TSA (Figura 32C-D, G-H), mientras que la marca de la histona H4K20me1 sigue presente en el cuerpo XY después del tratamiento (Figura 32I-L). Por otra parte, notamos una drástica pérdida de la histona con la marca H3K27me1 en el cuerpo XY (Figura 32M-P). Estos resultados sugieren que al afectar la vía de metilación de histonas, se altera el perfil epigenético de la heterocromatina ligada a la formación del cuerpo XY y por tanto, se afecta su estructura y formación.

10.2.6. Disociación de la heterocromatina del cuerpo XY

Una de las observaciones realizadas en los túbulos seminíferos de las ratas tratadas con la droga inhibidora de desacetilasas de histonas, fue la muerte celular de paquítenos tardíos, etapa donde se aprecia claramente el cuerpo XY (Figura 19). Al buscar el cuerpo XY en paquítenos iniciales y medios en las ratas tratadas con TSA, se observó que una de las alteraciones más frecuentes es la ausencia de una concentración de heterocromatina, característica del cuerpo XY (Figura 33), por lo tanto se hizo difícil la identificación de dicho cuerpo. Para evidenciar el cuerpo XY, se utilizó un marcador específico de su heterocromatina, la variante histónica H2AX fosforilada (H2AX γ) (Turner et al., 2004). En células en etapa de leptoteno la histona H2AX γ se observó en todo el núcleo, marcando los DSBs, tanto en ratas control, como en ratas tratadas con TSA (Figura 33A-D). En ratas control, esta marca de histona se acumula en el cuerpo XY en etapa de paquíteno (Figura 33I-J); delimitando la heterocromatina de este cuerpo (Turner et al., 2004); sin embargo, en ratas tratadas con TSA, la

señal asociada a la histona H2AX γ , no se aprecia como en ratas control (Figura 33G-H y K-L). La distribución de la histona H2AX γ en células paquiténicas de ratas tratadas con TSA, se observa disminuida y rodeando dos ejes cromosómicos que no están apareados (Figura 33G-H y K-L), lo que sugiere que la distribución de esta histona se acumuló a la cromatina de los cromosomas sexuales, pero no hay formación del cuerpo XY.

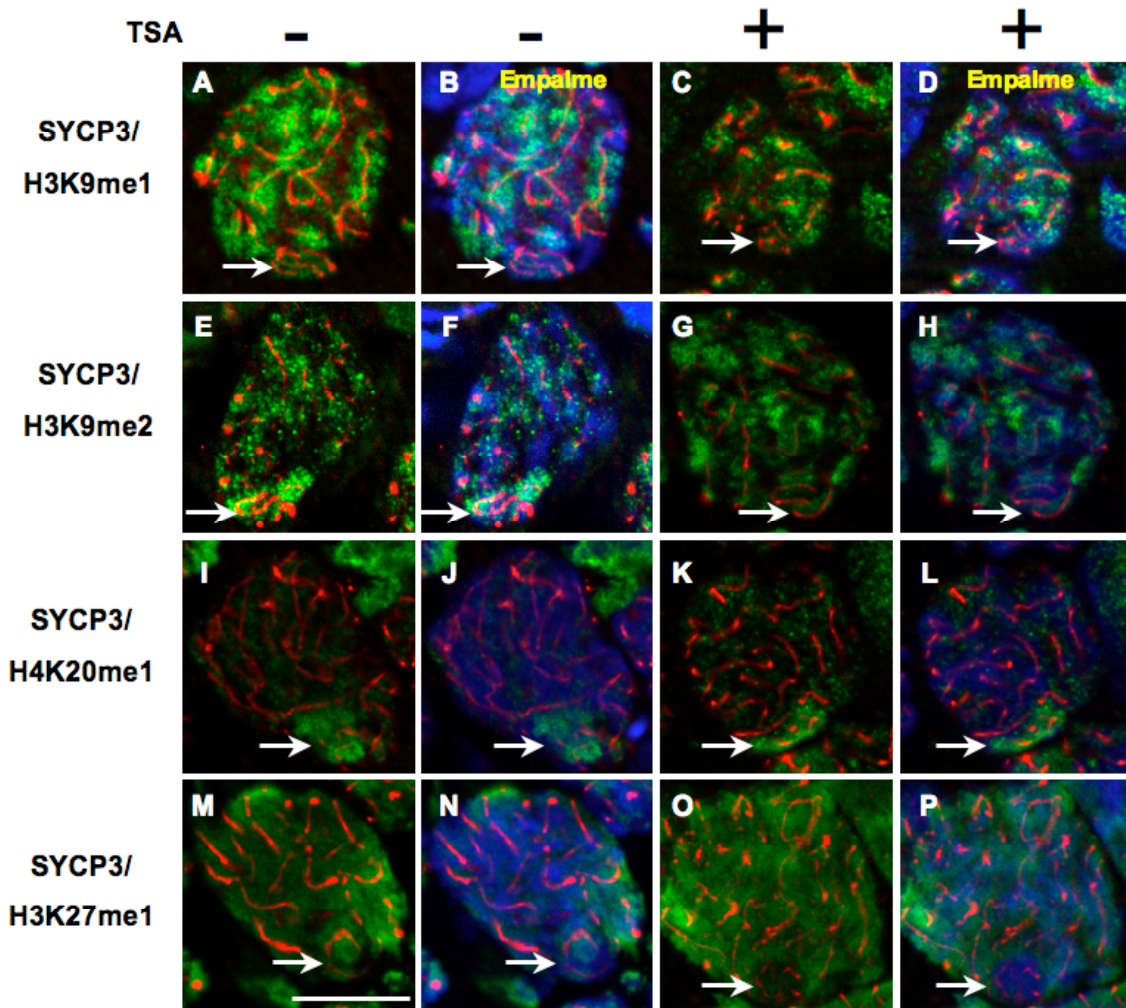


Figura 32: Secciones ópticas de dobles inmunolocalizaciones mostrando el cuerpo XY (DAPI, azul), sus elementos laterales (SYCP3, rojo) y su perfil epigenético (verde) en ratas control y tratadas con TSA. **A-D)** Inmunolocalización de SYCP3 (rojo) y H3K9me1 (verde) en la heterocromatina del cuerpo XY (flecha) en ratas control (A, B) y en ratas tratadas con TSA (C, D). **E-H)** Inmunolocalización de SYCP3 (rojo) y H3K9me2 (verde) en la heterocromatina del cuerpo XY (flecha) en ratas control (E, F) y en ratas tratadas con TSA (G, H). **I-L)** Inmunolocalización de SYCP3 (rojo) y H4K20me1 (verde) en la heterocromatina del cuerpo XY (flecha) en ratas control (I, J) y en ratas tratadas con TSA (K, L). **M-P)** Inmunolocalización de SYCP3 (rojo) y H3K27me1 (verde) en la heterocromatina del cuerpo XY (flecha) en ratas control (M, N) y en ratas tratadas con TSA (O, P). La barra representa una escala de 10 μ m.

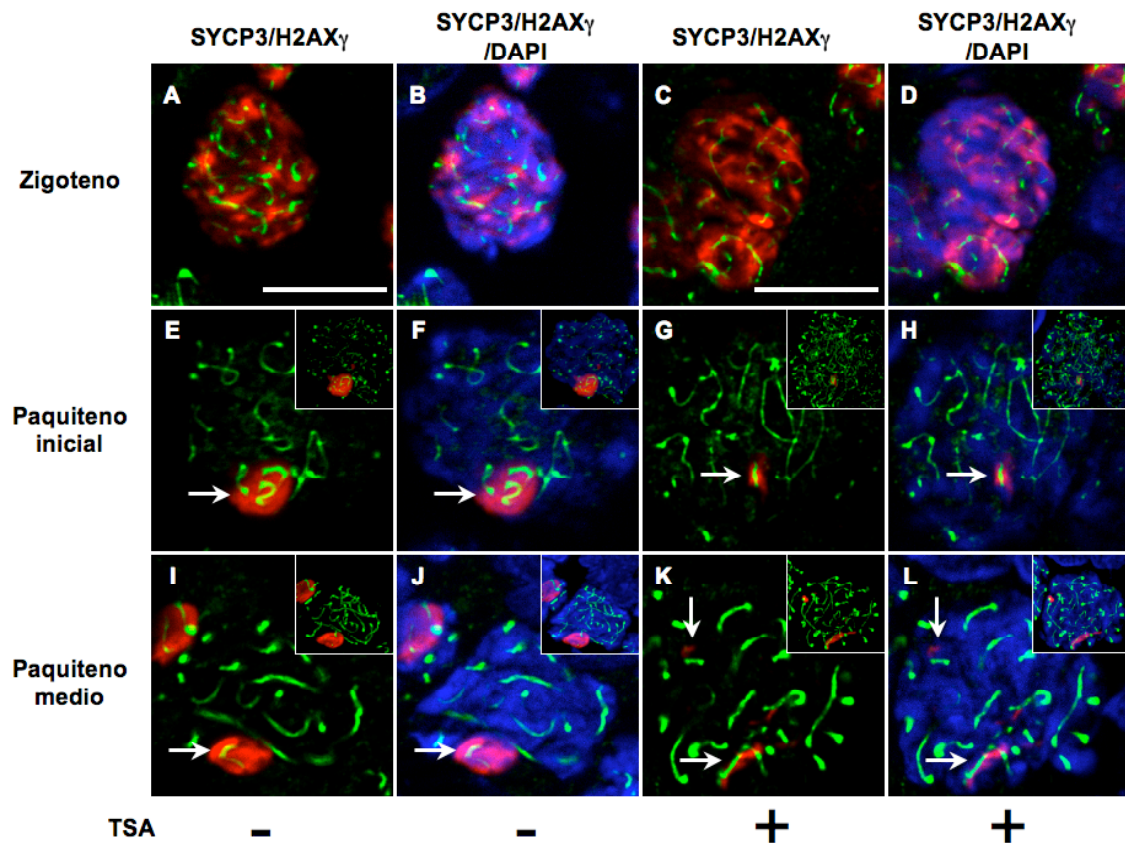


Figura 33: Secciones ópticas de dobles inmunolocalizaciones contra SYCP3 y H2AX γ en ratas control y en ratas tratadas con TSA. **A-D)** inmunolocalización de SYCP3 (verde) y H2AX γ (rojo) en etapa de zigoteno en ratas control (A, B) y en ratas tratadas con TSA (C, D). **E-H)** Inmunolocalización de SYCP3 (verde) y H2AX γ (rojo) en etapa de paquiteno inicial en ratas control (E, F) y en ratas tratadas con TSA (G, H). **I-L)** Inmunolocalización de SYCP3 (verde) y H2AX γ (rojo) en etapa de paquiteno medio en ratas control (I, J) y en ratas tratadas con TSA (K, L), las flechas en K, L muestran las dos zonas del núcleo donde se observa la marca de la histona H2AX γ . Los recuadros representan las proyecciones en el plano focal "Z" de las secciones ópticas en los paneles correspondientes. Las barras representan una escala de 10 μ m.

10.2.7. Formación anormal del cuerpo XY

En células paquiténicas de ratas control, los cromosomas sexuales del cuerpo XY se sitúan dentro de la masa de heterocromatina característica del cuerpo XY (Figura 34A-D), con una reducida región de homología entre los cromosomas sexuales X-Y que se aparean y forman un CS, con una región central (RC) construida por SYCP1. Los ELs de los cromosomas sexuales son marcados mediante una inmunolocalización de la proteína SYCP3 (Figura 34B), mientras que la RC se evidencia con la inmunolocalización de SYCP1 (Figura 34C), la cual es casi imperceptible debido al nivel de resolución de los microscopios ópticos. Por otra parte, en células paquiténicas de ratas tratadas con TSA, se observa la masa de heterocromatina clásica del cuerpo XY (Figura

34F y K); sin embargo, dentro de este cuerpo se aprecian los ELs de los cromosomas sexuales con inconsistencias en su estructura, observándose fragmentados y discontinuos (Figura 34L). De manera inesperada, los ELs de los cromosomas sexuales aparecen apareados y con una clara sinapsis, evidenciada por la inmunolocalización de SYCP1 (Figura 34H y M). Las imágenes obtenidas sugieren que la formación de heterocromatina es importante para la organización del cuerpo XY y que al afectar parcialmente esta vía, los cromosomas sexuales cercanos entre sí realizan apareamientos y sinapsis de manera incorrecta.

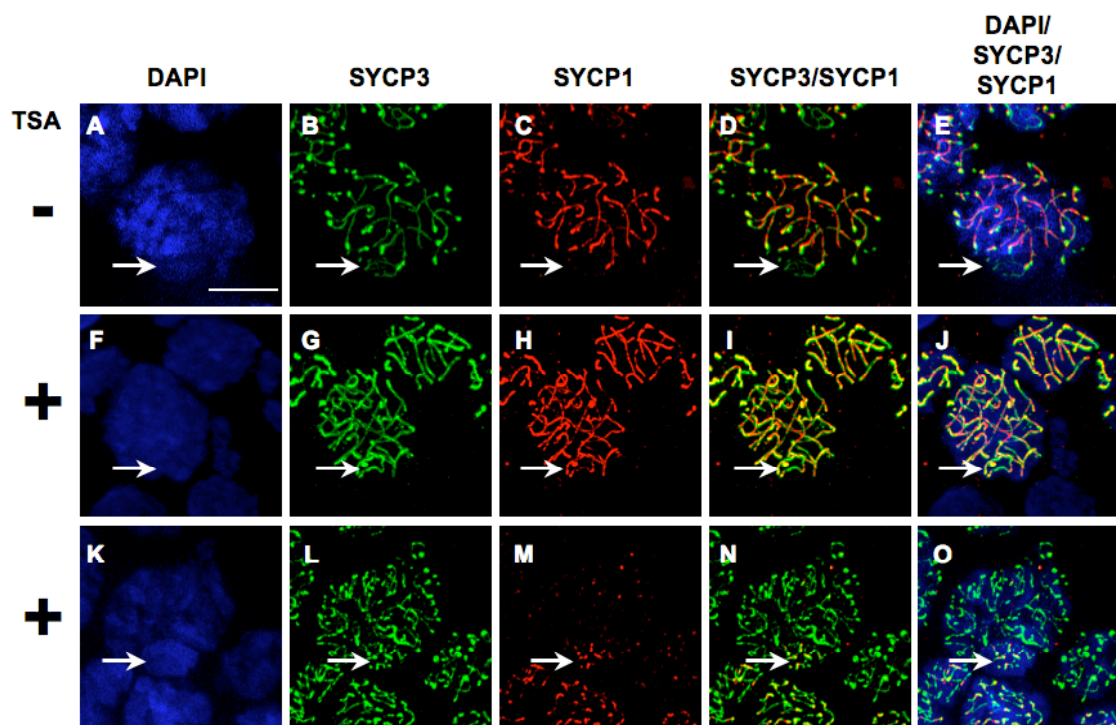


Figura 34: Proyecciones en el plano “Z” de dobles inmunolocalizaciones contra SYCP3 (verde) y SYCP1 (rojo) en la masa de heterocromatina del cuerpo XY (flecha). **A-E)** Ratas control. **F-O)** Ratas tratadas con TSA. La barra en A representa una escala de 10 μm para todas las imágenes.

10.2.8. Modelo de la heterocromatina del cuerpo XY

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, proponemos un modelo que pretende explicar la organización del cuerpo XY y sus alteraciones debido a defectos epigenéticos (Figura 35). A nivel de microscopía óptica, este cuerpo se observa como una masa de heterocromatina adosada a la envoltura nuclear, que se puede evidenciar con el DAPI, dentro de esta masa se

encuentran dos ELs, los cuales corresponden a cada uno de los cromosomas sexuales. Dichos ELs se aparean y forman un pequeño CS en su región de homología (región pseudoautosómica, PAR) (Figura 35A). Esta estructura del cuerpo XY, depende de la formación de heterocromatina, determinada por la metilación de los residuos de lisinas en las histonas, como: H3K9me1, H3K9me2, H3K27me1 y H4K20me1 (Figura 35A). Cuando se interfiere con la metilación de residuos de lisinas, mediante la inhibición de las desacetilasas de histonas (HDACs), se observan tres fenómenos: 1) no se aprecian alteraciones en la estructura y formación del cuerpo XY, pero se pierde parte de su patrón epigenético (Figura 35B), como lo son las marcas de histonas H3K27me1, H3K9me2 y H2AX γ , 2) el cuerpo XY se disocia y los ELs de los cromosomas sexuales ocupan distintas regiones en el núcleo, como se muestra a partir de la distribución de la histona modificada H2AX γ (Figura 35B) y 3) se observa la estructura densa correspondiente al cuerpo XY, pero al interior de esta masa se presentan alteraciones en la estructura de los ELs y aún más evidente es la presencia de sinapsis inadecuadas entre éstos (Figura 35C). Estos datos sugieren que la heterocromatina del cuerpo XY es indispensable para su formación y estructuración. Por otra parte, la presencia de ARNs dentro del cuerpo XY, sugiere un papel de estos ARNs en la formación y/o estructura de los componentes del cuerpo XY, sin embargo se necesita de otros experimentos para determinar su función.

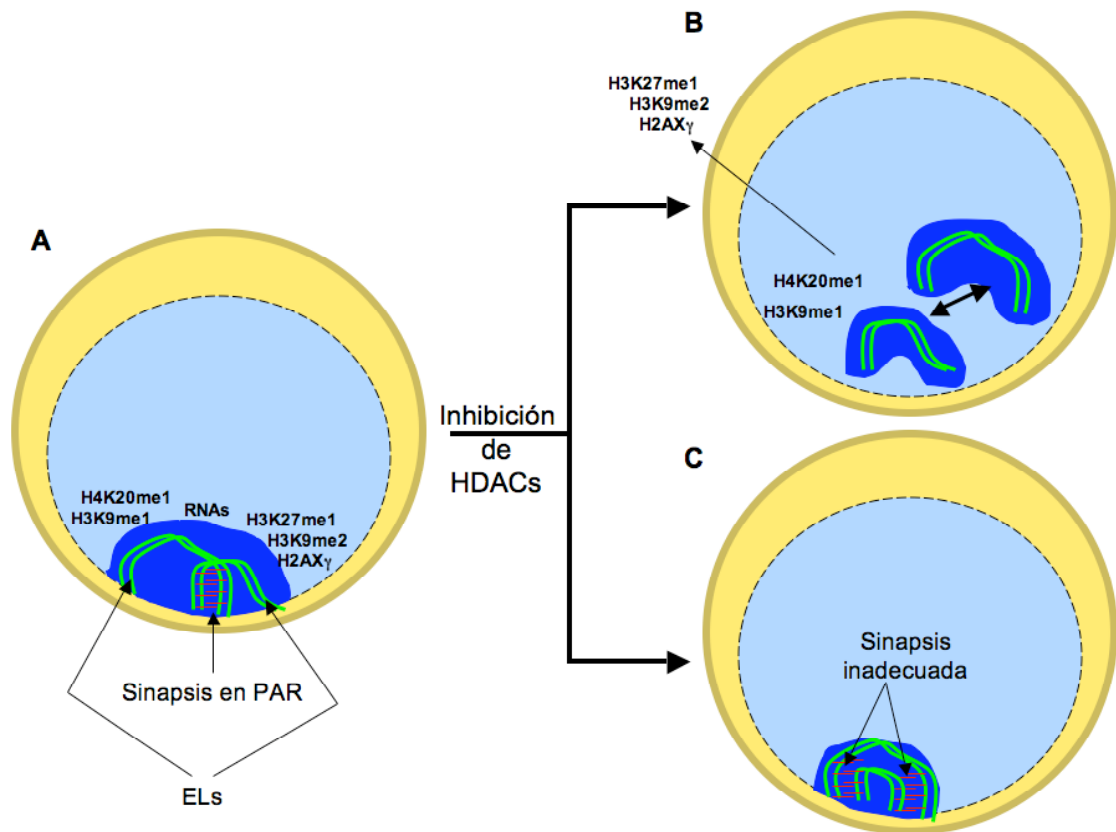


Figura 35: Modelo que explica la estructura del cuerpo XY. **A)** El cuerpo XY se encuentra adosado a la envoltura nuclear de un meiocito en estado de paquiteno. La heterocromatina de este cuerpo está enriquecida en marcas de histonas como lo son: H3K9me1, H3K9me2, H3K27me1, H4K20me1, H2AX γ , además de ARNs. Los elementos laterales (ELs) de los cromosomas sexuales comparten una pequeña región de homología (PAR) que es la que realiza sinapsis, formando un pequeño complejo sinaptonémico. **B)** Por medio de la inhibición de HDACs, se interfiere parcialmente con la formación de heterocromatina y como consecuencia de esta inhibición, la heterocromatina del cuerpo XY se disocia, pierde parte de su patrón epigenético y los cromosomas sexuales ocupan diferentes regiones en el núcleo. **C)** Por otra parte, el cuerpo XY se forma, pero con sinapsis inadecuadas entre los ELs de los cromosomas sexuales.

11. Discusión y conclusiones

Los organismos con reproducción sexual presentan ventajas evolutivas al tener variabilidad genética y por lo tanto más probabilidades de sortear las presiones de selección natural. Este tipo de reproducción se originó a partir de un proceso molecular y citofisiológico que permite a las células sexuales recombinar material genético entre sus cromosomas homólogos y reducir su juego cromosómico diploide en un número haploide. Al unirse dos células progenitoras o sexuales, mediante el proceso de la fecundación, cada célula provee su material genético; formando un nuevo organismo diploide, el cual mediante una división celular meiótica posterior, produce otro evento de intercambio de material genético entre ambos genomas. Para que estos eventos de recombinación ocurran, las células progenitoras llevan a cabo una división meiótica, en la cual los cromosomas homólogos se reconocen, aparean, recombinan y se segregan, asegurando una correcta progresión de la meiosis (Figura 1). Cualquier defecto en algunos de los procesos mencionados, produce severos daños en los organismos como infertilidad y/o aneuploidias (Hassold y Hunt, 2001).

El reconocimiento de homología ocurre en etapas iniciales de la profase meiótica I (Hernández-Hernández et al., 2008b), este reconocimiento de homología atrae y asocia a los cromosomas de forma que en etapa de zigoteno inicia su apareamiento mediante una estructura proteica conocida como el CS (Page y Hawley, 2004), en donde también se lleva a cabo el proceso final de intercambio de material genético, mientras que los cromosomas sexuales en machos de mamíferos que son heterólogos, sufren un proceso de inactivación y condensación, formando una estructura conocida como el cuerpo XY (Figura 4; Mckee y Handel, 1993). Estas dos estructuras son críticas para la progresión de la meiosis. Pocos estudios se han enfocado en analizar la relación que tiene la estructura de la cromatina en la formación el CS y del cuerpo XY. En este trabajo, se aislaron y caracterizaron de manera sistemática las secuencias asociadas a la estructura proteica del CS, además de elucidar las características de estas secuencias, que les permiten incorporarse al andamiaje del CS. Por otra parte, se detallaron algunos de los componentes estructurales del cuerpo XY, como la presencia de ARNs y de un patrón

epigenético. Además se demostró que la heterocromatina del cuerpo XY es importante para su formación y/o estructuración.

11.1. La estructura cromatínica de secuencias genómicas particulares, permite el anclaje de los cromosomas al complejo sinaptonémico

En este trabajo, hemos aislado y caracterizado las secuencias de ADN asociadas a los ELs del CS, las cuales nombramos LEARS (por sus siglas en inglés Lateral Element Associated Repeat Sequences), estas secuencias son del tipo de las altamente repetidas en el genoma de mamíferos (International Human Genome Sequencing Consortium 2001). Previamente, se había sugerido la asociación de algunas secuencias repetidas al CS (Karpova et al., 1989, 1995; Pearlman et al., 1992; Dadashev et al., 2005), sin embargo es la primera vez que se realiza un estudio sistemático en el cual se caracteriza un número tan amplio de secuencias asociadas al EL del CS, además de demostrar la co-localización *in situ* de las LEARS con los ELs del CSs a nivel de microscopía óptica y electrónica. Los resultados indican que no todas las secuencias repetidas del genoma de la rata se incorporan al andamiaje proteico del CS, sugiriendo un mecanismo de selección de secuencias para su incorporación al EL del CS. Por otra parte y de manera inesperada las hibridaciones *in situ* ultraestructurales evidenciaron la presencia de asas de cromatina que invaden la RC desde los EL del CS y que se encuentran marcadas con las sondas que reconocen las secuencias repetidas asociadas al EL (Figura 14). Debido a que el intercambio de material genético entre cromosomas homólogos se lleva a cabo en la RC del CS, las secuencias repetidas podrían estar involucradas directamente en una función adicional relacionada a la recombinación meiótica (Figura 14). Resultados que son apoyados por datos que implican a las secuencias repetidas en procesos de recombinación debido a que estas secuencias se asocian a “hot-spot” (regiones del genoma donde se observan altos índices de rompimiento de doble cadena y de recombinación) (Jeffreys et al., 2004, 2005; Myers et al., 2005).

Debido a que no todas las secuencias repetidas forman parte del EL del CS en etapa de paquiteno, se sugiere un mecanismo de incorporación y de exclusión. Sin embargo, el análisis bioinformático reveló que las LEARS no

comparten secuencias consenso ni regiones de homología, las cuales funcionarían como una señal para su incorporación al EL. Como alternativa, se evaluaron características en la estructura de la cromatina de estas LEARS, de esta forma reportamos las modificaciones epigenéticas que se asocian a los ELs de los CSs y demostramos que la incorporación de las LEARS depende de un código epigenético. Nuestros resultados mostraron que las secuencias repetidas SINEs y LTRs pierden su asociación al EL del CS y que esta asociación depende directamente de la presencia de la marca epigenética H3K27me3. Por el contrario, las secuencias LINE asociadas al EL también están vinculadas a la histona H4K20me3, mientras que las secuencias satelitales están asociadas a los ELs y a las marcas H3K9me3 y H4K20me3. Después del tratamiento con TSA, las secuencias LINE y satelitales pierden su asociación con sus marcas de histonas (Figura 26), pero no pierden su incorporación al EL del CS (Figura 23), lo cual sugiere la presencia de otras modificaciones epigenéticas asociadas a estas secuencias u otras características no identificadas en este estudio. Por estudios de inmunofluorescencia se observa que la distribución de las histonas H3K9me3 y H4K20me3 con respecto al CS no se afectan drásticamente después del tratamiento con TSA; sin embargo, los ensayos de ChIP-ReChIP revelan que estas marcas de histonas pierden su asociación a las secuencias LINE y satelitales en el EL, lo cual es contradictorio si se toma en cuenta a las LEARS como el total de secuencias asociadas al EL. Lo anterior sugiere que existen otras secuencias asociadas al EL del CS que presentan estas marcas y que no son cruciales para el anclaje, al menos, de las secuencias tipo LINE y satelitales. Por lo tanto, se hace evidente la falta de una caracterización adicional de las secuencias que se asocian a los ELs de los CS.

11.2. Componentes estructurales del cuerpo XY y su papel en su formación y/o estructura

Por otra parte, hemos reforzado los datos de la presencia de ARNs en el cuerpo XY (Echeverría et al., 2003; Marcon et al., 2008) y la ausencia de ARN Xist en esta masa de heterocromatina (Turner et al., 2002). La ausencia de ARN *Xist* y la presencia de ARNs y elementos de la maquinaria de RNA de interferencia sugieren un mecanismo de formación del cuerpo XY único y aún

no caracterizado (Echeverría et al., 2003; Costa et al., 2006; en este estudio). En este rubro, la presencia de una masa de heterocromatina determinada por un perfil epigenético apunta a un mecanismo de silenciamiento y heterocromatinización determinado por un mecanismo epigenético en la formación y estructuración del cuerpo XY (Figura 35). La interferencia con la metilación de los residuos lisina en las histonas afectó la formación y estructura del cuerpo XY a diferentes niveles. Por lo tanto, sugerimos que la heterocromatina del cuerpo XY es determinante para evitar recombinaciones heterólogas entre los cromosomas sexuales X-Y, cuando estos están alineados por los mecanismos de reconocimiento de homología y por el acercamiento espacial a través de los movimientos teloméricos durante la etapa del “bouquet” en zigoteno. Por otra parte, después del tratamiento con el TSA, no se observó la heterocromatina característica del cuerpo XY, esto se podría explicar mediante los defectos observados en los CSs de los autosomas, en donde las RCs tuvieron defectos en su formación, evitando la sinapsis en grandes regiones. En el cuerpo XY, la RC es muy acotada por lo que al presentarse defectos en esta, los cromosomas sexuales no se mantienen unidos y pierden su citolocalización ocupando diferentes regiones en el núcleo, semejante a lo observado en ausencia total de las RCs en ratones mutantes para SYCP1 (de Vries et al., 2005). Sin embargo, la presencia de ARNs, de maquinaria de RNA de interferencia y de modificaciones epigenéticas en el cuerpo XY, sugiere que la heterocromatina es sólo la causa de un proceso iniciador de la inactivación/condensación de los cromosomas sexuales que lleva a la formación del cuerpo XY. Debido a esta complejidad, se justifica la necesidad de estudios *in vivo* y multidisciplinarios para elucidar el mecanismo de formación del cuerpo XY.

En este estudio, se ha corroborado la formación del cuerpo XY de manera independiente a la presencia de ARN *Xist*. A pesar de no encontrar al ARN *Xist* en el cuerpo XY, reportamos por primera vez la presencia del ARN *Xist* en espermatogonias tipo A (Figuras 28 y 29). Estudios realizados mediante RT-PCR demostraron previamente la presencia del ARN *Xist* en la espermatogénesis de humanos y roedores, a partir de las espermatogonias A y durante toda la onda espermatogénica (Salido et al., 1992), sin embargo

nuestros datos *in situ* revelan la presencia del ARN *Xist* sólo en espermatogonias A. La presencia del transcrito, detectado por RT-PCR a lo largo de la espermatogénesis puede ser un artefacto producido por la presencia de espermatogonias A, a lo largo de toda la onda espermatogénica y por lo tanto en cualquier edad en donde se enriquecen ciertos tipo celulares de la onda espermatogénica, que es el enfoque con el cual se abordaron los experimentos de RT-PCR (Salido et al., 1992). Pero si el ARN *Xist* no está involucrado en la formación del cuerpo XY (Turner et al., 2002), ¿Por qué se expresa únicamente en la espermatogénesis de mamíferos machos? (Salido et al., 1992) y ¿Por qué sólo en espermatogonias tipo A? (en este estudio). Las deleciones en el gen *XIST* no producen alteraciones en el cuerpo XY (Turner et al., 2002), sin embargo dichas deleciones causan la muerte de los embriones en etapas iniciales de su desarrollo (J. Lee, Harvard Medical School, comunicación personal). En las primeras horas del desarrollo embrionario de organismos mamíferos hembras, durante la etapa de 4-8 células del embrión, el cromosoma X paterno es siempre inactivado epigenéticamente (Xu et al., 2007; Erwin y Lee, 2008), por lo tanto, la presencia del ARN *Xist* en espermatogonias A, podría estar confiriendo alguna memoria epigenética al cromosoma X paterno para inactivarse inmediatamente después de la fecundación. Idea que es apoyada por la presencia de un perfil epigenético de los cromosomas sexuales X-Y aún después de la segunda división meiótica durante el proceso de espermiogénesis (Greaves et al., 2006). Por lo tanto, es necesario abordar el dato surgido en este trabajo, para un mejor entendimiento de la inactivación inicial del cromosoma X en embriones hembras, después de la fecundación y antes de la inactivación azarosa de unos de los dos cromosomas X. Probablemente a través del transcrito ARN *Xist* en una función distinta aún no caracterizada durante la espermatogénesis.

12. Perspectivas

En este trabajo de investigación se han aportado datos relevantes que contribuyen a un mejor entendimiento de la meiosis. Por una parte, hemos caracterizado la relación que mantiene la estructura proteica del CS con la estructura en la cromatina de los cromosomas que se anclan a este complejo, al mismo tiempo que hemos generado datos que indican que las LEARS no sólo participan en el anclaje, si no también en la recombinación meiótica de los cromosomas homólogos. Con base en lo anterior, ahora es necesario diseñar nuevos experimentos que nos permitan demostrar la contribución de las LEARS en la recombinación meiótica, dichos experimentos incluyen inmunoprecipitaciones de cromatina usando proteínas específicas de los núdulos de recombinación tardíos, para de esta forma caracterizar de manera sistemática a las secuencias de ADN asociadas a estos procesos de recombinación. Estos datos permitirían esclarecer los mecanismos moleculares y genéticos que permiten el intercambio de material genético en las células sexuales.

Por otra parte, hemos descifrado parcialmente la estructura de la cromatina en los ELs y su importancia en la formación del CS, sin embargo al mismo tiempo encontramos datos que indican que las LEARS no representan el total de las secuencias que se anclan al CS, además de vislumbrar un intrincado código epigenético que permite la incorporación de las LEARS al EL del CS, de tal forma que debemos realizar un mapa completo de los puntos de anclaje de los cromosomas al CS, mediante técnicas emergentes y de gran impacto como el Solexa-ChIP-Seq que permitiría la cobertura total de los puntos de anclaje de todos los cromosomas al CS (Barski et al., 2007). Mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina asociada a las principales proteínas del EL, en las diferentes células de la profase meiótica I, podríamos detallar la incorporación temporal de estas proteínas al EL del CS.

De la misma forma, la presencia de un complejo código epigenético en la cromatina asociada al CS, nos obliga a pensar en muchas otras modificaciones de histonas, metilación del ADN y/o RNA no-codificantes como factores necesarios y complementarios para la formación y funcionamiento del CS. Por

lo tanto, son necesarios estudios enfocados a descifrar el complejo código epigenético de la cromatina asociada a los ELs del CS. Incluyendo inmunoprecipitaciones de ARN, usando las proteínas específicas de los ELs para determinar y caracterizar los transcritos presentes en los ELs del CS, así como las secuencias de ADN de las cuales provienen estos transcritos.

Por último, la formación del cuerpo XY parece necesitar de ARNs no-codificantes de manera activa, por lo cual proponemos un diseño experimental en el que se altere la presencia de los ARNs. Por ejemplo, experimentos de inhibición de la transcripción durante ciertas etapas de la profase meiótica I, nos permitirían evaluar la participación de ARNs y de la transcripción en sí misma, no solo en la formación del cuerpo XY, sino también en la constitución del CS y del reconocimiento de homología entre estos cromosomas.

Un aspecto novedoso es la presencia del transcrito ARN *Xist* en espermatogonias tipo A de la espermatogénesis en ratas machos, tema que es de amplia relevancia para entender muchos de los aspectos de la inactivación de los cromosomas sexuales X-Y durante la meiosis de machos, así como de la inactivación del cromosoma X paterno durante el desarrollo embrionario de hembras. Por otra parte, si este mecanismo de memoria es validado, se aportarán más datos relacionados a la contribución de cierta memoria epigenética por uno de los progenitores, en un proceso conocido como impronta genética. Además, este sería un modelo determinante para estudiar los procesos de establecimiento y borrado de dicha impronta genética, debido a su dinámica a partir de células meióticas hasta células embrionarias.

Por lo tanto, es necesario, no solo un estudio multidisciplinario, si no una colaboración multicientífica para una mejor aproximación a aspectos tan importantes de la meiosis, que ciertamente son cruciales para su correcta progresión, la cual ha dado origen a la reproducción sexual y a la gran variedad fenotípica que confiere ventajas antes las presiones de selección natural.

13. Referencias

- Adler IK. 1996. Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mut. Res.* 352:169-172
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. 1996. *Molecular Biology of the Cell*. Third edition. Gerten Science USA.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Fourth edition. Garland Science USA.
- Austin CR. and Short RV. 1982. *Células germinales y fertilización*. Ediciones científicas. La Prensa Médica Mexicana, S.A. México, DF.
- Ayoub N., Richler C. and Wahrman J. 1997. Xist RNA is associated with the transcriptionally inactive XY body in mammalian meiosis. *Chromosoma* 106:1-10
- Barski A., Cuddapah S., Cui K., Roh TY., Schones DE., Wang Z., Wei G., Chepelev I. and Zhao K. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129:823-837
- Bedell J., Korf I. and Yandell M. 2003. BLAST. Publisher: O'Reilly
- Berger SL. 2007. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447:407-412
- Bernhard W. 1969. A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastruct. Res.* 27:250-265
- Boyle AL., Ballard SG. and Ward DC. 1990. Differential distribution of long and short interspersed element sequences in the mouse genome: Chromosome karyotyping by Fluorescence *in situ* hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:7757-7761
- Brown K. 2002. Visualizing nuclear proteins together with transcribed and inactive genes in structurally preserved cells. *Methods* 26:10-18
- Burgess SM. 2002. Homologous chromosome associations and nuclear order in meiotic and mitotically dividing cells of budding yeast. *Adv. Genet.* 46:49-90
- Carpenter ATC. 1975. Electron microscopy of meiosis in *Drosophila melanogaster* females. II. The recombination nodule - a recombination-associated structure at pachytene? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72:3186-3189

- Celerin M., Merino ST., Stone JE., Menzie AM. and Zolan ME. 2000. Multiple roles of Spo11 in meiotic chromosome behavior. *EMBO J.* 19:2739-2750
- Cerna A., Cuadrado A., Jouve N., Diaz de la Espina SM. and De la Torre C. 2004. Z-DNA, a new *in situ* marker for transcription. *Eur. J. Histochem.* 48:49-56
- Chenna R., Sugawara H., Koike T., Lopez R., Gibson TJ., Higgins DG. and Thompson JD. 2003 Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* 31:3497-3500
- Clermont Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* 52:198-236
- Cogliati R. and Gautier A. 1973. Mise en évidence de l'ADN et des polysaccharides á l'aide d'un nouveau réactif de type Schiff. *C. R. Acad. Sci. D.* 276:3041-3044
- Cooper GM. 2000. *The Cell a molecular approach.* ASM Press. USA.
- Costa Y., Speed R., Öllinger R., Alsheimer M., Semple CA., Gautier P., Maratou K., Novak I., Hoog C., Benavente R. and Cooke HJ. 2005. Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *J. Cell Sci.* 118:2755-2762
- Costa Y., Speed RM., Gautier P., Semple CA., Maratou K., Turner JM. and Cooke HJ. 2006. Mouse MAELSTROM: the link between meiotic silencing of unsynapsed chromatin and microRNA pathway? *Hum. Mol. Genet.* 15:2324-2334
- Dadashev SYa., Grishaeva TM. and Bogdanov YuF. 2005. *In Silico* identification and characterization of meiotic DNA: *AluJb* possibly participates in the attachment of chromatin loops to synaptonemal complex. *Russian J. Genet.* 41:1419-1424
- de Vries FA., de Boer E., van den Bosch M., Baarends WM., Ooms M., Yuan L., Liu JG., van Zeeland AA., Heyting C. and Pastink A. 2005. Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev.* 19:1376-1389

- Echeverría OM., Benavente R., Ortiz R. and Vázquez-Nin GH. 2003. Ultrastructural and immunocytochemical analysis of the XY body in rat and Guinea pig. *Eur. J. Histochem.* 47:45-54
- Eijpe M., Offenberg H., Jessberger R., Revenkova E. and Heyting C. 2003. Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesions SMC1 β and SMC3. *J. Cell Biol.* 160:657-670
- Ekwall K., Olsson T., Turner BM., Cranston G. and Allshire RC. 1997. Transient inhibition of histone deacetylation alters the structural and functional imprint at fission yeast centromeres. *Cell* 91:1021-1032
- Erwin JA. and Lee JT. 2008. New twists in X-chromosome inactivation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20:349-355
- Esponda P. and Jiménez-Martin C. 1973. The attachment of synaptonemal complex to the nuclear envelope. A structural and cytochemical analysis. *Chromosoma* 30:405-417
- Fawcett DW. 1956. The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2:403-406
- Felsenfeld G. and Groudine M. 2003. Controlling the double helix. *Nature* 23:448-453
- Fenic I., Hossain HM., Sonnack V., Tchatalbachev S., Thierer F., Trapp J., Failing K., Edler KS., Bergmann M., Jung M., Chakraborty T. and Steger K. 2008. In vivo application of histone deacetylase inhibitor trichostatin-A impairs murine male meiosis. *J. Androl.* 29:172-185
- Fenic I., Sonnack V., Failing K., Bergmann M. and Steger K. 2004. In vivo effects of histone-deacetylase inhibitor trichostatin-A on murine spermatogenesis. *J. Androl.* 25:811-818
- Fung JC., Rockmill B., Odell M. and Roeder GS. 2004. Imposition of crossover interference through the nonrandom distribution of synapsis initiation complexes. *Cell* 116:795-802
- Furlan-Magaril M., Rincón-Arano H and Recillas-Targa F. 2008. Sequential chromatin immunoprecipitation protocol: ChIP-reChIP. *Methods Mol. Biol.* In press

- Giroux CN., Dresser ME. and Tiano HF. 1989. Genetic control of chromosome synapsis in yeast meiosis. *Genome* 31:88-94
- Greaves IK., Rangasamy D., Devoy M., Marshall-Graves JA. and Tremethick DJ. 2006. The X and Y chromosomes assemble into H2A.Z-containing facultative heterochromatin following meiosis. *Mol. Cell Biol.* 26:5394-5405
- Hamer G., Gell K., Kouznetsova A., Novak I., Benavente R. and Höög C. 2006. Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *J. Cell Sci.* 119:4025-4032
- Handel MA. 2004. The XY body: a specialized meiotic chromatin domain. *Exp. Cell Res.* 296:57-63
- Hassold T. and Hunt P. 2001. To err (meiotically) is human: The genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet.* 2:280-291
- Hernández-Hernández A. 2003. Formación del cuerpo XY durante etapas iniciales de la profase meiótica I en espermatoцитos de rata. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hernández-Hernández A., Rincón-Arano H., Recillas-Targa F., Ortiz R., Valdes-Quezada C., Echeverría O.M., Benavente R. and Vázquez-Nin GH. 2008. Differential distribution and association of repeat DNA sequences in the lateral element of the synaptonemal complex in rat spermatocytes. *Chromosoma* 117:77-87
- Hernandez-Hernandez A., Vázquez-Nin GH., Echeverría OM. and Recillas-Targa F. 2008b. Chromatin structure contribution to the synaptonemal complex formation. *Cell Mol. Life Sci.* In press.
- Hoyer-Fender S. 2003. Molecular aspects of XY body formation. *Cytogenet. Genome Res.* 103:245-255
- International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of human genome. *Nature* 409:860-921
- Jeffreys AJ., Holloway JK., Kaupii L., May CA., Neumann R., Slingsby MT. and Webb AJ. 2004. Meiotic recombination hot spots and human DNA diversity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 359:141-152

- Jeffreys AJ., Neumann R., Penayi M., Myers S. and Donnelly P. 2005. Human recombination hot spots hidden in regions of strong marker association. *Nat. Genet.* 37:601-606
- Karpova OI., Penkina MV., Dadashev SY., Mil'shina NV., Hernandez J., Radchenko IV. and Bogdanov IuF. 1995. Features of the primary structure of DNA from the synaptonemal complex of the golden hamster. *Mol. Biol. (Mosk.)* 29:289-295
- Karpova OI., Safronov VV., Zattseva SP. and Bogdanov YF. 1989. Some properties of DNA isolated from mouse synaptonemal complexes fraction. *Mol. Biol.* 23:571-579
- Keeney S., Giroux CN. and Kleckner N. 1997. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88:375-384
- Khalil AM., Boyar FZ. and Driscoll DJ. 2004. Dynamic histone modifications mark sex chromosome inactivation and reactivation during mammalian spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:16583-16587
- Kleckner N. 1996. Meiosis: How could it work? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:8167-8174
- Kouzarides T. 2007. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128:693-705
- Li B., Carey M. and Workman JL. 2007. The role of chromatin during. *Cell* 128:707-719
- Marcon E., Babak T., Chua G., Hughes T. and Moens PB. 2008. miRNA and piRNA localization in the male mammalian meiotic nucleus. *Chromosome Res.* 16:243-260
- Martens JH., O'Sullivan RJ., Braunschweig U., Opravil S., Radolf M., Steinlein P. and Jenuwein T. 2005 The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO J.* 24: 800-812
- McKee BD. and Handel MA. 1993. Sex chromosomes, recombination, and chromatin conformation. *Chromosoma* 102:71-80

- Meuwissen RL., Offenberg HH., Dietrich AJ., Riesewijk A., van Iersel M. and Heyting C. 1992. A coiled-coil related protein specific for synapsed region of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J.* 11:5091-6100
- Moens PB., Kolas NK., Tarsounas M., Marcon E., Cohen PE. and 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. *J. Cell Sci.* 115:1611-1622
- Moens PB., Pearlman RE., Traut W. and Heng HHQ. 1998. Chromosome cores and chromatin at meiotic prophase. *Curr. Top. Dev. Biol.* 37:241-262
- Moses MJ. 1956. Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *J Biophys. Biochem. Cytol.* 2:215-218
- Moses MJ. 1968. Synaptonemal complex. *Annu. Rev. Genet.* 2:363-412
- Myers S., Bottolo L., Freeman C., Mcvean G. and Donnelly P. 2005. A fine-scale map of recombination hotspots across the human genome. *Science* 310:321-324
- Ogawa Y., Sun BK. and Lee JT. 2008. Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways. *Science* 320:1336-1341
- Ortiz R., Echeverría OM., Ubaldo E., Carlos A., Scassellati C. and Vázquez-Nin GH. 2002. Cytochemical study of the distribution of the RNA and DNA in the synaptonemal complex of guinea-pig and rat spermatocytes. *Eur. J. Histochem.* 46:133-142
- Page SL. and Hawley RS. 2004. The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20:525-558
- Pearlman RE., Tsao N. and Moens PB. 1992. Synaptonemal complexes from Dnase/treated rat pachytene chromosomes contain (GT)_n and LINE/SINE sequences. *Genetics* 130:865-872
- Peters AH., Plug AW. and de Boer P. 1997. Meiosis in carriers of heteromorphic bivalents: sex differences and implications for male fertility. *Chromosoma Res.* 5:313-324
- Recillas-Targa F y Escamilla del Arenal M. 2004. Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica. *Mensaje Bioquímico* 28:173-200

- Romanienko PJ. and Camerini-Otero RD. 2000. The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol. Cell* 6:975-987
- Salido EC., Yen PH., Mohandas TK. and Shapiro LJ. 1992. Expression of the X-inactivation-associated gene *XIST* during spermatogenesis. *Nat. Genet.* 2:196-199
- Schmekel K. and Daneholt B.1995. The region of the synaptonemal complex revealed in three dimensions. *Trends Cell Biol.* 5:239-242
- Solari AJ. 1974. The behavior of the XY pair in mammals. *Intern. Rev. Cytol.* 38:273-317
- Solari AJ. 1999. *Genética humana. Fundamento y aplicaciones en medicina.* 2^a Ed. Panamericana. Argentina
- Spencer VA., Sun JM., Li L. and Davie JR. 2003. Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods* 31:67-75
- Steiberger A. 1975. Hormone action. En Hardman JG and O'Malley BW. Part D. Isolated cells, Tissues and Organ systems. *Methods Enzymol.* 39: 289-290
- Storlazzi A., Tesse S., Ruprich-Robert G., Gargano S., Pöggeler S., Kleckner N. and Zickler D. 2008. Coupling meiotic chromosome axis integrity to recombination. *Genes Dev.* 22:796-809
- Sullivan BA. and Karpen GH. 2004. Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:1076-1083
- Tsubouchi H. and Roeder GS. 2002. The Mnd1 protein forms a complex with hop2 to promote homologous chromosome pairing and meiotic double-strand break repair. *Mol. Cell Biol.* 22:3078-3088
- Turner JM., Aprelikova O., Xu X., Wang R., Kim S., Chandramouli GV., Barrett JC., Burgoyne PS. and Deng CX. 2004. BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Curr. Biol.* 14:2135-2142
- Turner JM., Mahadevaiah SK., Elliott DJ., Garchon HJ., Pehrson JR., Jaenisch R. and Burgoyne PS. 2002. Meiotic sex chromosome inactivation in male mice with targeted disruptions of *Xist*. *J. Cell Sci.* 115:4097-4105

- Vakoc CR., Mandat SA., Olenchock BA. and Blobel GA. 2005. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol. Cell* 19:381-391
- Vázquez-Nin GH. and Echeverría OM. 1976. Ultrastructural study on the meiotic prophase nucleus of rat oocytes. *Acta Anatómica* 96:218-231
- Vázquez-Nin GH. and Echeverría OM. 2000. Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vázquez-Nin GH., Flores E., Echeverría OM., Merket H., Wettstein R. and Benavente R. 1993. Immunocytochemical localization of DNA in synaptonemal complexes of rat and mouse spermatocytes and chick oocytes. *Chromosoma* 102:457-463
- Viera A., Parra MT., Page J., Santos JL., Rufas JS. and Suja JA. 2003. Dynamic relocation of telomere complexes in mouse meiotic chromosomes. *Chromosome Res.* 11:797-807
- von Wettstein D., Rasmussen SW. and Høla PB. 1984. The synaptonemal complex in genetic segregation. *Annu. Rev. Genet.* 18:331-413
- Waterston RH., et al., (Mouse Genome Sequencing Consortium). 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520-562
- Westergaard M. and von Wettstein D. 1972. The synaptonemal complex. *Annu. Rev. Genet.* 6:71-110
- Wettstein R. and Sotelo R. 1971. The molecular architecture of the synaptonemal complex. *Adv. Cell Mol. Biol.* 1:109:152
- Xu N., Donohoe ME., Silva SS. and Lee JT. 2007. Evidence that homologous X-chromosome pairing requires transcription and Ctf protein. *Nat. Genet.* 39:1390-1396
- Yang F., Gell K., van der Heijden GW., Eckardt S., Leu NA., Page DC., Benavente R., Her C., Höög C., McLaughlin KJ. and Wang PJ. 2008. Meiotic failure in male mice lacking an X-linked factor. *Genes Dev.* 22:682-691
- Zicker D. and Kleckner N. 1999. Meiotic chromosomes: Integrating structure and function. *Annu. Rev. Genet.* 33:603-754

14. Apéndice I: Protocolos

14.1. Disgregación de células de testículo de rata (para CHIP con el anticuerpo anti-SCYP3)

1. Se usa una rata de 22 días de edad para enriquecimiento de paquitenos y de 3 meses de edad para todas las poblaciones celulares.
2. Anestesiarse la rata con éter o cloroformo
3. Disectar los testículos. Rompiendo la túnica albugínea.
4. Descapsular los testículos (con navajas de afeitar) en una cera con PBS y se extraen los tubos seminíferos.
5. Incubar los tubos en una solución de tripsina al 0.01% en PBS, agitar vigorosamente durante un minuto y después incubar durante 15 min a 31°C ó a temperatura ambiente en agitación (en tubos falcon de 15 ó 50 ml)
6. Preparar 30 ml de solución de tripsina por cada g de tejido (cada testículo pesa aproximadamente 1 g)
7. Después de la incubación, se deja reposar los tubos hasta que éstos se precipiten al fondo del tubo falcon.
8. Se transfiere el sobrenadante (el cual contiene las células disgregadas) a un falcon limpio y se adiciona suero fetal bovino (SFB) (inhibidor de tripsina) a una concentración final de 2%.
9. Se centrifuga (para separar las células) a 500 g por 10 min.
10. Se resuspende el botón de células en PBS (si se usan las células inmediatamente) ó en medio de cultivo DMEM adicionado con SFB al 10% (si se almacenan, máximo por 4 horas).
11. Los tubos seminíferos del paso 7 se re-incuban con una nueva solución de tripsina como en el paso 5.
12. Se repite el procedimiento 3 veces y se juntan los tres resuspendidos de botones celulares del paso 10 en un volumen final de 50 ml.
13. Se cuentan las células en un hematocitómetro y un microscopio con un objetivo 40X.
14. Se realiza una dilución 1/5 de 10 µl de la muestra en 40 µl de azul tripano. Cargar 10 µl en una parte de la cámara de Neubauer.

15. Conteo en cámara de Newbawer.
16. Cálculos: Media de los 4 cuadrantes X 5 (factor de dilución 10 μ l muestra/50 μ l totales) X volumen del medio X 10^4 (factor de conversión)
17. Se cuentan las células en un hematocitómetro (cámara de Newbauer) bajo un microscopio con un objetivo de 40X. Se necesitan como mínimo 20 millones de células por cada anticuerpo a usar y como máximo 40 millones.

14.2. ChIP (Inmunoprecipitación de cromatina)

- 1) Se obtienen aproximadamente 100 millones de células meióticas de los dos testículos.
- 2) Se precipitan los meiocitos centrifugando a 1500 rpm (centrífuga de rotor de cabeceo, HERAEUS 400R). por 5 min.
- 3) Se resuspenden en 30 ml de PBS a temperatura ambiente
- 4) Se agregan 3 ml del amortiguador de formaldehído

a) Amortiguador de formaldehído 25 ml de VT)	Concentración final
b) 7.45 ml de formaldehído al 37%	11%
c) 0.5 ml de NaCl 5 M	0.1M NaCl
d) 50 μ l de EDTA 0.5 M (pH 8)	1 mM EDTA
e) 25 μ l de EGTA 0.5 M (pH 8)	0.5 mM EGTA
f) 1.25 ml de Hepes 1 M (pH8)	50 mM Hepes
g) 15.75 ml de H ₂ O	
- 5) Con reloj en mano se cuentan 5 minutos y agitando.
- 6) Se detiene la reacción agregando 1.5 ml de glicina 2.5 M
- 7) Se centrifuga a 1500 rpm. por 5 min. a 4°C.
- 8) Se lava el botón celular con 30 ml de PBS frío con los inhibidores de proteasas:

a) 60 ml de PBS frío + inhibidores de proteasas:		
	“Stock”	Concentración final
b) 120 μ l de Aprotinina	Aprotinina 500x	1x
c) 60 μ l de PMSF	PMSF 1 M	1 mM
d) 120 μ l de Leupeptina	Leupeptina 500x	1x

- | | | |
|-------------------------|-----------------|----|
| e) 600 µl de Pepstatina | Pepstatina 100x | 1x |
| f) 600 µl de Benzamida | Benzamida 100x | 1x |
| g) 120 µl de Butirato | Butirato 500x | 1x |

9) Se centrifuga a 3000 rpm por 5 min a 4°C

10) Se vuelve a lavar el botón con 30 ml de PBS frío con los inhibidores de proteasas, se centrifuga nuevamente.

11) Se resuspende el botón con 3 ml de amortiguador de lisis

Nota: se usan 500 µl de amortiguador de lisis por cada 20 millones de células y por cada anticuerpo.

- | | |
|--------------------------------------|----------------------|
| a) Amortiguador de lisis (100 ml VT) | Concentración final: |
| b) 10 ml de SDS 10% | 1% SDS |
| c) 1 ml de EDTA 0.5 M | 5 mM EDTA |
| d) 5 ml de Tris-HCl 1 M, pH 8.1 | 50 mM Tris-HCl |

Inhibidores de proteasas para 3 ml de amortiguador de lisis:

- e) 6 µl de Aprotinina
- f) 3 µl de PMSF
- g) 6 µl de Leupeptina
- h) 60 µl de "EDTA-free cocktail" 50x (mezcla de inhibidores) (ROCHE)

12) Se coloca en hielo, mínimo 10 min.

13) Sonicar

- a) Características de la sonicada para espermatozoides:
- b) 6 pulsos de 30 segundos cada uno (tiempo: 30 segundos; pulso dentro 1 segundo, pulso fuera 1 segundo; amplitud de onda 35% en un sonicador de 500 Watts)

14) Se centrifuga 10 min. a max. vel. a 4°C

15) Alicuotar 50 µl (Input)

16) Tomar los 3 ml y llevarlos a 30 ml (dilución 1:10 amortiguador de lisis: amortiguador de dilución) con el amortiguador de dilución

- | | |
|---|---------------------|
| a) Amortiguador de dilución (100 ml VT) | Concentración final |
| b) 10 ml de Triton X-100 10% | 1% Triton X-100 |
| c) 400 µl de EDTA 0.5 M | 2 mM EDTA |
| d) 3 ml de NaCl 5 M | 150 mM NaCl |
| e) 2 ml de Tris-HCl 1 M, pH 8.1 | 20 mM Tris-HCl |

Inhibidores de proteasas para 20 ml de solución final:

- f) 40 μ l de Aprotinina
- g) 20 μ l de PMSF
- h) 20 μ l de Leupeptina.
- i) 400 μ l de "EDTA-free" 50X

17) Agregar a este 100 μ l de esferas de proteínas A/G sefarosa pre-absorbidas (Amersham).

- a) Pre-absorción de proteínas A/G sefarosa:
- b) Tomar 0.2 gr. de esferas de proteína A y 100 μ l de esferas de proteína G llevar a un volumen final de 1 ml con una solución 9:1 de Amortiguador de dilución : Amortiguador de lisis.
- c) Pre-absorber las esferas con 100 μ g/ml de BSA (2 μ l de BSA 10%) y 500 μ g/ml de esperma de salmón fragmentado (100 μ l de ssDNA 10mg/ml).
- d) Incubar a 4°C toda la noche en rotación
- e) Remover la mezcla de pre-absorción y lavar las esferas dos veces con amortiguador de dilución
- f) Resuspender las esferas en un volumen final de 1 ml, con una solución 9:1 de Amortiguador de dilución : Amortiguador de lisis.

18) Incubar en agitación en el cuarto frío por 1 hora.

19) Centrifugar a 800 g (2100 rpm) por 5 min.

20) Alicuotar 10 ml de este producto y congelar (no es muy recomendable ya que con el tiempo de almacenamiento se pierde efectividad en la inmunoprecipitación)

21) Tomar 5 ml de la muestra y colocar 5 μ g del anticuerpo.

22) Tomar una segunda muestra de 5 ml y agregar otro anticuerpo como control negativo (anti-rodopsina como anticuerpo inespecífico).

23) Incubar toda la noche (O/N) con agitación en cuarto frío (4°C)

24) Añadir 50 μ l de esferas de proteína A/G sefarosa (Amersham, pre-absorbidas) y 2 μ l de ssDNA (ADN de esperma de salmón) a cada tubo.

25) Incubar 4-6 horas con agitación en cuarto frío (4°C).

26) Separar las esferas por centrifugación (2000 rpm -2 min).

27) Se lavan las esferas con el amortiguador Paro (I, II y III) con los inhibidores por 10 min

28) Se transfieren las esferas con el amortiguador Paro I en un tubo eppendorf limpio.

29) Entre los lavados centrifugar a 3 000 rpm -1 min.

a) Amortiguador Paro I (100 ml)	Concentración final
b) 1 ml de SDS 10%	0.1% SDS
c) 10 ml de Triton X-100 10%	1% Triton X-100
d) 400 µl de EDTA 0.5 M	2 mM EDTA
e) 2 ml de Tris-HCl 1 M, pH 8.1	2 mM Tris-HCl, pH 8.1
f) 3 ml de NaCl 5 M	150 mM NaCl

g) Amortiguador Paro II (100ml)	Concentración final
h) 1 ml de SDS 10%	0.1% SDS
i) 10 ml de Tritón X-100 10%	1% Tritón X-100
j) 400 µl de EDTA 0.5 M	2 mM EDTA
k) 2 ml de Tris-HCl 1M, pH 8.1	2 mM Tris-HCl, pH 8.1
l) 10 ml de NaCl 5 M	500 mM NaCl

m) Amortiguador Paro III (100 ml)	Concentración final
n) 1.05 gr. de LiCl	0.25 M LiCl
o) NP-40	1% NP-40
p) Deoxicolato	1% Deoxicolato
q) 200 µl de EDTA 0.5 M	1 mM EDTA
r) 1 ml de Tris-HCl 1 M, pH 8.1	10 mM Tris-HCl

Amortiguador Paro (I, II, III) + Inhibidores de proteasas:

Inhibidores de proteasas para 3 ml de amortiguador paro:

- s) 6 µl de Aprotinina
- t) 3 µl PMSF
- u) 6 µl de Leupeptina.
- v) 60 µl de "EDTA-free" 50X (mezcla de inhibidores de proteasas)

30) Se lavan las esferas tres veces con amortiguador TE y se centrifuga a 3000 rpm por 1 min

- a) Amortiguador TE (Tris-EDTA):
- b) 10 mM Tris-HCl, pH 7.4-8.0
- c) 1 mM EDTA, pH 8

14.2.1 Para ensayos de ReChIP (Furlan-Magaril et al., 2008)

- d) Resuspender las perlas en 100 μ l de TE suplementado con 10 mM de DTT.
- e) Centrifugar para remover las perlas y el sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo
- f) Incubar 1/2 hora a 37°C
- g) Diluir la muestra 10 veces con amortiguador de dilución (llevar a 1 ml)
- h) Se incuba el segundo anticuerpo O/N a 4°C.
- i) Añadir proteínas A/G como en paso 23 y seguir con los lavados hasta extraer como el paso 30.

31) Para separar el ADN de las esferas, se extrae el ADN con 150 μ l de amortiguador de extracción (se adiciona y se deja O/N con este amortiguador) y se incuba toda la noche a 65°C

Amortiguador de extracción (3 ml)	Concentración final
a) 300 μ l de SDS 10%	1%
b) 300 μ l de NaHCO ₃ 1 M	0.1 M
c) 3 μ l de PK (10 mg/ml)	10 μ g/ml
d) Aforar a 3 ml con H ₂ O	

32) Se extrae el ADN con el protocolo de extracción MinElute PCR purification Kit protocol (Qiagen).

33) Se recupera el ADN en 50 μ l de H₂O desionizada.

34) El ADN del "Input" se recupera mejor con una extracción de fenol cloroformo:

- a) Incubar la cromatina del input con 1 μ l de proteinasa K [5mg/ml] a 65°C toda la noche.
- b) Adicionar un volumen similar de mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico.

- c) Mezclar bien (30 seg. en vortex) y centrifugar a máxima velocidad durante 15 min. para separar bien las fases
 - d) Recuperar el sobrenadante y precipitar el ADN
 - e) Adicionar 1 volumen de Acetato de Sodio 3 M pH 5.2
 - f) Adicionar 2 volúmenes de Etanol absoluto
 - g) Opcionalmente adicionar 1 μl de glicógeno
 - h) Incubar por 30 min a -70°C o por 2 horas a -20°C u O/N
 - i) Centrifugar a máxima velocidad por 15 min a 4°C
 - j) Lavar pastilla una vez en Etanol 70% y centrifugar nuevamente para volver a precipitar la pastillas
 - k) Dejar secar al aire la pastillas
 - l) Resuspender en 100 μl de H_2O MiliQ y estéril
 - m) Medir concentración de ADN
- 35) El ADN recuperado se usa por dos protocolos: 1) Clonación y secuenciación y 2) PCRs radioactivas.

14.3. Clonación y secuenciación de ADN

- 1) El ADN obtenido se digiere con la enzima Mung Bean (Promega)
- 2) Se prepara el amortiguador de almacenamiento de enzima para alcanzar una concentración de 0.1 $\text{u}/\mu\text{l}$.
 - a) 24.7 μl de H_2O
 - b) 0.7 μl de NaCl 5 M
 - c) 37.5 μl de Glicerol 100 %
 - d) 0.75 μl de Tris 1 M pH 7.5
 - e) 7.5 μl de Triton 0.1 %
 - f) 3.75 μl de Mung Bean 2 $\text{u}/\mu\text{l}$

 - g) 75 μl volumen total (VT)
- 3) Preparar la muestra con amortiguador de reacción:
 - a) 18 μl de muestra de ADN de CHIP
 - b) 2.5 μl de amortiguador de reacción.
 - c) 3 μl de enzima en amortiguador de almacenamiento
 - d) 1.5 μl de H_2O

- e) _____
- f) 25 µl VT
- 4) Incubar 10 min. a 37 °C
- 5) Neutralizar enzima con 10 µl de Tris-HCl 1 M pH 8
- 6) Extraer con amortiguador de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico
- 7) Mezclar bien
- 8) Centrifugar a max. vel por 5 minutos
- 9) Enjuagar con 1 volumen de cloroformo.
- 10) Centrifugar a max vel por 5 min.
- 11) Recuperar sobrenadante
- 12) ADN con extremos rasurados listo para ligar en pGEM-11zf- digerido con Mung Bean.

14.3.1. Ligación en vector de clonación pGEM-11zf-

- 1) Preparar la reacción de ligación:
 - a) 18 µl de ADN inmunoprecipitado (con los diferentes anticuerpo)
 - b) 2 µl de Vector de clonación pGEM-11zf- (Promega)
 - c) 1 µl de T4 ADN Ligasa (NewEngland, BioLabs)
 - d) 2.5 µl de amortiguador de reacción de la ligasa
 - e) 1.5 µl de H₂O desionizada y estéril
 - f) _____
 - g) 25 µl VT
- 2) Incubar a 4°C toda la noche

14.3.2. Transformar ligación en células competentes DH5α

- 1) Colocar 15 µl de la ligación en 100 µl de células competentes
- 2) Colocar en hielo al menos 30 minutos antes de choque térmico
- 3) Choque térmico a 42°C por 40 segundos
- 4) Colocar inmediatamente en hielo al menos 10 min.
- 5) Adicionar 1 ml de medio de cultivo LB
- 6) Incubar durante 1 hora a 37°C
- 7) Centrifugar las células a máxima velocidad por 1 min.
- 8) Quitar el sobrenadante y con el medio restante resuspender las células

- 9) Transformar en placas con agar y medio de cultivo LB suplementada con 100 µg/ml de ampicilina. Treinta minutos antes de plaquear adicionar 40 µl de Isopropil thiogalactosida (IPTG) 0.1 M y 40 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indol-beta-D-galactopiranosida (X-gal) 20 mg/ml (X-gal solución "stock" se prepara en dimetil sulfoxido (DMSO) ó en dimetil formamida)
- 10) Plaquear la transformación e incubar a 37°C toda la noche
- 11) Analizar las colonias positivas (colonias con color blanco) (descrito más abajo en este protocolo)

14.3.3. Cuando la Mung Bean es de Invitrogen, el ADN se digiere para ligar como sigue

Nota: La Mung Bean de Invitrogen es más fácil de usar y produce menos digestiones inespecíficas

- 1) Preparar una reacción en un tubo eppendorff de 1.5 ml:
 - a) 40 µl de ADN inmunoprecipitado y purificado
 - b) 5 µl de Amortiguador de reacción de la enzima (10X)
 - c) 0.4 µl de enzima Mung bean [10u/µl]
 - d) 4.6 µl de H₂O miliQ y estéril

- e) 50 µl VT
- 2) Incubar a 37°C por 10 min.
- 3) Inactivar la enzima con 5 µl de SDS 0.1% para que quede a una concentración final de 0.01%
- 4) Purificar por columna (MinElute PCR purification Kit protocol, Qiagen)
- 5) Preparar ADN para ligar en vector de clonación pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen)
 - a) 40 µl de ADN digerido con Mung bean y purificado por columna
 - b) 5 µl de fosfatasa alcalina (PA)
 - c) 5 µl de Amortiguador de reacción de la PA (10X)

- d) 50 µl VT
- 6) Incubar 1 hora a 37°C
- 7) Purificar por columna el ADN desfosforilado

14.3.4. Clonación en el vector pCR-Blunt II-TOPO

- 1) Clonación en pCR-Blunt II-TOPO(Anexo 2, mapa 2):
 - a) 4 μ l de ADN desfosforilado
 - b) 1 μ l de Solución salina (incluida en el kit del vector)
 - c) 1 μ l de Vector pCR-Blunt II-TOPO(Invitrogen)

 - d) 6 μ l de VT
- 2) Incubar a TA durante 30 min.
- 3) Colocar en hielo.

14.3.5. Transformación de vector en células competentes TOP10 (Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit)

- 1) Colocar la ligación en hielo por al menos 10 minutos antes de transformar
- 2) Descongelar las células competentes TOP10 en hielo
- 3) Tomar 100 μ l de células competentes
- 4) Adicionar 3 μ l de la ligación con el vector pCR-Blunt II-TOPO
- 5) Colocar en un baño a 42°C para choque térmico (Heat shock) durante 30 segundos
- 6) Inmediatamente colocar en hielo e incubar durante 30 min.
- 7) Adicionar 1 ml de medio de cultivo LB
- 8) Incubar a 37°C durante una hora en agitación a 200 rpm
- 9) Centrifugar las células a máxima velocidad por 1 minuto.
- 10) Quitar el sobrenadante y con el medio restante resuspender las células
- 11) Sembrar la transformación en una placa con agar y medio LB suplementada con kanamicina 50 μ g/ml
- 12) Dejar crecer las colonias toda la noche a 37°C

14.4. Análisis de restricción de colonias positivas

Las colonias se analizaron por dos métodos distintos:

14.4.1. Análisis de restricción por mini-preparaciones (Miniprep, método lisis alcalina)

- 1) Poner pre-cultivos de las colonias: En un tubo falcon estéril agregar 3 ml de medio LB adicionado con 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina.
- 2) Inocular una colonia por tubo falcon.
- 3) Incubar a 37°C toda la noche y en agitación
- 4) Al día siguiente pasar los cultivos a tubos eppendorff de 1.5 ml y centrifugar a 3000 rpm durante 1 minuto (repetir el paso dos veces en el mismo eppendorff, ya que son 3 ml de cultivo)
- 5) Resuspender las bacterias en 100 μl de solución I
Solución I:
 - a) 50 mM glucosa
 - b) 25 mM TrisHCl (pH 8.0)
 - c) 10 mM EDTA (pH 8.0)
 - d) Colocar en autoclave y guardar a 4°C
 - e) Mezclar con vortex hasta que todas las células estén resuspendidas
- 6) Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente
- 7) Agregar 200 μl de la solución II recién preparada
Solución II:
 - a) 0.2 N NaOH
 - b) 1% SDS
 - c) Preparar fresca cada vez que se usa.
- 8) Mezclar de cabeza cada tubo en el vortex por 10 segundos exactos
- 9) Incubar en hielo por 5 minutos.
- 10) Adicionar 150 μl de la solución III pre-enfriada en hielo.
Solución III:
 - a) 60 ml de Acetato de Potasio 5 M
 - b) 11.5 ml de Acido acético glacial
 - c) 28.5 ml de Agua desionizada
 - d) Guardar a 4°C
- 11) Mezclar tres veces invirtiendo el tubo.
- 12) Incubar en hielo por 10 minutos.
- 13) Centrifugar por a máxima velocidad por 10 minutos a 4°C
- 14) Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorff limpio
- 15) Limpieza: Añadir un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico.

- 16) Mezclar con vortex 30 segundos y centrifugar a máxima velocidad para separar bien las fases
- 17) Recuperar el sobrenadante en un tubo eppendorff limpio
- 18) Agregar 1 ml de etanol absoluto. Mezclar.
- 19) Incubar de 10 a 20 minutos a temperatura ambiente
- 20) Centrifugar 15 minutos a 4°C a máxima velocidad.
- 21) Decantar y lavar la pastilla con etanol al 70%
- 22) Centrifugar nuevamente 15 minutos a 4°C a máxima velocidad y decantar el sobrenadante. Dejar secar la pastillas invirtiendo el tubo sobre una toalla absorbente y un minuto después dejar secar al aire.
- 23) Resuspender el ADN en 50 µl de H₂O desionizada
- 24) Agregar 1 µl de RNasa A [5 mg/ml]
- 25) Incubar a 37°C por 1 hora
- 26) Guardar a -20°C

14.4.2. Digestión enzimática de plásmidos

- 1) Colocar en un tubo eppendorff de 1.5 ml:
 - a) 8 µl de plásmido (recuperado de la miniprep de una colonia individual)
 - b) 0.1 µl de enzima de restricción Eco RI [10 u/µl] (NewEngland, BioLabs)
 - c) 0.1 µl de enzima de restricción Hind III [10 u/µl] (NewEngland, BioLabs)
 - d) 2.5 µl de amortiguador de reacción 2 (NewEngland, BioLabs)
 - e) 14.3 µl de H₂O desionizada

 - f) 25 µl VT
- 2) Incubar a 37°C por 3 horas
- 3) Correr muestras en un gel de agarosa al 1% durante 30 minutos a 100 voltios
- 4) Tomar foto del gel y escoger las colonia positivas para secuenciar el ADN
- 5) Secuenciación de ADN.

14.4.3. PCR de colonia

- 1) Preparar reacción de PCR para cada colonia:

- a) 2 µl de amortiguador de reacción para la ADN Taq polimerasa (*Thermus aquaticus* DNA polymerase).....Concentración final: 1X
- b) 2 µl de Cloruro de Magnesio (MgCl₂) 25 mM.....2.5 mM
- c) 0.4 µl de dNTPs 10 mM.....200 µM
- d) 0.1 µl de “Primer M13 Reverse” de pCR-Blunt II-TOPO zero.....2 pMol
- e) 0.1 µl de “Primer M13 forward” de pCR-Blunt II-TOPO zero.....2 pMol
- f) 0.05 µl de Taq ADN polimerasa.....1 u/20µl
- g) 15.35 µl de H₂O desionizada y estéril

h) 20 µl VT

2) Condiciones del termociclador para la reacción de PCR:

- a) 1 ciclo a 95°C por 5 minutos.
- b) 25 ciclos con:
- c) Temperatura de desnaturalización de ADN de 95°C por 1 minuto
- d) Temperatura de alineamiento de oligonucleótidos de 58°C por 30 segundos
- e) Temperatura de extensión de producto de 72°C por 1 minuto
- f) 1 ciclo a 72°C por 10 minutos para extensión final
- g) 1 ciclo a TA para enfriar la reacción

3) Correr los productos de PCR en un el de agarosa al 1% durante 30 minutos a 100 voltios

4) Tomar foto del gel y escoger las colonias positivas para realizar Miniprep y secuenciar el ADN

5) Secuenciación de ADN.

14.5. PCRs radioactivas

1) Preparar en un eppendorff de 1.5 ml lo siguiente:

- | Reactivo | Concentración final: |
|--|--|
| a) 2 µl de amortiguador de reacción 10X..... | 1X |
| b) 2 µl de MgCl ₂ 25 mM..... | 2.5 mM + 1.5 mM (en amortiguador) = 4 mM |
| c) 4 µl de amortiguador Q 5X..... | 1X |
| d) 0.1 µl de dNTPs* 10 mM..... | 50µM |
| e) 0.05 µl de DNA pol. Hot Start [5 u/µl] (QIAGEN) | 0.25 u/reacción |

- f) 1 μ l de Oligonucleótidos**X**
 - g) 1 μ l de ADN inmunoprecipitado
 - h) 0.05 μ l de [α -³²P] dCTP 10 mCi/ml (GE Healthcare).....0.5 μ Ci/reacción
 - i) 9.8 μ l de H₂O desionizada y estéril
-
- j) 20 μ l VT

*La solución “stock” de estos dNTPs se prepara con menos dCTP de lo normal (10 mM de dATP, 10 mM de dTTP, 10 mM de dGTP y 5 mM de dCTP), para facilitar la incorporación de [α -³²P]dCTP en las reacciones de PCR, ya que algunas secuencias repetidas tiene bajo contenido de Citocinas.

**La secuencia de los oligonucleótidos y su concentración para cada PCR dúplex se muestra en la tabla 3 en la sección de Materiales y métodos

- 2) Correr PCR en un termociclador con las siguientes condiciones:
 - a) 1 ciclo a 95°C durante 15 min
 - b) 33 ciclos como sigue:
 - c) Temperatura de desnaturalización de la doble hebra de ADN a 95°C por 1 minuto.
 - d) Temperatura de apareamiento de oligonucleótidos a 59°C por 30 segundos.
 - e) Temperatura de extensión de cadena sintetizada a 72°C por 30 segundos.
 - f) Finalmente 1 ciclo a 72°C por 10 minutos para extensión final
 - g) 1 ciclo a temperatura ambiente.
- 3) Correr las muestras en un gel de acrilamida al 6%, durante 2 horas a 150 voltios.
- 4) Secar el gel en un desecador durante 2 horas a 80°C
- 5) Exponer gel en un cassette con pantalla para fósforo radiactivo.
- 6) Revelar y digitalizar la imagen en un phospo-imager (Typhoon scanner 8600)

- 7) Cuantificar bandas de los productos de PCR usando el programa Image Quant.

14.6. Extracción de ADN genómico de rata a partir de un tejido

- 1) Sacrificar y extraer el tejido a usar (Hígado)
- 2) Inmediatamente cortar el tejido en fragmentos pequeños y congelar en Nitrógeno líquido.
- 3) Si se está trabajando con el hígado, quitar la vesícula biliar, que contiene altos niveles de enzimas degradativas.
- 4) Empezando entre 200 mg y 1 gr. de tejido, se muele en un mortero pre-enfriado ó se aplasta con un martillo hasta dejar un polvo fino (continuar con los fragmentos de tejido, sí el aplastado es incompleto)
- 5) Resuspender el tejido macerado en 1.2 ml de amortiguador de digestión por cada 100 gr. de tejido. No debe haber grumos.

Amortiguador de digestión:

- a) 100 mM NaCl
 - b) 10 mM Tris-Cl, pH 8
 - c) 25 mM EDTA, pH 8
 - d) 0.5 % SDS
 - e) 0.1 mg/ml proteinasa K
 - f) Almacenar a temperatura ambiente
- 6) Incubar las muestras a 50°C por 12 a 18 horas en tubos falcon bien tapados y en agitación.
 - 7) Después de 12 horas de incubación las muestras se pondrán viscosas, el tejido debe de ser casi indiscernible, las muestras de tejido deben aparentar ser un lodo.
 - 8) Extracción de ácidos nucleicos: extraer completamente las muestras con un volumen igual de la mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico.
 - 9) Centrifugar a 1700 g por 10 minutos en un rotor de columpio.
 - 10) Si las fases no están bien definidas, agregar otro volumen de amortiguador de digestión, omitiendo la proteinasa K y repetir la centrifugación.
 - 11) Si hay una delgada capa de material blanquecino entre las fases, repetir la extracción orgánico con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico.

- 12) Purificación del ADN: Transferir la capa acuosa (sobrenadante) a un tubo nuevo y agregar:
 - a) 1/2 volumen de acetato de amonio 7.5 M
 - b) 2 volúmenes de etanol 100%
- 13) Precipitar el ADN por centrifugación a 1700 g por 2 minutos.
- 14) Esta breve precipitación, en presencia de alta concentración de sales, reduce la cantidad de precipitación de ARN. Para almacenamientos a largo plazo (más de un año) es conveniente dejar el ADN en presencia de etanol.
- 15) Alternativamente, para prevenir la fragmentación del ADN de alto peso molecular, omitir los pasos 12 a 18 y remover los disolventes orgánicos y las sales del ADN mediante al menos dos pases de diálisis en mínimo 100 volúmenes de amortiguador TE. Debido a la alta viscosidad del ADN es necesario que la diálisis sea de al menos 24 horas.
Amortiguador TE (Tris-EDTA):
 - a) 10 mM Tris-Cl, pH 7.4, 7.5 ó 8.0
 - b) 1 mM EDTA, pH 8.0
- 16) Enjuagar el botón de ADN con etanol al 70%. Decantar el etanol y dejar secar botón al aire
 - a) Es importante enjuagar bien para remover residuos de sal y de fenol.
- 17) Resuspender ADN a una concentración de 1 mg/ml en amortiguador TE o en Agua desionizada y destilada hasta que se disuelva completamente el botón. Agitar moderadamente a temperatura ambiente o a 65°C durante 4 horas para facilitar la solubilización.
- 18) Almacenar a 4°C
- 19) A partir de 1 g de tejido se obtienen aproximadamente 2 mg de ADN.
- 20) Si es necesario, el ARN residual se puede remover añadiendo 0.1% de SDS y 1 µg/ml de RNasa libre de DNasa e incubar a 37°C durante 1 hora, seguido de una extracción orgánica con fenol:cloroformo, como arriba descrito.

14.7. Producción de sondas para hibridaciones *in situ*

14.7.1. Sondas de ADN por “Nick-Transaltion”

Para marcar el ADN con Biotina se usa el kit de "BioNick Labeling system" (Invitrogen)

- 1) Colocar en un tubo de 1.5 ml en hielo
 - a) 5 μ l de 10X dNTP Mix
 - b) 1 μ l de ADN genómico digerido con Sph1 (1 μ g de ADN)
 - c) 34 μ l de H₂O desionizada (suficiente para aforar a 45 μ l)
 - d) 5 μ l de Mix de enzima.

 - e) 45 μ l VT
- 2) Mezclar en vortex
- 3) Centrifugar a 13 000 rpm por 10 seg.
- 4) Incubar a 14 °C por 60 min.
- 5) Pasar a hielo
- 6) Correr gel de agarosa al 2% (3 μ l de muestra)
- 7) Cuando se tengan fragmentos de 300 a 600 pb entonces:
- 8) Agregar 5 μ l de amortiguador de interrupción de reacción
- 9) Agregar 2 μ l de ssDNA
- 10) Agregar 1/10 de volumen de Acetato de Sodio 3M (5 μ l de AcNa 3 M)
- 11) Agregar 2 volúmenes de etanol absoluto (100 μ l de etanol absoluto)
- 12) Precipitar 15 min a -75°C, 2 horas a -20°C o toda la noche si se desea mayor recuperación.
- 13) Centrifugar 30 min. a max vel a 4°C
- 14) Eliminar sobrenadante
- 15) Secar patilla al aire
- 16) El secado es muy importante para eliminar residuos de etanol, que puedan afectar que la sonda se resuspenda.
- 17) De esta forma la pastilla se seca mejor en speed vacuum (4 min a 30°C)
- 18) Resuspender la pastilla en 10 μ l H₂O miliQ estéril (la sonda queda entonces a 100 ng/ μ l)
- 19) Resuspender a 37°C por 30 min, con ocasional agitación en vortex
- 20) Almacenar a -20°C (evitar repetidos descongelamientos)
- 21) Antes de usar, diluir la sonda en la solución de hibridación 1:5 de tal forma que la sonda quede a 20 ng/ μ l

22) Resuspender el botón en 40 μ l (10 μ l para cada laminilla) de una solución:

Solución de hibridación:

- a. 250 μ l de formamida 100%
- b. 50 μ l de 20XSSC
- c. 100 μ l de Dextrán sulfato 50%
- d. Preparar fresca cada vez
- e. Vortex por 1 hora

23) Guardar a -20°C sonda marcada.

14.8. Inmunofluorescencia acoplada a hibridación *in situ* para ADN (Inmuno-FISH ADN)

1) Para esta técnica se usaron crio-cortes montados en portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina

14.8.1. Inmunolocalización (SYCP3)

- 2) Fijación de los crio-cortes con paraformaldehído al 1% durante 10 minutos a TA
- 3) Lavados en PBS 3X5 min c/u
- 4) Bloqueo con Glicina 100mM durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 5) Incubar con el anticuerpo primario (anti-SYCP3, guinea pig) [1/200] en PBS, durante 1 hora a TA ó incubar O/N a 4°C en cámara húmeda
- 6) Lavar con PBS 3x3 min c/u.
- 7) Incubar con el anticuerpo secundario (anti-guinea pig-FITC ó anti-guinea pig-TXR) [1/200] en PBS, durante 1 hora a TA (centrifugar el anticuerpo secundario antes de usar)
- 8) Lavar con PBS 3X5 min c/u
- 9) Pasar a PBS

14.8.2. Fijación de la Inmunolocalización

- 10) Fijar en paraformaldehído al 4% en PBS por 10 min a Temperatura ambiente (el paraformaldehído se disuelve calentando a 60°C)
- 11) Lavados en PBS 1x10 min a temperatura ambiente
- 12) Pasar a PBS

14.8.3. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Pre-tratamiento:

- 13) Eliminación de la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% en PBS por 15 minutos.
- 14) Tratamiento con una solución de RNasa en 2XSSC (10 µl de RNasa 10 mg/ml en 1 ml de 2XSSC)
- 15) Incubar 1 hora a 37°C en cámara húmeda
- 16) Lavar en 2XSSC 3x3-4 min a TA, sacudiendo para eliminar cubreobjetos
- 17) Deshidratar en alcoholes de concentraciones graduales crecientes (etanol 70, 80, 90, 2X100% a 4°C 2 min c/u) (no es recomendable, en inmuno-fish ya que se seca la muestra)

Nota: Este paso de deshidratación, no se realiza en Inmuno-FISH, ya que la laminilla con la inmuno no se debe de secar en ningún paso

- 18) Eliminar un poco de 2XSSC con una toalla absorbente y continuar con la variante 2 (ya que es la que da mejores resultados)

14.8.3.1. Hibridación, variante 1

- 19) Desnaturalizar la sonda marcada a 75°C por 5 min
- 20) Colocar 10 µl de la sonda en la muestra
- 21) Sellar con un cubreobjetos y con cemento vulcanizador ("Anahuac", UHU ó con cemento para parches de bicicletas)
- 22) Desnaturalizar el ADN de la laminilla "*in situ*" con la sonda
- 23) En un baño maría a 80°C. colocar las laminillas sobre una superficie conductora de la temperatura. 4-10 min a 80°C
- 24) Enfriar progresivamente hasta llegar a 37°C
- 25) Colocar las laminillas en una toalla absorbente en una cámara húmeda por 2XSSC a 37°C
- 26) Hibridar en una cámara húmeda (en estufa) 2-72 horas a 37°C

Lavados post-hibridación:

- 27) Colocar un baño a 45°C
- 28) Eliminar el cemento de la laminilla
- 29) Lavar una vez rápidamente en 4XSSC a TA para remover el cubreobjetos (agitando un poco)

30) Lavar una vez en solución de formamida 50%/2XSSC a TA por 5 min, agitar bien para eliminar la solución.

Solución de lavado pos hibridación:

a) 50 ml de formamida

b) 10 ml de 20XSSC

c) 40 ml de H₂O

d) 100 ml colocar en dos jarras koplín

31) Lavar en 2XSSC 1X10 min a 45°C

32) Lavar en 2XSSC 1X10 min a TA

33) Lavar en 4XSSC 2X3 min a TA

34) Dejar en 4XSSC hasta amplificación con "TSA biotin system"

14.8.3.2. Hibridación, variante 2

35) Desnaturalizar la sonda previamente marcada a 75°C por 5 min

36) Colocar la sonda en hielo por 10 min

37) Colocar la sonda en un baño a 37°C (pre-alineamiento de Cot-1 human ADN con secuencias no-repetidas)

38) Desnaturalizar el ADN de la laminilla, colocando 100 µl de NaOH pH 12 (se puede usar desde pH 12-13 dependiendo del tamaño de las proteínas) por 2 min exactamente. (Importante preparar NaOH fresca cada vez)

39) Lavar las laminillas rápidamente con PBS frío para detener la desnaturalización

40) Neutralizar con tres lavados cortos de PBS frío 3x2 min

41) Colocar la sonda ya desnaturalizada

42) Sellar con cubreobjetos y con cemento vulcanizador "Anahuac" (no es necesario si se hibrida a 37°C)

43) Hibridar a 37°C toda la noche en cámara húmeda

Lavados post hibridación (igual que en la variante 1, a excepción del paso de la formamida)

14.8.3. Rondas de amplificación con el sistema "TSA Biotin System" (PerkinElmer)

Paso de bloqueo: (100 µl) todo en cámara húmeda

44) Bloquear las laminillas por 30 min en PBS-B (PBS con agente bloqueador según hoja técnica)

Incorporación de HRP.

45) Incubar las laminillas con el apropiado agente SA-HRP (estreptavidina acoplada a peroxidasa de rábano) por 30 min a TA.

a) 100 µl de SA-HRP diluido 1:100 en PBS-B (PBS más el agente bloqueador al 0.05%)

46) Lavar las laminillas 3 veces por 3 minutos cada uno, en PBS-Tween a temperatura ambiente con agitación (muy importante la agitación).

Amplificación con el sistema TSA:

47) Incubar las laminillas con la solución de trabajo de Tiramida Biotinilada (agente de amplificación 100 µl por cada laminilla) por 4 min (3-10 minutos).

48) Solución de trabajo 1:50 en diluyente de amplificación 1X.

49) Lavar las laminillas 3x3 min en PBS-Tween a TA en agitación.

50) Para las laminillas que tendrán una doble amplificación volver a repetir el proceso desde la incorporación de SA-HRP.

14.8.4. Detección fluorescente

51) Bloquear las laminillas con Blotto (4XSSC/5% leche) 100 µl por laminilla, por 10 min a TA (en cámara húmeda)

52) Adicionar 100 µl de blotto con estreptavidina TXR (dilución 1:300)

53) Incubar 30 min a TA y en oscuridad

54) Lavar 3x3 en 2SSC a TA 5 min c/u.

55) Montar con DAPI y medio de montaje.

56) 100 µl de DAPI por 2 min (en oscuridad)

57) Lavar con PBS-Tween por 2 min

58) Montar cubreobjetos con 10 µl de medio de montaje (VECTASHELD, Vector)

59) Sellar con barniz

60) Guardar laminillas a -20°C y protegidas de la luz.

14.9. Hibridación *in situ* fluorescente de ARNs totales usando una sonda de ADN (ADN-ARN FISH)

- 1) Preparar todas las soluciones con H_2O tratada con DEPC al 0.1% para las soluciones y H_2O -DEPC al 0.05% para enjuagar materiales.
 - a) H_2O miliQ adicionar DEPC a una concentración de 0.1% y/o 0.05%.
 - b) Resuspender en campana de extracción al menos 2 horas.
 - c) Tratar a 37°C O/N.
 - d) Esterilizar
- 2) Preparar crio-cortes
 - a) Crio-fijación:
 - b) Preparar un recipiente con nitrógeno líquido y en medio colocar un vaso con isopentano (recién sacado del REVCO).
 - c) Sacrificar rata, extraer testículos y fraccionarlos en pedazos muy pequeños.
 - d) Aventar los pedacitos de testículo al Isopentano y dejar fijar durante un minuto y sacar antes de que se empiece a congelar el Isopentano.
 - e) Crio-cortar inmediatamente y montar en laminillas cubiertas con poli-L-lisina.
 - f) Para muestras que se guardarán en REVCO: colocar Isopentano en un crio-vial y colocar el fragmento de testículo (solo se congelan una vez, se cortan y no se vuelve a almacenar, ya que la descogelación/congelación lenta daña el material considerablemente).
- 3) Tratamiento de muestras:
 - a) Fijar en paraformaldehído al 1% durante 10 minutos a TA (el paraformaldehído se disuelve en PBS-DEPC)
 - b) Lavar 2x3 minutos en PBS-DEPC
- 4) Marcado de sonda de ADN con el "Bio-Nick Translation Kit"
Colocar en un tubo de 1.5 ml en hielo
 - a) $5\ \mu\text{l}$ de 10X dNTP Mix
 - b) $1\ \mu\text{l}$ de ADN genómico digerido con Sph1 ($1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADN genómico)
 - c) $34\ \mu\text{l}$ de H_2O desionizada (suficiente para aforar a $45\ \mu\text{l}$)

d) 5 μ l de Mix de enzima.

e) 45 μ l VT

f) Mezclar en vortex

g) Centrifugar a 13 000 rpm por 10 seg.

h) Incubar a 14 °C por 60 min.

i) Pasar a hielo

j) Correr gel de agarosa al 2% (3 μ l de muestra)

k) Cuando se tengan fragmentos de 300 a 600 pb entonces:

l) Agregar 5 μ l de amortiguador de paro

m) Agregar 2 μ l de SsDNA

n) Agregar 2 μ l de tRNA como competidor.

o) Agregar 1/10 de volumen de Acetato de Sodio 3M (5 μ l de AcNa 3M)

p) Agregar 2 volúmenes de etanol absoluto (100 μ l de etanol absoluto)

q) Precipitar 15 min. a -75°C, 2 horas a -20°C o toda la noche si se desea mayor recuperación.

r) Centrifugar 30 min. a max vel a 4°C

s) Eliminar sobrenadante

t) Secar patilla en speed vacuum (4 min a 30°C)

u) El secado es muy importante para eliminar residuos de etanol, que puedan afectar que la sonda se resuspenda.

v) Resuspender la pastilla en 10 μ l de DEPC-H₂O miliQ esteril (la sonda queda entonces a 100 ng/ μ l)

w) Resuspender a 37°C por 30 min, con ocasional agitación en vortex

x) Almacenar a -20°C (evitar repetidos descongelamientos)

y) Antes de usar, diluir la sonda en la solución de hibridación 1:10 de tal forma que la sonda quede a 10ng/ μ l

z) Resuspender el botón en 40 μ l (10 μ l para cada laminilla) de una solución:

Solución de hibridación:

aa) 250 μ l de formamida 100%

bb) 50 μ l de 20XSSC

cc) 100 μ l de Dextran sulfato 50%

- dd) Preparar fresca cada vez
- 5) Hibridación.
 - a) Desnaturalizar la sonda a 75°C por 5 min
 - b) Colocar la sonda en hielo por al menos 2 min para evitar que se vuelva viscosa.
 - c) Colocar 10 µl de la sonda sobre el tejido de la laminilla y cubrir con cubreobjetos
 - d) Incubar a 37°C O/N y en cámara húmeda.
 - 6) Lavados post-hibridación.
 - a) Lavar una vez rápidamente en 4XSSC-DEPC a TA para remover los cubreobjetos (agitando un poco)
 - b) Lavar 2 veces en 2XSSC a TA con agitación (la agitación es muy importante por lo que deberá de ser constante, de preferencia en agitador).
 - c) Transferir a 4XSSC-DEPC a temperatura ambiente por 5 min.
 - d) Mantener allí hasta amplificación y detección
 - 7) Detección.
 - a) -Bloquear las laminillas con Blotto (4X SSC/5% leche) 100 µl por laminilla, por 10 min a TA (en cámara húmeda).
 - b) Adicionar 100 µl de blotto con estreptavidina TXR (dilución 1:400)
 - c) Incubar 60 min a TA y en oscuridad
 - d) Lavar 3X5 min en 2XSSC-DEPC a 37°C en agitación
 - e) Montar con DAPI y medio de montaje:
 - f) 100 µl de DAPI (10 µl/ml) por 2 min en oscuridad
 - g) Lavar en PBS-DEPC por 2 min en oscuridad
 - h) Montar cubreobjetos con 10 µl de medio de montaje VECTOR
 - i) Sellar con barniz
 - j) Almacenar a -20°C protegiéndolas de la luz.

14.10. Sonda de ARN por transcripción *in vitro*

Transcripción *in vitro* para la generación de ribosondas de ARN, empleando el “DIG RNA Labeling Kit” (SP6/T7) (ROCHE)

- 1) Amplificar por PCR el fragmento de ADN a transcribir (ARN *Xist*)

- 2) Clonar en un vector que tenga ambos sitios de inicio de transcripción para la ARN polimerasa SP6 y T7
- 3) Vector pGEM-T Easy (Promega) con el inserto de XIST, generando así el plásmido pGEMt-XIST
- 4) Digerir la clona con una enzima que corte 5' del sitio de inicio de la transcripción (PvuII).
 - a) ADN (pGEMt-XIST) (20 µg)-----20µl
 - b) Amortiguador 2-----6µl
 - c) PvuII-----3µl
 - d) Agua-----31µl
- 5) O/N a 37°C
- 6) Inactivar a 80°C por 20 min.
- 7) Tomar una alícuota de 3 µl y correr en un gel de carriles pequeños
- 8) Precipitar:
- 9) 55 µl de ADN
- 10) 5.5 µl Acetato de Sodio 3 M (pH 5.2) (1/10 del volumen total)
- 11) 1 µl de Glicógeno
- 12) 110 µl de Etanol 100%
- 13) Precipitar 1 hora a -20°C
- 14) Centrifugar a máxima velocidad 15 min a 4°C
- 15) Resuspender en 15 µl de H₂O-DEPC al 0.1%
- 16) Medir concentración de ADN
- 17) Llevar a 1 µg/µl
- 18) El vector pGEMt-XIST digerido con PvuII, genera el nuevo pGEMt-XITS dig PvuII
- 19) Colocar en un tubo de 1.5 ml en hielo

pGEMt-XIST dig PvuII

SP6 T7

- a. pGEMt-XIST dig PvuII (1 µg/µl)-----2µl-----2µl
- b. H₂O-DEPC (0.1%)-----11µl-----11µl
- c. 10X NTP "labeling mixture" (vial 7)-----2µl-----2µl
- d. 10X "Transcription buffer" (vial 8)-----2µl-----2µl
- e. Inhibidor de RNasas (vial 10)-----1µl-----1µl

f. ARN polimerasa ----- 2µl-----2µl

g. -----

h. -----20 µl VT

- 20) Mezclar cuidadosamente y meter a centrifugar brevemente
- 21) Incubar reacción por 2 horas a 37°C
- 22) Adicionar 2 µl de ADN libre de RNasa
- 23) Incubar 1 hora a 37°C
- 24) Adicionar 2 µl de EDTA 0.2 M (pH 8.0) para detener la reacción de la polimerasa
- 25) Precipitar:
- 26) Adicionar 2.5 µl de LiCl 4 M y 75 µl de etanol 100% pre-enfriado
- 27) Precipitar por al menos 30 min. a -70°C o 2 horas -20°C
- 28) Centrifugar a 13 000 rpm en una microcentrífuga por 15 min a 4°C
- 29) Eliminar sobrenadante
- 30) Lavar el botón con 50 µl de etanol 70% pre-enfriado
- 31) Centrifugar a 13 000 rpm por 15 min. a 4°C
- 32) Secar el botón al vacío:
- 33) Speed vacum 4 minutos a 30°C
- 34) Resuspender el botón de ARN en 100 µl de H₂O-DEPC (0.1%)
- 35) Correr una alícuota de 20 µl de ARN marcado en un gel desnaturalizante de agarosa.
- 36) Almacenar la sonda a -20°C (-70°C de preferencia). Evitar constantes descongelaciones y congelaciones
- 37) Antes de usar diluir a concentración de trabajo (0.2-10 ng/µl) en el amortiguador de hibridación.

14.11. Hibridación ARN-ARN (De acuerdo a: Detection of mRNA in tissue sections using DIG-labeled RNA and oligonucleotide probes. ROCHE)

- 38) Para muestras incluidas en Parafina:
- 39) Desparafinar e hidratar:
- 40) 100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50%, 30% por 5 min c/u
- 41) 2X5 min. H₂O-DEPC
- 42) Pasar a PBS (en H₂O-DEPC)

43) Para crío cortes:

44) Fijar en paraformaldehído al 4% (en PBS-DEPC) 10 min a TA

45) 1x1 min PBS-DEPC

Pre-hibridación:

46) Incubar las laminillas 2x5 min en PBS-DEPC

47) Bloquear en Glicina 100 mM en PBS-DEPC 2x5 min.

48) Permeabilizar con Triton X-100 0.3% en PBS-DEPC durante 15 min.

49) 2x5 min. PBS-DEPC

50) Permeabilizar 30 min. a 37°C con una solución de proteinasa-K libre de RNasa en TE (100 mM TrisHCl, 50 mM EDTA pH 8.0) a 1 µg/ml para cortes por congelación o a 5-20 µg/ml para cortes en parafina (5 µg/ml, resultados excelentes para parafina).

51) Post-fijar las muestras 5 min. en Paraformaldehído al 4% (en PBS-DEPC)

52) 2x5 min. PBS-DEPC

53) Acetilar laminillas: Colocar laminillas en un contenedor e incubar 2x5 min. con 0.1 M de amortiguador trietanolamina (TAE), pH 8.0, adicionado con Anhídrido acético 0.25% (v/v).

54) Nota: Anhídrido acético es altamente inestable. Adicionar el anhídrido acético a cada cambio de TAE-Anhídrido acético inmediatamente antes de la incubación.

55) Incubar las laminillas a 37°C por al menos 10 min (TA, da mejores resultados) en el amortiguador de pre-hibridación (4XSSC con 50% de formamida desionizada)

Hibridación *in situ*

56) Preparar el amortiguador de hibridación:

- a. 40% de formamida desionizada
- b. 10% de dextrán sulfato
- c. 1x solución de Denhardt's (0.02% de Ficoll, 0.02% polivinilpirrolidona, 10 mg/ml de BSA libre se RNasa)
- d. 4XSSC
- e. 10 mM DTT
- f. 1 mg/ml de ARNt de levadura (ó de *E. coli*)

g. 1 mg/ml ssADN.

Nota: Desnaturalizar y adicionar el ssADN al amortiguador justo antes de la hibridación.

Nota 2: El amortiguador de hibridación (sin ssADN) puede ser almacenado a -20°C por algunos meses.

57) Decantar el amortiguador de pre-hibridación de las laminillas y cubrir las muestras con 20 µl de amortiguador de hibridación con la sonda 5-10 ng de la sonda de ARN.

58) Cubrir las muestras con un cubreobjetos o con parafilm

59) Incubar las laminillas a 42°C O/N en una cámara húmeda.

Post-hibridación.

Nota: Usar material limpio o diferente en los pasos de pre- y post-hibridación.

60) Remover pegamento de cubreobjetos

61) Remover cubreobjetos sumergiendo las laminillas en por 5-10 min. en 2xSSC (no colocar laminillas hibridadas con diferentes sondas en el mismo contenedor)

62) En un baño con agitación a 37°C lavar las laminillas:

63) 2x15 min con 2xSSC

64) 2 x 15 min. con 1xSSC

65) Para digerir sondas de ARNs de cadena sencilla (ARN no-hibridado), incubar las laminillas por 30 minutos a 37°C en el amortiguador NTE (500 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) conteniendo 20 µg/ml de RNasa A (OMITIR ESTE PASO PARA MEJORES RESULTADOS).

66) Precaución: Tener mucho cuidado con el manejo de la RNasa, ya que es una enzima muy estable y difícil de inactivar. Evitar contaminación de los equipos o contenedores los que podría ser utilizados para preparación de la prueba o para procesos de pre-hibridación.

67) En un baño a 37°C y con agitación, lavar las laminillas 2x30 min. con 2xSSC

Nota: Si en estos lavados se obtiene altos niveles de ruido de fondo o señales no específicas, intente lavados post-hibridación a 52°C con 2xSSC que contenga 50% de formamida (OMITIR ESTE PASO PARA MEJORES RESULTADOS).

Detección inmunológica.

- 68) Bloquear laminillas con solución blotto (4xSSC/5% leche) por 30 minutos
- 69) Adicionar el anticuerpo primario (anti-Digoxigenina-FITC) 1:200 en PBS-DEPC.
- 70) Incubar 1 hora a TA.
- 71) Lavar 3x5 min en PBS-DEPC
- 72) Contrastar con DAPI
- 73) Montar

14.12. TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling) para determinar muerte celular por Apoptosis

- 1) Desparafinar las muestras
 - a) Desparafinar: 65°C por 10 min.
 - b) Xilol - 10 min
 - c) OH absoluto - 3 min
 - d) OH 90% - 3 min
 - e) OH 70% - 3 min
 - f) OH 50% - 3 min
 - g) PBS - 5 min
- 2) Incubar con una solución de proteinasa-K (20 µg/ml) durante 15 min a temperatura ambiente
- 3) Lavados en PBS, 2x2 min c/u
- 4) Eliminar el exceso de líquido e inmediatamente incubar con 75 µl/5 cm² del amortiguador de equilibrio por al menos 10 segundos a TA
- 5) Eliminar el exceso de líquido (aspirándolo) e inmediatamente incubar con 55 µl/5 cm² de la solución de enzima TdT por 1 hora a 37°C en cámara húmeda.

Solución de la enzima TdT:

- a) 77 µl de amortiguador de reacción
- b) 33 µl de enzima TdT
- c) 110 µl de VT
- d) Se prepara en a una razón de 70% de amortiguador de reacción y 30% de enzima TdT

- e) Mezclar por vortex. Esta solución debe ser preparada al instante y no por más de 6 horas antes de usarse
- 6) Pasar las laminillas a una jarra koplín con amortiguador de paro y lavado, agitar por 15 segundos e incubar por 10 min a TA
Amortiguador Paro/lavado:
 - a) 1 ml de amortiguador Paro/lavado
 - b) 34 ml Agua desionizada
 - c) 35 ml VT
 - d) Esta solución se puede preparar y almacenar a 4°C hasta 1 año
- 7) Lavar en PBS 3x1 min c/u
- 8) Eliminar el exceso de PBS, (aspirando o sacudiendo)
- 9) Descongelar una alícuota del anticuerpo y llevar hasta TA.
- 10) Incubar con 65 $\mu\text{l}/5\text{ cm}^2$ del anticuerpo: anti-digoxigenina-TXR por 30 min a TA, protegiendo las muestras de la luz
 - a) Anticuerpo:
 - b) 68 μl (53% v:v) solución de bloqueo
 - c) 62 μl (47% v:v) de anti-dig-fluoróforo
 - d) 130 μl VT
 - e) mezclar por vortex y mantener en hielo. Debe de prepararse fresco y protegido de la luz
- 11) Lavar en PBS 4x2 min c/u
- 12) Teñir con una solución 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DAPI.
- 13) Montar con medio de montaje para fluorescencia Vectasheld

14.13. Producción y purificación de anticuerpos

Inmunizar animales con las proteínas sintéticas de interés:

- 1) Para SYCP1 se produjo un péptido sintético de los últimos 78 aminoácidos (aa) en el extremo carboxilo terminal (C-Terminus).
- 2) Para SYCP2 se produjo un péptido sintético de los primeros 21 aa en el extremo amino terminal (N-Terminus).
- 3) Para SYCP3 se produjo una proteína sintética de los primeros 24 aa del extremo amino terminal.

- 4) Los péptidos sintéticos fueron introducidos en cobayos, para que el sistema inmunológico del cobayo produzca los anticuerpos contra estos péptidos
- 5) Una vez producidos los anticuerpos, el animal fue desangrado y el suero sanguíneo fue separado de las células sanguíneas.
- 6) Este suero se usó para purificar el anticuerpo por columnas de alta afinidad.

14.13.1. Purificación de anticuerpos

- SYCP1: El cDNA completo de SYCP1 se encuentra clonado en el vector de clonación y expresión pCR-Blunt II-TOPO.
- SYCP2: El cDNA completo de SYCP2 se encuentra clonado en el vector de clonación y expresión pQE31.
- SYCP3: El cDNA completo de SYCP3 se encuentra clonado en el vector de clonación y expresión pCR-Blunt II-TOPO.

14.13.2. Producción del cDNA de interés

- 1) Para SYCP1:
 - a) Se amplifica el producto correspondiente a los últimos 78 aa del extremo terminal carboxilo.
 - b) Los oligonucleótidos correspondientes para amplificar esta secuencia poseen las coordenadas: 2872-3098 del cDNA completo (el cual está clonado en el vector de clonación y expresión pCR-Blunt II-TOPO)
 - c) Clonar el cDNA correspondiente a la región carboxilo en el vector pET21a, el cual tiene una etiqueta de histidinas (6xHis-tag) que permite hacer proteínas fusionadas con etiquetas His.
- 2) Para SYCP2:
 - a) Usar el extremo amino terminal de SYCP2 que empieza desde el codón de inicio hasta el primer sitio de restricción Hind III. Este fragmento se puede sacar del cDNA de SYCP2 clonado en el vector pCR-Blunt II-TOPO con los sitios de restricción EcoRI y Hind III y sub-clonar en un vector de expresión, en este caso fue en el vector pQE31 y se transformó dentro de células XL-Blue (sub-clona de una cepa de *E. coli*)

3) Para SYCP3:

- a) Se realizó una construcción de los primeros 127 aa del cDNA de SYCP3 (extremo amino-Terminal) en el vector pQE31-His-tag.
- b) Se transformó en bacterias competentes M15 y se continuó con el protocolo.

14.13.3. Transformación de cDNA y producción de proteína

- 1) Transformar la ligación por “heat-shock” (42°C, 40 segundos) en bacterias Rosseta, BL21, M15 o XL-Blue (cepas de *E.coli* para expresión de proteínas). Adicionar 1 ml de medio de cultivo LB e incubar 1 hora a 37°C en agitación.
- 2) Sembrar la transformación en placas de agar con medio de cultivo LB (adicionado antibióticos para selección a concentraciones finales de 34 µg/ml de Cloranfenicol más 50 µg/ml de ampicilina) y hacer análisis de restricción a las colonias resultantes.
- 3) Hacer un precultivo de una colonia positiva con 30 ml de medio LB mas antibióticos e incubar a 37°C toda la noche en agitación a 250 rpm.
- 4) Al día siguiente pasar el precultivo a 2.5 lts de cultivo con medio LB mas los antibióticos (6 ml de precultivo por cada 500 ml de medio fresco), e incubar a 37°C durante aproximadamente tres horas hasta que la concentración de bacterias de una densidad óptica en el espectrofotómetro de OD₆₀₀= 0.4-0.6.
- 5) Una vez alcanzada la densidad óptica entonces adicionar IPTG a una concentración final de 1 mM para la inducción de la proteína.
- 6) Después de la inducción de la expresión del cDNA de la proteína incubar a 37°C durante 5 horas para permitir la traducción de la proteína.

14.13.4. Purificación de proteínas

- 1) Colocar el medio en tubos falcon de 50 ml y centrifugar a 10 000 g durante 20 min y coleccionar en un tubo lo correspondiente a 150 ml de medio de cultivo (en un mismo tubo se recolectan tres botones celulares).
- 2) Decantar el medio resultante y adicionar 7.5 ml de amortiguador de lisis (1/20 parte del volumen total de donde provienen los botones celulares).
Amortiguador de lisis (200 ml):

- a) 8 mM Urea
- b) 100 mM NaH₂PO₄
- c) 10 mM Tris
- d) Ajustar pH a 8.0 con NaOH

Nota: Preparar 4 veces el mismo amortiguador y ajustar a los siguientes pH:

- e) pH 8.0: Amortiguador de lisis
 - f) pH 6.3: Amortiguador de lavado
 - g) pH 5.9: Amortiguador de elución 1
 - h) pH 4.5: Amortiguador de elución 2
- 3) Lisar las células toda la noche a 4°C en agitación circular.
 - 4) Al otro día coleccionar los lisados y centrifugar a 10 000 g durante 10 minutos a 4°C, para eliminar los restos celulares
 - 5) Separar el sobrenadante, el cual se pasará por las columnas de agarosa para la unión de la etiqueta de histidinas a la matriz de agarosa
 - 6) Equilibrar las columnas de agarosa
 - 7) Colocar verticalmente una columna de cristal en un soporte y tapar la parte inferior de la columna.
 - 8) Adicionar 4 ml de Ni-NTA agarosa 50:50 (matriz de agarosa acoplada a un grupo níquel que es a donde se unirán las proteínas con la etiqueta de histidinas)
- Nota:** Usar una columna con 4 ml de matriz (2 ml de matriz + 2 ml de vehículo) para cada litro de cultivo.
- 9) Lavar la columna con 10 volúmenes (con respecto a la matriz de Ni-NTA) de amortiguador de lisis pH 8 (20 ml). Añadir de 3 ml por vez.
 - 10) Pasar los lisados celulares por la columna.
 - 11) Sin dejar secar la matriz, añadir inmediatamente 20 ml de amortiguador de lisis (Urea 8 M, pH 8).
 - 12) Lavar la matriz con 20 ml de amortiguador de lavado (Urea 8 M, pH 6.3)
 - 13) Inmediatamente que ha fluido el amortiguador de lavado, adicionar 4 ml de amortiguador de elución 1 (Urea 8 M, pH 5.9) y recoleccionar cada 1 ml en eppendorffs, a los cuales previamente se adicionan 100 µl de Tris 1M pH 9.5 (para la estabilización de la proteína).
 - 14) Eluir la proteína con 6 ml de amortiguador de elución 2.

- 15) Al final de la elución se tendrán de 10 a 12 tubos eppendorffs de los cuales 5 μ l son usados para correr en un gel desnaturante de SDS para comprobar las fracciones con mayor elución de proteína
- 16) Lavar y almacenar matriz con amortiguador de lisis (Urea 8 M, pH 8), 10 ml.
- 17) Correr 5 μ l de cada fracción de elución en un gel desnaturante de SDS al 15% (el porcentaje se decide de acuerdo al tamaño de la proteína a purificar).
- 18) Teñir el gel de SDS con azul de Comassi o con el sistema de tinción "Fast system".
- 19) Una vez identificadas las fracciones que contengan más proteína, se procede a precipitar la proteína.

14.13.5. Precipitación de la proteína

- 1) En un tubo eppendorff de 1.5 ml adicionar:
 - a) 150 μ l de fracción con la proteína purificada.....1X
 - b) 600 μ l de Metanol a 4°C.....4X
 - c) 150 μ l de Cloroformo.....1X
- 2) Agitar en vortex y añadir
- 3) 300 μ l de H₂O desionizada pre-enfriada a 4°C.....3X
- 4) Incubar a 4°C durante 5 minutos
- 5) Centrifugar a 10 000 g ó a máxima velocidad durante 2 minutos.

Nota: Después de centrifugar, se pueden identificar tres fases: una blanquecina sólida entre dos acuosas.

- 6) Pipetear y quitar la parte acuosa superior sin tocar la fase blanquecina intermedia.
- 7) Con una espátula estéril tomar la fase sólida y recolectar todas las fases sólidas en un tubo eppendorff

Nota: La fase sólida blanquecina se puede tomar con una espátula o con una punta azul de 1 ml recortada.

- 8) Dividir las fases sólidas en 4 tubos eppendorffs
- 9) Dejar secar las fases sólidas a temperatura ambiente aproximadamente dos horas.
- 10) Resuspender en amortiguador de unión:

Por cada eppendorff adicionar:

- a) 10 μ l de SDS 10%
- b) 200 μ l de Amortiguador de unión.

Amortiguador de unión:

- c) 0.2 mM NaHCO₃
- d) 0.5 M NaCl
- e) Ajustar a pH 8.3

11) Pipetear suavemente

12) Incubar a 37°C ó 80°C con constantes agitaciones en vortex hasta tener soluble a la proteína.

13) Colectar los 4 resuspendidos y llevar a 1 ml de volumen final con amortiguador de unión adicionado con 0.5% SDS.

14.13.6. Unión de la proteína a la columna de alta afinidad “HiTrap” (HiTrap NHS-activated 1 ml, GE Healthcare Life Sciences)

1) Preparar la columna: La columna viene adicionada con 1 ml de isopropanol para preservar la matriz de sefarosa acoplada al ester N-hidroxi-succinimida (NHS).

2) La parte superior de la columna se conecta a una bomba de inyección. La cual se usará siempre a una velocidad de 1 ml por min.

Nota: Tomar en cuenta la capacidad de la manguera de inyección al momento de inyectar las soluciones (2.5 ml a lo largo de la manguera).

3) Se pasan 6 ml de HCl 1 mM a través de la columna. Nota: Evitar burbujas de aire.

4) Pasar el mililitro de la proteína solubilizada en amortiguador de unión.

5) Tapar la columna e incubar 1 hora a TA

6) Lavar con 6 ml de amortiguador A.

7) Lavar con 6 ml de amortiguador B.

8) Lavar con 6 ml de amortiguador A.

9) Incubar la columna durante 1 hora a TA (ó 4 horas a 4°C)

10) Lavar con 6 ml de amortiguador B.

11) Lavar con 6 ml de amortiguador A.

12) Lavar con 6 ml de amortiguador B.

13) Pasar 2 ml de amortiguador de almacenamiento:

Amortiguador de almacenamiento:

a) 0.05 M Na_2HPO_4

b) 0.1% NaN_3 , pH3

14) Incubar con el amortiguador de almacenamiento a 4°C toda la noche.

15) Lavar la columna con 3 ml de MgCl 3.5 M

14.13.7. Purificación del anticuerpo

1) Diluir el suero de los animales inmunizados 1/10 con PBS

a) 3 ml de suero + 27 ml de PBS

2) Pasar el suero tres veces por la columna para una mayor unión del anticuerpo

3) Lavar con 30 ml de PBS

4) Lavar con 30 ml de PBS + NaCl 350 mM (hasta 500 mM NaCl)

5) Lavar con 10 ml de PBS

6) Eluir el anticuerpo con 15 ml de Glicina 100 mM pH 2.5 a una velocidad de 3 ml por min.

7) Hacer alícuotas de los 15 ml de glicina con el anticuerpo en tubos eppendorfs de 1 ml adicionados con 50 μl de Tris-HCl 1 M pH 8.5 para estabilizar el pH del anticuerpo.

14.13.8. Diálisis del anticuerpo

1) En un matraz de Erlenmayer de 2 litros, lavar un fragmento de manguera para diálisis en glicina 0.2 M durante 1 hora a TA en agitación.

2) Amarrar uno de los extremos de la manguera y adicionar los 15 ml de la glicina con el anticuerpo.

3) Amarrar la manguera del extremo faltante.

4) Colocar la manguera dentro de un matraz de 3 litros con PBS y dializar durante 1 hora a TA y en agitación

5) Dializar en PBS a 4°C y en agitación O/N

6) Colocar los 15 ml en una columna de concentración de muestras biológicas (Centriplus VM-50, Millipore), para concentrar el anticuerpo

7) Centrifugar para concentrar (de acuerdo a las indicaciones del fabricante)

8) Después de 5 minutos se tiene un concentrado de 5 ml aproximadamente

9) Leer densidad óptica y dejar de concentrar hasta alcanzar una concentración del anticuerpo de 1 mg/ml.

10) Adicionar BSA a una concentración final de 1 mg/ml y Azida de Sodio (NaN_3) a una concentración de 0.1%.

Nota: el BSA no es necesario cuando el anticuerpo está concentrado a 1 mg/ml, solo se adiciona cuando esté a una menor concentración

14.14. Fijación e inclusión en parafina

- 1) Extracción de fragmentos de testículo para dos fijaciones diferentes
- 2) Fijación en paraformaldehído al 4% por 1 hora a 4°C
- 3) Lavados en PBS 3x1 horas c/u.
- 4) Deshidratar las muestras como en paso 8
- 5) Fijación en agente fijador Bouin por 24 horas a TA
- 6) Post-fijar en Formol al 10% por 24 horas
- 7) Lavados en PBS 3x1 hr c/u.
- 8) Deshidratar:
- 9) Alcohol 30% por 30 min
- 10) Alcohol 50% por 30 min
- 11) Alcohol 60% por 30 min
- 12) Alcohol 70% por 30 min (en este paso se pueden incubar O/N)
- 13) Alcohol 80% por 30 min
- 14) Alcohol 90% por 30 min
- 15) Alcohol 96% por 30 min
- 16) Alcohol absoluto 2 lavados por 15 min cada uno
- 17) Alcohol absoluto/Xilol por 30 min (en este paso se evalúa la deshidratación, con un color acaramelado de los tejidos)
- 18) Aceite de cedro/Xilol por 1 hora (En este paso se puede quedar máximo hasta 8 horas) Este paso es para aclarar, por lo tanto el material se tiene que transparentar
- 19) Enjuagar con Xilol 5-10 min
- 20) Parafina/Xilol por 15 a 30 min
- 21) Nota: Las parafinas se colocan en estufa a 60°C desde un día antes.
- 22) Parafina 1 de 30 min a 1 hora

- 23) Parafina 2 de 30 min a 1 hora (En este paso se pueden escurrir los tejidos y proteger del polvo a TA e incluir al día siguiente)
- 24) Incluir en bloques.

15. Apéndice 2: Secuencias Inmunoprecipitadas

Tabla con el análisis de secuencias IP con anti-SYCP3, anti-Pol II, anti-ZDNA y de ADN genómico

Sec IP anti-SYCP3	Tamaño de sec IP (pb)	Características	Distribución en el genoma de rata
M2	834	Repetida simple	Distribución media
M3	834	Repetida simple	Distribución media
M8	593	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M9	698	SINE	Ampliamente distribuida, intergénica e intrónica
M34	87	Repetida satelital	Centromérica y sub-telomérica
M44	801	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M48	816	SINE	Ampliamente distribuida, intergénica e intrónica
M51	299	SINE	Ampliamente distribuida, intergénica e intrónica
M53	82	LTR	Ampliamente distribuida, intergénica
M57	158	LTR	Ampliamente distribuida, intergénica
M62	259	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M67	67	SINE	Ampliamente distribuida, intergénica e intrónica
M68	81	Repetida satelital	Centromérica y sub-telomérica
M72	79	ADN transponible	Pobrememente distribuida
M102	95	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M108	765	LTR	Mediana distribución, intergénica
M110	500	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M116	141	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M118	300	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M124	308	SINE	Mediana distribución, intergénica
M125	96	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M128	188	LTR	Ampliamente distribuida, intergénica
M129	835	LTR	Ampliamente distribuida, intergénica
M131	771	SINE	Ampliamente distribuida, intergénica e intrónica
M140	260	LTR	Ampliamente distribuida, intergénica
M148	778	LINE	Mediana distribución, intergénica
M149	782	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M152	756	LTR	Ampliamente distribuida, intergénica
M153	94	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M157	434	LTR	Ampliamente distribuida, intergénica
M167	226	Repetida simple	Mediana distribución, intergénica
M174	792	LTR	Ampliamente distribuida, intergénica
M175	624	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M176	600	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica

M177	226	Repetida simple	Mediana distribución, intergénica
M179	790	SINE	Ampliamente distribuida, intergénica e intrónica
M180	226	LINE	Mediana distribución, intergénica
M182	600	SINE.	Ampliamente distribuida, intergénica e intrónica
M185	699	Repetida simple	Mediana distribución, intergénica
M186	788	LTR	Ampliamente distribuida, intergénica
M197	776	LINE	Mediana distribución, intergénica
M204	557	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M208	557	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M215	792	Repetida simple	Ampliamente distribuida, intergénica e intrónica
M219	792	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M220	795	Repetida simple	Ampliamente distribuida, intergénica e intrónica
M221	550	Repetida simple	Mediana distribución, intergénica
M222	550	Repetida simple	Mediana distribución, intergénica
M227	697	LTR	Mediana distribución, intergénica
M228	482	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M229	781	ADN transponible	Mediana distribución, intergénica
M234	785	ADN transponible	Mediana distribución, intergénica
M235	440	SINE	Mediana distribución, intergénica
M236	292	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M237	786	LTR	Mediana distribución, intergénica
M244	419	LTR	Ampliamente distribuida, intergénica
M245	668	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M252	785	SINE	Ampliamente distribuida, intergénica e intrónica
M255	779	SINE	Ampliamente distribuida, intergénica e intrónica
M257	780	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M259	784	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M260	780	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M261	276	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M263	787	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M302	607	LTR	Ampliamente distribuida, intergénica
M303	421	SINE	Mediana distribución, intergénica
M305	618	SINE	Mediana distribución, intergénica
M308	192	LINE	Mediana distribución, intergénica
M309	103	LTR	Ampliamente distribuida, intergénica
M310	156	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M314	374	SINE	Ampliamente distribuida, intergénica e intrónica
M319	162	LTR	Mediana distribución, intergénica
M320	451	LTR	Mediana distribución, intergénica
M322	451	LTR	Mediana distribución, intergénica
M323	168	SINE	Mediana distribución, intergénica e intrónica

M325	275	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica e intrónica
M326	498	ADN transponible	Mediana distribución, intergénica
M327	498	ADN transponible	Mediana distribución, intergénica
M337	350	LINE	Mediana distribución, intergénica
M341	414	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M344	192	LINE	Mediana distribución, intergénica
M346	560	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M353	424	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M358	498	ADN transponible	Mediana distribución, intergénica
M360	748	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica e intrónica
M362	168	SINE	Mediana distribución, intergénica e intrónica
M363	608	LTR	Ampliamente distribuida, intergénica
M364	249	Repetida simple	Ampliamente distribuida, intergénica e intrónica
M365	202	LINE	Mediana distribución, intergénica
M367	376	SINE	Mediana distribución, intergénica e intrónica
M375	451	LTR	Mediana distribución, intergénica
M379	782	SINE	Ampliamente distribuida, intergénica e intrónica
M382	353	Repetida simple	Centromérica y sub-telomérica
M384	520	SINE	Ampliamente distribuida, intergénica e intrónica
M386	157	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
M390	492	LRT	Ampliamente distribuida, intergénica
M392	474	LINE	Mediana distribución, intergénica
M393	236	LTR	Mediana distribución, intergénica
M400	199	SINE	Ampliamente distribuida, intergénica e intrónica
M401	358	LINE	Mediana distribución, intergénica
Sec IP anti-RNA Pol. II			
Pol 1	486	SINE	Ampliamente distribuida, intergénica e intrónica
Pol 2	186	ADN genómico no codificante	Pobre
Pol 3	665	Sec codificante	Pobre
Pol 5	534	LTR	Ampliamente distribuida, intergénica
Pol 6	778	ADN genómico no codificante	Pobre
Sec IP anti-ZDNA			
Z1	312	LINE	Mediana distribución, intergénica
Z4	384	Sec codificante	Pobre

Z11	538	ADN genómico no codificante	Pobre
Z13	640	SINE	Ampliamente distribuida, intergénica e intrónica
Z14	84	LTR	Ampliamente distribuida, intergénica
Z15	354	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
Z17	703	SINE	Ampliamente distribuida, intergénica e intrónica
Z18	865	ADN genómico no codificante	Pobre
Z19	932	Sec codificantes	Pobre
Z20	190	LINE	Mediana distribución, intergénica
Sec. IP ADN genómico			
I4	101	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
I7	784	Sec codificante	Pobre
I11	799	SINE	Ampliamente distribuida, intergénica e intrónica
I14	376	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
I15	101	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
I18	376	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
I19	375	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica
I21	278	LINE	Ampliamente distribuida, intergénica

SECUENCIAS (en dirección 5'-3')

Secuencias IPs con anti-SYCP3

-M2

tcgagggtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgctgctggcggtttccata
ggctccgccccctgacgagcatcacaataatcgacgctcaagtcagaggtggcgaacccgacaggact
ataaagataaccaggcggttccccctggaagctccctcgctgctctcctgttccgaccctgccgctaccggata
cctgtccgcttctccctcgggaagcgtggcgcttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggt
cgttcgctccaagctggcgtgtgtgcacgaacccccggtcagcccgaccgctgcgcttatccggtaactatc
gtcttgagtccaaccgtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagag
cgaggtatgtaggggtgctacagagttctgaagtggcctaactacggctacactagaagaacagtattt
ggatctgcgctctgctgaagccagttacctcgaaaaagagttgtagctctgatccggcaaacaaaccac
cgctggtagcgggtggtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctt
tgatcttttnnacgggtctgacgctcaagnggaaacgaaaactcacgtttaaggaattttggtcatgaaatt
atcaaaaaggatctcacntanaccttttaataaaaatgnanntttaantcaantcaaaagtattgantra
acttgntganagtaac

-M3

gtcaggcaaccgtaaaaaggccgctgctggcggtttccataggctccgccccctgacgagcatcaca
aatcgacgctcaagtcagaggtggcgaacccgacaggactataaagataaccaggcggttccccctggaag
ctccctcgctcctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcttctccctcgggaagcgtg
cgcttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgtcctcaagctgggctgtgtgcacga
cccccggtcagcccgaccgctgcgcttatccggtaactatcgcttgagtccaaccggtaagacacgact
atcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtagggcgtgctacagagttctt

gaagtggcctaactacggctacactagaagaacagtatggtatctgcgctctgctgaagccagttacctt
cggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaccaccgctggtagcgggtggtttttggttcangca
gcanattacgcgcanaaaaaaggatctcaagaanacctttgatctttctacgggtctgacgctcagtgga
acgaaaactcacgtaagggantttggnatgaaattatcaaaaggatcttcnctaaatcnttinaattaa
agnaanttttaaatcaatctaaggtattttgantaaattgggctgaagttacnagtntaatc

-M8

ggtacacacacatgtacatataaatataacctgctgggtctgtctgtctagtgtgattactacagaacactaatg
accactgagagggagaaactaactctcccaggaggagtgccctaattagctaggaatgcaaggtagtcag
gcctgaaataaagtttttaaaagctaatacctacatatgtacgatgttcatgtattaactcatctgccaccagc
cactgggctgtttctgctgtttgcattttaagactgcgcatgagcattctttttctcctgaatctttatattaaca
catcacctagaggtagctccagtacaccattttaccagaagctttactataaccattatcaattttttaaatatgt
aagttgtcattatttttgtaccacacaaaacattgtcatatctggcttatgcatgttccatgtgcacagggct
gaaaactccctagggaaacatgtccagaaggaacctcatgtgcacaattctctggaaaaagctagttagtg
tgtgctgctgggagtgcaaaaaattactgcatttctctgtccatcc

-M9

gagtattctatagtgacctaataagcttggcgtaatcatggtcatagctgttctgtgtgaaattggtatccgctc
acaattccacacaacatacagagccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtcctaattgagtgagcctaact
cacattaattgctgtcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggc
caacgcgaggggagagggggttgcgtattggcgctctccgcttctcgtcactgactcgtcgcctcggctc
gttcggctcggcgagcggatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataac
gcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgctgtgctggc
gttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaacc
gacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtcgcctcctgttccgaccctgcccgt
tacggatacctgtcccnnttctccctcggganngggggctttctcatagctcacgctgtagnatctcanttccg
gggnagncgttcnccccnagctggntgggnacn

-M34

taggcgaattcagtgagttccaatgggacatgcttgatgagctgctttcaatatagagcaacattttgtggaa
gggc

-M44

tatctccatataaaaatatagaagggtggtggtcagaaaccagaagctttagtctaaatactagaattcaaat
tgatagaaattactacatgtttccagagtaaaggtaaagagtataaagatgaatgtatcctctacacaattttc
cctcaccaaaagatacaaaacaaaacacaacaaaacaaaacaaaagagaaaccaaacaacaaac
caacaaccaacaaatgaacaaaagcagcaacaacaacaatacaacatcaacaacaaaacccaag
ggattagtgagaagttggtgggaaagatcttcagtgtaaaaggtaggaagctagctgtgagaagaata
ttctaagagcataggtagaaaaaagtttaggaatatgactccaacataaaatctgaggaagaatcattac
accgtgcatgtcagttggaaggaagaaagcttgcaagcttttaggctagaaaacaattaaaggaatcttta
agtaagagaacaggacacattgtcattgcaaggaaggaacaaagaatggttggtatgtatgatacaaatg
gtgagccatgagaacatgaatgtatgtaattttgctggttctacagtttatattcaaaaatgtacatgtatgtaa
atacatgtatgtattcaacaatcttaatgatataatagcccattgtgcttttaggagtgagagagaaggtaaaa
atgtatgttagagtcaggatgtgaaagaaaaagcaattaaattactctgaaaaataacaagggcga

-M48

gacagacagcactggatcatgaaaaagacaaaagactcctttctgaaactctttatgtagagattgaccttc
agtacatggagagccactgctctgctcctgagtgctgggagatccatcccaactccatcccccttaaca
catgcaagcaacaagaatgctccagatatcaaccctaaccctaaccctccagatgcaagcaacaagaatgc
tctccagatatctaccctaaagatagtcactttcattttgggtgggtccttgcaatgtggtgggagatagtagccat

gaaaccacgtgcaggcttaagcaagaaagactgtcggagtgtgcttggtaaaagctgggttgctctgcata
gaaaccacttacagattgaactgtgttgaagaggtagtcaggctcaaaactggagccatgatccaaagga
acaggtgcacttgaggaagctgtttattggtgtcttaagcttacaaccacagataatagttaaagggcgattct
gcagatatccattcacactggcggcgcctcgagcatgcatctagagggccaattcgccctatagtgagtcgt
attacaa

-M110

attctttctcggctgtttctttgtatagaggaaggcaactgatttttgagtaattttatacccagccactttgct
gaagtgttatcagcttagtagttctctggtggaactttgggatcacttaataactatcatgtcatctgcaaata
gtgatatttgacctctctttccgatctgtatcccttgatctcctttgtgtctgattgctctggctagaactcaagaa
ctatattgaataagtagggagagagtgggcagcctgtctagtccttgatttagggattgctcaagttctctc
catttagttaatgttagcaactggttgctgtatggctttactatgtttaggatggcctgaattcctattctttcca
ggactttatcatgaaggggtgtgaattttgcaaatgctttctcagcatctaataaatgatcatgtggttctgttctt
tcaaagggcg

-M116

gaccaggtcaaatagcaccatattccctatagaccaggtcaaatggcaccctattccctatagaccaggtcaa
atggcaccatattccctatagaccaggtcaaatggcaccatattccctatagaccaggtcaaagggcg

-M118

agattatgtaaatgctggccttctgtcaataaaacttagataaaacttaaatgactgaaaagccaacacaaga
tcaattccagtgctctgaacataatacacatactaaaaatatttaataagaatattttcaacattaaagaaccta
tcatatctttcttttataaaagacagattttagagtaatttggtatctagaattacatggcatagttgaattctgcta
cttgcagtggaatttttatatatatattttatctttattaacttgagtatttcttaagggcg

-M124

taccaatctctgaaatgcctttcccatgcttaaaaacagcaagaaatcaatctgaaatctcccatctcgag
cacagcaggtgagaacctgccacctccaaccacaatggaagaatttagtcagctcagaaatctcacctgca
cagctccatacaattccactaaatgacctccaatgacatttgatggcaaagggcggaagctctttgctca
acagcggaagagaaggaaataagatattgattgaaactctgagctcaggtttcattgcaatcacacagagaa
agggatgaagggcg

-M125

tactaatattgtttgttctcatagcccattatcagtgagtcgtatgccattgattgatgcctcagttacatttatta
cagggaaagggcg

-M128

tactgaaanaaanatgtaattggcctccttgaacagaaattacagaaacntttatagttaagattacaagann
gacataggccaatactganaaacaggtgtcaatcataaacaggaatttacctagctagctttaatatagtttt
gatcttaataaacaatggagctaggctgaagggng

-M129

tnctgannnannatntaattgnntccttgaacnaanttacnnaancntttatagttaanattacnagnn
nnacntangccantacttgaaaaacaggtgtcaatcntaacaggantttacctantagctcttaatatant
ttgatcttaantannnnntggagctaggctgaagggnaattctgnnnatatccatcncantggcggcgcgct
cgagnntgcgtcnnagggcccaattnnccctatnntgagncnnattacaanncctggccnncnttttacn
gcgtcnnngntgnaannncctgnngttaccnncctaatgccttgcnccacatcccccttcnncnctgg
nnnantannnnagangnccgcncgatgccttcccannntgcnancctatacgtacggnnnttaa
ggtttacacctataananagaganncgttatcgtctgtttgtggannnacagagtgatantnngacacnccn
ggcgacngatngtgccttggcagngnnntctncnncagannntctcngtgaacntnccc

ggtggnngnntatcnggnatgaaagctggcgcnngatgaccaccgatnnggnngtggtgccggtctccgn
nntatcgnnnaanangtgnngtanctcannncngnagatgacatcganaacgccnttanccngatgnn
cnggnnnnnnnnatgncnngnntgnnattannaaaaggnctntcnnnnatntcctttcnnnnnnann
nngncnnnanaangnngntnancccnnannaatgncnntnng

-M131

cagacgtggcccagctaaggccccgtggatgctcctagtcccaaagggtctatccagaccctgaaggagaa
agtaactgacaacaagtggaagctacagcaagacacagtgagggcatctggcagtgcattggctgggga
gatggaaatatcaggagattctgtgccaagggtgcaaatgcctttaatcccagctcttgaaggcggaggcag
aggcagagacagaggcaggcagatctccatgagtctgaggtcagcacagcttacaaggaagtccaaga
cagccagggctgttacacagaaaagcctgtctcaaaaaacaaaaaaggggagtggggatttagctcagt
ggtagagcgttgcctaggaagcacaaggccctgggtcggctgccagctccgggaaaaaaaattgaaaa
aaaaaatgaaaaaaccaaaaaaggaaaaaaaagtaaggaaaaagactctttctctcctttgtcat
tcaaagccaattccattcaattctattaaatccataaaacttttagtgaagatttagaggacaaccaacc
agggattagtctagcctccacatagcggtagccgcaaacgagtgcaatgaactttacattgtagcaaaagt
aattactaaaagcatttctattagaaagcagattttgtttctgtttacatgcatgctgtatcttgatatttgacaca
ggctctctaatgtatgtgtatgcatgtgtacatgatcttg

-M140

taaagtaataaagttgttggtgaatggttggcttggggagttctgttccatccacccaaatgtgtctgtgttttctat
atgtacatatatgtgtatatgtacacatgcatgaatacttgggaactgatggaatagatggtgtgcccgg
ccatagtgtgggtgatgaatgtttaatgtatacatgtcactgcataatctgcctgtacacagcatcttgattcttctct
tcctctctggtcaaggcg

-M148

cctgatgttctggggaatataaatgtcaggcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttcacgtag
aaagccagtcgcagaaaacggtgctgacccccgatgaatgtcagctactgggctatctggacaagggaaa
acgcaagcgaagagaaaagcaggtagcttgcagtgggcttacatggcgatagctagactgggcggtttat
ggacagcaagcgaaccggaattgccagctggggcgcctctggtaagggtgggaagccctgcaaagtaaa
ctggatggcttctgcccgaaggatctgatggcgcaggggatcaagctctgatcaagagacaggatgagg
atcgtttcgcagattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggagaggctattcggcta
tgactgggcacaacagacaatcggctgctctgatgccgctgttccggctgtcagcgcaggggcccggctt
cttttgtcaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaagacgaggcagcgcggctatcgtggctgg
ccacgacgggcttcttgcgcagctgtgctcgacgttgcactgaagcgggaagggactggctgctattggg
cgaagtccggggcaggatctctgtcatctcacttgcctcggagaaagatccatcatggctgatgcaa
tgcggcggctgcatacgttgatccggctacctgccattcgaccaccaa

-M149

atgtaagcaacagaaaacttgacagactactgacatcatcaaaaaccagggttcccaccagagcaataactg
gatatctaaacaccccagaaaagcaagatttagatttaaaatcacattttatgatgatgatggatgaatttaaga
aggacgtaataatccctaaagaaatagagggcaacacaagtaacaagtagaagccctaaagagga
atcacaanaatcccttaagaattacaagaaaacacaaccaaacaggtgaagggtgaacaaaaccattc
agaatttaaaaatggacatagaaaataaagaaagcacaaggggagacaaccctggatatagaaaacc
aaaggaagagacaaggagccatagatacaagcatcacaatagaatgcaagagatagaagagagaatc
tcaagagcagaagattccatagaaatcgatacaactgtcaagataatftaaaacggaaaaagatactggc
ctataacatacaagaaatccaggacacaatgagaagatcaaacctaaggataatagatagagaagagagt
gaagactccaactcaaggatcagtaaatcttcaacaaaatcatagaagaaaactccctaacctaaag
aaagagatgccataaacatacaggaagcctacaaaactccaaatagattgaatcagaaaagaaactcct
cctgtcataatagtcaaaaaccaaagtcacaaaacaaataaagaatattaaaagcagtaacggaaaatgt
gat

aatgtctaaaattatftttacatgtataaaactattagagaatacaaagtaaaatfttaaggtgtcattaaaag
atgatatgtatfttttagcaaacataagtgatctgtttctgaataatattgaaacccaaactaaatataaataaata
aataatataaataagatgtggcatatgtaagactgaaagttacctctctatccataaagcaacagtatactttc
tcttgataattggcacacttaaactcctcagcctagggcaaaacaccaggaggcaacacagtgtgtactaaa
gcacaaaaccagtctgcatctctactgacagatagggcccacaaagttaaagcatctctacacagcaaagg
aaacaattaactgaattaagagacagcctataaaatgggagaaaaatctttgctaggtatgtatctftaaagga
ctaactctagactatacaaagaactcaaaaaactatcaaaaaatcaaatcacctactcaataaatattgtta
ataagattaacaattgttcttaaaagatgaag

-M215

ggagcaaaatattattgaataataagttgatgaataattgtgttctgaacataagtatataaaacagattatataa
gcatagatgtttatgtaactactftttgccccagttgactgtcaagagattagaagcctacctgaattgaacatgat
aacttgattcatgtttctatgttaagttctaaccatgacaacagccctgtgagagacagatfttttaagctggaggg
gtaaagtactftcaaaaatgtctctaattacatagcaaaactftgacatgtfttaatttaacatafttttaaaaaa
atgttcttacaagtagaaagtatagcacaatgaccaggtcctagttgagcaccattgactfttaagagttctgtt
attgagaatccatgacatagttaagaagatacaccaacattaggataaaatatagcttattcagtttcaaaa
atcatgcttattcattatftaactggccacttaactgaggccgftttgtaataatfttaattgatcatattcactcttct
ctgtctcaggattcagaagatggaaaggaggtagaatagttgtttccatgatcaaaactgatcagctcctctg
agaacaaaaatgaaattaacatagacagtaagagtcagattcctgtgtaaatgaggaacatctccacctgt
ctataggtgtgtctgtggtctgtgtgctgtctgtctgtgtttgatgtctgtctgtgtgctgtccctaaca
aaggatt

-M219

tatccactaatcagtaagtgcataccatgtgtgttttacctcactcaggatgatattttctagtttcatctattgtctat
gaatttcatgaagtcactatfttttaatagctgagtagtactccattgtgtagatataaccaatfttctgtatccattcctc
tattcatggacacctgggtftttccaggttctagcaattataaataaggctgctatgaacatagtgaggacatagtc
ctgttataatgttgagcatctfttgggtatagcccaagagttctatagctgggtcctcaggtagtagtactatgtccaatt
ttctgaggaacctccagactgattccagaatggtgtaccagcttgcattccaccaacaatggaggagtgttc
ctcttctccacatcctcgccagcatctgctgtcacctgagttttgatcttaaccattctgactgggtgtgagggtggaa
tctcagagttgtttgatttccctgatgactaaggatgttgaaaatttctttggatgcttctcagtcattcaatatt
cctcagcagagaatctfttttttaattctgtggatgaattgtaccaaacagaaagaattaactagtagcttcaaa
aaaatgatgacaaatftttgaattgaaaatfttaatfttcaaaagagtatgaccctgacatctcagatacattatg
acatatcatggaaatfttccatagataggaagtcactgataactaaacatattagagtttcagacactgttccagg
attga

-M220

ctcctctctctctctfttctctctctctctcgtctctctctfttctctctctctctctctctctctctctctctctctct
gtgattgtgtggggaggggaggagaaggggcaatactcagctctgttaacaactatccaccagctfttttcaat
gctccatttctggtactfttccatagcagcctcctcagaggggtgtccagggttactgggttcatgctgaataaata
gaggcatctggaagataatgccctctgctccccccaccctcctatgtgggtctacggcagtggtctgagac
agcagcctctaccggaactgacattgttctgctgaagcgggacgtgccctgaagtcctccagggttcttctta
gagtcatttctgacaactcattacagataagccttctgctcaggtcagtttctggggaacagaatgggaaacaa
ataggtgaaaatgtcttccagatagctaccagcctgttcatgaccttgcaggagagtcagaacacggagtt
ggtaaagagcccagctccaagacagttcaccaaagtccagatttgacattgatggagctgcttaaccttaca
gcagtggtgatgacaaaaaatgtatggatgaggtatactgggggcaagtctactgacagagagaagagaa
atgggtgtcttcttcttcttccattccaagctctgcccagcatgtgacagaggacagcaaaagagctcagt
gcaaccaaattctcatccattaacagaatc

-M221

agcagaatcagtatftttcaggtttggaatctctaagactgtgtgccgaatagcttctgtttgtggctaccagtgga

atccgtgttcagttgtggaagtgtgaggagacacggtgacctcacgcctgctcgtgtgtgtagacgggtg
gcacactcctgacctctgactctcagcgtgagtgtagccctggctgggagtccacggaagggaggag
gccgaagcttagggctgtgtatacgcactcagatataagagattaaaagtgtctaaagagaagaagaaaag
agtacacagctgccgtcccctaaacagacctcccatctgccaccacgatttgcattgtcaccttctccgggctc
atgtgacttcattaactgccattgacttaacaagatttatgcaaatgacacataggagctccctaactcccactg
caatcaagtgattatgtatgtacaacttgccacagcgatgaaaaattaatacgtgacaagcccactggccgct
gagctgggcccgtgctttatctctcg

-M222

agcagaatcagatcttcaggttggaatctctaagactgtgtgccgaatagcttctgtttgtggctaccagtgga
atccgtgttcagttgtggaagtgtgaggagacacggtgacctcacgcctgctcgtgtgtgtagacgggtg
gcacactcctgacctctgactctcagcgtgagtgtagccctggctgggagtccacggaagggaggag
gccgaagcttagggctgtgtatacgcactcagatataagagattaaaagtgtctaaagagaagaagaaaag
agtacacagctgccgtcccctaaacagacctcccatctgccaccacgatttgcattgtcaccttctccgggctc
atgtgacttcattaactgccattgacttaacaagatttatgcaaatgacacataggagctccctaactcccactg
caatcaagtgattatgtatgtacaacttgccacagcgatgaaaaattaatacgtgacaagcccactggccgct
gagctgggcccgtgctttatctctcg

-M227

aggtataaacaattgtggttaaagttgcattgtgactgtaagacactgacctaaagtccaattaggaagaggg
agatctttccaaaataaatgtggtgaaatcattccatcattctgaacatgatagcttagccgaatacacacca
gaatatctgcagggcattcaaaatagatgactgctttcaacatttgcactaggaaatgagaggctagaaatg
gttaaaaaatgtggttaaattgtgtaccataatgaccacagcctctatttaaaacaaagaaaccaagagactc
tatacgtgttcaaaaataggcaataaggctgtgcttttaacttttcaaagcaataaggggaagagttccactt
tcatgcaactttagaatccgtgtatcctgttaggaacattcatagcaaatataccaaggatttgcataatcttttaa
gtagcaagtcattctcacatgaggccaggggttaacgtcatctaaagaaaagccataataattcaagtaca
atttctatgtgatacgtcaaaagtcattgtaataagcaagtcacacctcaagtagagggcattttcaaatg
aataatggtttgacctgaaaatggaattaaatctcagacgaaataagacaaaaataattcgaagcattgttaa
tatagttagttatctctcg

-M228

tggaacacatagccagaggggaaatttctaaacagaaacattaatgacttacgatctatgatcaagaatcaa
caataggacctcataaaatgcaaagctgctgtaaggcaaagggccctgtcattaggacaaaatggcaac
catcagattgagaaagtatcttttaacaatcctacgtccaatagagatcttatgtctaatgtagacaaagaactca
agaaatgtgactccagaaaatcacataacccttttaaaaaatggacttcagagctaaacaaagaattgtcaac
tgagtaatatcgaaaggcagagaagcaccttttaagaaatgttcaacatccttagtcatcgaggaaacgcaa
attaaaacattttgagattccacttctcaccagtcagaatggtaagattaataactcaggttagagcagatactg
gcaaggatgttaaaaaagagaaacacttatccattgttg

-M229

ttcataactgtatgtactatgcttctaacacatactaggaggtcaagcaatccacacaataaagagaaagag
actaaggagtggatgcagaaagaaaaaggactgaaaagtggatgcagaaaggtattacattagcag
agaggctttaggatggtagcaggaaggcaattaaatgcagggcttgtgtgcctgcacactgaacccaa
agctaactcttcttccacagtaggaactagacactcattgctggtgacacctcaagggtgaactccatcag
ctcgtctcgtcctcagaacctcccattattgctgtttatcacaagcaagttctccacacgggaatccaggagag
catttaggtgataaaaatctcatcaactttcaccagctactggagctaattaaaatggagtagactaataaac
cgagtctaggatgaaaagataattagaaaatccctaaatgtaattacccttttagatagaatcttctgtctgata
tgtgttcaagttgtcttctcctcacagttgagcataattcacactgaagacttaactcaaggccactaccagct
tctgtcaaggcagaacctactgctatctatcaccttattataactgattttatgagattttgtatttctatccctagtg
ctggcattttcattttcaattttccttattttaccaaaataaaaagtgcacaatatttaaccatttcccaaacctg

aaattcagccactgttttc

-M234

ttcataacttgatgtactatgcttctaacacatactaggagggtcaagcaatccacacaataaagagaaagag
actaaggagtggatgcagaaagaaaaagggactgaaaagtggatgcagaaaggtattacattagcag
agaggtctttaggatggtgagcaggaaggcaattaaatgcagggcttggtgcctgcacactgaacccaa
agctaactcttcttccacagtaggaactagacactcattgctggtgacacctcaaggttgaactccatcag
ctcgcttgcctcagaacctcccattattgcttcttatacagaagcaagttctccacacgggaatccaggagag
catttaggtgataaaaaatcttcatcaaacttccaccagctaggagctaattaaatggagtagactaataaac
cgagtctaggatgaaaagataattagaaaatccctaaatgtaatttacccttttagatagaatcttctgctgcata
tgttcttaagttgttcttccctcacagttgagcataatttccactgaagacttaactcaaggccactaccagct
tctgtcaaggcagaacctactgctatctatcacctcattataactgattttatgagattttgtatttcttaccctagtg
ctggcattttcattttcaattttcttattttaccaaaataaaaaagtgcaacaaatatttaaccatttcccaaact
gcaaaattcagccactgttttc

-M235

cttggtctgagccttagacacccgatgaggcagggcatgtctacagagctgtgattggtctgacacagggaa
aaagtaaaaagccaagggcgaatgggtgaaagttcaaggactggcccagtatgtacaaagctggtcagt
aaagcagcccaagacgggtgtcaggaggtggtggaactaggatttctaacagtgttacaatatctgctct
ctgggtacctcagctcgaagagagagaacagtggtcttaggttaggacctgaggcctctgccagatgtctgc
caaaactttaataagtcctgtcgactttctgtgactctccacaagtttgaggctcctcccgcaacctcat
ccttctccaggaataaagctcaggttcagagtaaggtcactttctcggggtgccagggagaggctg

-M236

tcagaaaattggacattgaactacctgagtaccagctatacctcttgggaatacacccaaaagatgtccca
acatatacaaaaacacatgctccactatgttcatagcagcctattataatagccagaagctggaaagaac
ccagatgccctcaacagaggaatggatacagaaaatgtggtacatcttcaaatggaatattactcagctatc
aaaacaatgactatgaaattcataagcaaatggatggaactagaaaatatcatcctgagtgaggtaacc

-M237

cactgaagaatttattcttgaaggcaggaggtgcaataactgagcattctgtcagccaaaataatacttagt
acctaggcggatacatgtgtcattgacaaatgaatacccttcaactaggatgttacagcagaggttaagagatg
ggatgtagtgaaagctcactcttcaacctgaacaactttaagtgaaagtaattgggcttttattctccatct
ctttaggtcacttccccctctgtttgtattgttttgtaaattactgttacaaggatcgtataacctcctcttaa
tagtctctaaatactatttggtattaaaacgagagacatgcatgtcagaaaggtagacattcttaacgaattca
gtgtcagaatagatttagcgtctcatgggacagacctgcagaaggttagccttctgcagagagctcactcctc
tatcttaatttaggactggttagctctgccccaaagctttgagatggccacactgtgtgtagcaaggggagcttg
tgcttctatatttctatcaggaaagtctgtgaaaaatgtggatggctgacagatactgcaaacgggaaacca
ctccttctcctctctctcttctcggagccctatctgactcagagatgaagattcttcaagcttatgctgtctct
cctcaatctgtactagaaggctcatgagtgatcctcatgcttctaaattatgccctggcttctctcgggac
ctaaactcacag

-M244

ttctatccacatgcaagccaatcttccccagcagccttccatgaacatgtagaccttcaacttctggcac
catgactgcctggatactgcatgctcccagcttgatgatactggactgagctctgaacctgcaatcctgtgtcc
attaatgttgcctcataagagctgcattggtcatggtgtgtctgttctcagcagtaaaccctaaatgagacaatg
tcaatgttccctgctccagcttctggctatagaagctacacacatgaccggtattcttctcgatattggccta
aggctctaggctgtcttctgactgagagtgctaggacatcctgttgctaagggcattgttactgttccatgcaat
actgtgaaaacatcagcaggtcctgcttctgttac

-M245

atacatacagccaccaaccagacaatattgctgatgccaagaagtgcatgctgacaggagcctgatatag
ctgtctcctgagaggctctgccagagcctgacaaatacagtggttgattctctcagtcacaccattgaactgggaa
tggggctcccattggaggagttagagaaaggattgaagaaactgaagggatttgcaaccccgataggaaga
acaacaataccaaccaaccagagctgccagggactaaaccaccattcaaagagtacatatggacatatcc
atggctccagtcacattttagcagaggatgacctattggacatcagtgagaggagaggcctttggccctgtg
aaggctcaatgccctgtgtaggggaatgccagggcaggagatgagaggagtggttgggtggtgggaca
ctctcgcggaggcagggggaggaggaaaggggttaggggtattccagagtggggattgggaaaggggata
atattgaaatgtaagtaaagaaaatccaataaaaaaatggaaaaaaaacttttgcataatattctcaaa
acaggtgctactctactcagtaatctttataatgccaaaggatatactaaaagcttcaataattattcccct
atgctcaagaggct

-M252

cagctggctctcctaattgtgagtacatatgtgtgggagcacagtagggctagtcacgtgactgagagtcaggg
agtcagccctgggtctaccactgtccatctaagtggcccagaccacattagttaacctgtccaagcctcagttt
ccccgctgtaaaaaagggatagataaaaagtgtaaatttggggcttgagagatggcttggctggtaaaagg
acttgctgctctgtgaaggattgtgttctcccagcaccacatagcagctcacaacctctgtgactccagt
tccagaggaagcagcacccttctctagctctctgggcaccatccatacatgtggtacacataatagtagtga
catatatacacacagggaaactcatgcacgtgaaataaatatacacgactcttgaatttgaagccctt
agattcagaatacagagggtattcattcattcaccatcttggctcgttcattcattgattagtgaaatagttatcgaagg
tccagtgaggcacagacactgtactgagtgtagcataacaaagtcagaagcactgaagatgtttaccaagg
gcttggctcatatgccagcttctgtacttagcactttatgggaaggttccttacaatgttcttaggggtcattcata
aatggaaaagagagcaaagaacccatagggattgggatagggatgctgggtgagagtagataaatagaa
caggaacaacaacaacaaaacccacctatccattta

-M255

cagctggctctcctaattgtgagtacatatgtgtgggagcacagtagggctagtcacgtgactgagagtcaggg
agtcagccctgggtctaccactgtccatctaagtggcccagaccacattagttaacctgtccaagcctcagttt
ccccgctgtaaaaaagggatagataaaaagtgtaaatttggggcttgagagatggcttggctggtaaaagg
acttgctgctctgtgaaggattgtgttctcccagcaccacatagcagctcacaacctctgtgactccagt
tccagaggaagcagcacccttctctagctctctgggcaccatccatacatgtggtacacataatagtagtga
catatatacacacagggaaactcatgcacgtgaaataaatatacacgactcttgaatttgaagccctt
agattcagaatacagagggtattcattcattcaccatcttggctcgttcattcattgattagtgaaatagttatcgaagg
tccagtgaggcacagacactgtactgagtgtagcataacaaagtcagaagcactgaagatgtttaccaagg
gcttggctcatatgccagcttctgtacttagcactttatgggaaggttccttacaatgttcttaggggtcattcata
atggaaaagagagcaaagaacccataggggattgggataacggatgctgggtgagagtagataaaatag
aacaggaacaacaacaacacccacctatc

-M257

ccacaacagggagggagggagggacagggaaagggaaaaagattgggggttggggaagagggagcat
gatctgtattgggtaaggggaaaaggactaaagccctgagggccaggagaaagactgaaaacagtcaac
ctcaggaggaaggaggttgggaagaccttctagaatgtaccagagacctgggaacagagagactctcagg
actcaaaggggagtagccttagatgaaaggccctacagtgagagagggaaacttataatctacctcagc
agaaagacagggcatcaagtaggagatgggggtgctatcccacaggcaaagcactgatccatatcttctgt
ctaaaagaaatgcaggcatggaatggaagagctgaggaaaagacagttcagctcaaacgggaggctc
ccaaatagcaacattactgaagctatggggcgttaccaaaaggacactctgctctccaaaagacataa
caagcagctaaaagaatcagatgcagatatgtcactcaaccaacaacagaagctgctgacctgaccgct
ctgggtgaattaggggaaaagctggaggaagctgaggaagaggacaacctgtaggaggactatcattctc
aattaacgttgaccctgagatctttaaactggatcgccaaccaggcagcatacaccagctgagatgag
gcctccaacacatttacagcacaggactcccgtctcagtcagagtaatctgaagggaaggaagccccag

gaag

-M259

ccacaacagggagggagggagggacagggagggaaaaagattgggggttggggaagagggagcat
gatctgttattgggtaaggggaaaaggactaaagccctgagggccaggagaaagactgaaaacagtcaac
ctcaggaggaaggaggttgggaagaccttctagaatgtaccagagacctgggaacagagagactctcagg
actcaaaggggagtagccttagatgaaaggccctacagtggagagaggggaacttattaaatctacctcagc
agaaagacagggcatcaagtaggagatgggggttctatcccacaggcaaagcactgatccatatcttctgt
ctaaaagaaatgcaggcatggaatggaagagtctgaggaaaagacagttcagctcaaacgggaggctc
ccaaatagacaacattactgaagctatggggcgttaccaaaaaggacactactgctctccaaaagacataa
caagcagctaaaagaatcagatgcagatatgtgactcaaccaacaacagaagctgctgacctgaccgt
ctggttgaattagggaaaagctggaggaagctgaggaagaggacacatgtaggaggactatcattctcatt
acgttgaccctgagatctctaaacactggatcgccaccaggcagcatacaccagctgagatgagcctcca
acacatttacagcacagactccgtctcagtcgagtatctgaagggagggagccagaagttaaagtcttg
ggtgat

-M260

ccacaacagggagggagggagggacagggagggaaaaagattgggggttggggaagagggagcat
gatctgttattgggtaaggggaaaaggactaaagccctgagggccaggagaaagactgaaaacagtcaac
ctcaggaggaaggaggttgggaagaccttctagaatgtaccagagacctgggaacagagagactctcagg
actcaaaggggagtagccttagatgaaaggccctacagtggagagaggggaacttattaaatctacctcagc
agaaagacagggcatcaagtaggagatgggggttctatcccacaggcaaagcactgatccatatcttctgt
ctaaaagaaatgcaggcatggaatggaagagtctgaggaaaagacagttcagctcaaacgggaggctc
ccaaatagacaacattactgaagctatggggcgttaccaaaaaggacactactgctctccaaaagacataa
caagcagctaaaagaatcagatgcagatatgtgactcaaccaacaacagaagctgctgacctgaccgt
ctggttgaattagggaaaagctggaggaagctgaggaagaggacaacatgtaggaggactatcattctca
attaacgttgaccctgagatctctaaacactggatcgccaaccaggcagcatacaccagctgagatgagc
cctccaacacatttacagcacaggactcccgtctcagtcagagtatctgaagggagggagcccaggaag
ttaa

-M261

tatatatatatatatatatatatatatacaactttacaaagtaaattctgaggcaaaatcctaagtag
agataaaaagacataaatgtgacaactaagatttcagcacagccaggagatagaattactctaactgaatg
atatctattaatgtacctgaaaatatataaagtataaatggtaaaactcagagagagagaggggggagggag
gaaagaaaaaggaaaagaaagaaagaacatgtaggggaatgctaggggagggg

-M263

ccacaacagggagggagggagggacagggagggaaaaagattgggggttggggaagagggagcat
gatctgttattgggtaaggggaaaaggactaaagccctgagggccaggagaaagactgaaaacagtcaac
ctcaggaggaaggaggttgggaagaccttctagaatgtaccagagacctgggaacagagagactctcagg
actcaaaggggagtagccttagatgaaaggccctacagtggagagaggggaacttattaaatctacctcagc
agaaagacagggcatcaagtaggagatgggggttctatcccacaggcaaagcactgatccatatcttctgt
ctaaaagaaatgcaggcatggaatggaagagtctgaggaaaagacagttcagctcaaacgggaggctc
ccaaatagacaacattactgaagctatggggcgttaccaaaaaggacactactgctctccaaaagacataa
caagcagctaaaagaatcagatgcagatatgtgactcaaccaacaacagaagctgctgacctgaccgt
ctggttgaattagggaaaagctggaggaagctgaggaagaggacaacatgtaggaggactatcattctca
attaacgttgaccctgagatctctaaacactggatcgccaaccaggcagcatacaccagctgagatgagg
cctccacacatttacagcacaggactcccgtctcagtcagagtaatctgaagggagggagcccaggaag
gtttaaagtc

-M302

ataaaaaataaagttgatggcggccaatacctgggcagagacacagaggtaggactttaggattcttgacta
gggaaccagaaaggaaggaatftttaggactaccatgtctggaaggagatgccagtcctgagagctata
gaagagagaatagagcaatcatataagaccaggatcatggctcaggaggactaaatatgggaacag
ggcagccaagatggattataggtgtaataagcaagaattcaggaatagcagaggggagagtgtgtagcc
acatgcaggttggaatggcccagtcattgagttgtaatacatattaaaatagagggctgctgtgtgtcttfc
atttgggaatccagaacattgatggaggcagcaaggaatgtgtgccaacaactccagggcaatttgagcagg
ataatctccagtgcaacatgtaaccatacataaagtatgtagtcccacctcaattacctcatttagataatcattc
acagacaagtacagatactaggctcattgtgatgctagaacttatcatgatgacatactagccagtagtagta
acctaactcttagtatttag

-M303

aggtcggggacagggaccatgcacaagctcggctgaggcctgcaaactgtcaggctttggggagaggg
gcaggtcggggcctgtatagctgcgtggaggtgctcgggatatggggtgggggcttcatcaaggctggg
agccagggctcatgtggaatggcctggcactaacctgtgactaggtgagcccagtcaaaagccatggggg
aggggcacatggccaggtggaggggtgcgtgcctttgtggtaaactgtaacctggtggactctgactttgccag
ggaggcccgcagccttgaggactattctgagcttgatactgcaagggtaacattggcagagctggccagtc
tggggcctgctggatccacaacatcccaactgtgaccctatcactaaaattaggtagaa

-M305

aaaaatggaaaccacaaaatgtcaggccctctgacttcagcctggatgccagtggtgattgattctgtttatt
tttaagattctcatccgagggtagtgccacctctctgagagccacagtgggaccctggctgccattctctcatta
atccttaggatgtccccgagagggggcaagagacagctctcggattccctctgtgtagaaagagaagctaag
gtttgggaaggtaagagactgcccagggtatttagcaaattaggagagggcacttggggacagagctcca
ggtgcctaggttctgtggctgcaacaagagagcccttggcagagagagacactttatgtttcatgttcaagaga
aactcttacttggtgtagaaacaaaataagttcatattttagttcagtccttccctgtattctacaccaacacacac
actcacaccattagttg
tagagaacaggttagccctggattagaacttgcaataaactccctgatttctgcagaagtctcaatgtattcta
tttttagaatcgaccacacac

-M308

cagtaattaattttattattcagtcctctggaccaattggcatctctatattttgtttgaattattttggttgggcttaatt
tgtattttgtattgccatagatccacacagcagaaatctatttgggtggggaggggtaacaacttttttta
ttattaactgagtagttctattt

-M309

agctcaagtcaggaacctggaagcaggaattgatgccgaagttgtgatgaatgctatttatgggcttgctcctc
atggcttgctcagcttgatttctcacac

-M310

cctcattctccacattctgcccagcatcattgttacctgagattttatcttagcaattctgatgggtgtgaggtggaat
ctcaggggtgtttgatttgcatttaactgatgactaaggatgtagaacatttcttaggtacttctcagccattt

-M314

ccaaacttttctctgtgtgctaaagtccattctgtagattgggttgaaaactgtttttgcccaggcagtcagtcagc
catacctttcattccagcactctgtaggcagagggcagcagatctgaaattcaagtccagctctggtttacagag
ctagttccataaggcatctagggtacactaagaaatcaagtctcgaaaacaaaacaaataaaaatgtttta
cttttacagagccatttagatgacataaaaatctctgaaatctagtcacaattgaagataaccaatcttgagaaa
attatattgactgagccagaggtagctcagtagatgggaattctcctggtgtatctgagctctaggttg

-M319

agatccctcatccatattcacctgagtaacacccccccccccattcctgacatgtcctttcctgggtacaggg
ccgcctggccgcatgtttgctcagtagatgtccctcaaattgatagttatactcctgtttcaactctaccatg
gtagaaa

-M320

tgacntttaccaaaccantccctgtcctctgtgtttctctctttannganataactggatttgnactttactgnctt
annaacnnanngtgtttggaatcctgccnctactaanntatcagaaggatttaaggctgctggaatccantt
naanatttantcngctgactcaactgggtctgaagtaaaaaatcaaccatagattaaatgtttancatcna
cattgtaattgngctcctggtcataannantcacgtctatttctgtttcagacagctctccataggtttctcccca
gtgcctcacacnngctggnntccanatangttatttctatgaggctacnccttatataactcttttatanactt
gancccccacgctgtgtgcanttcattataagctcccggtagactcanngatcacaacacn

-M322

tgacntttaccaaaccantccctgtcctctgtgtttctctctttannganataactggatttgnactttactgnctt
annaacnnanngtgtttggaatcctgccnctactaanntatcagaaggatttaaggctgctggaatccantt
naanatttantcngctgactcaactgggtctgaagtaaaaaatcaaccatagattaaatgtttancatcna
cattgtaattgngctcctggtcataannantcacgtctatttctgtttcagacagctctccataggtttctcccca
gtgcctcacacnngctggnntccanatangttatttctatgaggctacnccttatataactcttttatanactt
gancccccacgctgtgtgcanttcattataagctcccggtagactcanngatcacaacacn

-M323

ggaatggtgatcaatgcctctttctctgaaactcatcatTTTTGGAGGGTCGGGGCTGTGAAGCTAAGGCTCA
CGCATTCAAGGCAACAGATGTACCAAGGAGCTGTCTCCTGCCCTTACTTTGAGATGGGACCTCACTATGCC
CAGTGGCCTC

-M325

tgaagcaatcccactaaaatcagggactagacaaggctgccactctctccctacttattcaatatagttcttga
aattctagccagagcaatcagacaacaaaaggaggtaaggggatacagatcggaaaagaagacgtca
aaatatcactattgcagatgatatgatagataatttaagtatccaaaagttctaccagagaactactaaagct
gataaacaactcagcaaaagtggtgggtataaaatcaactcaataaatcagttg

-M326

ggctcctgcattgaaggagttatctgcttctgcagagaagtcattcataccatcccatacacacatcacacat
ctactcacctcaactcaaaccactccttcaaagatacctccatcttgcttgcaccatgaatcagtgtagaca
gccgattcatgttctttgcttactgaactgcaactgcacattggccagtgacatgagcaagaactcataagaatg
aatagcctgtggaatcaattcacgacatgaagtgataatgggatattgatgttttgcaatTTTATACTATAAG
ATTGTAATAGAATTTAGCATATAGTAAATGTACGTGTGCCATATCCCCTCTCTAAAGTAGGCATTAATGTTG
CCTCACTGTGAGTGGATCTCTCCCTGTTCTTAGAGATTCCCTACTGGTGAGTATTGATAAATACAGACAGTGTAGG
CTCCAGTGTGGACAGATGTCAGAAACAGAGTCT

-M327

ggctcctgcattnnaaggnagttatctgcttctcngcanagaantcattcataccatcccatacnacatcacann
tctannnacctcanctcnnaccactccttcaaagatacctccntcttgcttgcaccatgaatcagtgtaga
cagccgattcatgttctttgcttactgaactgcaactgcacattggccagtganntgagcaagaactcataana
atgaatanctgtggaaatcaattcacgacatgaagtgataatgggatattgatgttttgcaatTTTATACTAT
AANATTGTAATANAATTTANCATATAGTAAATGTACGTGTGCCATATCCCCTCTCTAAAGTAGGCATTAAT
GTTGCTCACTGTGAGTGGATCTCTCCCTGTTCTTNNAGATTCCCTACTGGTGAGTATTGATAAATACANACAGT
NANGCTCCNNTGTGGACACANANGNNAACAGAGTCT

-M337

caaccaactgaacctgctttaccagttacaaaaactacaagaaggtaaacgaccatctagaagaacacctttat
tgtggtagtcattacaacataaggaggagtagtagttaaaggagatcaacctcccagactacctcctgcat
gcacacatgcacacgcactaaagcatacacttacatagctaaaatgggatgtctatgctcagattgtaa
ctcccaatcagaagtaagtctcatacaatgtgcactcactggactcacataaacaccgccttatttctgtatctca
caatcttttttttcagtcagccattgccctcctccagacccccctcc

-M341

tgtattgtgaaatgtaccacactttctgtaccttcacctctgtgaaggcatctgggttctttccagttttgctattat
aaataaggttactatgaatgtagtggagcatgtgtccttattatgtttggagcatcttttgggtatagcccaagag
tggtatagctgggttctcaggtagcactatgtataatgtttgaggtactagactgattccatagtggtgcacc
agcttgcaatcccaccaacagatattcgaaatcctttagttatcagggaatacaaatcaaaactactctgaga
ttccacctcacaccagtaagaatggctaagataaaaaactcaggtgacagcagatgctggcgaggatgtgg
agaaacagcaaacactcttctattgttggtg

-M344

cagtaattaatatttattcagtcctcctggaccaattggcatcttctatattttgtttgaatttttgggtgggctaatt
tgtattttgtattgccatagtagtccacacagcagaaatctatttgtgttggggaggggtaacaactttttttta
ttattaacttgagtatttcttatt

-M346

gagaggcaagcgcaggaaccaagcaacagaaaccaagactacatgccatcatcggagcccaatttctcc
caccaaaacaacatggaatatccaacacaccagaaaagcaagatctagtttcaaaatcatatttgatcat
gatgctggaggacttcaagaaagacatgaacacacttagggaaacgcaggaaaacattaataaacaagta
gaagcctacagagaggaatagcaaaaatcctgaaagaattccaggaaaacacaatcaaacagttgaag
gaattaaaaatggaaatagaagcaatcaagaaagaacacatggaaacaacctggatatagaaaaaca
agaagagacaaggacctgtagatacaagcttccaacagaaatacaagagatggaagagagaatctca
ggagcagaagattccatagaaatcattgactcaactgtcaaagaaaatgtaaagcggaaaaagctactggg
ccaaaacatacaggaaatccaggactcaatgagaagatcaaacctaaggataataggatagaagagagt
g

-M353

attaaaaaatgattttgtgaaattcatagacaaatggatagaactaaaaatcatcctaagtgagataac
ccattcaciaaataccacacatgatatgacccactgacaaatacagaggtggatgctaacagtcaaccatt
gaactgagaacaggggtccccaatagaggagtagagaaagacctgaaggagctgaaggagtttgaacc
ataggaagaacaacaataccaaccaaccagaacccccagagtcccagagactaaaccactctttcaaaa
atacacatggagggacctttggctccagtcacatttgaacaaaggatggctttgccgggcatcaatgggaga
agaagcccttggcttctgcaaggcttgatgccccagtgtaagaaatggtcaggggtggggagggg

-M358

ggctcctgcatttgaaggagttatctgctctgcagagaagtcattcataccatcccatacacacatcacacat
ctacttcacctcaactcaaaccactccttcaaagtatacctccatcttgccttgcaccatgaatcagtgtagaca
gccgattcatgttctttgcttactgaactgcaactgcacattggccagtgacatgagcaagaactcataagaatg
aatagcctgtggaatcaattcacgacatgaaggtataatgggatattgatgttttgcaattttataactataag
attgtaatagaattttagcatatagtaaattgacgtgtgtgccatccccctctctaaagtaggcattaaatgttg
cctcactgtgagtgatcttccctgttcttagagattccctactgggtgagattgataaatacagacagtgtagg
ctccagtgtagcacagatgtcagaacagagctt

-M360

caaatttacctactctcaactcctgtacaatgttcaagtcgaagtgatcaagaacctccatataaaaccagac

atgctgaatataatagaagagaccgtgggaaagagcctcaaacacattggcacaggggaaaatttctgact
agaatgccaatggcttatgttctaaaaatcaccattcgacaaatgggacctataaaattgaaaagtatctgtacg
gcaaaggcttaatcattaggagaaaatggcaatccagagattgggaaaagatctctactgatcctacattga
tagagagctaatataaaaaatacacaatacagaagttagtctccaaaaatccaaaaacaatattttcaa
acgggttacagagctaaacaaagaattctcaactaaggagccttgaatggatgagaagcactaaagaagt
gttcaacatccttctctcaggggaagtgtaaatcaaatgacctcacaatccacagcacagcaatgactaa
gatcaaaaccacaggtgacaggaaatgctggcaaggatgtggagaaagagcaacactcttctactgctgg
agaactgcaagctgtaaaatcacttagaaatcaattcagtgcttctcgaaaattaaatagtctacatg
aacactagctatacactactagacataaatccccaagatgtccaacatataacgaggccccatgctccctta
tgtttataaagcctt

-M362

ggaatggtgtatcaatgcctcttttctgaaactcatcatttttggagggtcggggctgttgaagctaaggctca
cgcacattcaggcaacagatgtaccaaggagctgtcttctgccttctactttgagatgggacctcactatgcc
cagtggtgccttc

-M363

ataaaaaataaagttgatggcggccaatacctgggcagagacacagaggtaggactttaggattcttgacta
gggaaccagaaaggaaggaatttttaggactaccatgtctggaaaggagatgccagtcctgagagctata
gaagagagaatagagcaatcatataagaccaggatcatggctcaggaggactaaatataatgggaacag
ggcagccaagatggattataggtgtaataagcaagaattcaggaatagcagaggggagagtgtgctagcc
acatgcaggttggatggcccagtcattgagttgtaatacatattaaatagagggctgcttgtgtgtctttc
atttgggaatccagaacattgatggaggcagcaaggaatgtgtgccaacaactccagggcaattgagcagg
ataatctccagtgcaacatgtaaccatacataaagatgtagtcccacctcaattacctcattagataatcattc
acagacaagtacagatactaggctcatttgtgatgctagaactatcatgatgacaatactagccagctactgag
aacctaactcttagtatttag

-M364

attcacatgtacatgctccactcgcaagtatgtgtcaaacaggaatatgaatgcagataaggtgtacacac
acacacacacacacagtcctcagtcacacctgccagctgctgtttactccaacaattctattctttaagcc
aggcttctcccaggagaccacgcagctgagatgtctgatgacagaagggtgaaagcaaagaggaaga
gaggtgatgaatcattacataaacattc

-M365

tgaccaacatttccaatcagacaccacttgctagatcctatcctgacagtgctattaaattggcctggcaattgc
ttctttgacaaagaagttctccttaccatcttctcagaagccccagctctaagtgtgcttgggaaccagct
ttcagccaatgagacctttcacatctaggctccttgtgcttttgactg

-M367

gtgcccaggagtatccactgtagcgtgtactgtgtttgtgtagttggcatcctgaagagggtagccgtacctcgc
agccctcctgtagttcagatagaataatagaaggattcgtgctttcattcacatgtgtagtgacgacagtggtt
acagactggaaagacagaggagcaggagtgtgcttggatctttaggcagagataatgacggaatccaca
caactacctgagaagggaacactggagtcagcatcagctgtacacgtgctgcccgtcggcctttaggcctta
cactttctagtcaggagaccgagagtgaagtctctgctgtcgtttaatgctctgtgatttgggttacagttaacc
at

-M375

tgacgtttaccaaccagttccctgtcctctgtgtttctctccttaaggagataactggatttgtactttactgtctat
taacagaatgtgttttggatcctgccactactaacagatcagaaggatttaaggctgctggaatccacttgaa
gatttaattctgctgactcagcttgggtctgaagtaaaaaatcaaccatagataaatgttttagcatcgtacattg

taattggcgctcctggtcataaatactcacgtctatctgtttcagacagcttccataggttctccccagtgct
cacacaatgctggcttcccagatgaggtatcttctatgaggctacccttatataactcttttatagactgagccc
ccacgctgtgtgcaattcattataagctcccgtacactcactgatcacaacaca

-M379

ggagctggaagaatagaccagagattaaaattctggcagattttacagaggatctggatctctcccagaactc
acatgtcagctcacaagaattcttacctctattccaggaaatcctatccctactctgtctgacatctgtctccaa
aaaaatacagcaaacatggcagtcatagatattaaataaataagtataaaaatcagtttacgaaatttaactga
caaaaagtcatatgggtgcagttcgaacagggtccagataagttgactcgtattcaaaagtaactttctgtttctg
ttttgtttatttttaactcagagactattgtttccatagagttaaatcatctcttacacataaacacagcacacaca
cacatacatt
cacatagagaggggtgtggggttaactatgaaaatcaaagaaaacaacctgtaaacttaagagtttaccaa
ttgagttattagtaggtgggggtgaatgaatggagagttactgtgatgatagtaagataagctgggaatgga
ggagaaatggagggagtaatgtgatataattctatttcattaaaaaaaatactgaaaaatacaaaaaataaa
aacgtgtctaacctttcacaagttatacaagaaatactgacataatattaggtatagatgattaatcaaaactca
tattatatacaataacatgctatatttat

-M382

gtgtgctttcaatatgtaacaacatttaaggaacggactctaagtatcatggtnaattcagtaggttccaatg
ggattcgcagtaataagcttgttattcaagatagagcagcngtttaaggaacggaaactgtttctctgtgaa
ttcnttactcccagtagcaggctctgttaatatgctgacttctaagatttatcaaaatgggtgtccgaatctgag
taacatggtgaattcggtagttcccaataggccgcagtagtaantaantggactgtcgggatanaaaaaant
cccgantggaatcnnnttctnggtgaatcagtgagntcccantgg

-M384

actctattttaaaaacgttatattttatttatatgaacacactgcagctgtcttcagacacaccaagaggggtgtg
gatcccactacaagtgggtctgagccaccatgtggttgctaggattgaaactcaggacctctggaagagcagtc
agcactcttaactgctgagccatctctccagccccctaggctacactgaaactcaggattctctgcctcagctc
ctaagtgtgtaaacaccacctctggctcaaagatgactttaangnaataaattttatttttangganttgatt
atgaaagtaattcncactagaacagattcncatctgctgctattttttaantgggnttcnagtgatcaancctt
aagttgtccngaagaccnagggctnnaacaaccanagggnacntgtggncaaaagnggnccnc
ccccggnncgggactgtaacctgncgtgctcangcngnaatgganncnanggcaaaccccc

-M386

gatcttagagcgtgaagccattggngttttgttaggaaatcttccagtgcccatgtgtccagatgcttccctagtt
ttcttctattagctaaagtgtgctggttgatgtggaggctctgatccactggactaccaacttgcaattct

-M390

gtggaagatggtgggactttgggctaggaaagtgatggatgctgtaatcagggtcactgagccaccctagt
gggatctggaagtcaatagtctgagagcaatgtaggtctggaggcccagctcaagagattacataggggg
accatattagccattgagctagaggcaattctataatatttggaatgtatctgggggtttttttttttttttgccc
cttatcatcggaaatctgtctgatgctaaattgaaatcctgtaactgggaaagaanaaaaggggtgagagatttt
cctgttctaaaagcnagaaatcnaagggcgaattccngccccctggcggccgttantantggatccnagctcg
gtcccagcttgatgcaaacctngtantcatagtgccctaatactgccaactggccnacngtctctggngaa
atgtaccctccantccncaaacaccccgagcnaaan

-M392

caactgttctgtgctgatattgaagagaantccttttcatcctcccaatgttgggtcctgcttccctccctgcc
aacacgagtgccatgattctcccctgtgacgtcatcaaccttactggtcaatcattggtttctgactggagta
ggcagaagaatgaaaagcacaaccagctccttgggatctatccagtcaggaanttgcaatattatgtggg

agaaagcagagtaggagaggcaagctgtgtgttgctggctccactataaaaaagccagtatctagcattcat
ctatatgtgcagtaaactatgtatgtgtaaaatacatgattttaaccatnttaangtttacctccagtgccattaaat
attcagggttgcttgacacantcctccnacctccataaacntctgncccngtaaccactctccnttcctcccgg
ntatgcccctccag

-M393

aaaataaatctctccttttgctgttcacagattgggtcacagcaatgaggttaacaaaataattcaggttcctggg
ctttcatcactccantaggagatccatggcttcaccttngnacgctcatgtangcttngctgngtgcntgcann
cagtaacgcaaanantnagacaaagnntacggananccnacaacaangaccgatcncnggaaa
tangncccacaacac

-M400

agaagaggaagtcagaggcctggagctggagtgcccgngctttgagccaccagagaactcaggtct
cctgaaagagcagctcaggcttaactgctgagcccctcngttcagnttttaattcccattccctcnatnanaaa
cgaccctgccntgttctattgncnggatctttcncggttnttntacntta

-M401

tttgcaatagctttctgacaaaaataagtatttagaataatagagaaactccatttgggataagaagttttgcct
gaaaaagaaaaagaaattatcagtttattataactgggttctatatttttgtaagcaaaaaatattgtagtta
attaagacaatgcactaaattacagcattctaacaacagaccagggcatggcatgacagctgccaggatct
tgaaagagagcgccattataacaattgatagctaaggacctgcccagccagcagaatctatagcccaaac
aagtaantatgactcaaaggacagaactttctttcccagtgaaagatcttgaaagt

16. Apéndice 3: Publicaciones

- Hernández-Hernández A., Rincón-Arano H., Recillas-Targa F., Ortiz R., Valdes-Quezada C., Echeverría O.M., Benavente R. and Vázquez-Nin GH. 2008. Differential distribution and association of repeat DNA sequences in the lateral element of the synaptonemal complex in rat spermatocytes. *Chromosoma* 117:77-87
- Hernandez-Hernandez A., Vázquez-Nin GH., Echeverría OM. and Recillas-Targa F. 2008b. Chromatin structure contribution to the synaptonemal complex formation. *Cell Mol. Life Sci.* In press.
- Hernández-Hernández A., Ortiz R., Ubaldo E., Echeverría Martínez OM., Vazquez-Nin G. and Recillas-Targa F. 2008. Synaptonemal complex stability depends on repressive histone marks of the lateral element associated repeat sequences. *PLOS Genetics*. Submitted

Differential distribution and association of repeat DNA sequences in the lateral element of the synaptonemal complex in rat spermatocytes

Abrahan Hernández-Hernández ·
Héctor Rincón-Arano · Félix Recillas-Targa ·
Rosario Ortiz · Christian Valdes-Quezada ·
Olga M. Echeverría · Ricardo Benavente ·
Gerardo H. Vázquez-Nin

Received: 14 June 2007 / Revised: 22 September 2007 / Accepted: 28 September 2007 / Published online: 30 October 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract The synaptonemal complex (SC) is an evolutionarily conserved structure that mediates synapsis of homologous chromosomes during meiotic prophase I. Previous studies have established that the chromatin of homologous chromosomes is organized in loops that are attached to the lateral elements (LEs) of the SC. The

characterization of the genomic sequences associated with LEs of the SC represents an important step toward understanding meiotic chromosome organization and function. To isolate these genomic sequences, we performed chromatin immunoprecipitation assays in rat spermatocytes using an antibody against SYCP3, a major structural component of the LEs of the SC. Our results demonstrated the reproducible and exclusive isolation of repeat deoxyribonucleic acid (DNA) sequences, in particular long interspersed elements, short interspersed elements, long terminal direct repeats, satellite, and simple repeats. The association of these repeat sequences to the LEs of the SC was confirmed by *in situ* hybridization of meiotic nuclei shown by both light and electron microscopy. Signals were also detected over the chromatin surrounding SCs and in small loops protruding from the lateral elements into the SC central region. We propose that genomic repeat DNA sequences play a key role in anchoring the chromosome to the protein scaffold of the SC.

Communicated by T. Hassold

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00412-007-0128-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Hernández-Hernández · R. Ortiz · O. M. Echeverría ·
G. H. Vázquez-Nin (✉)
Laboratorio de Microscopía Electrónica,
Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),
México, DF C.P. 04510, México
e-mail: ghvn@hp.fciencias.unam.mx

A. Hernández-Hernández · H. Rincón-Arano ·
F. Recillas-Targa · C. Valdes-Quezada
Instituto de Fisiología Celular,
Departamento de Genética Molecular,
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),
México, DF C.P. 04510, México

R. Benavente
Department of Cell and Developmental Biology, Biocenter,
University of Würzburg,
97074 Würzburg, Germany

Present address:
H. Rincón-Arano
Division of Basic Sciences,
Fred Hutchinson Cancer Research Center,
Seattle, WA 98109, USA

Introduction

The synaptonemal complex (SC) is an evolutionarily conserved meiosis-specific structure that contributes to homologous chromosome synapsis, meiotic recombination, and proper chromosome segregation (for reviews, see Moses 1968; Sotelo 1969; Moens 1994; Maguire 1995; Kleckner 1996). The SC shows a characteristic tripartite organization, composed of a central region (CR) and two lateral elements (LEs). The CR is made up of the core element and the transverse filaments, which run perpendicular

to the core element. This central component bridges the space between LEs and holds the homologous chromosomes together (Page and Hawley 2004). The major protein components of mammalian SC are the LE proteins SYCP2 and SYCP3 (Lammers et al. 1994; Dobson et al. 1994; Offenberg et al. 1998) as well as the following proteins, SYCP1, SYCE1, SYCE2 and TXE12, which are associated with the CR (Meuwissen et al. 1992; Costa et al. 2005; Hamer et al. 2006).

The chromatin of the homologous chromosomes is organized in loops surrounding the SC, and it has been suggested that the LEs provide attachment sites for those chromatin loops (Rattner et al. 1980). Previous electron microscopy studies have shown that SCs also contain deoxyribonucleic acid (DNA) and that most of the SC-associated DNA is located in the LEs. The CR of the SC is mainly devoid of DNA. However, there are some exceptions where the recombination nodules as well as small noncharacterized loops protrude from the LEs into the CR (Vázquez-Nin and Echeverría 1976; Vázquez-Nin et al. 1993; Ortiz et al. 2002). Previous biochemical studies have shown that SC-associated DNA sequences correspond to GT/CA repeats, short interspersed elements (SINEs), and long interspersed elements (LINEs, Karpova et al. 1989, 1995; Pearlman et al. 1992). Furthermore, based on *in silico* studies, it has been proposed that DNA, which is highly repeated in the genome (such as *Alu* repeat sequences), may be anchoring the chromosomes to the LEs of the SC (Dadashev et al. 2005). However, the specific identity of genomic DNA associated with the LEs has not been characterized.

To understand the role of LE-associated DNA sequences, we performed a detailed characterization and cytolocalization of these sequences. To this end, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays in rat pachytene cells using an antibody against the SYCP3 protein, which is a major structural component of the LEs. This yielded a large set of genomic sequences. Sequence analysis of the DNA and *in situ* hybridization demonstrated a specific enrichment of different types of repeat sequences in the LEs of the SC. Our results suggest that repeated genomic sequences participate in the SC conformation and most likely are involved in recombination events.

Materials and methods

Chromatin immunoprecipitation

In the present study, we used testes of 22-day-old Wistar rats. There is an enrichment of pachytene-stage spermatocytes in this tissue. To isolate germ cells, seminiferous tubules were excised and digested in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.01% trypsin (GIBCO) for 15 min

at 37°C. After digestion, cells were pelleted and resuspended in Dulbecco minimal essential medium supplemented with 2% fetal bovine serum, to inhibit trypsin. The ChIP assay was performed as previously described (Weinmann et al. 2002; Rincón-Arano et al. 2007). The following antibodies were used: SYCP3 antibody (Alsheimer and Benavente 1996), which we purified using high-affinity columns, anti-Z-DNA (Abcam), anti-RNA polymerase II (COVANCE), and a mock IP using normal IgG. Immunoprecipitated DNA was purified by the MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN) and eluted in 50 μ l and 1 μ l was used for each polymerase chain reaction (PCR) reaction. For duplex PCRs, 25-mer primers were designed to amplify the representative repeat sequences and a coding sequence (Table 1). The final concentration of each primer was chosen to achieve amplification products of almost similar intensity when the whole genome is used as a template (input chromatin; Supplementary Fig. 1). The amplified fragments were electrophoretically separated in a 6% acrylamide gel, digitally imaged using a phosphorimager (Typhoon scanner 8600), and the ImageQuant program was used for quantification of PCR bands.

DNA cloning

DNA samples obtained from ChIPs using anti-SYCP3, anti-RNA polymerase II, and anti-Z-DNA antibodies were treated with 0.1 U of Mung Bean nuclease/volume sample (New England BioLabs) to remove the remaining single strands. The DNA was then ligated into the pCR-Blunt II-TOPO cloning vector (Invitrogen). Positive clones were isolated, purified, and sequenced.

Sequence analysis

All the isolated sequences were designated “M” and numbered as they were sequenced and are available on request. The general features of the isolated sequences were analyzed using the BLAT program from University of California Santa Cruz Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>), BLAST program from the National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), and the Repeat Masking program (www.repeatmasker.org/). For the search of a high-scoring segment pair (HSP), BLASTN analysis was performed on a database, which was generated from the 100 identified sequences (Bedell et al. 2003). The database was formatted to create the alignment matrix using nine- and six-word size, respectively. The BLASTN program was run comparing the 100 independent sequences among themselves, and the HSP were analyzed. The ClustalW program was used to search for putative consensus sequences (Chenna et al. 2003).

Immunolocalization and fluorescent in situ hybridization

Rat seminiferous tubules were fixed in acetone at -20°C for 10 min, included in Jung Tissue Freezing medium (Leica Instruments), frozen, and sectioned in a cryostat at -14°C . Sections were mounted on slides covered with poly-L-lysine (SIGMA). For immunolocalization, samples were blocked with Tris-buffered saline (0.01 M Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl, 3 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 5 mM sodium butyrate pH 8.0) for 30 min then incubated with the anti-SYCP3 antibody (1/100 in PBS) at 4°C overnight. The next day, slides were washed in PBS-Tween 0.05% (PBST) and incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-Guinea pig (Jackson ImmunoResearch) secondary antibody (1/100 in PBS) for 1 h at room temperature in the dark. All of the following steps were carried out in the dark. Slides were washed once with PBST and then with PBS. The secondary fixation was performed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature, and sections were washed with PBS. For in situ hybridization, the endogenous peroxidase was quenched with 3% H_2O_2 in PBS for 15 min at room temperature and washed twice with PBS. RNase treatment was performed by incubating the samples with RNase A (SIGMA) in $2\times$ sodium chloride-sodium citrate (SSC) for 1 h at 37°C in a humid chamber and washing three times with $2\times$ SSC. The DNA was denatured with a NaOH solution (pH 12) for 2 min (Brown 2002), and the NaOH was then neutralized by washing the slides three times with cold PBS. The representative DNA probes (LINE-M8, SINE-M9, and small cytoplasmic ribonucleic acid [ScRNA] repeat sequences, respectively) were placed on the sections, and the hybridization was carried out at 65°C overnight under a coverslip in a humid chamber. The probe had been

previously labeled with biotin (Bio Nick Labeling System, GIBCO BRL) and denatured at 75°C for 5 min just before hybridization. The next day, the coverslip was removed, and slides were by washed in $2\times$ SSC for 10 min at 45°C . Two cycles of signal amplification were performed using the TSA Biotin System (Perkin Elmer). The slides were then incubated for 30 min at room temperature with Texas Red coupled to Streptavidin (Perkin Elmer; 1/400 in PBS) and counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The slides were rinsed with PBST, mounted using Vectashield mounting medium (VECTOR) and analyzed by epifluorescence and optical sectioning in an Apotome microscope (Carl Zeiss) and by a laser scanning microscope (Olympus).

Ultrastructural in situ hybridization

Small fragments of rat testis were fixed in 4% paraformaldehyde for 1 h, rinsed with PBS, dehydrated, and Lowicryl K4M embedded. The polymerization was performed using UV light for 24 h at 4°C . The resin blocks were cut with a Leica ultra microtome (Leica Instruments). The sections were collected on formvar-coated 200-mesh nickel grids, treated with RNase at 37°C for 1 h, and rinsed twice with $2\times$ SSC. The DNA was denatured with NaOH (pH 12) for 30 min, and then the grids were washed three times with cold PBS. The representative biotinylated DNA probe (LINE-M8) was placed on the grids, and the hybridization was carried out at 40°C overnight in a humid chamber. For probe detection, the grids were incubated with streptavidin coupled to 10-nm colloidal gold particles (SIGMA) for 30 min at 37°C . The grids were contrasted with uranyl acetate for 10 min and with lead citrate for 5 min and then observed in a JEOL 1010 transmission electron microscope (JEOL).

Table 1 Oligonucleotidic sequences and primer concentrations for duplex PCR's

Amplification product	Primer sequence	Size (bp)	Concentration for duplex PCRs (pmol)
LINE-M44 sequence (Family L1)	L1: 5'-3', GGCTAGAAAACAATTTAAAGGAATC L1rev: 5'-3', GGCTCACCATTTGATACTACATAAC	108	1.5
SINE-M9 sequence (Family <i>Alu</i>)	S1: 5'-3', GCAATGGTGGTGCATGCCTTTAATC S1rev: 5'-3', CAAGGATTCTCTATGTAGCTCTGGT	119	2.5
LTR-M157 sequence	LTR: 5'-3', CCCTTAACCAAATGAGCATGAGTCA LTRrev: 5'-3', GGGAGGACATGTGATATTGGAGAGA	210	2.5
Satellite-M68 sequence	Sat: 5'-3', GGGACATGCTTGTATGAGTTTGCTT Satrev: 5'-3', GGGAACTACTGAATTCACCATGAT	89	0.5
Rat Actin (intron-exon2 and intron-exon3)	Act: 5'-3', GGCCCTGTGTTCACTTTGTATTTTCG Actrev: 5'-3', CCATCACTAGCCACTTCTGCTTCCTC	353	3.5 (with LINE and LTR primers) 2.5 (with SINE primers) 4.5 (with Satellite primers)
ScRNA (Small Cytoplasmic RNA)	ScRNA: 5'-3', GGGGTTGGGGATTAGCTCA ScRNArev: 5'-3', CCGGAGCTGGGGACCGAACC	93	

Table 2 Repeat sequences associated with SYCP3, classification (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001) and distribution in rat genome databases

Repeat sequences Class and family	Frequency on SYCP3-IP chromatin ($n=100$)	Size range (bp)	Distribution on rat genome
Transposon-derived repeats			
LINE (family L1)	39	94–801	Broadly distributed, intergenic
SINE (family <i>Alu</i>)	8	67–816	Broadly distributed, intergenic and intronic
(family ID)	1	299	Broadly distributed, intergenic and intronic
(family MIR)	4	308–618	Broadly distributed, intergenic and intronic
(family B1-B4)	7	199–790	Broadly distributed, intergenic and intronic
LTR	22	82–835	Broadly distributed, intergenic
DNA transposons	6	79–785	Middle distribution
Simple sequences repeats (SSRs)			
Satellite	3	81–353	Centromeric and sub-telomeric distribution
Simple repeat	10	226–834	Middle distribution

Results

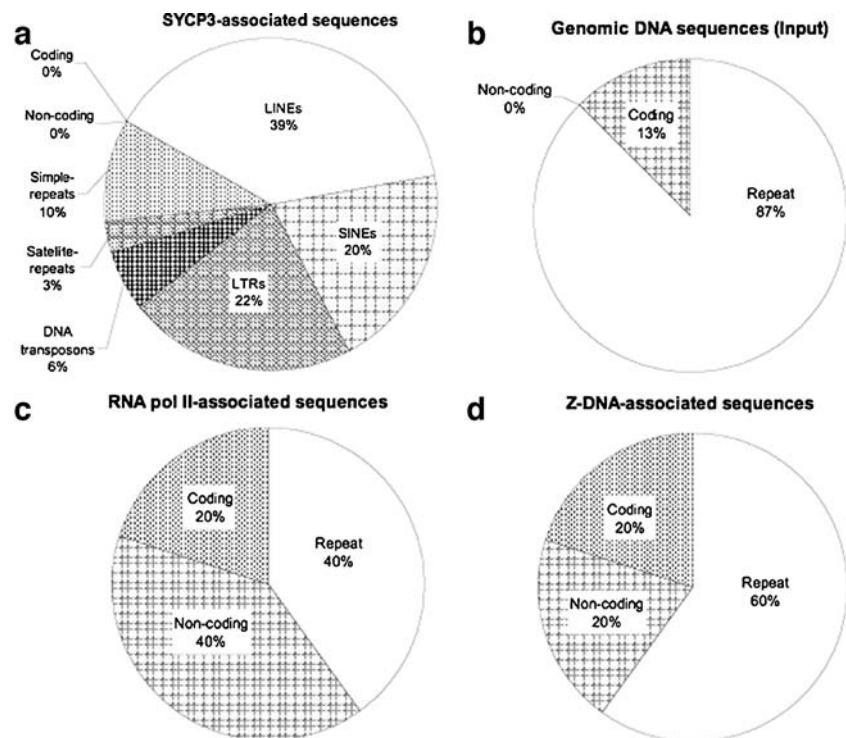
Isolation and characterization of SC-associated DNA sequences

Previous biochemical studies isolated a small subset of repeat DNA sequences associated with the SC (Pearlman et al. 1992). In addition, our group described the presence of DNA within the LEs of the SC (Vázquez-Nin et al. 1993; Ortiz et al. 2002). These observations suggest that a particular subtype of genomic sequences interacts with

highly specific components of the SC. The systematic characterization of such sequences would allow a better understanding of the organization of meiotic chromosomes.

To analyze the DNA associated with the LEs of the SC, we performed ChIP assay on rat spermatocytes using an anti-SYCP3 antibody. The immunoprecipitated DNA fragments were cloned, sequenced, and analyzed using bioinformatics programs and web-based databases. We found that the 100 independent resulting sequences correspond exclusively to different types of the repeat sequences present in eukaryotic genomes (International Human Genome

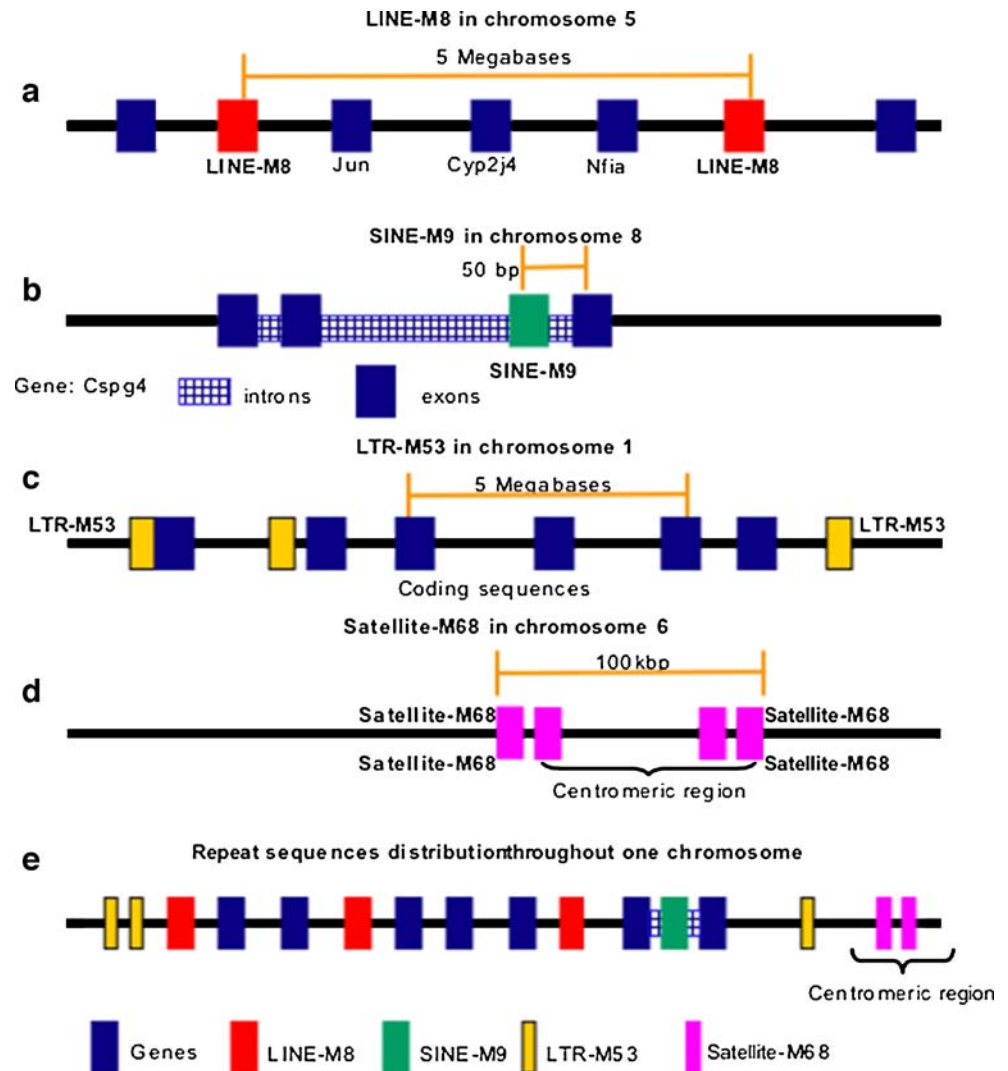
Fig. 1 Graphics showing the profile of the isolated sequences by ChIP. **a** Percentages of DNA sequences immunoprecipitated with anti-SYCP3. Coding sequences were absent (0%). **b** Percentages of DNA sequences from genomic DNA (*input chromatin*). **c** Percentages of DNA sequences immunoprecipitated with anti-RNA polymerase II. **d** Percentages of DNA sequences immunoprecipitated using anti-Z-DNA



Sequencing Consortium 2001). Most of these sequences correspond to transposon-derived repeats: 39 LINES, 20 SINEs, 22 long terminal direct repeats (LTRs), and 6 DNA transposons. The simple sequence repeats class is also represented, with three satellite repeats and ten simple repeats (Table 2). Notably, in a sample of 100 independent isolated sequences we were unable to identify a single coding sequence (Fig. 1a). Database searches revealed that the identified LINE, SINE, and LTR sequences are broadly distributed throughout the rat genome, while the satellite sequences are confined to centromeric and subtelomeric regions; alternatively, simple repeats are under-represented in the rat genome (Table 2). In agreement with our findings, two simple repeat sequences identified in our study (M2 and M3) were previously reported to be associated with the SC (Pearlman et al. 1992). The distribution of identified LINE sequences reveals that the great majority of those sequences are located on intergenic genomic regions, frequently flanking coding sequences in the rat genome.

As a representative example, the isolated LINE-M8 sequence is found in several locations all along chromosome V. It is interesting to note that LINE-M8 repeats are distributed on each side of a cluster of three genes encompassing a 5-Mb genomic region (Fig. 2a). If the two matches with LINE-M8 repeats correspond to anchorage points, the 5-Mb genomic region would represent a single chromatin loop surrounding the SC. Moreover, the identified SINE sequences are distributed along intergenic and intronic genomic sequences in the whole rat genome. For instance, one match with the identified SINE-M9 sequence is located in the intron of the chondroitin sulfate proteoglycan 4 gene on chromosome 8 (Fig. 2b), indicating that the anchorage point may be located in introns as well. The isolated LTR sequences are distributed over intergenic regions in the rat genome, and matches corresponding to the LTR-M53 sequence are found near coding regions (Fig. 2c). As predicted, satellite repeats sequences are confined to centromeric and subtelomeric domains of all

Fig. 2 Schemes showing representative location of the repeat sequences. **a** Matches of the LINE-M8 sequence are located in intergenic and flanking coding regions, as in chromosome 5, where repeat sequences are flanking a 5-Mb coding region composed of three known rat genes. **b** Matches of the isolated SINE-M9 sequence are located in intergenic and intronic regions. One match shows the SINE-M9 sequence located in an intron of the chondroitin sulfate proteoglycan 4 gene. **c** Matches of the identified LTR-M53 sequence are found in intergenic regions flanking coding sequences. **d** The identified matches of the Satellite-M68 are confined to centromeric and subtelomeric domains. **e** Scheme showing the distribution of the isolated repeat sequences along a chromosome



chromosomes, as we observed on chromosome 6 (Fig. 2d). Figure 2e depicts the location of the identified repeat sequences throughout a chromosome and demonstrates a broad distribution of the repeat sequences along the chromosome. These widespread distributions of repeat sequences may represent multiple anchorage sites throughout the entire chromosomes to the SC.

Chromatin immunoprecipitation assay corroboration

The repeat DNA sequences comprise 44% of rodent genomes (Martens et al. 2005); thus, a bias produced by their high abundance is possible. To verify the specificity of the ChIP assay, we sequenced DNA fragments from the input chromatin (genomic DNA), from the immunoprecipitations with anti-RNA polymerase II and with Z-DNA antibodies, which is able to detect DNA after it has been transcribed (Cerna et al. 2004). The genomic DNA obtained in these immunoprecipitations corresponds to 87% repeated

and 13% coding sequences (Fig. 1b). Meanwhile, from the bulk of RNA polymerase II-associated chromatin, we found 40% repeated, 40% noncoding, and 20% coding sequences (Fig. 1c). It is interesting that immunoprecipitations using the RNA polymerase II isolated not only coding sequences but also repeat sequences. This may occur because some repeats are transcribed or may simply be due to nonspecific immunoprecipitation. In contrast, when an antibody specific to SYCP3 is used, repeat sequences are exclusively recovered, and no coding sequences were isolated (Fig. 1a). This fact supports the specificity of our approach, and the highly frequent association of SYCP3 to repeat sequences as an important component of the LEs. Finally, from the Z-DNA-associated chromatin, 60% were repeated, 20% were noncoding, and 20% were coding sequences (Fig. 1d), indicating the transcription status of such sequences. With these corroboration tests, we confirmed once more that the enrichment of repeat sequences in the SYCP3-IP chromatin is due to the specificity of the SYCP3-repeat sequence

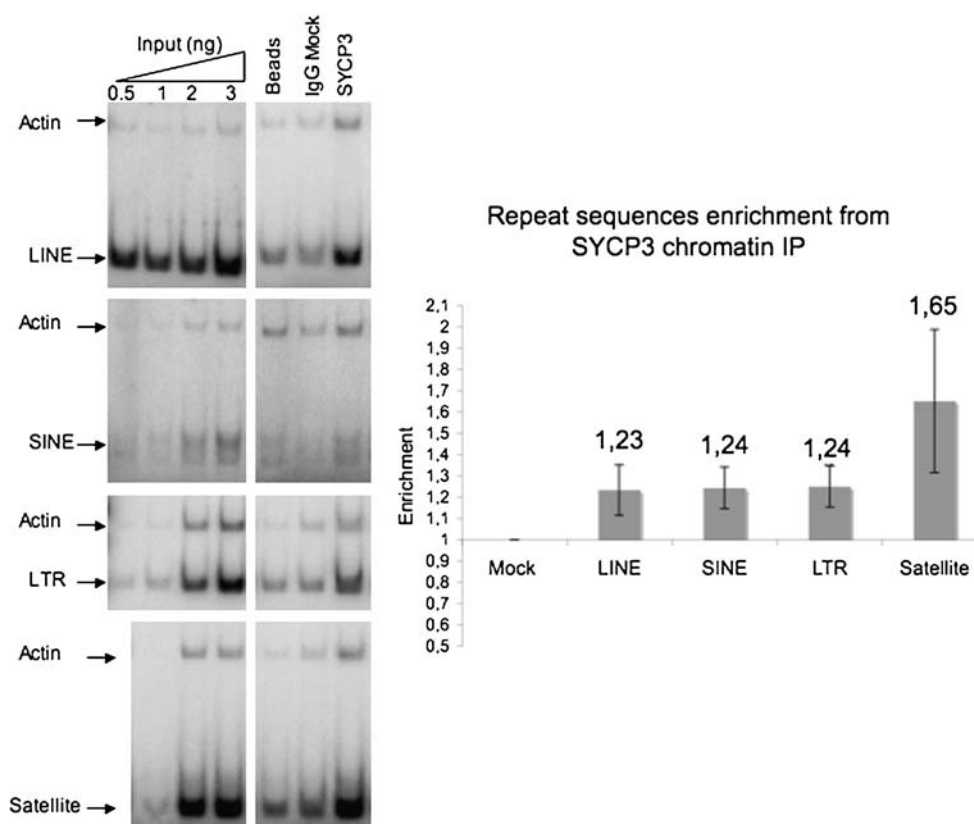


Fig. 3 Chromatin immunoprecipitation validation. Radioactive duplex PCRs and quantification. To obtain the linear range of amplification, duplex PCRs of repeat sequences (LINE, SINE, LTR, and satellite repeats), and coding sequence (Actin) were performed using increasing concentrations of genomic DNA (*Input*; gels on the left side of each repeat sequence panel, respectively). Duplex PCRs were then performed using the chromatin IPs with anti-SYCP3, anti-IgG (*Mock*), and with the immunoprecipitation reagent (*beads*). The

repeat/coding sequence ratio from SYCP3-bound fraction was standardized by dividing by the repeat/coding ratio from the IgG-bound material to determine enrichment of repeat sequences during the immunoprecipitation. Enrichment of the repeat sequence over the actin gene is determined to be greater than 1, which indicates no enrichment. Radioactive PCRs were done in triplicate, and three independent ChIP assays were performed. Standard errors are shown

interactions and not to a bias produced by the high percentage of these sequences in the rat genome (Martens et al. 2005).

To semiquantitatively evaluate the enrichment of repeat sequences compared to coding sequences in the immunoprecipitated chromatin (IP), we performed radioactive duplex PCRs. We designed the PCR reaction to obtain a one-to-one ratio between representative repeat sequences (LINE-M44, SINE-M9, LTR-M157, and Satellite-M68) and a coding sequence (Actin) using genomic DNA as a template

(Supplementary Fig. 1). Radioactive PCR was performed on templates from chromatin IPs using anti-SYCP3 and mock chromatin IPs using IgG. The amplification of representative repeat sequences was performed in the linear range of the PCR reaction. The ratio of products obtained with repeat and coding sequences was determined for SYCP3 and IgG antibodies, respectively (Fig. 3). We obtained a modest but reproducible enrichment of all the repeat sequences previously found (LINE, SINE, LTR, and satellite repeats) when SYCP3-IP chromatin was used as a

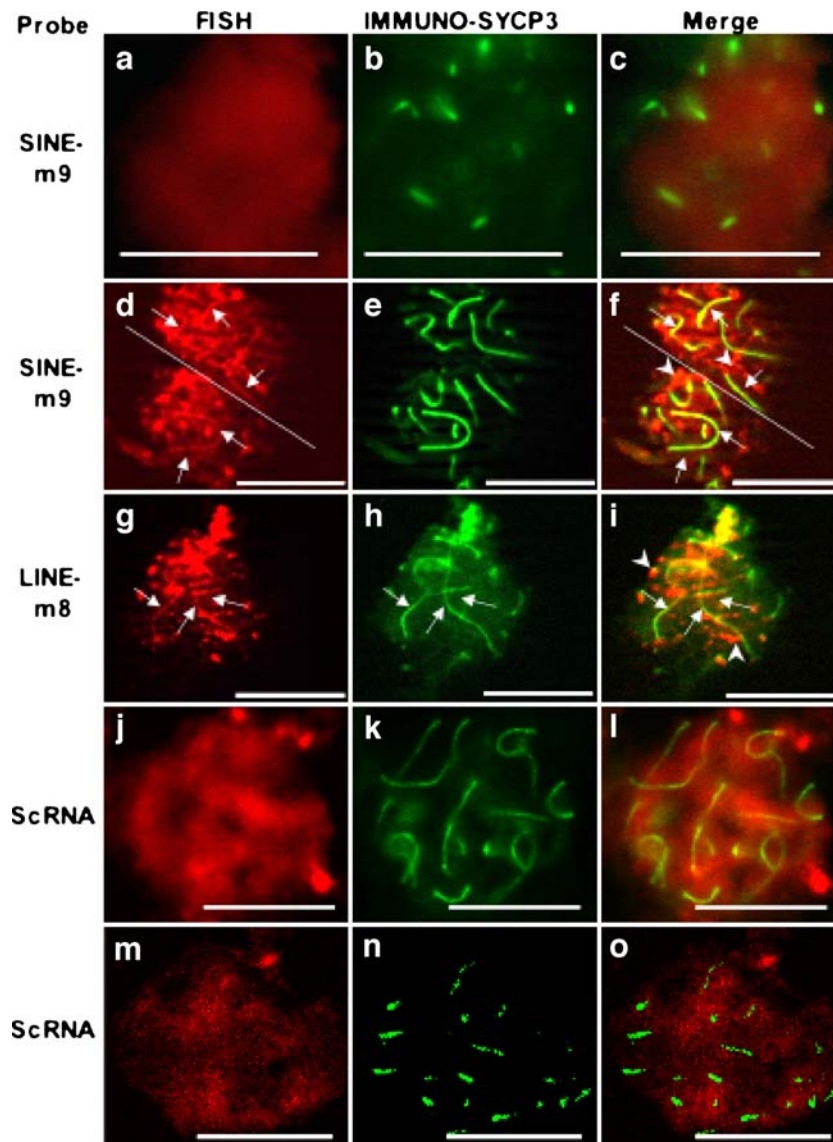


Fig. 4 Epifluorescent and optical sections of Immuno-FISH assays in rat pachytene cells. Probes for LINE, SINE and ScRNA sequences (LINE-M8, SINE-M9, and ScRNA) were used to detect the DNA repeat sequences (*red*). Synaptonemal complexes are labeled by anti-SYCP3 (*green*). **a–c** Epifluorescence of a prepachytene cell using SINE-M9 repeat as a probe. The signal is diffuse, and no thread-like structures are found. The SINE-M9 probe is associated with linear structures (*arrows* in **d**), which correspond to those labeled by SYCP3 (*arrows* in **e**). The *merge* shows that both signals colocalize (*arrows* in

f). **g–i** Sequence LINE-M8 is also localized to linear structures stained with anti-SYCP3 (*arrows* in **i**). Both SINE and LINE sequences are associated with the chromatin not in direct contact with the SC as demonstrated by the diffuse red fluorescence (*arrowheads* in **f**, **i**). **j–l** Epifluorescence analysis of ScRNA in pachytene cells: The signal is found surrounding the SC. **m–o** In an optical section of the FISH, using ScRNA as probe, no colocalization with SYCP3 is observed. *Bar* represents a 10 μ m scale

template (Fig. 3). This reproducible and constant enrichment confirms that repeat sequences are associated specifically with the SYCP3 protein.

Repeat DNA sequences are associated to the LEs of the SC

To survey the cytolocalization of the isolated repeat sequences, we performed fluorescence in situ hybridizations (FISH) coupled to SYCP3 immunolocalization (immuno-FISH; Fig. 4a–i). SYCP3 antibody was used for immuno-detection of the SC. We chose repeat sequences the SINE-M9 and LINE-M8 as representative and used them as probes for hybridizations. As a control probe, we incorporated the ScRNA repeat sequence (obtained from rat genome databases available at (www.genome.ucsc.edu/)). This sequence was not one of those recovered in our ChIP assays. Optical sectioning was performed (see “Materials and methods”). When LINE-M8 and SINE-M9 probes were used, the signal in meiotic cells localizes to thread-like structures in the majority of the pachytene nuclei (arrows in Fig. 4d,g). These structures correspond to the SC as confirmed by the anti-SYCP3 labeling (arrows in Fig. 4f,i). By contrast, the ScRNA probe does not colocalize with the SYCP3 signal (Fig. 4j–o). In prepachytene cells, where SYCP3 dots are discernible, SINE-M9 probe is diffusely observed, and no thread-like structures are evident (Fig. 4a–c).

No signal above background was detected when the empty vector is used as a probe (Fig. 5a–c). To eliminate the possibility of a leakage of green FITC emission into the red channel, we used SYCP3-FITC-labeled nuclei (with no M8 or M9 probe hybridization), and the images were captured in the red channel under the same exposure conditions as in immuno-FISH. We conclude that the hybridization signal of

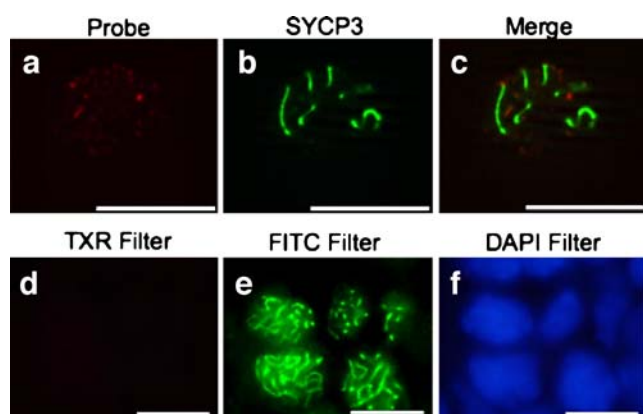


Fig. 5 Immunostaining controls. **a–c** As a negative control, the cloning vector was labeled and hybridized with the pachytene cells. **d–f** To discount a leakage of FITC emission into the red channel, an anti-SYCP3-FITC-labeled nucleus (which is not hybridized with LINE-M8 or SINE-M9) was visualized in the green and in the red channel. A picture was obtained in the red channel under the same exposure conditions as in **a–c**. No signal in the red channel could be detected. Bar represents a 10- μ m scale

the M8 and M9 probes is due to Texas red-coupled probes and not to a leakage of FITC fluorescence into the red channel (Fig. 5d–f). Furthermore, in the pachytene cells, the M8 and M9 probes hybridized throughout the surrounding chromatin of the SCs (arrowheads in Fig. 4f,i).

In summary, association of isolated repeat sequences LINE- M8 and SINE- M9 with LE is specific and not due the high frequency of these sequences in the rat genome. Moreover, in pre-pachytene stages the SINE-M9, did not form thread-like structures suggesting, that these sequences do not precede the SC formation. These results indicate that in pachytene cells, the repeat sequences are specifically recruited to the SC, but a portion of those repeats remained diffusely distributed throughout the nucleus.

Ultrastructural analysis of LE-associated repeat sequences

To further characterize these associations, we investigated the localization of repeat sequences among the components of the SC using ultrastructural in situ hybridization, using the LINE-M8 sequence as a probe. The hybridization signal was localized to the LEs of the SC (arrows in Fig. 6a–c). Components of the LE and the prominent signal are more

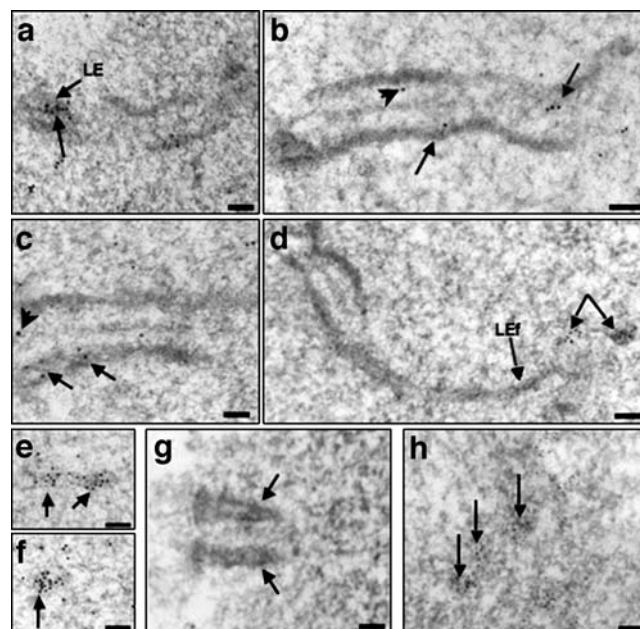


Fig. 6 Ultrastructural in situ hybridization. The LINE-M8 sequence coupled to 10-nm gold grains was used as a probe. **a–c** The signal is present on the LEs of the SC (arrows). Gold particles are also associated with filaments protruding into the central space (CE; arrowheads in **b** and **c**). **e, f** Transverse sections of the SC show that the lateral elements are densely labeled. Gold grains are present in the lateral element of the SC in the process of formation (arrows in **d**). **g** When the cloning vector was used as a probe, no hybridization signal was detected on the LEs of the SC. **h** The gold grains were also located in some heterochromatin clumps in prepachytene cells (arrows). Bar represents a 100 nm scale

prominent in cross-sections because of an increased accessibility of LE-associated DNA to the probes at the surface of tissue sections (Fig. 6e,f). Evidence demonstrating that these structures, contrasted with uranyl-lead, correspond to LE cross-sections of the SCs is presented in Supplementary Fig. 2. Together, these results support the view that repeat sequences are involved in chromatin anchoring to the SC. It is noteworthy that clusters of gold particles were also observed over less electro-dense structures that are in contact with the highly contrasted LEs at the sites on which SCs are formed during zygotene (arrows in Fig. 6d). Within SCs, gold particles are present over noncharacterized loops protruding from the LEs into the CR of the SC (arrowheads in Fig. 6b,c). We speculate that these repeat sequences might have functions other than anchoring the LEs. As expected, the signal of repeat sequences was also found in heterochromatin clumps (Fig. 6h; Martens et al. 2005). When the cloning vector was used as a probe, no signal was detected in the LEs of the SCs (Fig. 6g). Together, these results demonstrate the association of distinct types of repeat sequences to the LEs of the SC. We suggest that they are involved in the anchorage of the chromatin loops to the SC. Furthermore, the presence of repeat sequences in chromatin loops protruding toward the CR of the SC advocate a function in the meiotic recombination, which takes place in the recombination nodules (see “Discussion”).

Repeat sequences do not share a consensus sequence

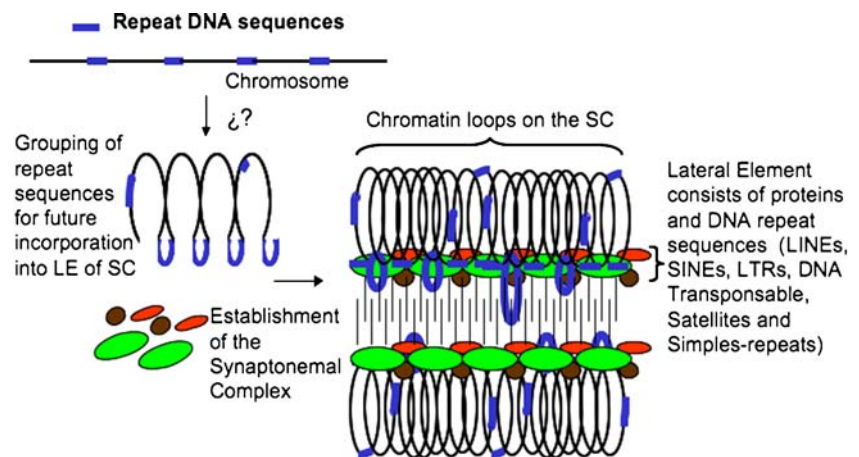
In an effort to elucidate the features of repeat sequences associated to the LE, the 100 isolated sequences were analyzed by means of BLASTN (Bedell et al. 2003) and ClustalW programs (Chenna et al. 2003). BLASTN did not find a HSP in either the leading strand or the lagging strand, only between the sequences of the same class of repeat element (i.e., LINE with LINE; data not shown). Further-

more, analysis with ClustalW confirmed that there are no consensus sequences or HSP that could be involved in the recruitment of the repeat sequences to the LE of the SC. In conclusion, we believe that the repeat sequences themselves associated with the LEs of the SC do not follow a primary sequence identity consensus. Instead, it seems reasonable to predict that their particular chromatin structure conformation represents a key aspect of these repeat sequences at the onset of SC formation (Dadashev et al. 2005; Peng and Karpen 2007).

Discussion

During the pachytene stage of meiotic prophase I, the chromatin of homologous chromosomes is anchored to the LEs of the SC. The requirements and mechanisms that govern chromosome attachment to the SC are unknown. Because LE-associated DNA is a good candidate for chromosome anchoring to the SC, we decided to isolate and characterize the associated genomic sequences. Using a ChIP assay with an antibody against the major LE protein SYCP3, we were able to isolate and characterize 100 independent DNA sequences. All the isolated sequences were repeat elements like LINE, SINE, LTR, satellite, and simple repeats. Remarkably, coding sequences were not immunoprecipitated with the SYCP3 antibody. Bioinformatic analysis revealed that repeat sequences have a widespread distribution throughout the whole genome (Fig. 2 and Table 2). Our in situ hybridization demonstrated that the isolated repeat sequences are present in the LEs. This is the first molecular and cytological systematic characterization of the association of repeat DNA sequences to the LE of the SC. These results strongly support that these repeat elements may play an important role in anchoring meiotic chromosomes to the SC during meiotic prophase I in rat pachytene cells.

Fig. 7 A model of the protein–DNA scaffold of the SC in pachytene rat spermatocytes. The repeat sequences (*blue lines*) are broadly distributed throughout the rat genome; some of these sequences are recruited to the lateral elements where they become associated with the structural proteins of these elements (*green, brown, and red circles*). Small loops of DNA containing these sequences protrude into the central space of the synaptonemal complex



As a first effort to address how repeat elements are attached to the LEs of SCs, we analyzed the isolated DNA sequences using the bioinformatics methods. No consensus sequences emerged from these analyses, which could suggest some functional property. The repeat element seems to share some characteristics in their chromatin organization, such as particular histone post-translational modifications (Kondo and Issa 2003; Martens et al. 2005; Peng and Karpen 2007). Thus, our experiments support the functional significance of repeat sequence association with the LEs of the SC in conferring specific chromatin conformations. Currently, we are interested in understanding whether precise histone post-translational modifications are needed for the association of repeat DNA to the LEs of the SC. There is evidence that certain protein components of the SC are likely to be involved in chromatin attachment. Sequence analysis of major SC proteins predicted that SYCP1 and SYCP2 but not SYCP3 contain putative DNA-binding motifs (Meuwissen et al. 1992; Lammers et al. 1994; Dobson et al. 1994; Offenberget al. 1998). Whether or not these proteins can specifically bind repeat DNA sequences such as those described here is currently unknown. Recent studies indicate that cohesins may also play an important role in chromatin anchoring (Revenkova et al. 2004). Mice lacking meiosis-specific cohesin SMC1 β appear to contain less chromatin in the LEs. They show an altered LE-to-loop ratio, with chromatin loops that are twice as long as those found in wild-type mice (Revenkova et al. 2004). It has been previously shown that cohesins can bind SYCP2, and this protein can bind SYCP3 (Pelttari et al. 2001; Eijpe et al. 2003); thus, the emerging picture points to a complex network of DNA–protein and protein–protein interactions mediating chromosome anchoring to the SC.

We propose a model for the protein–DNA scaffold formation at the SC (Fig. 7). In this model, the chromatin loops surrounding the SC are anchored to the LEs by means of short DNA loops, which are composed solely of DNA repeat sequences, such as LINE, SINE, LTR, satellite, and simple repeats. Some of these repeat sequences may protrude into the central space of the SC, with a predicted role in meiotic recombination. It is worth mentioning that not all the repeated sequences are associated with the LEs of the SC, although how certain repeat sequences are targeted to LEs and the kinetics of these associations remain a attractive topics of research.

Future studies are required to ascertain whether LE-associated repeat sequences possess a characteristic chromatin structure. Our study raises the question of whether the repeat elements described here are required, directly or indirectly, for recombination events. Several studies have shown that recombination hot spots are associated with repeat sequences such as *Alu* (i.e., a member of the SINE

elements), minisatellite (Jeffreys et al. 2004, 2005), and LTRs (Myers et al. 2005). The only correlation among most hot spots is their high G+C content (Gerton et al. 2000). It is interesting to note that others have described the presence of G+C rich regions in the LINE, SINE, LTR, and satellite repeat sequences (Scott et al. 1987; Meneveri et al. 1995). For this reason, we are interested in better understanding the role of distinct types of repeat sequences in meiotic-specific function and meiotic recombination.

Acknowledgments We thank Georgina Guerrero Avendaño for technical assistance. The authors thank Inti A. De La Rosa-Velázquez, Alexandre Neves, and Jessica Halow for constant discussions and critical reading of the manuscript. We thank L. Ongay, G Codiz, and M. Mora from Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), for DNA sequencing facility. We thank Gerardo Coello and Arturo Becerra for their advice in the bioinformatic analysis. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México, Grant 36450-N) and by Programa de Apoyo para la Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA, UNAM, Grant 211905). R. Benavente was supported by grant Be 1168/6-1 of Deutsche Forschungsgemeinschaft. F. Recillas-Targa was supported by CONACyT, México (Grants 42653-Q and 58767) and PAPIIT-DGAPA UNAM (Grants IX230104, IN209403, and IN214407). A. Hernández-Hernández and C. Valdes-Quezada are recipients of a fellowship from CONACyT and DGEP-UNAM, México.

References

- Alsheimer M, Benavente R (1996) Change of karyoskeleton during mammalian spermatogenesis: expression pattern of nuclear lamin C2 and its regulation. *Exp Cell Res* 228:181–188
- Bedell J, Korf I, Yandell M (2003) BLAST. O'Reilly, Sebastopol
- Brown K (2002) Visualizing nuclear proteins together with transcribed and inactive genes in structurally preserved cells. *Methods* 26:10–18
- Cerna A, Cuadrado A, Jouve N, Diaz de la Espina SM, de la Torre C (2004) Z-DNA, a new in situ marker for transcription. *Eur J Histochem* 48:49–56
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31:3497–3500
- Costa Y, Speed R, Öllinger R, Alsheimer M, Semple CA, Gautier P, Maratou K, Novak I, Hoog C, Benavente R, Cooke HJ (2005) Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *J Cell Sci* 118:2755–2762
- Dadashev SYa, Grishaeva TM, Bogdanov YuF (2005) In Silico identification and characterization of meiotic DNA: *AluJb* possibly participates in the attachment of chromatin loops to synaptonemal complex. *Russ J Genet* 41:1419–1424
- Dobson MJ, Pearlman RE, Karaiskakis A, Spyropoulos B, Moens PB (1994) Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J Cell Sci* 107:2749–2760
- Eijpe M, Offenberget al. H, Jessberger R, Revenkova E, Heyting C (2003) Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before SMC1 β and SMC3. *J Cell Biol* 160:657–670

- Gerton JL, DeRisi J, Shroff R, Lichten M, Brown PO, Petes TD (2000) Global mapping of meiotic recombination hotspots and coldspots in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11383–11390
- Hamer G, Gell K, Kouznetsova A, Novak I, Benavente R, Hoog C (2006) Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci* 119:4025–4032
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of human genome. *Nature* 409:860–921
- Jeffreys AJ, Holloway JK, Kaupii L, May CA, Neumann R, Slingsby MT, Webb AJ (2004) Meiotic recombination hot spots and human DNA diversity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359:141–152
- Jeffreys AJ, Neumann R, Penayi M, Myers S, Donnelly P (2005) Human recombination hot spots hidden in regions of strong marker association. *Nat Genet* 37:601–606
- Karpova OI, Safronov VV, Zattseva SP, Bogdanov YF (1989) Some properties of DNA isolated from mouse synaptonemal complexes fraction. *Mol Biol* 23:571–579
- Karpova OI, Penkina MV, Dadashev SY, Mil'shina NV, Hernandez J, Radchenko IV, Bogdanov IuF (1995) Features of the primary structure of DNA from the synaptonemal complex of the golden hamster. *Mol Biol (Mosk)* 29:289–295
- Kleckner N (1996) Meiosis: how could it work? *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8167–8174
- Kondo Y, Issa JPJ (2003) Enrichment for histone H3 lysine 9 methylation at *Alu* repeats in human cells. *J Biol Chem* 278:27658–27662
- Lammers JHM, Offenberg HH, van Aalderen M, Vink ACG, Dietrich AJ, Heyting C (1994) The gene encoding a major component of the lateral elements of the synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol* 14:1137–1146
- Maguire MP (1995) Is the synaptonemal complex a disjunction machine? *J Heredity* 86:330–340
- Martens JHA, O'sullivan RJ, Braunschweig U, Opravil S, Radolf M, Steinlein P, Jenuwein T (2005) The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO J* 24:800–812
- Meneveri R, Agresti A, Rocchi M, Marozzi A, Ginelli E (1995) Analysis of GC-rich repetitive nucleotide sequences in great apes. *J Mol Evol* 40:405–412
- Meuwissen RL, Offenberg HH, Dietrich AJ, Riesewijk A, van Iersel M, Heyting C (1992) A coiled-coil related protein specific for synapsed region of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J* 11:5091–6100
- Moens PB (1994) Molecular perspectives of chromosome pairing at meiosis. *BioEssays* 16:101–106
- Moses MJ (1968) Synaptonemal complex. *Ann Rev Genet* 2:363–412
- Myers S, Bottolo L, Freeman C, Mcvean G, Donnelly P (2005) A fine-scale map of recombination hotspots across the human genome. *Science* 310:321–324
- Offenberg HH, Shalk JA, Meuwissen RL, Van Aaldersden M, Kester HA, Dietrich AJ, Heyting C (1998) SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Res* 26:2572–2579
- Ortiz R, Echeverría OM, Ubaldo E, Carlos A, Scassellati C, Vázquez-Nin GH (2002) Cytochemical study of the distribution of RNA and DNA in the synaptonemal complex of guinea-pig and rat spermatocytes. *Eur J Histochem* 46:133–142
- Page SL, Hawley RS (2004) The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Ann Rev Cell Dev Biol* 20:525–558
- Pearlman RF, Tsao N, Moens PB (1992) Synaptonemal complexes from DNase-treated rat pachytene chromosomes contain (GT)_n and LINE/SINE sequences. *Genetics* 130:865–872
- Peltari J, Hoja MR, Yuan L, Liu JG, Brundell E, Moens P, Santucci-Darmanin S, Jessberger R, Barbero JL, Heyting C, Hoog C (2001) A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells. *Mol Cell Biol* 21:5667–5677
- Peng JC, Karpen GH (2007) H3K9 methylation and RNA interference regulate nucleolar organization and repeated DNA stability. *Nat Cell Biol* 9:25–35
- Rattner JB, Goldsmith M, Hamkalo BA (1980) Chromatin organization during meiotic prophase of *Bombyx mori*. *Chromosoma* 79:215–224
- Revenkova E, Eijpe M, Heyting C, Hodges CA, Hunt PA, Liebe B, Scherthan H, Jessberger R (2004) Cohesin SMC1 β is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat Cell Biol* 6:555–562
- Rincón-Arango H, Furlan-Magaril M, Recillas-Targa F (2007) Protection against telomeric position effects by the chicken *CHS4* β -globin insulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:14044–14049
- Scott AF, Schmeckpeper BJ, Abdelrazik M, Comey CT, O, Hara B, Rossiter JP, Cooley T, Heath P, Smith KD, Margolet L (1987) Origin of the human L1 elements: Proposed progenitor genes deduced from a consensus DNA sequence. *Genomics* 1:113–125
- Sotelo JR (1969) Ultrastructure of chromosomes at meiosis. In: Lima de Faria A (ed) *Handbook of molecular cytology*. North-Holland, Amsterdam, pp 412–434
- Vázquez-Nin GH, Echeverría OM (1976) Ultrastructural study on the meiotic prophase nucleus of rat oocyte. *Acta Anat* 96:218–231
- Vázquez-Nin GH, Flores E, Echeverría OM, Merket H, Wettstein R, Benavente R (1993) Immunocytochemical localization of DNA in synaptonemal complexes of rat and mouse spermatocytes and chick oocytes. *Chromosoma* 102:457–463
- Weinmann AS, Yan PS, Oberley MJ, Huang TH, Farnham PJ (2002) Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis. *Genes Dev* 16:235–244

Review

Chromatin structure contribution to the synaptonemal complex formation

A. Hernández-Hernández^{a,b}, G. H. Vázquez-Nin^b, O. M. Echeverría^b and F. Recillas-Targa^{a,*}

^a Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Genética Molecular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70–242, México D.F. 04510, (UNAM) (Mexico), Fax: (52 55) 56 22 56 30, e-mail: frecilla@ifc.unam.mx

^b Laboratorio de Microscopía Electrónica, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (Mexico)

Received 18 September 2008; received after revision 10 October 2008; accepted 24 October 2008

Abstract. Meiosis is a key cellular and molecular process for sexual reproduction contributing to the genetic variability of organisms. This process takes place after DNA duplication and consists in a double cellular division, giving rise to four haploid daughter cells or gametes. Meiotic recombination between homologous chromosomes, in the meiotic prophase I, is mediated by a tripartite structure named Synaptonemal Complex (SC). The SC is a peptidic scaffold in which the chromatin of homologous chromosomes

is organized during the pachytene stage, holding chromosomes together until the meiotic recombination and genetic exchange have taken place. The role of chromatin structure in formation of the SC and the meiotic recombination at meiotic prophase I remain largely unknown. In this review we address the epigenome contribution to the SC formation at meiotic prophase I, with particular attention on the chromatin structure modifications occurring during the sub-stages of meiotic prophase I.

Keywords. Synaptonemal complex, chromatin structure, epigenetic modification, meiotic prophase I, lateral element associated repeat sequences (LEARs).

Introduction

Molecular changes during the meiotic prophase I and chromatin structure. Chromosomal morphogenesis during the meiotic prophase I involves three main components: a) establishment of a physical interrelation between sister chromatids along with formation of axial chromosomal structures, b) interaction between chromosomes involved in homologous recognition, DNA recombination and SC formation, and c) temporally programmed variations in molecular

composition and compaction of bulk chromatin and axis-associated components. [1]. It is worth mentioning that all these processes occur in a chromatin template structured in multiple levels of compaction. Briefly, chromatin consists of a complex and dynamic array of nucleosomes, and non-histone proteins. Nucleosomes are composed by 146 base pairs of nuclear DNA wrapped around the octamer of histones [2]. The linker histone H1, which interacts with internucleosomal DNA, contributes to form the next higher order level of chromatin organization known as the solenoid or 30-nm fiber. Chromatin dynamics is achieved through the action of numerous binding factors and/or modifying enzymes inducing histone

* Corresponding author.

covalent modifications, as well as complexes mediating ATP-dependent chromatin remodeling [3]. Furthermore, histone modifications (acetylation, phosphorylation, methylation, ubiquitination) constitute highly specific regulatory signals affecting the epigenetic control of gene expression through chromatin structure [3]. Therefore we predict that specific epigenetic profiles established by dynamic chromatin structure during meiotic prophase I are related to chromosome morphogenesis.

Pre-meiotic S phase: homologous chromosomes recognition

During pre-meiotic S phase, the chromosomes begin a search for their homologous counterpart for subsequent pairing and exchange of genetic material in the pachytene stage [1]. One model postulates that this homologous recognition occurring in a large scale is mediated through DNA transcription [4]. Homology recognition mediated by transcription has been demonstrated recently in female stem cells as a prerequisite for X-chromosome inactivation, which allows gene dosage compensation [5]. Electron microscopy observations demonstrated the presence of axial elements (AEs) surrounded by loops formed by chromatin associated with ribonucleoprotein particles (RNPs) (lampbrush structures) at pre-leptotene stage. These lampbrush structures progressively associate between them [4] (Fig. 1). During this pre-meiotic S-phase, the chromatin is diffuse with reduced sectors of heterochromatin, indicating a relaxed chromatin configuration at this stage [1]. This correlates with early studies on DNase I accessibility in which specific DNA sequences showed increased DNase I sensibility in pre-meiotic S-phase, as compared with pre-meiotic stages. Furthermore, nuclease sensibility seems to be associated with transcriptionally active DNA; however, in pachytene cells nuclease action is observed in transcribed and non-transcribed genomic sequences [6], pointing to a more relaxed general chromatin configuration in cells entering meiotic prophase I. By contrast, the chromatin of sexual chromosomes in leptotene, zygotene, and pachytene stages presents a gradual decrease in nuclease digestion sensibility. In the pachytene stage the heterochromatin of the sexual chromosomes (XY body) is clearly seen under light and electron microscopy [6].

We assume that the relaxed chromatin status in pre-meiotic S phase is attributed to specific epigenetic events. In spermatogonia and pre-leptotene cells the whole genome displays histone H4 acetylation (euchromatic mark). However, this mark is absent in the following stages, until it reappears in elongated

spermatids with a loose chromatin structure, which allows the protamines-histones exchange [7, 8]. Histone H3 lysine 9 acetylation (acH3K9), considered an open chromatin mark, is detectable from type-B spermatogonia up to the zygotene stage [8]. On the other hand, the reduced constitutive heterochromatin found at the beginning of the meiotic prophase in type-B spermatogonia corresponds to centromeric and telomeric regions, where H4K20me3 and H3K9me3, which are modifications incorporated by the histone methyltransferase Suv39 h, are enriched [9, 10]. Both histone marks are present throughout the pre-meiotic, (spermatogonia B-type), as well as leptotene and zygotene stages [9]. At pachytene stage, when the homologous chromosomes are paired, H4K20me3 is present in centromeres, telomeres and nearby chromatin. These repressive chromatin marks are present until late pachytene (Table 1). Probably such histone marks are needed for regulated incorporation and preservation of centromeric and telomeric chromatin in the synaptonemal complex. Both marks are no longer present in elongated spermatids where the histones-protamines replacement takes place [9]. The relaxed status of chromatin and the presence of euchromatin epigenetic marks during pre-meiotic S phase correlate with high rates of DNA transcription, including genes in anti-sense orientation; [4, 11] as well as replacement of H3 by the histone variant H3.3 [11] (Table 1). It is interesting to note that in this stage splicing factors are scarce [12], while unspliced pre-mRNAs are highly abundant, as shown by immunolocalization of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) [4]. All these facts indicate that during meiotic S phase DNA is intensively transcribed and that nascent pre-mRNAs are processed only to a low extent, supporting the idea of the requirement of transcription for homologous chromosomes recognition. Nevertheless, this hypothesis remains poorly explored.

Pre-leptotene stage: Chromatin commitment for chromosomal pairing and recombination.

Differential epigenetic profiles contribute to the configuration of pre-leptotene chromatin. Phosphorylated serine 10 of histone 3 (H3S10P) begins to be discernible at this stage. The mark decreases in leptotene, and by the zygotene stage, H3S10P is diffusely detected [13] (Table 1). H3S10P is also associated with chromatin relaxation and compaction during the meiotic prophase I [13]. These observations indicate that chromatin dynamics, potentially involving H3S10P, is needed for prophase progression. Furthermore, other global chromatin rearrangements

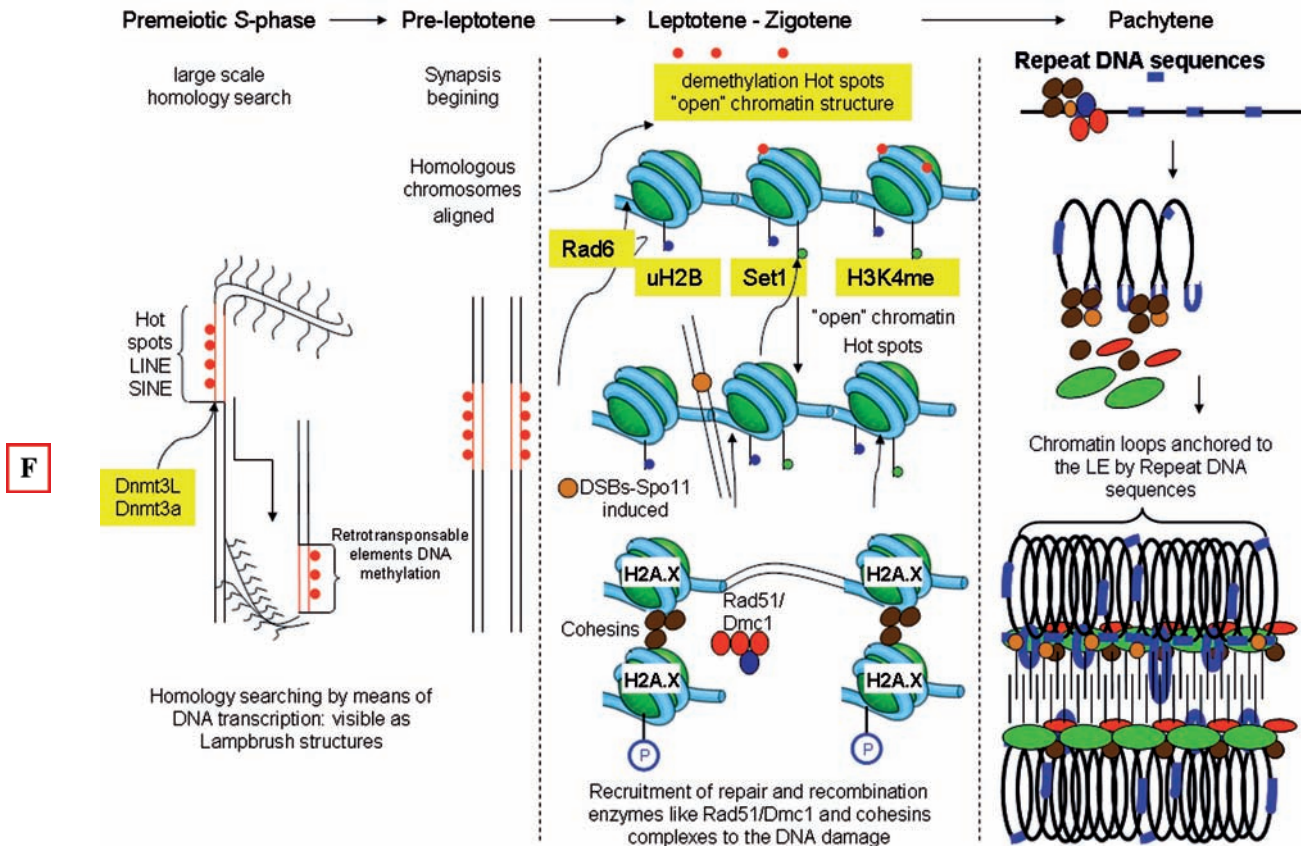


Figure 1. Scheme exemplifying the chromatin modifications at DNA sequences, which become part of the DNA-protein scaffold of the SC. At pre-meiotic S-phase the chromosome homology search takes place at big scale. One theory points out transcription as a relevant mediator for the homology search. In this stage repeat sequences are DNmtL-methylated, perhaps avoiding their participation in the homology search. At leptotene stage the homologous chromosomes become aligned. At leptotene-zygotene transition, the chromatin of the repeat elements related to hotspots undergoes changes and an active demethylation process allowing the ubiquitination of histone 2B (uH2B) and chromatin relaxation through Set1 dependent H3K4 methylation. Then, DSBs mediated by Spo11 are induced on this repeat sequences after – as a response to DNA damage – H2A becomes phosphorylated (γ H2A), a signal that favors the recruitment of other factors to remodel the chromatin structure and permit access to the recombination machinery, as Rad51 and DMC1 proteins, responsible for the early recombination nodule formation. Likewise, cohesin complexes are recruited to DSB, keeping together the chromatids and homologous chromosomes, allowing successful DNA repair. Spo11 is not removed from DSB and appear in the LEs of the SC in pachytene stage. In this way, as the pachytene stage is established, the LE of the SC is formed by LEARS; the LE-specific proteins, SYCP2, SYCP3; the cohesin complexes SMC1, SMC3, Rec8, and by the protein Spo11. In this way the repeat DNA sequences anchor whole chromosomes to the SC scaffold.

occur in this stage. The clumps of compact chromatin contacting the nuclear envelope progressively decrease and the nucleoli migrate towards the nuclear envelope. The homologous chromosomes, anchored to the nuclear envelope, migrate until they locate in proximity. Then, the chromatin fibers anchored to the early AEs act as a highly specific bar code for the recognition of homologous chromosomes, allowing pairing and formation of the rope-ladder structures [4, 14]. In conclusion, not only morphology but also the chromatin dynamics are required in these early steps of meiosis.

In pre-leptotene stage the chromatin structure undergoes changes that allow chromosome morphogenesis, such as formation of the recombination intermediates and SC formation. Furthermore, DNA replication in

the pre-leptotene stage in mouse and rat spermatocytes is accompanied by a wave of *de novo* synthesis of histones, besides replacement of somatic histones by testis-specific histone variants such as TH2A and TH2B [15]. Nevertheless, partial replacement of somatic histones H1A, H2A, H3 by TH1, H2AX and TH3 initiates during spermatogonial differentiation [15]. This histone replacement is necessary for further chromatin modification (see below). At this stage specific epigenetic events controlling the SC formation become more evident than in previous stages. Ubiquitination of the histone H2B (uH2B) by Rad6 allows H3K4 methylation by Set1, contributing to chromatin remodeling and generation of double strand breaks (DSBs) induction by Spo11 [7, 16] (Fig. 2). Thus, the first recombination intermediates,

Table 1.

Premeiotic S-phase	Pre-leptotene	Leptotene	Zygotene	Pachytene	Diplotene
-Replacement of H1A, H2A, H3 by TH1, H2AX and TH3	- Replacement of somatic histones by testis-specific histones TH2A and TH2B				
- Chromatin in a lax state	-First round of chromosome condensation	- Homologous chromosomes alignment	- Telomeres cluster forming the bouquet stage	- Synaptonemal complex assembling	- SC disassembling
- High rates of DNA transcription					
- H3 replacement by H3.3					
- Low presence of splicing factors					
acH4		acH3K9			
Demethylation of repeat sequences as LINE, SINE, LTR					
uH2B by Rad6			γH2AX disappearance of the DSB, relocating to the XY body	Repeat sequences are forming part of the SC scaffold	
H3K4me by Set1				uH2A	uH2A replacement by unmodified H2A
	γH2AX			Increase of uH2A in the XY body	
	DSBs by Spo11				
	H3S10P				
H3K9me3 by Suv39h in centromeric and telomeric heterochromatin					
H4K20me3 in centromeric and telomeric heterochromatin					
Dnmt3L methylate imprinted DNA					

namely DSBs, are governed by epigenetic modifications inducing changes in the chromatin structure potentially influencing SC formation.

Leptotene stage: Chromosomal dynamics and establishment of the SC nucleation spots

At leptotene stage the chromosomes are discernible as thin and filamentous structures [1]. At this point, sister chromatids organize into structures called AEs and most of the compact chromatin clumps are dissociated [17, 18]. At the early-mid leptotene the DSBs, produced by enzyme Spo11, recruit proteins related to the meiotic mismatch repair machinery (MMRM) and stabilize the association between the homologous chromosomes. Such interactions can be seen in association with the axial elements of the homologous chromosomes to be aligned [19]. These numerous interactions are described as inter-axial bridges of around 400 nm in width [18]. As leptotene progresses, a fraction of these bridges mature into axial associations (AAs), which hold together the paired Lateral Elements (LEs). Moreover, the AAs nucleate the formation of SC between the associated AEs [20]. Despite the fact that chromosomal homologous sequences are aligned at this stage, the DSB are

necessary for accurate SC formation. In the absence of functional Spo11 protein, synapses can be restored if DSBs are induced by other means, as has been shown for *spo11* mutant mice. In such mice, the DSB produced by the administration of the chemotherapeutic agent cisplatin rescues meiotic arrest and formation of SC, which are compromised otherwise [21]. During this stage, the DSBs are generated and the histone variant H2AX is phosphorylated (γH2AX). This covalent histone modification is present from leptotene up to zygotene. Later, in early pachytene, this modification is not observed in autosomes, whereas its presence is evident in the XY body; however this epigenetic modification seems not to be implicated in the formation of DSB on the XY body. Mammalian histone variant H2A.X is similar to H2A; however, it contains a unique SQ motif on its C-terminus, which is evolutionarily conserved. Upon DNA damage or DSBs, the H2A.X SQ motif becomes phosphorylated (γH2A.X), which tags DNA for recruitment of recombination enzymes [15, 22] (Table 1). After double strand cleavage, the ends of the broken molecule must be modified by the 5'-to-3' exonucleolytic activity of MRE1 and RAD50 enzymes, resulting in single stranded DNA (ssDNA) which, through the action of Rad51 and Dmcl, invade an unbroken DNA duplex in either sister chromatid,

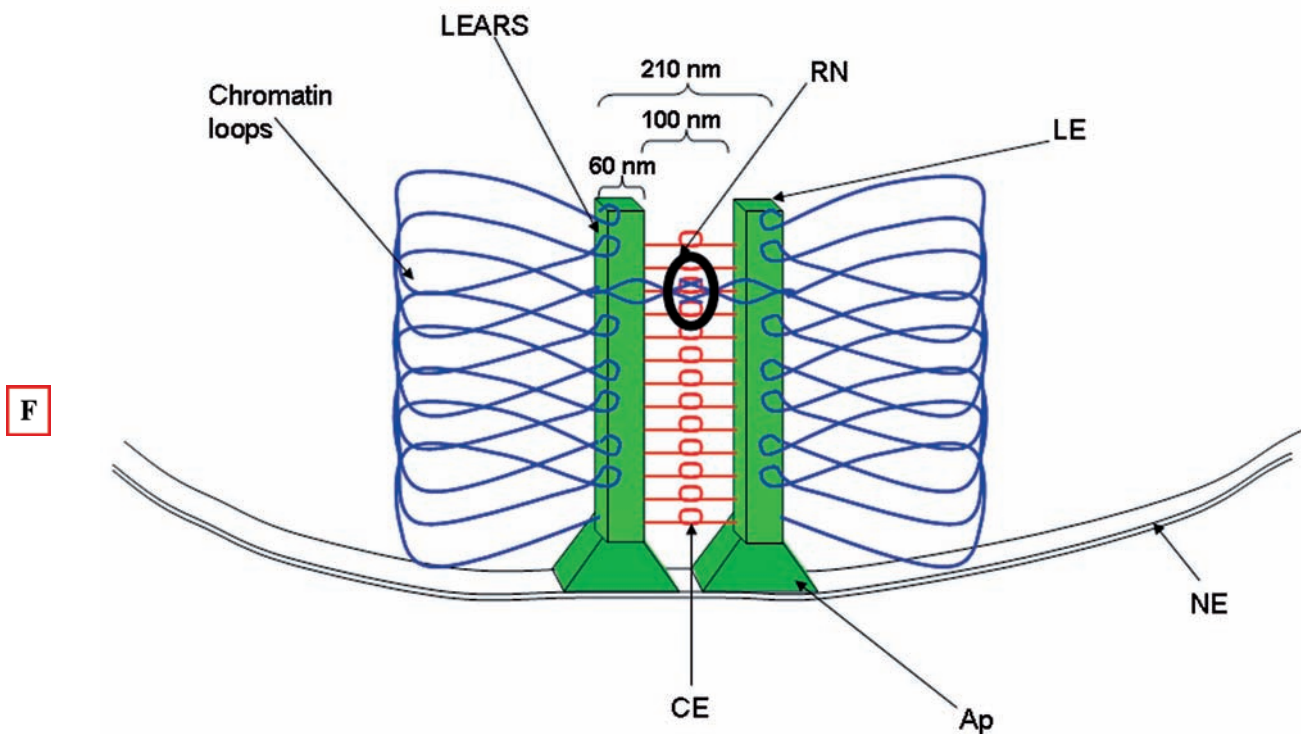


Figure 2. Synaptonemal complex (SC) is a tripartite composed of two lateral elements (LE) and a central element (CE). The thickness of the complex is 210 nm with two LEs of approximately 60 nm in width, and a central space of around 100 nm thick. The homologous chromosomes anchor to the LE by Lateral Element-Associated Repeat Sequences (LEARS). The ends of the LEs are attached to nuclear envelope (NE) by the adhesion plate (ap).

or the homologous chromosomes, for further use as a template for DSB repair. These interactions, occurring between homologous chromosomes, are critical for proper chromosome pairing and synapse [23]. During branch migration, which takes place in the mid-phase of the homologous recombination-repair process, nucleosomes are displaced causing dramatic chromatin structure changes in the region where formation of joint molecules occurs, and dsDNA is unwound through the activity of RAD54, which is a sub-unit of the SWI2/SNF2 ATP-dependent chromatin remodeling complex [15] (Fig. 2). Thus, epigenetic modifications induced as response to DNA damage are relevant for the proper chromatin rearrangements associated with the SC formation.

Upon DSB in *S. cerevisiae* DNA damage response kinases Tel1, Mec1 and Rad53 (ATM, ATR and Chk2 in mammals, respectively), phosphorylate H2AX and the repair protein Mre11 is recruited. Furthermore, it has been demonstrated that cohesin's complexes are recruited to DSBs by Mre11, suggesting that cohesion contributes to keeping chromatids and homologous chromosomes together, facilitating DNA repair, and avoiding homologous chromosome dissociation due to DSB. Moreover, in human cells cohesin's recruitment to DSBs requires the Smc5/6 complex, in

addition to Mre11, Smc5 and Nse2 subunits [24]. The picture emerging from all these data includes a complex network where DSBs produced by Spo11 at the meiotic hot spots, many of them associated with repeat rich sequences, becomes the recruitment signal for DNA damage-dependent kinases, which in turn phosphorylate H2AX. Such a process is required for damage-sensing and recruitment of DSB repair proteins to the break sites, with subsequent loading of cohesin's complexes. As the meiotic prophase I continues, most of these hot spots – linked to repeated, rich sequences which are coupled with proteins as Spo11, cohesins and LE specific-proteins – build up the LE of the SC in the pachytene stage [18, 24, 25] (Fig. 1). From these data it is clear that chromatin structure, which is deeply affected by its modifications, is involved in the anchorage of chromosomes to the SC scaffold. However, studies attempting to elucidate the complex network of DNA-proteins that compel to the SC formation are required.

First evidences of the SC formation

Ultrastructural evidence from our laboratories supports the beginning of SC formation near the nuclear

envelope (NE) [4]. The attachment of the SC scaffold to the NE is observed as an electron-dense structure named the adhesion plate (Fig. 2), which is also associated with telomeric DNA repeats [26]. Knock-out mice for the SYCP3 gene present dissociation of telomeric repeats from the adhesion plate along with perturbed SC [26]. Therefore, the connection between SYCP3 and telomeric repeats seems to be required for the initial steps of the SC formation. Telomeric and centromeric sequences represent the main source of constitutive heterochromatin and are highly enriched in epigenetic marks associated with gene silencing [27] (Table 1). Such features prompted us to propose that heterochromatin in telomeric sequences facilitate the beginning of the SC formation. This is supported by the fact that knockdown of Suv39 h and G9a histone methyltransferases causes synapsis establishment failure between homologous chromosomes [9, 28].

Towards the leptotene-zygotene transition, the chromosomes, anchored to the internal nuclear membrane by their telomeres (adhesion plate), move until they are close enough, forming a flower-like arrangement known as the “bouquet stage” [1, 29]. Such stage is transient and occurs simultaneously with SC formation. The bouquet formation has been observed in plants, fungi and animals [1]. In yeast, the leptotene-zygotene stage is associated with formation of the double Holliday junction (dHJ), which represents a stable intermediate stage between the induction of DSBs and DNA exchange. Interestingly, the bouquet structure behaves differently in other organism. In nematodes, including *C. elegans*, only one end of each chromosome anchors to the nuclear envelope and the bouquet is not formed. In contrast, in *D. melanogaster* physical clustering of heterochromatic centromeric regions occurs, visible as a weak polarization of telomeres [1].

In human spermatocytes and oocytes, the telomeric anchorage is mediated by a package of spherical filaments, between 100 and 150 nm, located along the cytoplasmic face of the nuclear envelope. Telomeric anchorage is only visible during zygotene and early pachytene stages, when the bouquet structure is formed. Furthermore, telomeric heterochromatinization is necessary for correct telomere clustering in the bouquet stage at the beginning of meiotic prophase, and for the AE formation, which precedes synaptic pairing [30, 31]. In the newly formed LEs, the optimal attachment of telomeres with the nuclear envelope may need additional structural components such as, for example, actin filaments of the cytoplasmic matrix and the *trans*-membrane proteins Sun1 and Sun2, which have been directly localized in association with the anchorage of telomeres [32–34]. These facts highlight the involvement of telomeric sequences and

associated epigenetic features in the SC formation onset during the transition from leptotene to zygotene stages.

Zygotene stage: assembling the SC

At zygotene stage the chromosomes become shorter, thicker and [1] locate in proximity to the nuclear envelope, at the homologous pairing site, where the SC's classical tripartite structure becomes visible [17]. Chromosomal dynamics initiate during leptotene stage. By early zygotene such movements are most prominent and gradually decrease throughout the zygotene stage, ending at early pachytene. Interestingly, the telomeres and kinetochores are also associated with the nuclear envelope and this interaction remains during the chromosomal movements. In wheat, this nuclear and chromatin mobility can be affected by colcemid, which causes microtubules (MTs) dissociation and destabilizes the nuclear envelope [35]. Actin polymerization seems to be necessary for chromosomal dynamics; however, it is not clear whether it is the nuclear or the cytoplasmic actin which is involved in this process [30]. It has been proposed that chromosomal re-location is needed for attraction of homologous chromosomal segments [1]. This is critical for chromosomal contact initiation and propagation. A novel set of new data supports inter- and intra-chromosomal contacts and chromosomal re-location as relevant for structural and regulatory processes [36, 37]. Such a view probably requires, in zygotenes stage, the fine modulation of chromatin structure, mainly through histone covalent modifications and the distribution of repetitive sequences associated to the SC assembling. Thus, chromosomal movements are needed to attract the already recognized homologous chromosomes and to initiate the SC assembly. Whether telomeric heterochromatin structure is important for these movements is an attractive question to be addressed.

Pachytene stage: synapsis of homologous chromosomes and the SC

In the pachytene stage the homologous chromosome pairs establish synapses, become shorter, and strengthen their association with the SC. Such association is visible as the characteristic tripartite form [18], in which the four sister chromatids remain aligned along the pachytene stage. At this point, the SC consists of two paired LEs, which are connected by transverse filaments running in a perpendicular orientation (Fig. 2). At electron microscopy level the SCs

present a central element (CE) as a medial linear electron-dense structure. Towards pachytene stage, the homologous chromosomes undergo gradual decondensation until the diplotene stage, in which the SC disassembles and the homologous chromosomes often dissociate, except at the recombination chiasmata [1, 18]. Immunohistochemical studies on mouse cells have shown that the levels of histone H2A ubiquitination (uH2A), which is linked with nucleosomal instability, peak during the pachytene stage [38]. In early pachytene, uH2A is concentrated in the condensed and transcriptionally inactive sex chromosomes XY. By mid-pachytene, uH2A is observed throughout the entire nucleus, but is subsequently restricted to the XY body in late pachytene spermatocytes [38]. Therefore, this uH2A distribution in pachytene chromatin could be related with nucleosome eviction to allow replacement of already modified histones, contributing to regulated meiotic prophase I progression. This is supported by previous studies showing that phosphorylation of H2A during late pachytene is needed for SC disassembling [39]. Furthermore, knockout mice for hr6b, which mediates H2A-ubiquitination, present SC structural and length defects [40]. Interestingly, the uH2A distribution pattern in the sex body heterochromatin of such mice does not change [41], supporting the fact that H2A ubiquitination is critical for histone replacement and further modification of newly incorporated histones. Ubiquitinated H2A reappears in elongated spermatids, where it might influence histones-protamines replacement [42, 43].

We recently found that sub-families of DNA repeat sequences are associated with LEs of the SC in pachytene rat spermatocytes. We called such sequences LEARS, which stands for Lateral Element-Associated Repeat Sequences [25]. This finding opens the possibility that the chromatin structure associated with repeat DNA sequences affects LE structure. Furthermore, the chromatin associated with the DNA repeats is targeted by several epigenetic modifications during meiotic prophase I. Thus, we favor the idea that epigenetic modifications could be linked to the incorporation of LEARS to the SC.

Synaptonemal complex structure

The structure of SC has been well conserved throughout evolution. The basic SC morphology in a longitudinal chromosomal section is the same for plants and animals, and is formed by three parallel peptidic elements. The thickness of the complex is 210 nm with two LEs of approximately 60 nm and a central space of around 100 nm (Fig. 2) [44]. The LEs of the SC are

composed of different proteins [44] and loop-shaped DNA filaments crossing at the middle. Several authors have indirectly suggested that the LE-associated DNA corresponds to repeat DNA [45–48]. Recently, our groups confirmed that these DNA filaments correspond exclusively to LEARS [25, 49] and are the chromosome's anchor point to the SC's LE (Figs. 1 and 2). Thus, the whole chromosome is organized around the LE through the SC's protein scaffold (Fig. 2). The SC's CE is built of transverse fibrillar elements of small diameter (1.6–2 nm) composed of protein SYCP1, which is present exclusively during meiosis [18], as well as SYCE1, SYCE2, TEX11 and TEX12, which are associated with the CE [50–53]. The LEs are composed of proteins, such as SYCP2 and SYCP3, and their paralogues in others organisms [18]. Furthermore, LEs also contain cohesin complex components SMC1, SMC3 and STAG3, which associate with REC8 protein forming part of the lateral element in mammals [54].

Chromatin structure during the SC formation

At the beginning of the meiotic prophase I chromatin is mostly relaxed, and the repeat elements, which are normally structured in compact chromatin, suffer configuration changes in order to allow accurate DNA synthesis during the pre-meiotic S phase. Afterwards, during the onset of large-scale homologous chromosome search in the pre-leptotene stage, repeat DNA is methylated, which might avoid interferences with homology recognition mediated by transcribed RNA [7, 8] (Fig. 1). Once the cells have entered leptotene, a large-scale genomic demethylation occurs. Then, Rad6 ubiquitinates histone H2B (uH2B), allowing H3K4 methylation by Set1 and therefore chromatin relaxation at the recombination hotspots, many of them corresponding to repeat sequences [55, 56]. Then, Spo11-dependent DSBs are produced at the hotspots and phosphorylation of histone H2A.X (γ H2A.X) occurs, favoring recruitment of meiotic mismatch repair proteins (MMRP) (Fig. 1). During DNA repair in response of DSB damage, Spo11 is not removed from the recombination hotspots, since it is detected in LEs during the SC formation onset, suggesting that Spo11 [21] perhaps plays a role in targeting hotspots to be recruited to the LE. After Spo11 dependent double strand cleavage the ends of the broken molecule must be resected by a 5'-to-3' exonucleolytic activity of the MMRP, Rad50 and Mre11 resulting in a single strand DNA tail (ssDNA). Then, through the action of Rad51 and Dmcl1, the ssDNA invades an intact DNA duplex of either the sister chromatid or the homologous chromosome and

uses it as template to repair the DSB as a damage response. At the same time Mer11 recruits cohesin complexes keeping together the chromatids and homologous chromosomes allowing successful DNA repair and avoiding their dissociation due the DSB (7, 8, 15, 22, 24). In this way, as the pachytene stage is established, the SC's LE is formed of LEARS [25, 47] along with the LE-specific proteins, SYCP2, SYCP3, the cohesin complex proteins SMC1, SMC3, Rec8 [18], and Spo11 [21] (Fig. 1). Hotspots not recruited to the LE participate in the meiotic recombination solved by crossing over, which takes place at the recombination nodule in the SC's CR [55, 56]. Several histone modifications are incorporated to hotspots during the course of the repair process. The idea that such modifications could constitute signals recognized by LE's proteins recruiting LEARS to the SC seem attractive. In this scenario, chromatin modifications in the hotspots could be recognized by cohesin complex components, which have the ability to recognize DNA secondary structures [57, 58] and are loaded to the unpaired AEs in pre-pachytene stages [54, 59], or by LE-specific proteins, which are loaded in the AEs during SC assembly in leptotone and zygotene stages [54]. Furthermore, there is evidence suggesting that certain SC components could be involved in chromatin attachment to the LE. Sequence analysis of major SC proteins predicted the existence of putative DNA binding motifs in SYCP1 and SYCP2 [50, 60–62]. However, whether these proteins can specifically bind repeat DNA sequences is currently unknown. Recent studies indicate that cohesins may also play an important role in chromatin anchoring [63]. Mice lacking cohesin SMC1 β , which is present specifically in meiotic cells, present a decrease in LE's associated chromatin as compared with normal mice. In addition, mutants present an altered LE-to-loop ratio with chromatin fiber loops twice as long as those found in wild-type mice [63, 65]. It has been previously shown that cohesins can bind SYCP2, which in turn interacts with SYCP3 [54, 65]. The emerging picture thus points to a complex network of DNA-protein and protein-protein interactions mediating chromosome anchoring to the SC.

SC and DNA methylation

B-type spermatogonia in premeiotic S-phase, as well as pre-leptotene and leptotene nuclei which present paternal imprinting, express Dnmt3L. This protein is an isoform of DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b, that requires interaction with Dnmt3a to methylate DNA [7]. In B-type spermatogonia Dnmt3L could be involved in methylation of trans-

posable DNA sequences like LINEs, SINEs and LTRs, interfering with their transcription even in relaxed chromatin [8]. During the zygotene stage the genomic non-imprinted regions, including retrotransposable elements, become demethylated [8], what could allow their participation in meiotic recombination [25]. These elements are methylated in following stages probably due to the need to reestablish imprinted patterns and inducing heterochromatin formation during post-fecundation stages, thus avoiding retrotransposition and mutation generation in early embryos [66]. Consistent with this idea, *de novo* DNA methylation of retrotransposable elements by Lsh is important for accurate progression of the meiotic prophase I [67]. In Dnmt3L and Lsh knockout mice, SCs are not formed, while the LEs appear to be normal [8, 67]. The hypomethylation of repeat sequences at pre-leptotone stages probably affects the homologous chromosomes search, thus impairing SC assembly. Furthermore, DNA hypomethylation prevents eviction of modified histones, such as phosphorylated H2AX, in leptotene-zygotene stages [67]. Therefore, another possibility is that impeding eviction of modified histones from repeat sequences could interfere with their incorporation to LEs, affecting SC formation.

RNA and SC

RNA could be another component that might participate in SC nucleation. Previous ultrastructural analyses revealed the presence of RNA in the SC's LE; moreover, the presence of specific miRNA in the SC has been documented [49, 68]. It is well established that non-coding RNA influences chromatin structure through the iRNA pathway and in gene dosage compensation through anti-sense transcripts, among others [69, 70]. Recently, the association of RNA to purified chromatin in chicken liver has been reported. Such RNA does not correspond to nascent transcripts, therefore it could be structural RNA [71]. Furthermore, it has been reported recently that repeat DNA sequences correspond to antisense transcription start sites [72]. Thus, the presence of repeat sequences in the SC's LE [25] may favor expression of non-coding transcripts influencing LE nucleation. Hence, the RNA present in SC's LEs could be involved in SC formation. Nevertheless, the exact features and function of LEs-associated RNA remain unknown and are the subject of intense investigation in our laboratories.

Conclusion and prospects

Meiosis is the main source of genetic variability in diploid organisms and implicates homologous recombination, which occurs uniquely in meiotic prophase and is mediated in part by the SC. The LE's anchorage points are constituted by specific DNA sequences called LEARS. These DNA repeat sequences are broadly distributed in the genomes and are subject to many epigenetic modifications, which serve as a means to control their transcriptional status in somatic cells. Epigenetic modifications are dynamic during the meiotic prophase I and are key for SC formation and function.

The chromatin has to undergo structural changes in order to allow progression of the meiotic prophase I, during which meiotic alignment, pairing and recombination of homologous chromosomes occur. The enzymatic machinery controlling chromatin epigenetic modification is critical for SC assembly and therefore for correct meiotic progression. Proper expression of meiosis-specific and mismatch repair genes is also needed. To understand the mechanisms behind SC formation, the complex networks of molecular interactions, as well as the exact succession of protein loading to the SC, have to be addressed. Uncovering the components and functions of the SC has deep implications in human diseases such as male infertility [73], as well as mammalian evolution and genetic variability, highlighting the relevance of understanding the mechanisms of sexual reproduction.

From the chromatin structure perspective a systematic genome-wide analysis is needed to reach deeper insights concerning the structural and functional knowledge all along the meiosis and its associated complexes, such as the SC. We propose detailed molecular studies coupled with cytological experimental approaches to describe in greater detail the components of the chromatin linked to these complexes. In particular, we need a systematic survey of different histone covalent modifications and their correlation with repetitive sequences and other, uncharacterized, genomic components. Of great interest will be to describe the type, abundance, distribution and functional properties of non-coding RNAs in tight relationship with the chromatin associated to the LE. For these purposes, genome-wide protein distribution, histone marks and non-coding transcription of the LEARS in conjunction with their three-dimensional arrangement will be important to better understand meiotic processes and genetic exchange.

Acknowledgements. We would like to thank Paul Delgado-Olguin and members of our research group for stimulating scientist discussions and suggestions. AHH is a fellowship recipient from the Posgrado en Ciencias Biológicas, CONACyT (181375). This work was supported for FRT by grants from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (IN209403 and IN214407) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-CONACyT (42653-Q and 58767). To GHVN DGAPA-PAPIIT, UNAM grant (IN203308-3).

- Zickler, D. and Kleckner, N. (1998) The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu. Rev. Genet.* 32, 619–69
- Felsenfeld, G. and Groudine, M. (2003) Controlling the double helix. *Nature* 23, 448–453
- Kouzarides, T. (2007) Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128, 693–705
- Vázquez-Nin, G. H., Echeverría, O. M., Ortiz, R., Scassellati, C., Martín, TE., Ubaldo, E. and Fakan, S. (2003) Fine Structural Analysis of Homologous Chromosome Recognition, Alignment, and Pairing in Guinea Pig Spermatogonia and Spermatocytes. *Biol. Reproduc.* 69, 1362–1370
- Xu, N., Donohoe, M. E., Silva, S. S. and Lee, J. T. (2007) Evidence that homologous X-chromosome pairing requires transcription and Ctf protein. *Nat. Genet.* 39, 1390–1396
- Wiltshire, T., Park, C. and Handel, M. A. (1998) Chromatin configuration during meiosis I prophase of spermatogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* 49, 70–80
- Rousseaux, S., Caron, C., Govin, J., Lestrat, C., Faure, A. K. and Khochbin, S. (2005) Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene* 345, 139–153
- Webster, K. E., O'Bryan, M. K., Fletcher, S., Crewther, P. E., Aapola, U., Craig, J., Harrison, D. K., Aung, H., Phutikanit, N., Lyle, R., Meachem, S. J., Antonarakis, S. E., de Kretser, D. M., Hedger, M. P., Peterson, P., Carroll B. J. and Scott, H. (2005) Meiotic and epigenetic defects in Dnm3L-Knockout mouse spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 4068–4073
- Peters, A. H. F. M., O'Carroll D., Schertan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schöper, C., Welpolshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., Opravil S., Doyle, M., Sibilia, M. and Jenuwein, T. (2001) Loss of the Suv39 h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 117, 323–337
- Kourmouli, N., Jeppesen, P., Mahadevhaiah, S., Burgoyne, P., Wu, R., Gilbert, D. M., Bongiorno, S., Prantera, G., Fanti, L., Pimpinelli, S., Shi, W., Fundele, R. and Singh, P. B. (2004) Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. *J. Cell Sci.* 117, 2491–2501
- Henning, W. (2003) Chromosomal proteins in the spermatogenesis of *Drosophila*. *Chromosoma* 11, 489–494
- Elliott, D. J., Oghene, K., Makarov, G., Makarova, O., Hargreave, T. B., Chandley, A. C., Eperon, I. C. and Cooke, H. J. (1998) Dynamic changes in the subnuclear organization of pre-mRNA splicing proteins and RBM during human germ cell development. *J. Cell Sci.* 111, 1255–1265
- Kleckner, N., Zickler, D., Jones, G. H., Dekker, J., Padmore, R., Henle, J. and Hutchinson, J. (2004) A mechanical basis for chromosome function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 12592–12597
- Snack, S. M. and Anderson, L. K. (2001) A model for chromosome structure during the mitotic and meiotic cell cycles. *Chromosom. Res.* 9, 175–198
- Baarends, W. M. and Grootegoed, J. A. (2003) Chromatin dynamics in the male meiotic prophase. *Cytogenet. Genome Res.* 103, 225–234
- Dehe, P. M. and Geli, V. (2006) The multiple faces of Set1. *Biochem. Cell Biol.* 84, 536–548
- Vázquez-Nin, G. H. and Echeverría, O. M. (1976) Ultrastructural study on the meiotic prophase nucleus of rat oocytes. *Acta Anat.* 96, 218–231

- 18 Page, S. L. and Hawley R. S. (2004) The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 525–558
- 19 Page, S. L. and Hawley, R. S. (2003) Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* 301, 785–789
- 20 Rockmill, B., Sym, M., Scherthan, H. and Roeder, G. S. (1995) Roles for two RecA homologous in promoting chromosome synapsis. *Genes Dev.* 9, 2684–2695
- 21 Romanienko, P. J. and Camerini-Otero, R. D. (2000) The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol. Cell* 6, 975–987
- 22 Bernstein, E. and Hake, S. B. (2006) The nucleosome: a little variation goes a long way. *Biochem. Cell Biol.* 84, 505–517
- 23 Roeder, G. S. (1997) Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev.* 11, 2600–2621
- 24 Ströma, L. and Sjögren, C. (2007) Chromosome segregation and double-strand break repair—a complex connection. *Curr. Opin. Cell Biol.* Volume 19, 344–349
- 25 Hernández-Hernández, A., Rincón-Arango, H., Recillas-Targa, F., Ortiz, R., Valdes-Quezada, C., Echeverría, O.M., Benavente, R. and Vázquez-Nin, G. H. (2008) Differential distribution and association of repeat DNA sequences in the lateral element of the synaptonemal complex in rat spermatocytes. *Chromosoma* 117, 77–87
- 26 Liebe, B., Alsheimer, M., Höög, C., Benavente, R. and Scherthan, H. (2004) Telomere attachment, meiotic chromosome condensation, pairing, and Bouquet Stage Duration Are Modified in Spermatocytes Lacking Axial Elements. *Mol. Biol. Cell.* 15, 827–837
- 27 Martens, J. H. A., O'sullivan, R. J., Braunschweig, U., Opravil, S., Radolf, M., Steinlein, P. and Jenuwein, T. (2005) The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO J.* 24, 800–812
- 28 Tachibana, M., Nozaki, M., Takeda, N. and Shinkai, Y. (2007) Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression. *EMBO J.* 26, 3346–3359
- 29 Pfeifer, C., Scherthan, H. and Thomsena, P. D. (2003) Sex-specific telomere redistribution and synapsis initiation in cattle oogenesis. *Dev. Biol.* 255, 206–215
- 30 Scherthan, H. (2007) Telomere attachment and clustering during meiosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 117–124
- 31 Pandita, T. K., Hunt, C. R., Sharma, G. G. and Yang, Q. (2007) Regulation of telomere movement by telomere chromatin structure. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 131–138
- 32 Ding, X., Xu, R., Yu, J., Xu, T., Zhuang, Y. and Han, M. (2007) SUN1 Is required for telomere attachment to nuclear envelope and gametogenesis in mice. *Dev. Cell.* 12, 863–872
- 33 Penkner, A., Tang, L., Novatchkova, M., Ladurner, M., Fridkin, A., Gruenbaum, Y., Schweizer, D., Loidl, J. and Jantsch, V. (2007) The Nuclear Envelope Protein Matefin/SUN-1 Is Required for Homologous Pairing in *C. elegans* Meiosis. *Dev. Cell.* 12, 873–885
- 34 Schmitt, J., Benavente, R., Hodzic, D., Höög, C., Stewart, C. L. and Alsheimer, M. (2007) Transmembrane protein Sun2 is involved in tethering mammalian meiotic telomeres to the nuclear envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 7426–7431
- 35 Corredor, E. and Naranjo, T. (2007) Effect of colchicine and telocentric chromosome conformation on centromere and telomere dynamics at meiotic prophase I in wheat-rye additions. *Chromosome Res.* 15, 231–245
- 36 Misteli, T. (2007) Beyond the sequence: cellular organization and genome function. *Cell* 128, 787–800
- 37 Fraser, P. and Bickmore, W. (2007) Nuclear organization of the genome and the potential for gene expression. *Nature* 447, 413–417
- 38 Lewis, J. D., Abbott, B. W. and Ausió, J. (2003) A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochem. Cell Biol.* 81, 131–140
- 39 Ivanovska, I., Candan, T., Ito, T. and Orr-Weaver, T. L. (2005) A histone code in meiosis: the histone kinase, NHK-1, is required for proper chromosomal architecture in *Drosophila* oocytes. *Gen. Dev.* 19, 2571–2582
- 40 Baarends, W. M., Wassenaar, E., Hoogerbrugge, J. W., van Cappellen, G., Roest, H. P., Vreeburg, J., Ooms, M., Hoeijmakers, J. H. J. and Grootegoed, J. A. (2003) Loss of HR6B ubiquitin-conjugating activity results in damaged synaptonemal complex structure and increased crossing-over frequency during the male meiotic prophase. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1151–1162
- 41 Baarends, W. M., Wassenaar, E., Hoogerbrugge, J. W., Schoenmakers, S., Sun, S. W. and Grootegoed, J. A. (2007) Increased phosphorylation and dimethylation of XY body histones in the Hr6b-knockout mouse is associated with derepression of the X chromosome. *J. Cell Sci.* 120, 1841–1851
- 42 Baarends, W. M., Hoogerbrugge, J. W., Roest, H. P., Ooms, M., Vreeburg, J., Hoeijmakers, J. H. J. and Grootegoed, J. A. (1999) Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Dev. Biol.* 207, 322–333
- 43 Rathke, C., Baarends, W. M., Jayaramaiah-Raja, S., Bartkuhn, M., Renkawitz, R. and Renkawitz-Pohl, R. (2007) Transition from a nucleosome-based to a protaminebased chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* 120, 1689–1700
- 44 Solari, A. J. (1999) *Genética humana. Fundamento y aplicaciones en medicina.* 2ª Ed. Panamericana. Argentina
- 45 Karpova, O. I., Penkina, M. V., Dadashev, S. Y., Mil'shina, N. V., Hernandez, J., Radchenko, I. V. and Bogdanov, Iu. F. (1995) Features of the primary structure of DNA from the synaptonemal complex of the golden hamster. *Mol. Biol. (Mosk)* 29, 289–295
- 46 Karpova, O. I., Safronov, V. V., Zattseva, S. P. and Bogdanov, Y. F. (1989) Some properties of DNA isolated from mouse synaptonemal complexes fraction. *Mol. Biol.* 23, 571–579
- 47 Pearlman, R. F., Tsao, N. and Moens, P. B. (1992) Synaptonemal complexes from DNase-treated rat pachytene chromosomes contain (GT)_n and LINE/SINE sequences. *Genetics* 130, 865–872
- 48 Dadashev, S. Ya., Grishaeva, T. M. and Bogdanov, Y. F. (2005) *In Silico* identification and characterization of meiotic DNA: *AluIb* possibly participates in the attachment of chromatin loops to synaptonemal complex. *Russian J. Genet.* 41, 1419–1424
- 49 Ortíz, R., Echeverría, O. M., Ubaldo, E., Carlos, A., Scasselati, C. and Vázquez-Nin G. H. (2002) Cytochemical study of the distribution of the RNA and DNA in the synaptonemal complex of guinea-pig and rat spermatocytes. *Eur. J. Histochem.* 46, 133–142
- 50 Meuwissen, R. L., Offenbergh, H. H., Dietrich, A. J., Riesewijk, A., van Iersel, M. and Heyting, C. (1992) A coiled-coil related protein specific for synapsed region of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J.* 11, 5091–6100
- 51 Costa, Y., Speed, R., Öllinger, R., Alsheimer, M., Semple, C. A., Gautier, P., Maratou, K., Novak, I., Hoog, C., Benavente, R. and Cooke, H. J. (2005) Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *J. Cell Sci.* 118, 2755–2762
- 52 Yang, F., Gell, K., van der Heijden, G. W., Eckardt, S., Leu, N. A., Page D. C., Benavente, R., Her, C., Höög, C., McLaughlin, K. J. and Wang P. J. (2008) Meiotic failure in male mice lacking an X-linked factor. *Genes Dev.* 22, 682–691
- 53 Hamer, G., Gell, K., Kouznetsova, A., Novak, I., Benavente, R., Höög, C. (2006) Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *J. Cell Sci.* 119, 4025–4032
- 54 Eijpe, M., Offenbergh, H., Jessberger, R., Revenkova, E. and Heyting, C. (2003) Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesions SMC1β and SMC3. *J. Cell Biol.* 160, 657–670
- 55 Jeffreys, A. J., Hollway, J. K., Kauppi, L., May, C. A., Neumann, R., Slingssy, M. T. and Webb, A. J. (2004) Meiotic recombination hot spots and human DNA diversity. *Phil. Trans. R. Soc. Lon. B.* 359, 141–152

- 56 Jeffreys, A. J., Neumann, R., Panayi, M. and Donnelly P. (2005) Human recombination hot spots hidden in regions of strong marker association. *Nat. Gen.* 37, 601–606
- 57 Akhmedov, A. T., Frei, C., Tsai-Pflugfelder, M., Kemper, B., Gasser, S.M., Jessberger, R. (1998) Structural Maintenance of Chromosomes Protein C-terminal Domains Bind Preferentially to DNA with Secondary Structure. *J. Biol. Chem.* 273, 24088–24094
- 58 Lobachev, K. S., Rattray, A. and Narayanan, V. (2007) Hairpin- and cruciform-mediated chromosome breakage: causes and consequences in eukaryotic cells. *Front. Biosci.* 12, 4208–4220
- 59 Valdeolillos, A. M., Viera, A., Page, J., Prieto, I., Santos, J. L., Parra, M. T., Heck, M. M. S., Martínez-A, C., Barbero, J. L., Suja, J. A. and Rufas, J. S. (2007) Sequential loading of cohesin subunits during the first meiotic prophase of grasshoppers. *PLoS Genet.* 23, 0204–0215
- 60 Lammers, J. H. M., Offenber, H. H., van Aalderen, M., Vink, A. C. G., Dietrich, A. J. J. and Heyting, C. (1994) The gene encoding a major component of the lateral elements of the synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol. Cell Biol.* 14, 1137–1146
- 61 Dobson, M. J., Pearlman, R. E., Karaiskakis, A., Spyropoulos, B. and Moens, P. B. (1994) Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J. Cell Sci.* 107, 2749–2760
- 62 Offenber, H. H., Shalk, J. A., Meuwissen, R. L., Van Aalders, M., Kester, H. A., Dietrich, A. J. and Heyting, C. (1998) SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Res.* 26, 2572–2579
- 63 Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Hodges, C. A., Hunt, P. A., Liebe, B., Scherthan, H. and Jessberger, R. (2004) Cohesin SMC1 β is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat. Cell Biol.* 6, 555–562
- 64 Novak, I., Wang, H., Revenkova, E., Jessberger, R., Scherthan, H. and Höög, C. (2008) Cohesin Smc1 beta determines meiotic chromatin axis loop organization. *J. Cell Biol.* 180, 83–90
- 65 Pelttari, J., Hoja, M. R., Yuan, L., Liu, J. G., Brundell, E., Moens, P., Santucci-Darmanin, S., Jessberger, R., Barbero, J. L., Heyting, C. and Höög, C. (2001) A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells. *Mol. Cell Biol.* 21, 5667–567
- 66 Giuffra, E., Törnsten, A., Marklund, S., Bongcam-Rudloff, E., Chardon, P., Kijas, J. M. H., Anderson, S., Archibald, A. L. and Andersson, L. (2002) A large duplication associated with dominant white color in pigs originated by homologous recombination between LINE elements flanking *KIT*. *Mamm. Gen.* 13, 569–577
- 67 De La Fuente, R., Baumann, C., Fan, T., Schmidtman, A., Dobrinski, I. and Muegge, K. (2006) Lsh is required for meiotic chromosome synapsis and retrotransposon silencing in female germ cells. *Nat. Cell Biol.* 8, 1448–1454
- 68 Marcon, E., Babak, T., Chua, G., Hughes, T. and Moens, P. B. (2008) miRNA and piRNA localization in the male mammalian meiotic nucleus. *Chromosome Res.* 16, 243–260
- 69 Lippman, Z. and Martienssen, R. (2004) The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 431, 364–370
- 70 Avner, P. and Heard, E. (2001) X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nature Rev. Genet.* 2, 59–67
- 71 Rodríguez-Campos, A. and Azorín, F. (2007) RNA is an integral component of chromatin that contributes to its structural organization. *PLoS ONE.* 2: e1182
- 72 Conley, A. B., Millar, W. J. and Jordan, I. K. (2008) Human cis natural antisense transcripts initiated by transposable elements. *Trends Genet.* 24, 53–56
- 73 Turner, D. J., Miretti, M., Rajan, D., Fiegler, H., Carter, N. P., Blayney, M. L., Beck, S. and Hurles, M.E. (2008) Germline rates of de novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. *Nat. Genet.* 40, 90–95

To access this journal online:
<http://www.birkhauser.ch/CMLS>

Synaptonemal complex stability depends on repressive histone marks of the lateral element associated repeat sequences.

Submitted to: PLOS Genetics

Hernández-Hernández A.^{1,2}, Ortiz R.¹, Ubaldo E.¹, Echeverría Martínez OM.¹, Vazquez-Nin G.¹, * and Recillas-Targa F.^{2,*}

¹Laboratorio de Microscopía Electrónica, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México D.F., C.P. 04510, México, ²Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Genética Molecular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México D.F., C.P. 04510, México.

*Corresponding author:

- Felix Recillas-Targa
- Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Genética Molecular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, México D.F. 04510, México.
- Phone: (52 55) 56 22 56 74.
- Fax: (52 55) 56 22 56 30.
- E-mail: frecilla@ifc.unam.mx

*Corresponding author:

- Gerardo H. Vázquez-Nin
- Laboratorio de Microscopía Electrónica, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México D.F. 04510, México

- Phone number: (52 55) 56 22 48 81
- Fax: (52 55) 56 22 48 28
- E-mail: ghvn@hp.fciencias.unam.mx

Key words: Synaptonemal complex (SC), Lateral element associated repeat sequences (LEARS), Trichostatin A (TSA), Histone desacetylases (HDACs)

Summary.

Synaptonemal complex is the central key structure for meiosis in sexual reproduction organisms. During meiotic prophase I the homologous chromosomes align, pair and exchange genetic information at the time they are attached to the SC's lateral elements. We have previously reported that chromatin loops of homologous chromosomes are anchored to the lateral elements by specific DNA sequences. These sequences include exclusively repeat DNA, which is subject to chromatin structure changes during meiotic prophase I. Thus, an epigenetic mechanism to recruit repeat DNA sequences to lateral elements may be critical for the meiotic prophase I to progress. As an initial approach to this issue we addressed the effect of altering chromatin structure, in repeat DNA sequences mediating anchorage to the SC's lateral element. Administration of the histone deacetylase inhibitor trichostatin into live rats caused death of cells in pachytene stage and changes in histone marks along the synaptonemal complex. The most notorious effect was partial loss of histone H3 lysine 27 tri-methylation. Our work describes the epigenetic landscape of lateral element-associated chromatin and reveals a critical role of histone marks in synaptonemal complex integrity.

Introduction

Meiosis gave rise to sexual reproduction and therefore genetic variability by homologous chromosomes recombination. Such recombination occurs in the context of the synaptonemal complex (SC), which is a proteinaceous structure that keeps together the chromatin of homologous chromosomes until they exchange genetic material (Page and Hawley, 2004). Homologous chromosomes are anchored to the SC's lateral elements (LEs). Analysis of DNA associated to the synaptonemal complex protein 3 (SYCP3) demonstrated enrichment of repeat DNA sequences, which locate in the SC's LE, as well as in the bulk of the chromatin, as shown by *in situ* hybridization (Hernández-Hernández et al., 2008). Features in the primary structure of lateral element associated-repeat sequences (LEARS) did not reveal any obvious consensus sequence, suggesting that secondary structure might be responsible for recruitment of LEARS to the SC's LE. In somatic cells most of these transcriptionally inactive repeat sequences are subject to epigenetic modification favoring their organization in heterochromatin (Martens et al., 2005). Further, chromatin structure dictated by epigenetic modifications during meiosis is critical for an accurate SC assembly and meiosis progression (Hernández-Hernández et al., 2008b). Therefore, it is possible that specific epigenetic modifications affecting the LEARS influence their interaction with LEs and impinge on the SC structure. In this work, we investigated the epigenetic profile of LEARS in the SC context by analyzing a sub-set of histone post-translational modifications. Furthermore, we addressed the effect of *in vivo* inhibition of histone deacetylases on the SC structure. Our results suggest that certain histone marks are indeed needed for the anchorage of chromosomes to

the SC's LEs; moreover the, loss of the interaction between DNA and the LEs is accompanied by alteration in the SC's proteinaceous structure.

Results

Epigenetic landscape of lateral elements associated-repeat sequences

In somatic cells, the chromatin of repeat DNA sequences associated to the SC, is target of several post-translational histone modifications mainly associated to compact chromatin configuration (Martens et al., 2005). Furthermore, during the meiotic prophase I nuclei present a dynamic chromatin structure. Thus, the chromatin associated to the SC's LE could influence SC formation. Hence, we decided to perform immunolocalization assays to identify the histone post-translational marks associated to LEARS. We use antibodies against histone marks associated with relaxed or compact chromatin configurations. Mono-methylation of histone H3 at lysines 9 and 27; and histone H4 at lysine 20 (H3K9me1, H3K27me1, and H4K20me1, respectively) are epigenetic marks associated to relaxed chromatin (Barski, 2007). In contrast, di-methylation of the same residues (H3K9me2, H3K27me2, and H4K20me2, respectively) is associated to facultative heterochromatin, while the tri-methylated states (H3K9me3, H3K27me3, and H4K20me3, respectively) are found in constitutive heterochromatin and in the majority of repeat elements (Martens et al., 2005; Barski, 2007). Our results indicate that the nuclear distribution of H3K9me1 and H3K9me2 was homogeneous in spermatogenic cells in pre-leptotene stages, which were identified by the cellular association at the different stages of the cycle of seminiferous epithelium (CSE) (Clermont, 1972), where SYCP3 is still not detected (Figs. S2, S3). At the time the SC is formed at pachytene stage, as

evidenced by the presence of thread-like structures of SYCP3, the mentioned histone marks appear to be absent from the SC core; however, they were found in the surrounding chromatin (Figs. S2, S3). H3K9me2 was observed in the chromatin of the sexual chromosomes (XY body) as expected, (data not shown) because of the presence of facultative heterochromatin in this structure (Khalil et al., 2004). H3K9me3 distribution was evident as dots along the nuclear periphery in pre-leptotene stage (Fig. 1A-D). When the SC was present (Fig. 1F), the H3K9me3 signal co-localized at the SC's extremity, where the brightest SYCP3 signals were seen (Fig. 1E-H). The colocalizing signals correspond to telomeres anchored to the adhesion plate (Ap) in the nuclear envelope (NE) (Viera et al., 2003). The H3K27me2 staining pattern was similar to the one observed for H3K9me1 (Figs. S2, S3), whereas H3K27me1 was homogeneously distributed in the pre-leptotene stage nuclei (Fig. S2). Once the SC is assembled at pachytene stage, this signal was relocated towards the nuclear periphery, but did not co-localize with either the SC or surrounding chromatin (Fig. S2). The most remarkable observation came from H3K27me3, which presence was not evident in pre-leptotene stages (Fig. 1I-L). H3K27me3 signal appearance coincided with SC assembly, moreover, it co-localized with SYCP3 in several points along the SC's LEs (Fig. 1M-P). H4K20me1 in pachytene stage was found at the SC's chromatin loops (Fig. S2). The signal obtained with H4K20me2 antibody was scarce in pre-leptotene and pachytene stages (Fig. S3). H4K20me3 was visible in pachytene stage at the telomeres of the SC anchored to the nuclear envelope (Fig. 1U-X).

These results show that H3K9me1, H3K9me2, H3K27me2, H4K20me1 and H4K20me2 localize at the SC's chromatin loops, while H3K9me3 and

H4K20me3 localize at the telomeric portion of the chromosomes anchored to the SC and to the NE through the Ap (Fig. 8A). Interestingly, H3K27me3, which was not present in pre-leptotene stages, appeared to co-localize with segments of the LE. These results suggest the possible involvement of the repressive chromatin structure associated with H3K9me3, H4K20me3 and H3K27me3 in the SC formation.

Histone deacetylases inhibition causes damage in pachytene cells

It has been previously reported that inhibition of histone deacetylases (HDACs) is associated with infertility, meiosis impairment and arrest of meiocytes in pachytene stage (Fenic et al., 2004; Fenic et al., 2008). Inhibition of HDACs impedes deacetylation and therefore methylation of histones, what interferes with the formation of heterochromatin (Ekwall et al., 1997) potentially affecting the SC formation. As a first approach to this question, we tested whether inhibition of HDACs affect the incorporation of repeat sequences to the SC's LE, To this end we treated rats with TSA (Fenic et al., 2004; Fenic et al., 2008) and analyzed the SC structure of meiotic cells. As expected, meiotic cells in seminiferous tubules undergo apoptosis (Fig. S4A-F). To identify the affected cells, we analyzed histological sections of seminiferous tubules. The meiotic stages were determined by the cell association according to the CSE (Clermont, 1972). During stage III of the CSE, cells in early pachytene and spermatids in stages 3 and 16 of spermiogenesis were visible in both control and treated rats (Fig. S4G-L). Interestingly, in treated rats, affected cells were identified in stage IX of the CSE, a moment in which spermatids in step 9 of spermiogenesis or medium pachytene cells are present in control and treated rats (Fig. S4H, K).

These results indicate that early pachytene cells do not progress to medium pachytene in TSA treated rats (Asterisk in Fig. S4K). In contrast, at stage XIII of CSE, cells were found unaffected (Fig. S4L). These results corroborate that HDACs inhibition affects pachytene cells as reported by Steger's group (Fenic et al., 2004; Fenic et al., 2008).

The epigenetic code is important for the SC structure

Our results suggest that the H3K9me3, H3K27me3 and H4K20me3, present in the SC's LE, could play a role in establishment of the LEARS chromatin structure. Inhibition of HDACs negatively affects the activity of histone methyltransferases, what induces increase in H3 and H4 acetylation. This interferes with heterochromatin establishment (Ekwall et al., 1997) without affecting expression of genes required for meiosis (Fenic et al., 2008), but potentially compromising the SC formation. Furthermore, we observed that only pachytene cells are affected in rats in which HDAC activity was inhibited by TSA treatment (Fig. S4). Thus, we decided to address whether chromatin structure disruption, by means of TSA-mediated HDACs inhibition, affects the SC structure. Gonad tissue sections obtained from control and treated rats were stained with antibodies against SYCP1 and SYCP3 to evaluate the structure of central and lateral components of the SC (Fig. 2). Control sections show a normal seminiferous tubule structure (Fig. 2A-D) in contrast to that observed in seminiferous tubules where the structure was affected by the presence of pachytene cells at the lumen of the tubule (Fig. 2L-O). This distribution was observed in most of the treated tubules in stages IX-XI of the CSE. In SCs of control sections, the previously establishment of SYCP1 and SYCP3 was

shown indicating the integrity of the SC structure (Fig. 2E-K). In sections of treated rats, many SCs present discontinuities in their staining patterns (Fig. 2P-V), the signal of SYCP1 protein was discontinuous (arrowheads in Fig. 2U, V), whereas SYCP3 staining was uniform (arrows in Fig. 2T, V) suggesting a partial failure in the SC structure associated to chromatin structure defects and CR dissociation. Two different features were detected in the SC structure of TSA-treated rats. First, some pachytene cells present defects in the staining pattern of SYCP1, whereas SYCP3 distribution appeared to be normal (Compare Figs. S5A-F and S5G-I). Second, SYCP3 and SYCP1 staining patterns in the SCs were affected. SYCP3 showed discontinuities in its pattern, while SYCP1 was absent (Fig. S5J-L). These differences in the SYCP3 and SYCP1 staining patterns could be due, at least in part, to the stage of the cycle of seminiferous epithelium and/or a TSA dosage-dependent effect, since we use a dosage that does not affect all the pachytene cells (Fenic et al., 2004).

With the aim to determine the ultrastructural SC's abnormalities due to TSA-mediated chromatin configuration disruption, we analyzed serial sections of TSA-treated rat gonads by electron microscopy and observed the SC's structure. We found a high frequency of unpaired and fragmented LEs (data not shown), and when discernible, SC presented altered component's structure (Fig. 3). In the serial section 1, the SC appears in its tripartite structure (arrows Fig. 3, s1). In the section 2, the SC undergoes a separation of its LEs at one on its ends and the CR is no more visible, whereas the two separated LEs are anchored to the nuclear envelope (NE) (arrows in Fig. 3, s2). The other end of the SC is also anchored to the NE (arrows in Fig. 3, s3-s7). The altered SC structure is more evident in a superposition of all slides (Fig. 3, 3D). These

results show ultrastructural defects in the SC structure of TSA-treated rat gonad. Thus, TSA-mediated HDACs inhibition correlates with partially altered SC structure presumably caused, at least in part, by chromatin configuration defects and SYCP1 dissociation.

Histone deacetylation inhibition correlates with loss of association of repeat DNA to the SC

To further characterize the effect of TSA-mediated disruption of chromatin configuration, via HDACs inhibition, on the SC structure, we addressed the interaction of LEARS with the SC's LE by ChIP assays as previously reported (Hernández-Hernández et al., 2008). LEARS comprise LINE-, SINE-, LTR- and satellite repeat sequences. Our ChIP analyses revealed that TSA treatment did not affect the enrichment of LINE and satellite repeat sequences in SYCP3-associated chromatin. In contrast the association of SINE and LTR sequences with the SC's LE through SYCP3 appeared to be diminished (Fig. 4). To confirm this observation, we performed ultrastructural preferential DNA staining in control and treated rats (Fig. 5). Pachyte cells were determined according to the cellular association in the CSE in both control and treated rats. In a longitudinal view of control SCs, the DNA is visible at both sides of the LE's middle part in control animals (arrows in Fig. 5A, C) as previously reported (Ortiz et al., 2002), whereas in TSA-treated pachytene cells, there was a drastic DNA staining decrease at the LE's middle part (arrowheads in Fig. 5B, D). However, the signal did not completely disappear, (arrows in Fig. 5B, D), suggesting a partial loss association of DNA to the LE. Interestingly, late pachyte cells present an altered and damage SC structure that we interpreted as cells in death process

(data not shown). These results are consistent with our ChIP assays, which shown that the association of SINE and LTR sequences to the LE was lost, whereas the LINE and satellite sequences remain attached to the LE in TSA-treated rats (Fig. 4). Therefore, our results support the idea that chromatin structure alteration via histone deacetylation inhibition, affects the anchorage of a specific sub-set of repeat DNA sequences to the SC's LE, therefore disrupting the SC structure.

Particular histone post-translational modifications are affected after TSA treatment.

The fact that chromatin structure disruption affects the repeat DNA interaction with the SC's LE led us to analyze the distribution of different histone marks of the SC-associated chromatin in pachytene cells. The distribution of H3K9me3 and H4K20me3 was similar in control and treated rats (Fig. 6A-H, Q-W). In contrast, the H3K27me3 distribution was clearly affected in treated animals (Fig. 6I-P). The co-localization of such histone mark with the SC observed in control pachytene cells (Fig. 6L) was lost in TSA-treated rats (Fig. 6P).

We further looked for the presence of characteristic histone marks associated to the LEARS in the SC's context, and addressed whether such marks are affected in TSA-treated rats (Fig. 7). To this end, we performed Re-ChIP assays over immunoprecipitated chromatin using an anti-SYCP3 antibody, employed to pull down the LEARS and associated proteins. The chromatin IP was evaluated by duplex PCRs to determine the presence of histone marks associated to control SCs and their alteration after HDACs inhibition (Fig. 7). The resulting immunoprecipitated DNA was analyzed by

PCR. Results were normalized with values obtained from amplification of DNA associated to histone H3 (acH3), which is not present in LEs. We employed an IgG-recognizing antibody (Rincon-Arano et al., 2007) as mock. Analysis in untreated rats revealed that H3K9me3 and H4K20me3 associate preferentially with LINE and satellite repeats, and satellite sequences, respectively. Instead, H3K27me3 was found to be enriched in SINE and LTR repeat sequences (Fig. 7). A decrease of H3K9me3 was observed in SYCP3-associated satellite repeat sequences, while H4K20me3 levels were diminished in LINE and satellite repeat DNA in TSA treated rats as compared to control animals. Importantly, H3K27me3 was reduced in SINE and LTR-repeat sequences in treated rats (Fig. 7). These results are consistent with the immunofluorescence analyzes showing that the H3K27me3 distribution was dramatically affected in treated rats (Fig. 6). In addition, the ChIP-ReChIP assays support the fact that, in TSA treated rats, the LEARS's SINE and LTR detach from the LE (Figs. 4, 5) due to partial loss of H3K27me3 (Fig. 7). In summary, the chromatin structure associated to LEARS is important for the LE structure. Furthermore, the differential distribution of histone marks over the LEARS, suggest the existence of an epigenetic code underlying the LE-chromatin structure.

SC structure in TSA-treated pachytene cells is not affected by failures in the repair process of DSBs

The SC formation can be affected by failures in DNA double strand breaks (DSBs) and in their repair process (Vallente et al., 2006; Bolcun-Filas et al., 2007), therefore we monitored the presence of the phosphorylated histone variant H2AX (H2AX γ), that is recruited to the DNA DSBs as damage respond.

The signal of H2AX γ was present in leptotene cells either in control (Fig. 8A and B) or in TSA-treated rats (Fig. 8C and D) when short SYCP3 thread-like structures are discernible (Fig. 8A-D). Furthermore, this histone H2AX γ is re-located to the heterochromatin of the XY body in pachytene stage of control rats, as expected (Fig. 8E and F). Moreover H2AX γ is not present in the XY body in pachytene cells of treated rats (Fig. 8G and H), suggesting failures in the formation of the heterochromatin of the XY body. This result provides additional evidences of the effects of TSA treatment in the heterochromatin formation.

Furthermore, DMC1 is a meiotic repair protein loaded to the DSBs to repair them during leptotene-zigotene stages and disappears at pachytene stage. We found that DMC1 signal was present in leptotene cells in either control (Fig. 8I and J) or TSA-treated rats (Fig. 8K and L). At pachytene stages, the signal of DMC1 is not more visible in any case (Fig. 8M-P). Taking together these results, we confirm that the failure in the SC structure is due to the LEARS dissociation of the SC and not due to failures in others pathways as DNA DSBs and their repair.

Discussion

Meiotic recombination represents a central process in which chromatin structure, the synaptonemal complex and epigenetic components are playing an active role. In this work, we have characterized the histone post-translational modifications that are present in the lateral element associated repeat sequences. We performed immunolocalization of H3K9, H3K27 and H4K20 at pre-pachytene and pachytene stages. We found that tri-methylated histones are

important for the SC formation. The H3K9me3 distribution near to the periphery of the pre-pachytene nucleus resembles the association of telomeric sequences to the NE (Viera et al., 2003). This mark is already present in the telomers of chromosomes at pre-pachytene stage (Fig. 1D) and persists even after the SC's assembly (Figs. 1H, 9A). H4K20me3, which marks constitutive and facultative heterochromatin (Benetti et al., 2007), was detected in pachytene, presenting the same distribution as H3K9me3 (Fig. 9A). Conversely, H3K27me3, which is found in either constitutive or facultative heterochromatin (Benetti et al., 2007; Barski et al., 2007), appeared at pachytene stage, colocalizing with large regions of the SC (Figs. 1P, 9A). These distribution patterns in addition to the fact that H3K9me3 interacts *in vivo* with SYCP3 in the LINE sequences suggest that this mark could be relevant for the SC formation and/or structure maintenance. This idea is further supported by studies where knockdown of Suv39h and G9a histone methyltransferases caused synapsis failure between homologous chromosomes (Peters et al., 2001; Tachibana et al., 2007). Additionally, H4K20me3 appears at pachytene co-localizing with the SC's ends: therefore this mark could also play a role in the SC formation (Fig. 1X). Indeed, chromatin that incorporates this modified histone interacts *in vivo* with LINE and Satellite-sequences through SYCP3 (Fig. 7).

The H3K27me3 distribution during pachytene, and its absence at pre-pachytene stage represent one of the most relevant findings of our investigation. At the time when the SC is formed this histone mark is incorporated to large domains of the SC's LEs (Figs. 1P, 9A). SINE and LTR were the only sequences associated with this histone mark, which is remarkably lost after TSA treatment. Moreover, these sequences form part of the SC's LE

as shown by ChIP assays (Fig. 4). These data suggest that H3K27 trimethylation in SINE and LTR sequences is as a pre-requisite for incorporation to the SC, which is consequently abolished when chromatin structure disruption is induced (Fig. 9B). This could also explain the partial DNA loss in the SC's LEs (Fig. 5).

We found that H4K20me3 is enriched in LINE sequences forming part of the LEARS, and that such histone mark is disturbed after TSA treatment without affecting the association of LINE sequences with the SC (Fig. 7). The same phenomenon was seen for Satellite-sequences, which are enriched in H3K9me3 and H4K20me3 (Figs. 4 and 7), therefore loose of H3K9me3 in LINE sequences, and H3K9me3 and H4K20me3 in satellite sequences does not affect their attachment to the SC's LE. Conversely, H3K273m seems to be critical for maintaining the association of SINE- and LTR-sequences with the LE.

Co-localization of H3K27me3 with the SC is lost upon TSA-mediated chromatin structure disruption in rats. However, the cytological distribution of H3K9me3 and H4K20me3 was not affected after TSA treatment (Fig. 6); notwithstanding such marks were decreased in LINE- and satellite-sequences, respectively (Fig. 7). Neither LINE- nor Satellite-sequences lost SYCP3 protein enrichment. Therefore, it seems unlikely that the H3K9me3 and H4K20me3 diminishment in LINE- and satellite-sequences interferes with their incorporation to the SC. The cytological distribution of these marks is not affected perhaps because they are present in constitutive telomeric heterochromatin, composed mainly of telomeric DNA repeats. Further studies attempting to elucidate the mechanisms by which all the LEARS are recruited to the SC are needed.

With all these results we propose a model in which the LE's chromatin composition play a central role in the SC formation and structure (Fig. 9). In such model H3K9me3 and H4K20me3 are associated to the end of the SC, presumably to the telomeric domain and to the region involved in anchorage with the NE. While H3K27me3 is present along extended tracts of the LE, it preferentially associates with SINE- and LTR-sequences. The destabilization of this histone mark produces detachment of chromatin, mainly SINE- and LTR-repeat sequences, from the LE; while the association of H3K9me3 and H4K20me3 to the extremity of the SC by SYCP3 is not altered (Fig. 6D-H, T-W). This is accompanied by alteration of the SC's central region (CR) what could in turn favor telomere separation as evidenced by Y-like shape structures observed by optical (Fig. 9C-G) and electron microscopy (Fig. 9H).

Previous studies have shown that treatment of mice with the histone deacetylase inhibitor TSA impairs meiosis at two points, in pachytene stage and in spermatids (Fenic et al., 2004). Recently the same research group has shown that pachytene cell death was not originated by down-regulation of meiosis specific genes (Fenic et al., 2008). Our results support the idea that the damage in pachytene cells is induced by alteration of specific epigenetic patterns associated to the LEARS.

Material and methods

Animal care and treatment

Wistar adult male rats were split into groups A, B and C, containing two rats each. Rats from group A were treated with 2.4 mg/kg of the histone deacetylases inhibitor Trichostatin A (TSA, Sigma), which was administered

daily by subcutaneous injection as previously reported (Fenic et al., 2004). TSA was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma) to obtain a 20 mg/ml stock solution. Animals from group B received DMSO diluted in PBS without TSA and served as control, while group C represented untreated control animals. Animals were treated for 9 days, which correspond to the time of leptotene to pachytene stage progression in the rat seminiferous cycle (Adler, 1996). Therefore, the pachyten cells found at the 9th day of treatment, are pachytene cell that have been daily treated since leptotene stage. Rats were sacrificed and testis were excised and split to perform three different procedures (Fig. S1). In the manipulation of the animals we followed the ethical guidelines as recommended in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Guide Line for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996)

Immunofluorescence and histochemistry

Testes were fragmented in small pieces and cryofixed with prechilled isopentane embedded in liquid nitrogen. Samples were sectioned immediately in a cryostat (Leica) and mounted in poly-L-lysine (Sigma) treated slides. Immunolocalizations were performed in a humid chamber employing the following antibodies: anti-SYCP3, anti-SYCP1 (Kindly provided by Ricardo Benavente), anti-H3K9me1, anti-H3K9me2, anti-H3K9me3, anti-H3K27me1, anti-H3K27me2, anti-H3K27me3, anti-H4K20me1, anti-H4K20me2, anti-H4K20me3 (some of them kindly provided by Thomas Jenuwein and others purchased from Abcam), anti-H2AX γ (upstate) and anti-DMC1 (Abcam). Antibodies were diluted 1/200 in PBS. Primary antibodies were detected with fluoresceince-coupled or texas red-coupled Alexa fluor (Invitrogen) secondary

antibodies in a 1/200 dilution. Slides were counterstain with 100 µg/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Slides were rinsed with PBS-Tween, mounted with Vectashield mounting medium (VECTOR) and analyzed in an Apotome equipped microscope (Carl Zeiss). Optical sections were analyzed with the Axiovision software. For histochemistry, small fragments of testis were fixed in Bouin fixative and embedded in paraffin using standard techniques. Five micrometers paraffin sections were stained with hematoxylin-eosin.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) and Re-ChIP

Chromatin immunoprecipitation was performed as reported (Hernández-Hernández et al., 2008). For the Re-ChIP assay briefly; a first chromatin immunoprecipitation was done with anti-SYCP3 antibody and the immunocomplex was precipitated employing sepharose beads-coupled A/G proteins. Then the immunocomplex was washed as reported (Hernández-Hernández et al., 2008). Before DNA extraction and crosslink reversal, the immunocomplex was dissociated adding 10 mM DTT and the beads were pelleted and discarded. Then, protein-DNA complexes were re-immunoprecipitated with 5 µg of the following antibodies: anti-H3 acetylated, anti-H3K9me3, anti-H3K27me3 and anti-H4K20me3. Next, immunocomplexes were pulled-down using sepharose beads-coupled A/G proteins and washed. The eluted DNA was employed as template in radioactive PCRs as previously reported (Hernández-Hernández et al., 2008)

Electron microscopy preferential staining

Rat seminiferous tubules fragments of 1 mm³ were fixed in 2.5% glutaraldehyde for 1 hour, rinsed with PBS, dehydrated and embedded in epoxy resin. After 24 hours of polymerization at 65°C, the resin blocks were cut in an ultra microtome (Leica Instruments). Pachytene cells were determined according to the cellular associations of the cycle of seminiferous epithelium in semi-fine sections. Once identified the pachytene cells, the blocks were cut in ultra-fine sections of approximately 60 nm in width. Sections were collected in sjostran nickel grids and mounted on a formvar film. Grids were split for the contrast methods. For general staining, the grids were contrasted with uranyl acetate for 10 minutes and lead citrate for 5 minutes. Samples were observed in a transmission electron microscope (JEOL 1010). DNA was stained using the osmium-ammine procedure (Cogliati and Gautier, 1973).

Acknowledgements

We would like to thank Paul Delgado-Olguín and members of our research group for stimulating scientific discussions and suggestions. AHH is a fellowship recipient from the Posgrado en Ciencias Biológicas, CONACyT (181375). This work was supported by grants from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (IN209403 and IN214407) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-CONACyT (42653-Q and 58767) to FRT. CONACyT (81213), DGAPA-PAPIIT (IN203308-3) to GHVN. We also acknowledge the excellent technical assistance of Georgina Guerrero Avendaño.

References

1. **Adler, I.D.** (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mutat Res.* **352**, 169-172.
2. **Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I. and Zhao, K.** (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**, 823-837.
3. **Benetti, R., García-Cao, M. and Blasco, M.A.** (2007). Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres. *Nat. Genet.* **39**, 243-250.
4. **Bolcun-Filas, E., Costa, Y., Speed, R., Taggart, M., Benavente, R., De Rooij, D.G. and Cooke, H.J.** (2007). SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. *J. Cell Biol.* **176**, 741-747.
5. **Clermont, Y.** (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* **52**, 198-236.
6. **Cogliati, R. and Gautier, A.** (1973). Mise en évidence de l'ADN et des polysaccharides á l'aide d'un nouveau réactif de type Schiff. *C R Acad Sci D.* **276**, 3041-3044.
7. **Ekwall, K., Olsson, T., Turner, B.M., Cranston, G. and Allshire, R.C.** (1997). Transient inhibition of histone deacetylation alters the structural and functional imprint at fission yeast centromeres. *Cell* **91**, 1021-1032.
8. **Fenic, I., Sonnack, V., Failing, K., Bergmann, M. and Steger, K.** 2004. In vivo effects of histone-deacetylase inhibitor trichostatin-A on murine spermatogenesis. *J. Androl.* **25**, 811-818.

9. **Fenic, I., Hossain, H.M., Sonnack, V., Tchatalbachev, S., Thierer, F., Trapp, J., Failing, K., Edler, K.S., Bergmann, M., Jung, M., Chakraborty, T. and Steger, K.** (2008). In vivo application of histone deacetylase inhibitor trichostatin-A impairs murine male meiosis. *J. Androl.* **29**, 172-185.
10. Guide Line for the Care and Use of Laboratory Animals. (1996). The National Academies Press, Washington, DC, pp. 1-140.
11. **Hernández-Hernández, A., Rincón-Arano, H., Recillas-Targa, F., Ortiz, R., Valdes-Quezada, C., Echeverría, O.M., Benavente, R. and Vázquez-Nin, G.H.** (2008). Differential distribution and association of repeat DNA sequences in the lateral element of the synaptonemal complex in rat spermatocytes. *Chromosoma* **117**, 77-87.
12. **Hernández-Hernández, A., Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O.M. and Recillas-Targa, F.** (2008b). Chromatin structure contribution to the synaptonemal complex formation. *Cell. Mol. Life Sci.* Accepted.
13. **Khalil, A.M., Boyar, F.Z. and Driscoll, D.J.** (2004). Dynamic histone modifications mark sex chromosome inactivation and reactivation during mammalian spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 16583-16587.
14. **Martens, J.H.A., O'sullivan, R.J., Braunschweig, U., Opravil, S., Radolf, M., Steinlein, P. and Jenuwein, T.** (2005). The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO J* **24**, 800-812.
15. **Ortíz, R., Echeverría, O.M., Ubaldo, E., Carlos, A., Scassellati, C. and Vázquez-Nin, G.H.** (2002). Cytochemical study of the distribution of the

- RNA and DNA in the synaptonemal complex of guinea-pig and rat spermatocytes. *Eur. J. Histochem.* **46**, 133-142.
16. **Page, S.L. and Hawley, R.S.** (2004). The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 525-558.
17. **Peters, A.H.F.M., O'Caroll, D., Schertan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schöper, C., Welpoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., Opravil S., Doyle, M., Sibilias, M. and Jenuwein, T.** (2001). Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* **117**, 323-337.
18. **Rincón-Arano, H., Furlan-Magaril, M. and Recillas-Targa, F.** (2007). Protection against telomeric position effects by the chicken cHS4 β -globin insulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 14044-14049.
19. **Tachibana, M., Nozaki, M., Takeda, N. and Shinkai, Y.** (2007). Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression. *EMBO J.* **26**, 3346-3359.
20. **Vallente, R.U., Cheng, E.Y. and Hassold, T.J.** (2006). The synaptonemal complex and meiotic recombination in humans: new approaches to old questions. *Chromosoma* **115**, 241-249.
21. **Viera, A., Parra, M.T., Page, J., Santos, J.L., Rufas, J.S. and Suja, J.A.** (2003). Dynamic relocation of telomere complexes in mouse meiotic chromosomes. *Chromosome Res.* **11**, 797-807.

Figure legends.

Fig. 1. Optical sections of the cryosections with the immunolocalization for H3K9me3, H3K27me3 and H4K20me3 (met) in pre-leptotene and pachytene cells. SYCP3 immunodetection was used to evidence the SCs (red). SYCP3/met indicates the merged signals. Nuclei were stained with DAPI staining. Barr corresponds to 10 μm . A-D, I-L and Q-T correspond to pre-pachytene cells. E-H, M-P and U-X correspond to pachytene cells.

Fig. 2. Immunofluorescence of SYCP3 and SYCP1 in sections of gonad tissue of control and TSA treated rats. A-K, Control rats, L-V, treated rats. A-D, normal morphology of seminiferous tubule. Barr represents 50 μm (50 μm). A and E, cell nuclei were stained with DAPI and SC components are evidenced by SYCP3 (green) and SYCP1 (red). Co-localization signals in yellow (merge) are shown. I-K, digital zooms of insets in F-H, respectively, showing the continuous signals of SYCP3 and SYCP1 and their co-localization (arrows). Barr in E-H represents 10 μm . L-O, altered morphology of seminiferous tubule in the TSA-treated rats, pachytene cells are visible in the lumen of the tubule. L and P, pachytene nuclei were stained with DAPI and SC components are evident by SYCP3 (green) and SYCP1 (red). Co-localization signals in yellow are shown (merge). T-V, digital zooms of insets in Q-S, respectively, showing the continuous signals of SYCP3 and SYCP1, their co-localization (arrows) and the discontinuities in SYCP1 signal (arrowheads). Bar in P-S represent 10 μm .

Fig. 3. Reconstruction of a SC in a TSA treated rat. Serial sections 1-7 (s1-s7) correspond to electron micrographs of an altered SC in a pachytene cell. Arrows show the SC in the different sections. r1-r7, drawings of the SC (arrows) in the serial sections. Lateral elements are shown in green, whereas the central region is in red. The drawings in r1-r7 were merged to reconstruct (3D) the altered SC attached to the nuclear envelope. Bar represents 500 nm.

Fig. 4. TSA-mediated chromatin disruption affects the interaction of specific LEARS with the SC. Chromatin immunoprecipitation from TSA untreated and treated rats. In order to determine linear range amplification conditions, radioactive duplex PCR amplification of repeat sequences (LINE-, SINE-, LTR- and Satellite-repeats), as well as the actin coding sequence (Actin), included as control for relative quantification, were performed using increasing concentrations of genomic DNA (Input) (lines 1-4). Duplex PCR amplifications were then performed using as template DNA immunoprecipitated with an anti-SYCP3 antibody in gonad tissue from control (line 9) and treated rats (line 10). An anti-IgG (mock) (lines 7 and 8) and the immunoprecipitation reagent (beads) (lines 5 and 6) were included as negative controls. Data are shown as relative enrichment of the repeat sequence over the actin gene coding sequence, to which the value of one was obtained from the repeat/actin ratio in the Input chromatin. Results represent three independent immunoprecipitations. Bars represent S.E. Asterisks show statistically significant differences in enrichment of the SYCP3-bound LEARS.

Fig. 5. Electron micrographs of SCs evidenced by preferential staining for DNA. A and C. DNA in the SC of a control rat is seen as a network (arrows) in the thickness of the LE (indicated by parallel lines), whereas in treated rats, B and D, the DNA in the thickness of the LE appears diffuse (arrowheads). Barr represents 100 nm.

Fig. 6. Optical sections of the cryosections with the immunofluorescence for the indicated histone post-translational modifications associated to the SC. A-D, I-L and Q-T correspond to controls, whereas E-H, M-P and U-W correspond to TSA treated rats. Bar represents 10 μ m.

Fig. 7. TSA-mediated chromatin disruption affects the interaction of specific histone marks with the LEARS and the SC's LEs. Re-ChIP assay from TSA untreated and treated rats. In order to determine linear range amplification conditions, radioactive duplex PCR amplification of repeat sequences (LINE-, SINE-, LTR- and Satellite-repeats), as well as the actin coding sequence (Actin), included as control for relative quantification, were performed using increasing concentrations of genomic DNA (Input) (lines 1-4). Duplex PCR amplifications were then performed using as template DNA immunoprecipitated with anti-SYCP3 antibody and with the histone mark indicated in gonad tissue from control (lines 5, 7, 9, 11 and 13) and treated rats (lines 6, 8, 10, 12 and 14). Data are shown as relative enrichment of the repeat sequence over the actin gene coding sequence, to which the value of one was obtained from the repeat/actin ratio in the Input chromatin. Results represent three independent immunoprecipitations. Bars represent S.E. Asterisks show the significant *in vivo*

interactions among SYCP3, Repeat sequences and epigenetic modification in control rats (white boxes) and asterisk in dark boxes indicate the significant reduction of *in vivo* interaction after TSA treatment.

Fig. 8. Optical sections of the cryosections. A-H, immunofluorescence for H2AX γ (red) plus SYCP3 (green) in leptotene and pachytene cells of control and TSA-treated rats. I-P, compiled optical sections of the whole nucleus with immunofluorescence for DMC1 (green) plus SYCP3 (red) in leptotene and pachytene cells of control and TSA-treated rats. Bar represents 10 μ m.

Fig. 9. Model of SC structure in control and TSA-treated rats. A, SC of a control rat. The chromatin of homologous chromosomes is anchored to the lateral elements (LE) through lateral elements-associated repeat sequences (LEARS), which chromatin structure is dictated by histone post-translational modifications like H3K9me3, H3K27me3 and H4K20me3. B, Upon inhibition of histone deacetylases, the presence of H3K27me3 in SINE and LTR sequences decreases dramatically, this could favor detachment of such sequences from the SC's LE. This is accompanied by alteration of the SC's central region (CR) what could in turn favor telomere separation as evidenced by Y-like shape structures observed by optical (C-G) and electronic microscopy (H).

Fig. S1. Experimental strategy for TSA administration into rats. The epithelium seminiferous cycle of the rat takes 29.5 days (29.5d). TSA daily administration started at the pre-leptotene stage (10.5d), when the axial elements' formation starts, and continued until 19d, corresponding to the pachytene stage. Rats at

two months (2mt) after birth (0 dab) were divided in three groups (A, B and C) of two animals each one. Rats in group A were treated with 2.4 mg/kg of TSA, whereas rats in group B were injected only with dilution vehicle, and rats in group C were not treated. Meiotic division I and II finish at day 29.5 (MI and MII).

Fig. S2. Immunolocalization of H3K9me1, H3K27me1 and H4K20me1 (met) in pre-pachytene and pachytene cells. SYCP3 immunodetection was used to evidence the SCs (red). SYCP3/met indicates the merged signals. Nuclei were stained with DAPI staining. Barr corresponds to 10 μ m. A-D, I-L and Q-T correspond to pre-pachytene cells. E-H, M-P and U-X correspond to pachytene cells.

Fig. S3. Immunolocalization of H3K9me2, H3K27me2 and H4K20me2 (met) in pre-pachytene and pachytene cells. SYCP3 immunodetection was used to evidence the SCs (red). SYCP3/met indicates the merged signals. Nuclei were stained with DAPI staining. Barr corresponds to 10 μ m. A-D, I-L and Q-T correspond to pre-pachytene cells. E-H, M-P and U-X correspond to pachytene cells.

Fig. S4. supplementary material, TUNEL assay. A, Seminiferous tubules of control rats stained with DAPI; B, TUNEL assay and C, Phases contrast. D, Seminiferous tubules of TSA-treated rats stained with DAPI; E, TUNEL assay and F, Phases contrast. TUNEL assay in E shows more cellular death as compared with control seminiferous tubule in B. Bar represents 50 μ m. G-L,

Hematoxylin-eosin staining of gonad sections showing cells in different stages of the cycle of seminiferous epithelium (CSE). G-I, sections of control rats in stages III, IX and XII of the CSE. J-L, Sections of TSA-treated rats in stages III, IX and XII of the CSE. Early pachytene, eP; Mid pachytene, mP; Diplotene, Di; Zygotene, Z; stages of spermiogenesis 3,9,13,16. Barr corresponds to 10 μm .

Fig. S5. supplementary material, Optical sections Z-stack. A-C, The synaptonemal complexes (SCs) of control rats are evident by SYCP3 staining (green), which marks the lateral elements (LEs). The central region (CR) was stained with anti-SYCP1 (red) antibody. All the thread-like structures present overlapping signals (arrows in merge), excepting the sexual chromosomes, where the LEs are not synapsed, therefore the CR is not present (arrowheads). Analysis of sections obtained from treated rats revealed, three phenomena. D-F, All the LEs (green) are synapsed (red) (arrows), excepting the sexual chromosomes (arrowheads). G-I, Various LEs are not synapsed (arrows). J-L, The LEs present discontinuous staining (arrows) and there is no CR between them (arrows), excepting the sexual chromosomes, where there is abnormal synapsis (data not shown) (arrowheads). Barr represents 10 μm .

Fig. 1

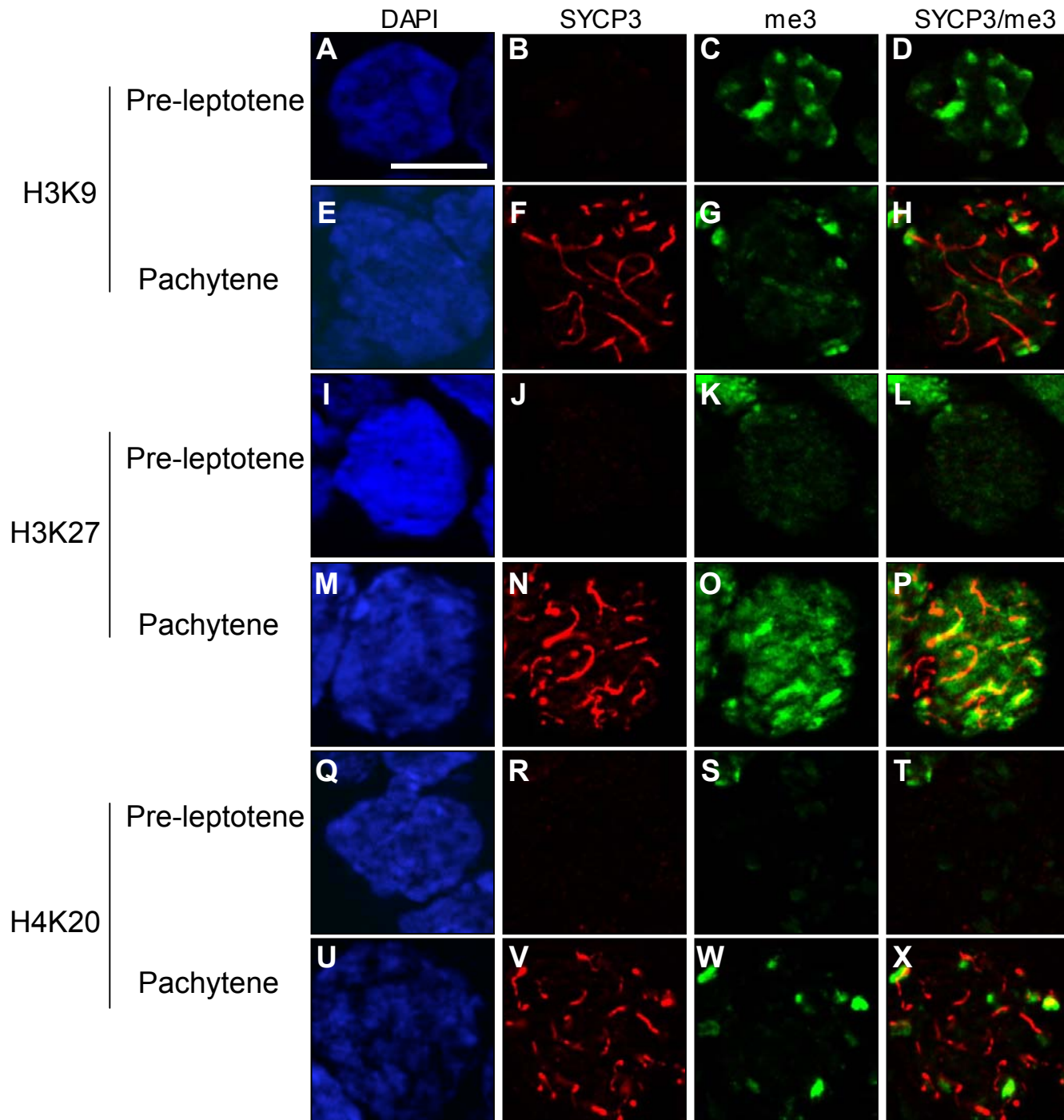


Fig. 2

Control rat

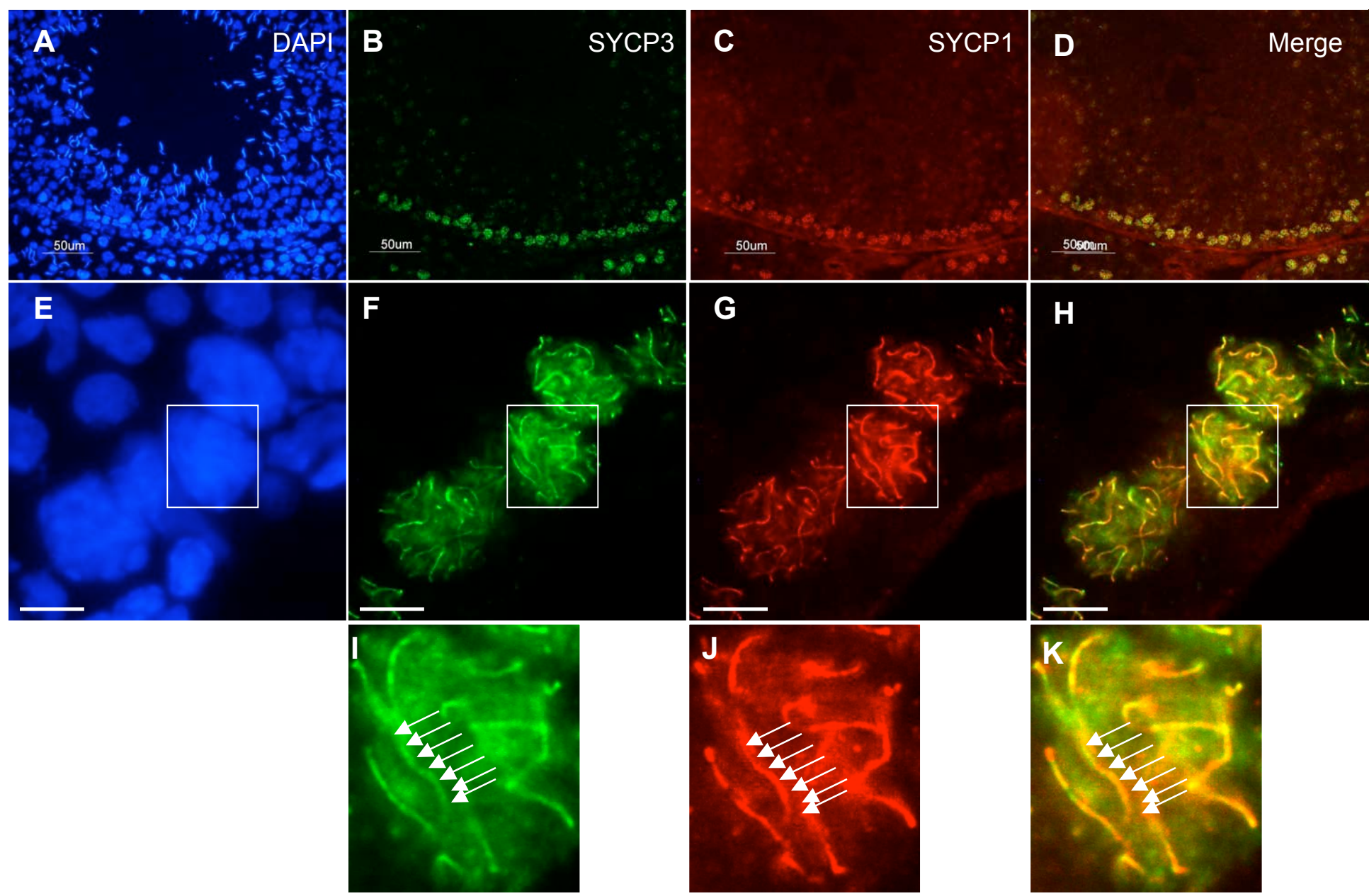
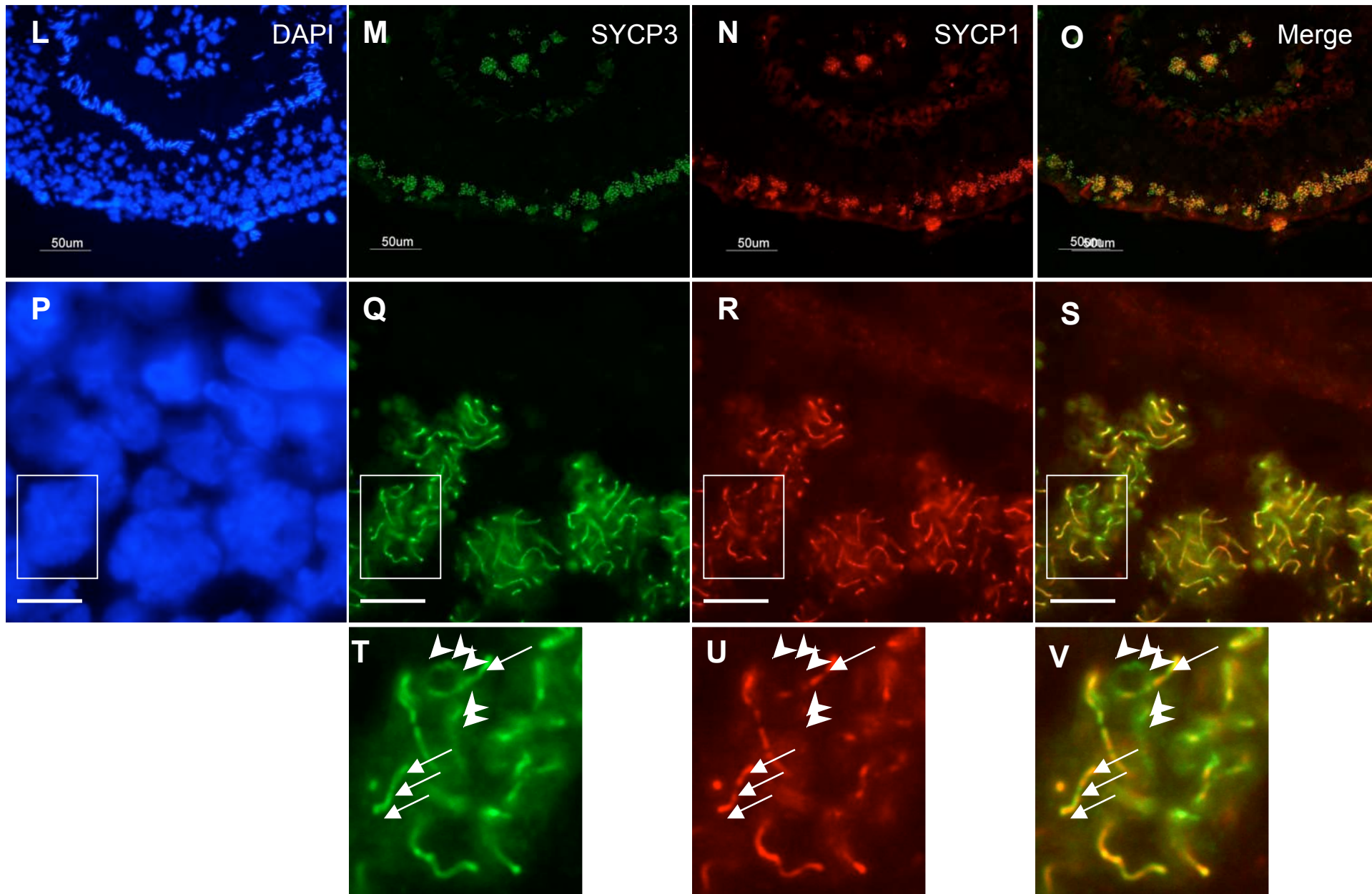


Fig. 2

Treated rat



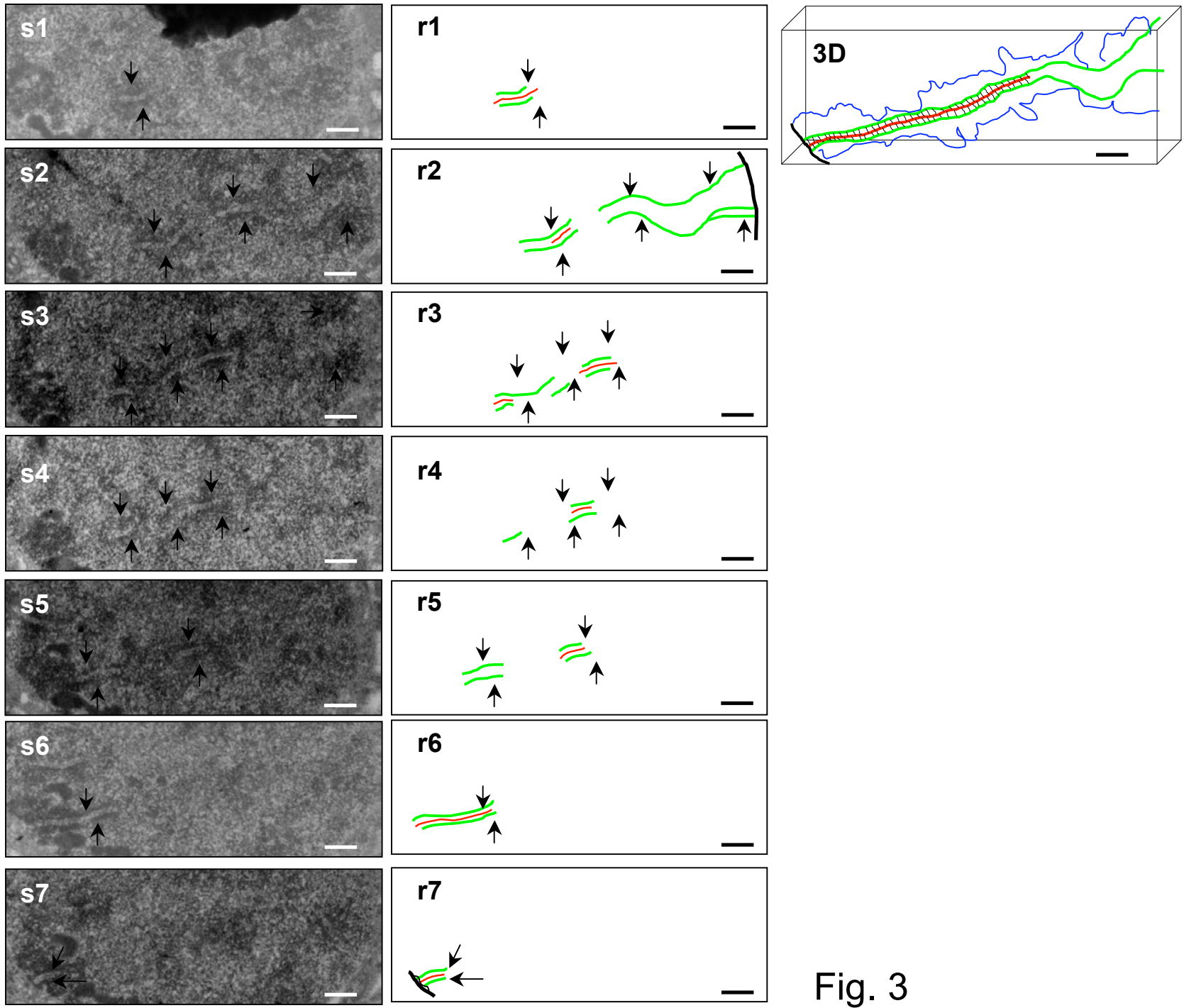


Fig. 3

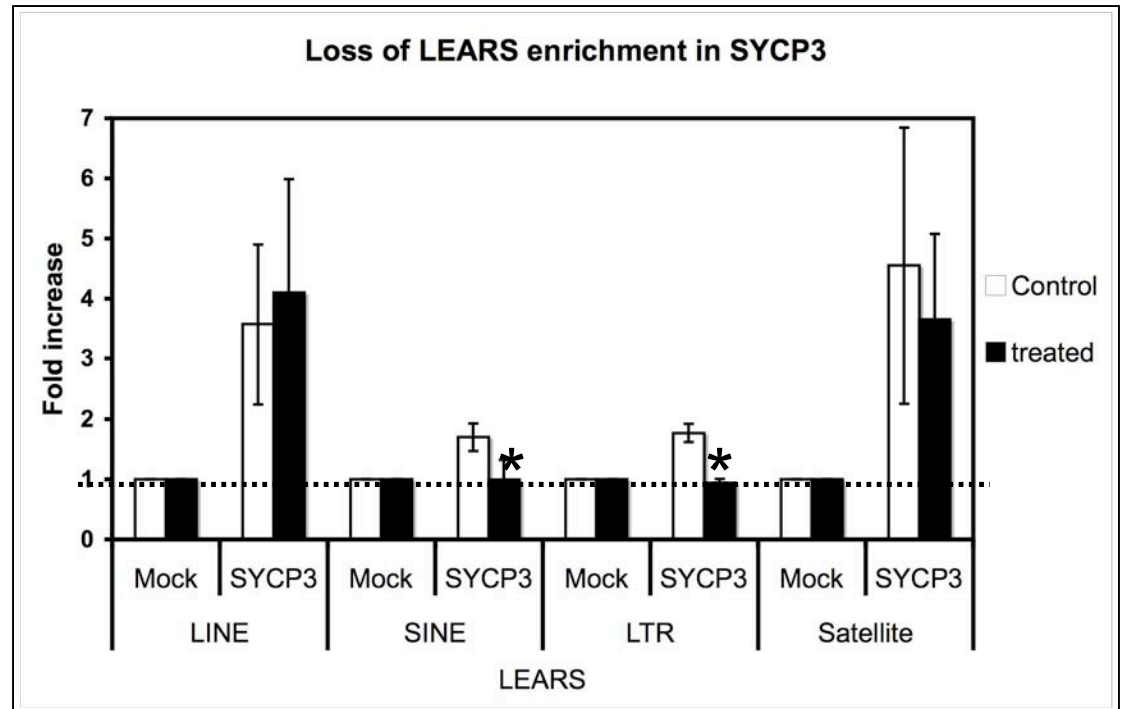
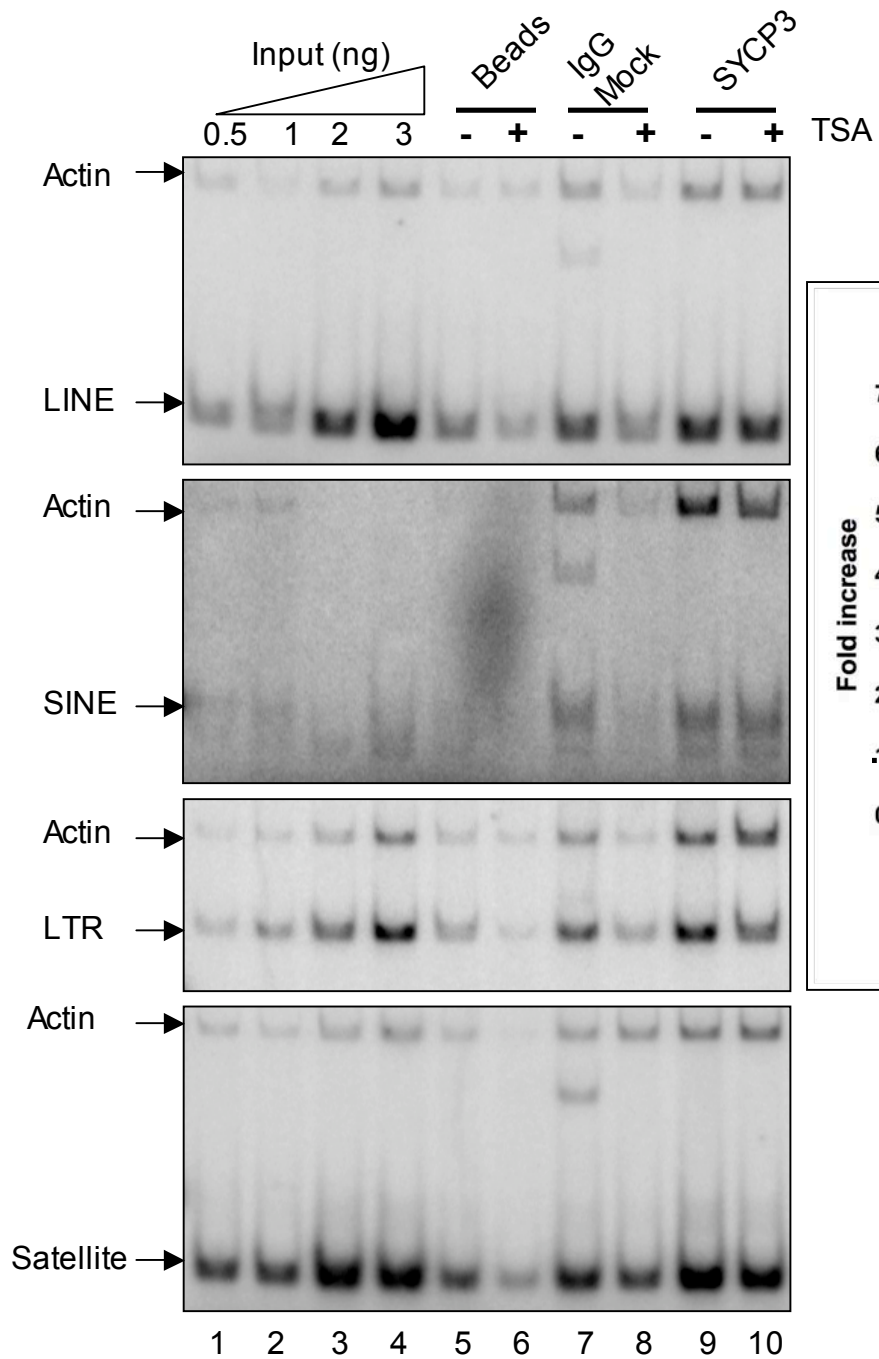


Fig. 4

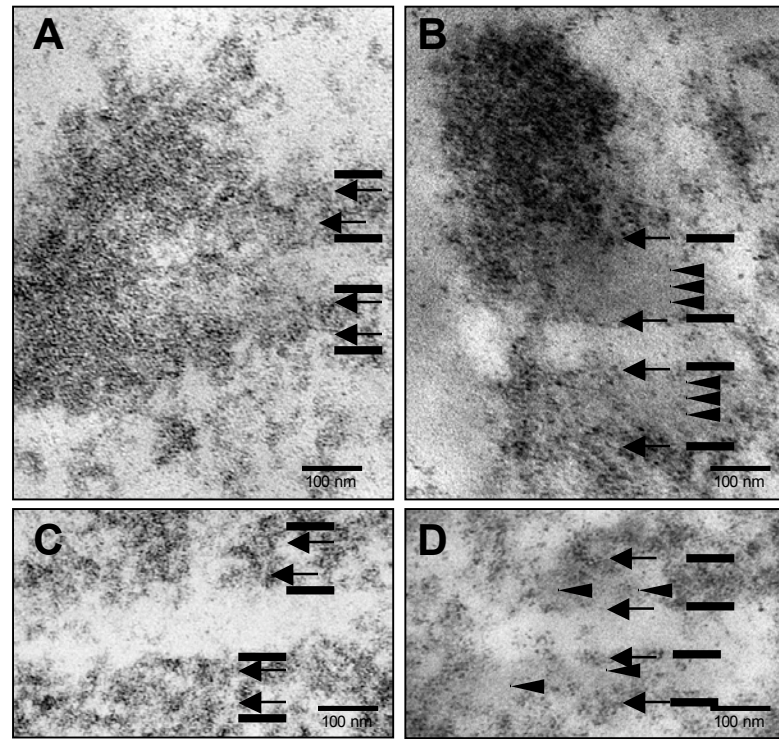


Fig. 5

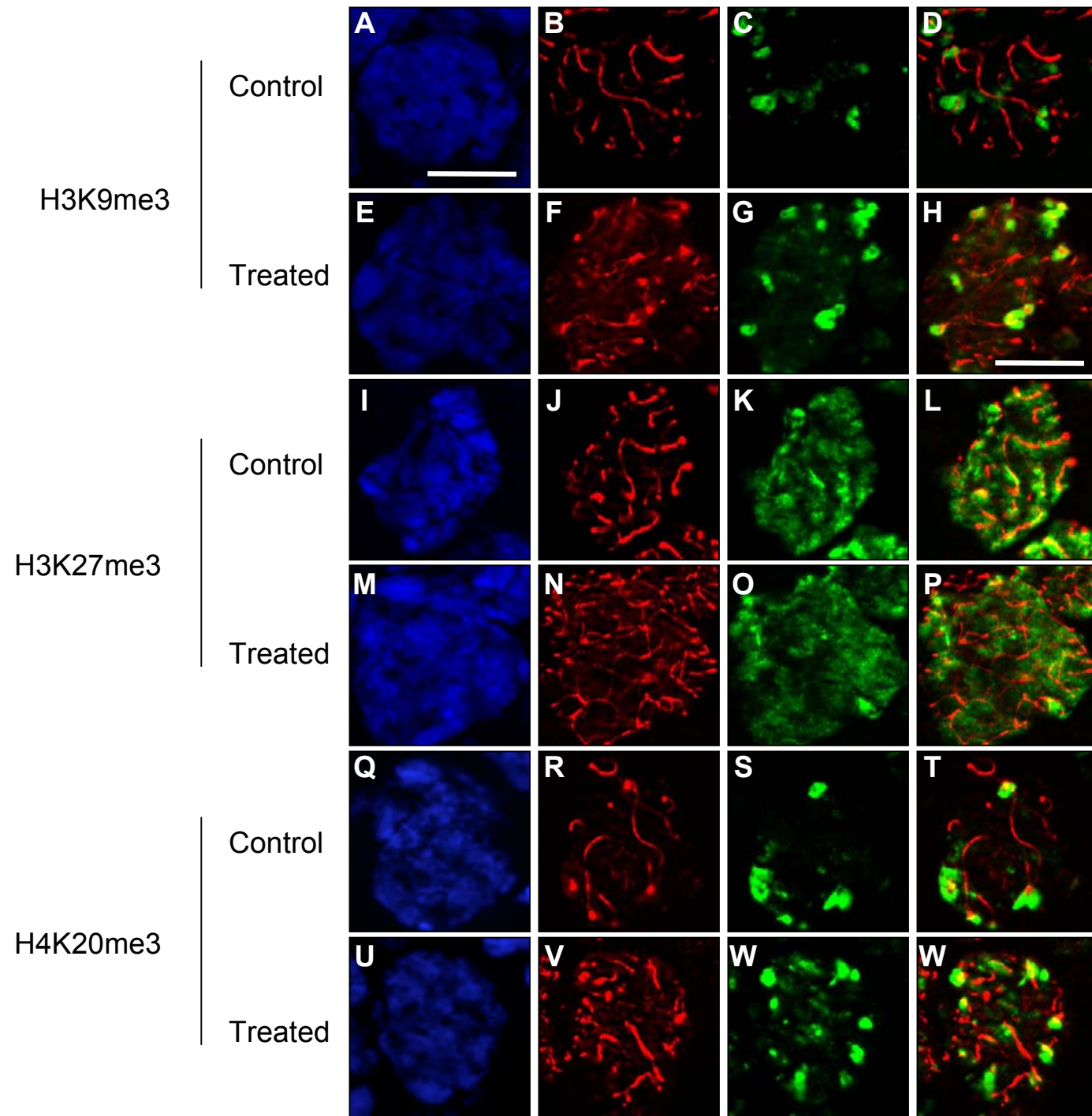


Fig. 6

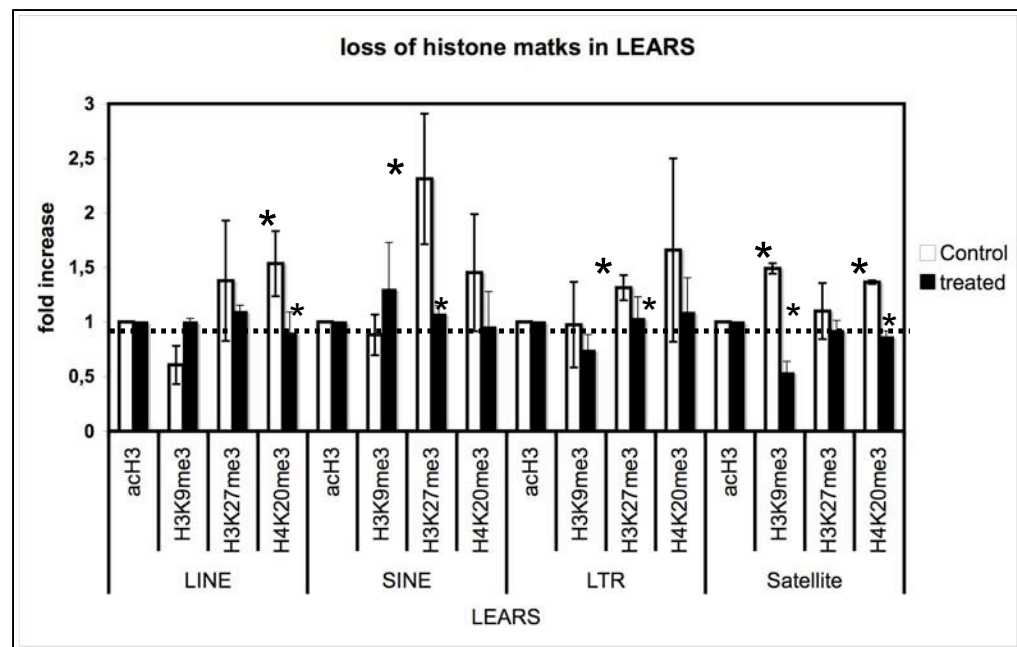
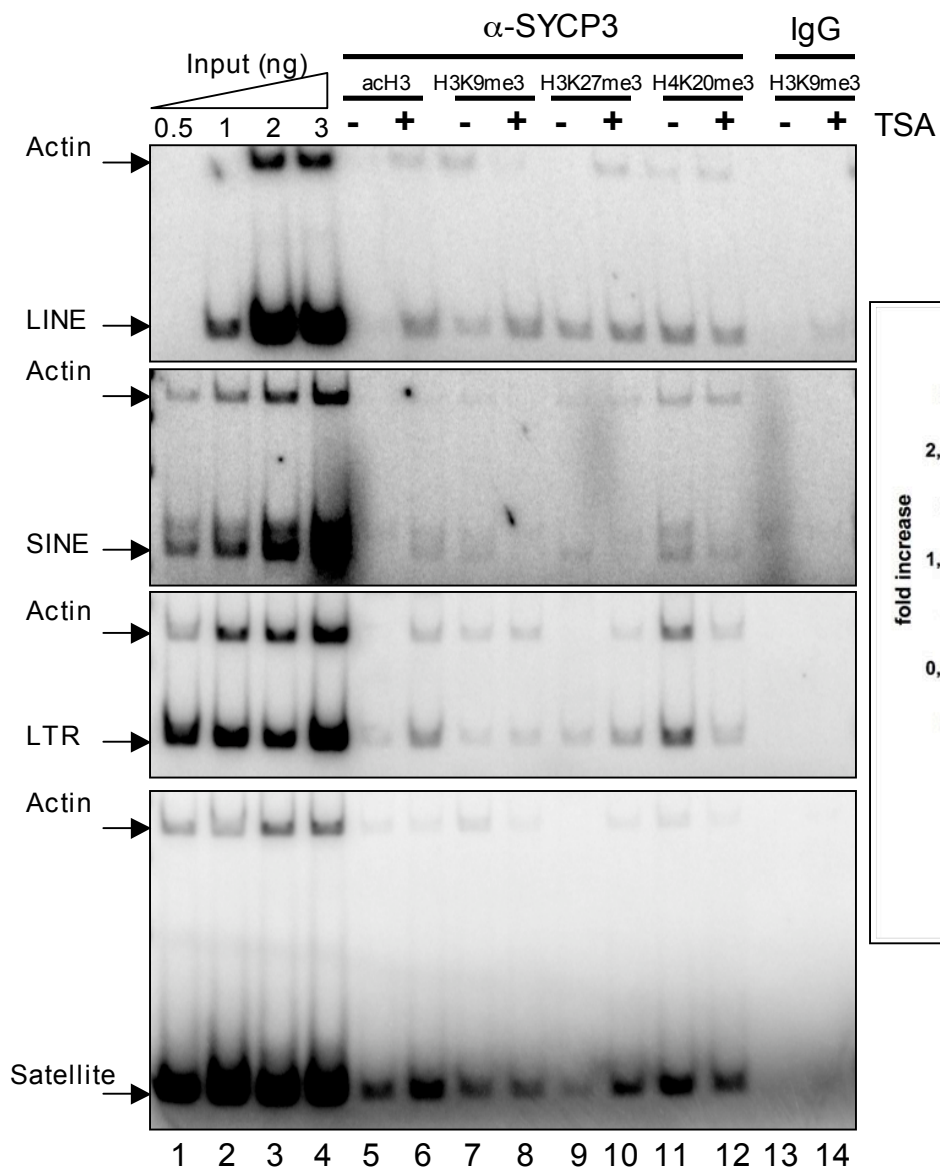


Fig. 7

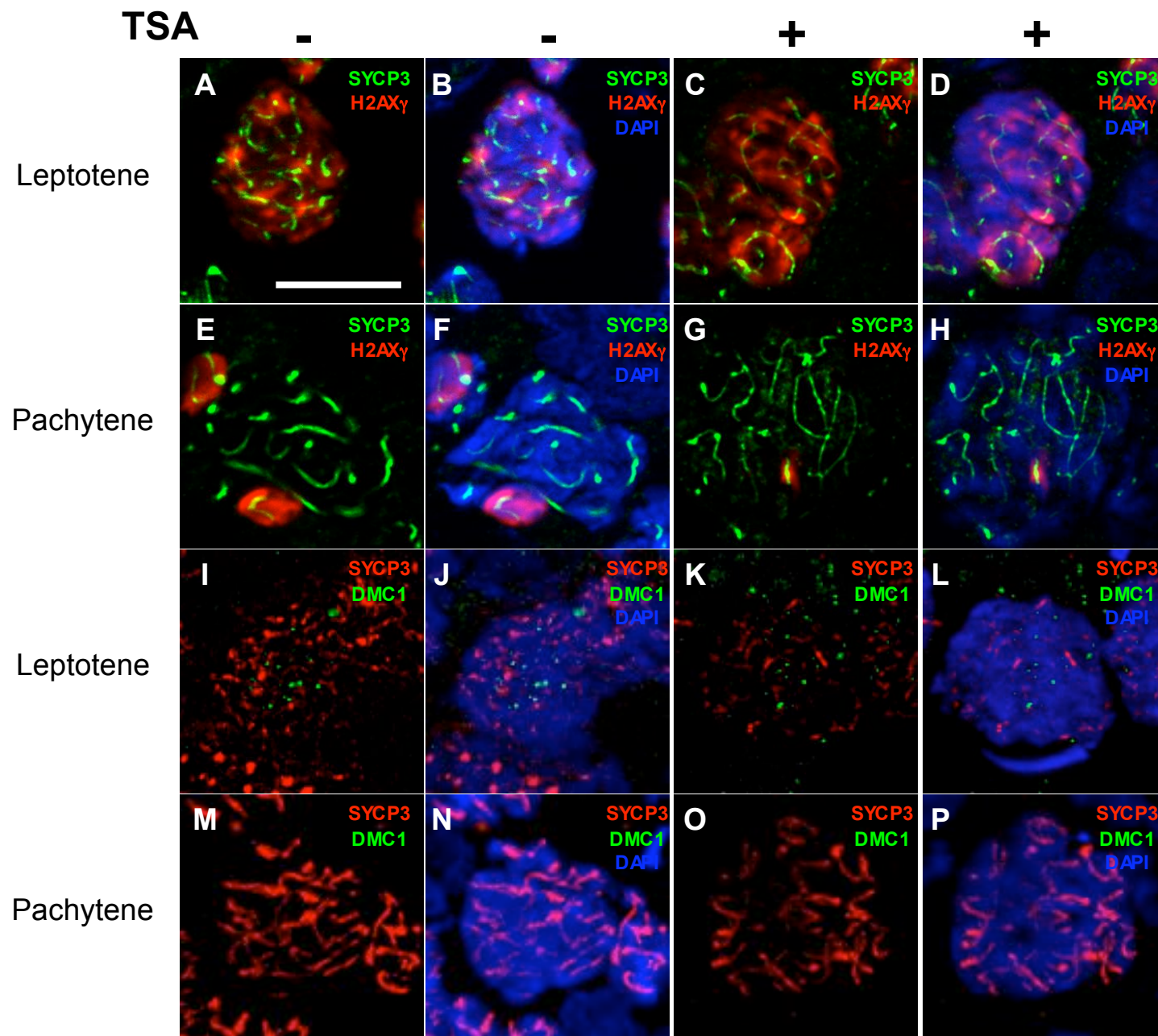


Fig. 8

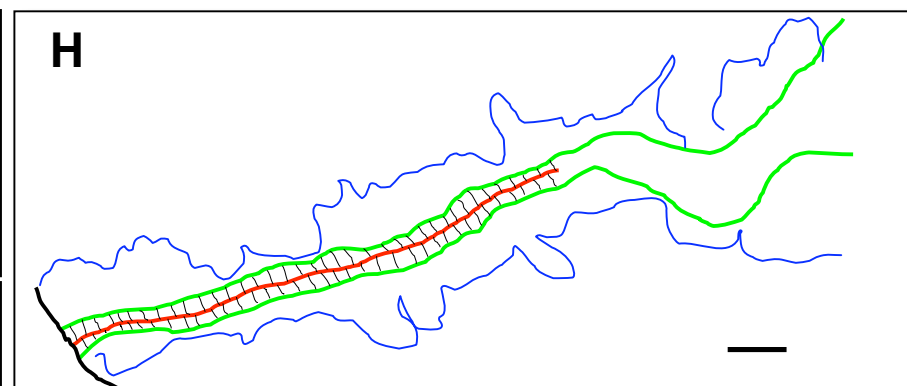
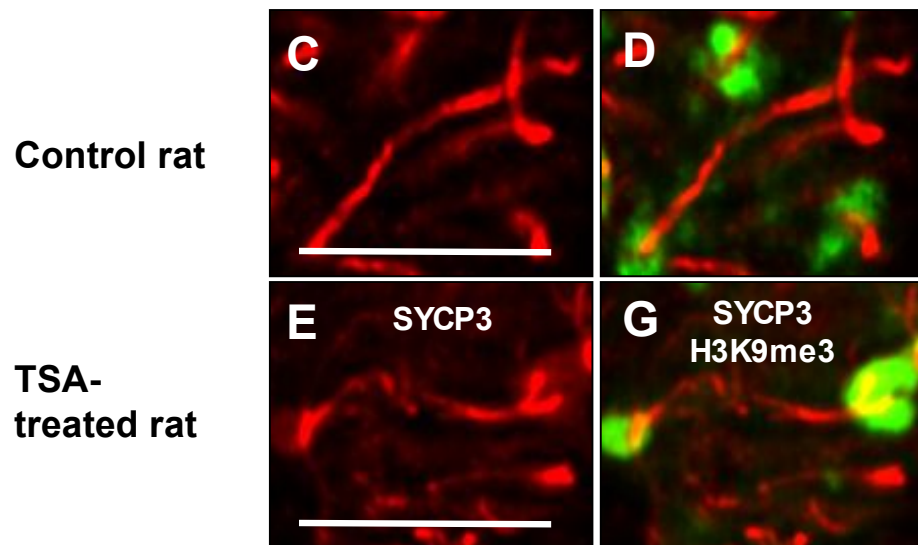
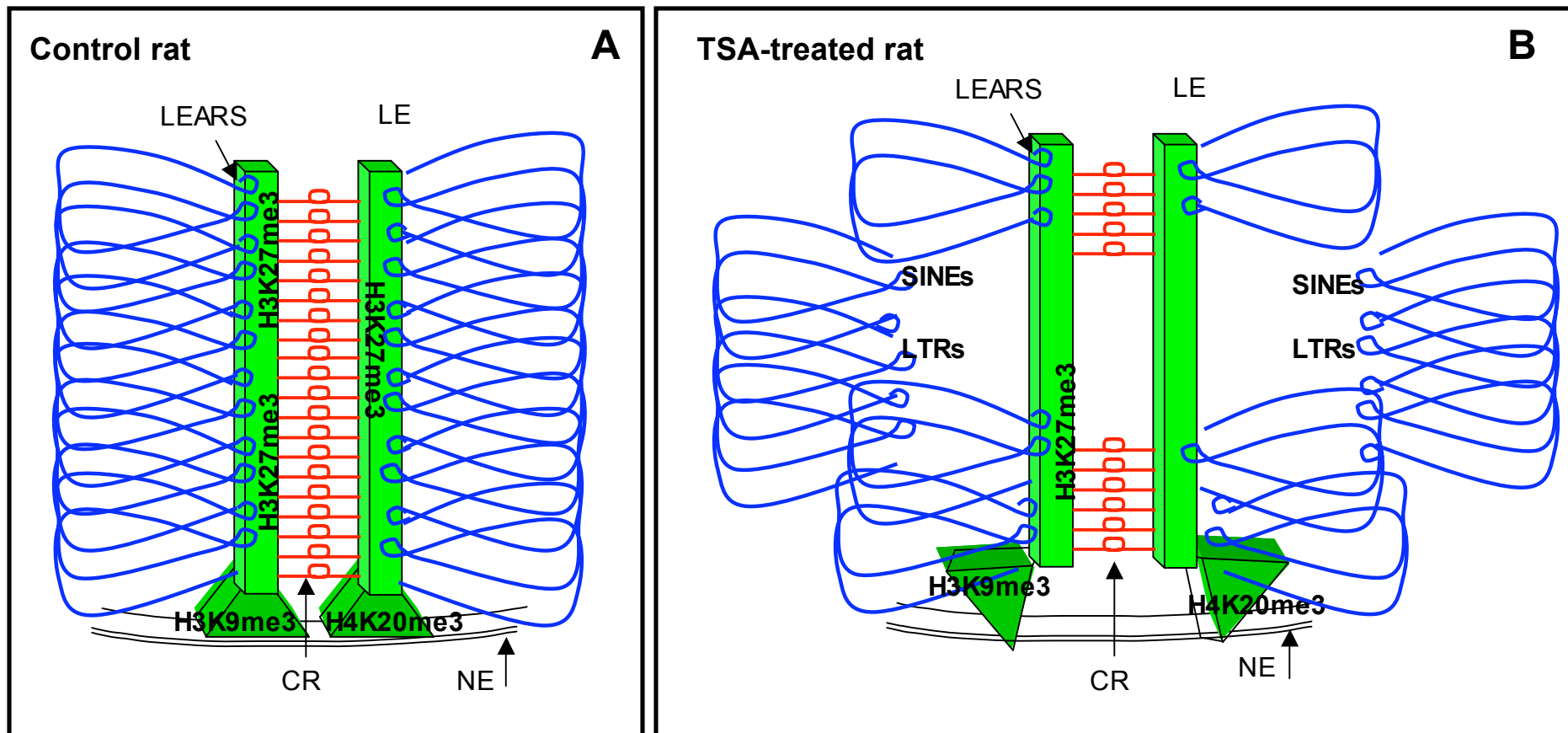


Fig. 9

Fig. S1

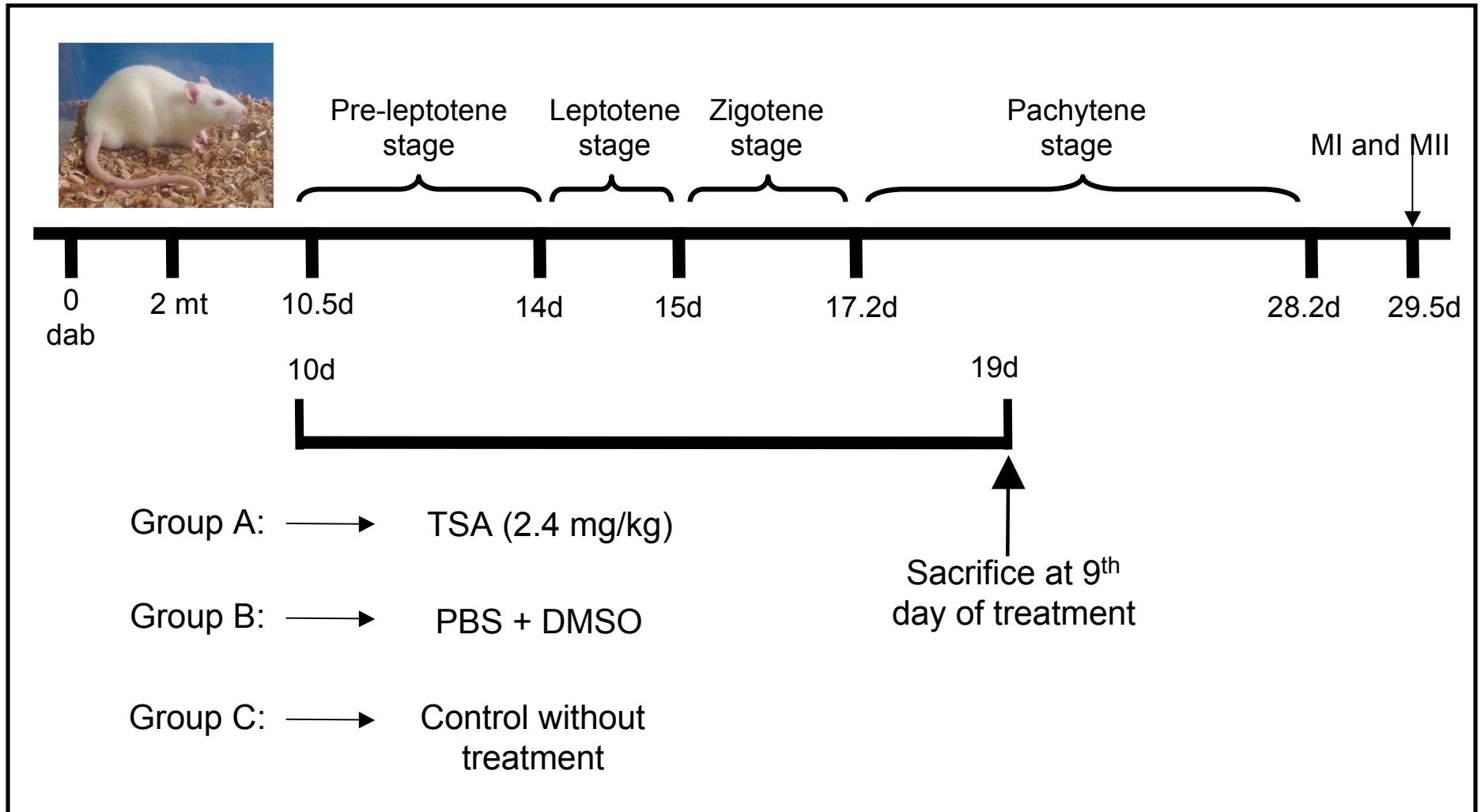


Fig. S2

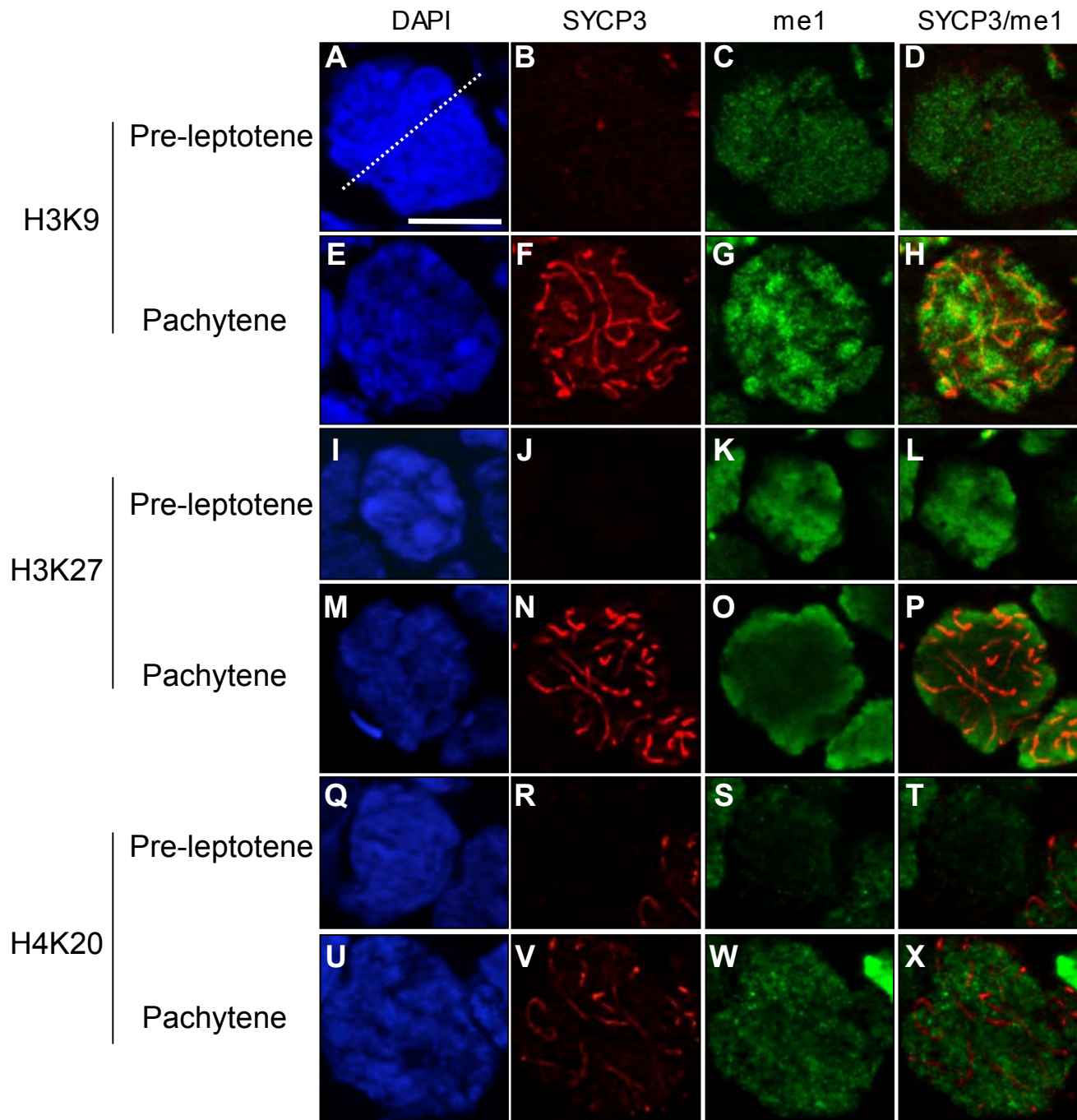


Fig. S3

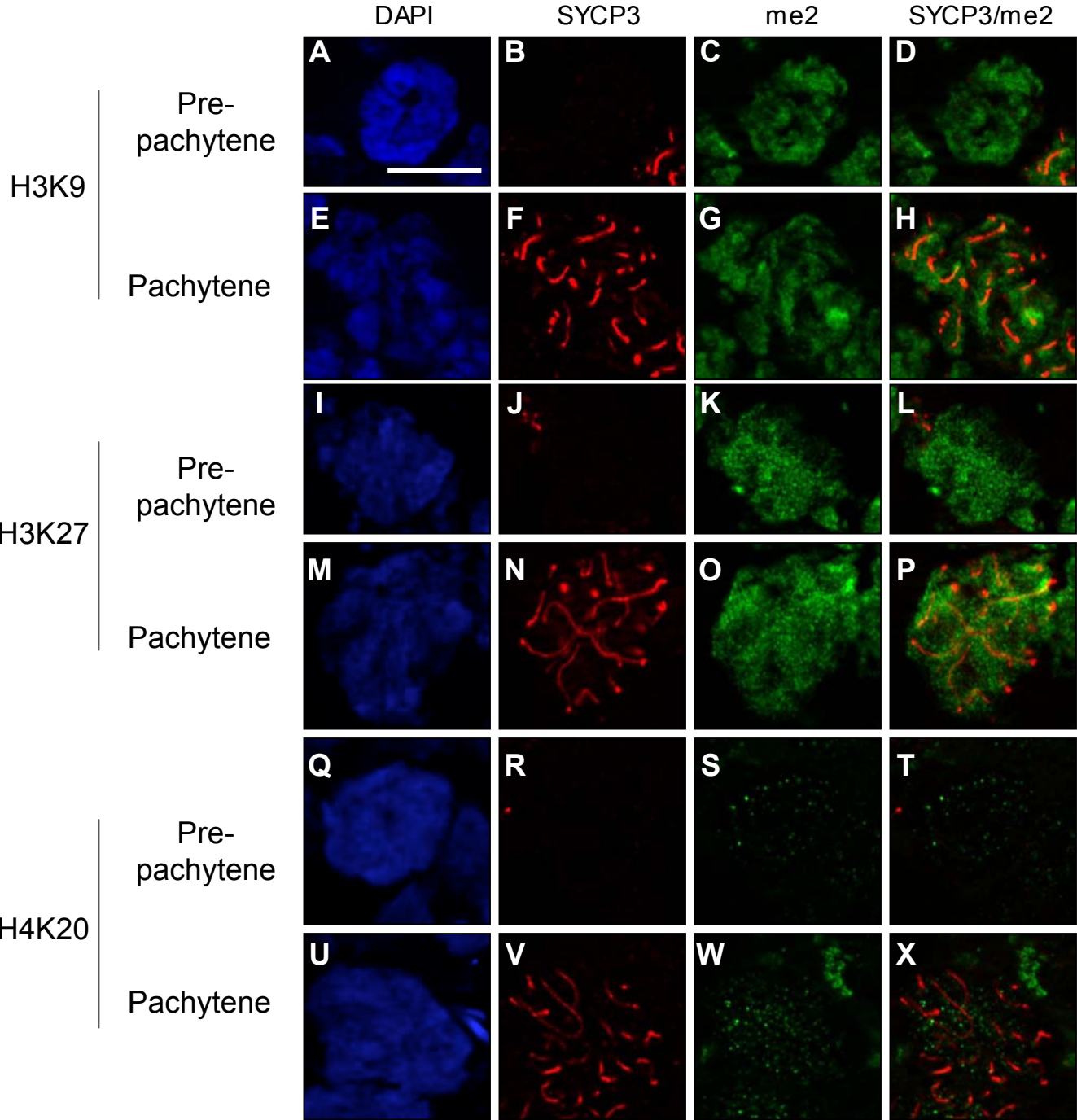
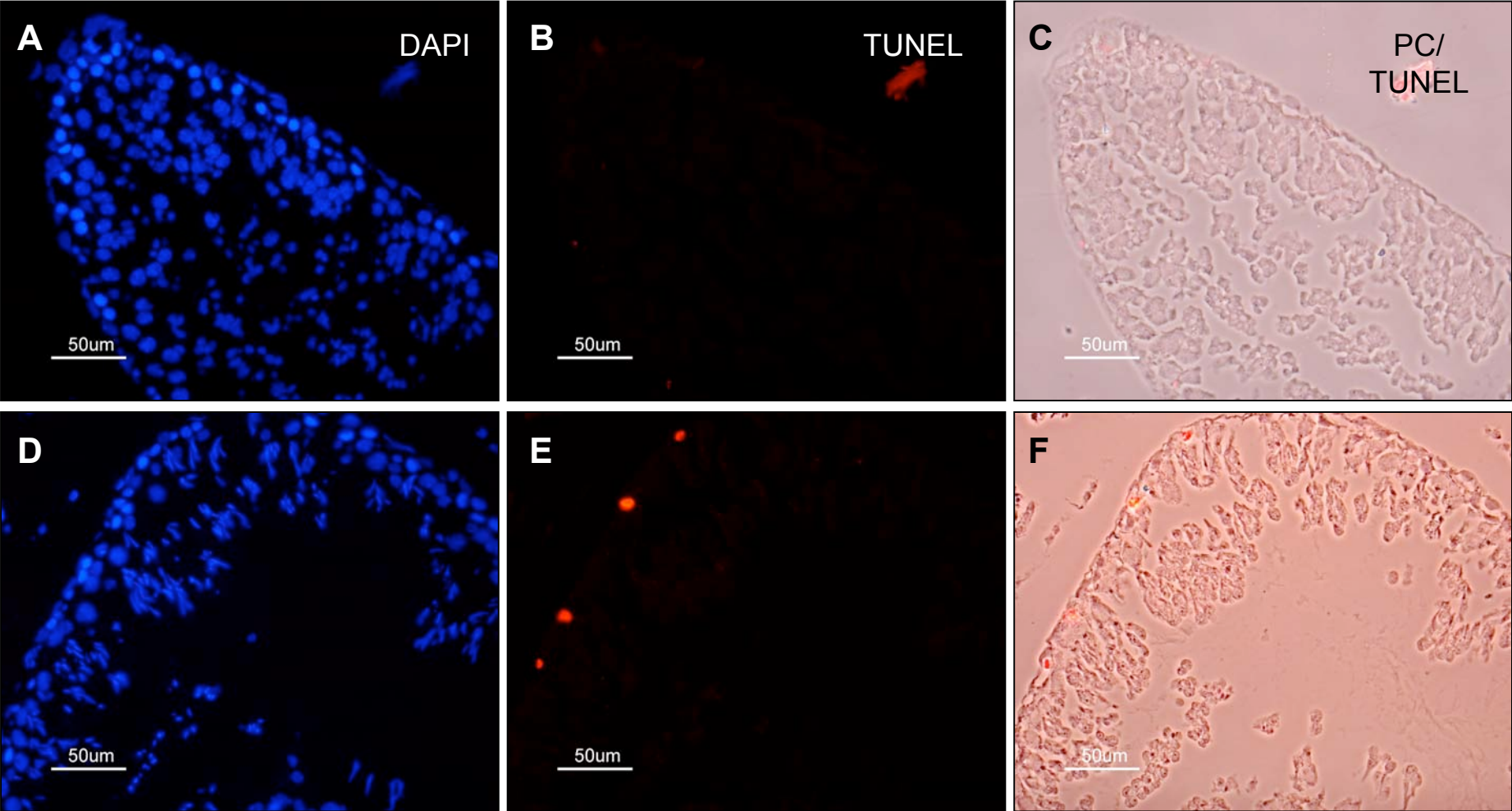


Fig. S4

Control rat



Treated rat

Fig. S4

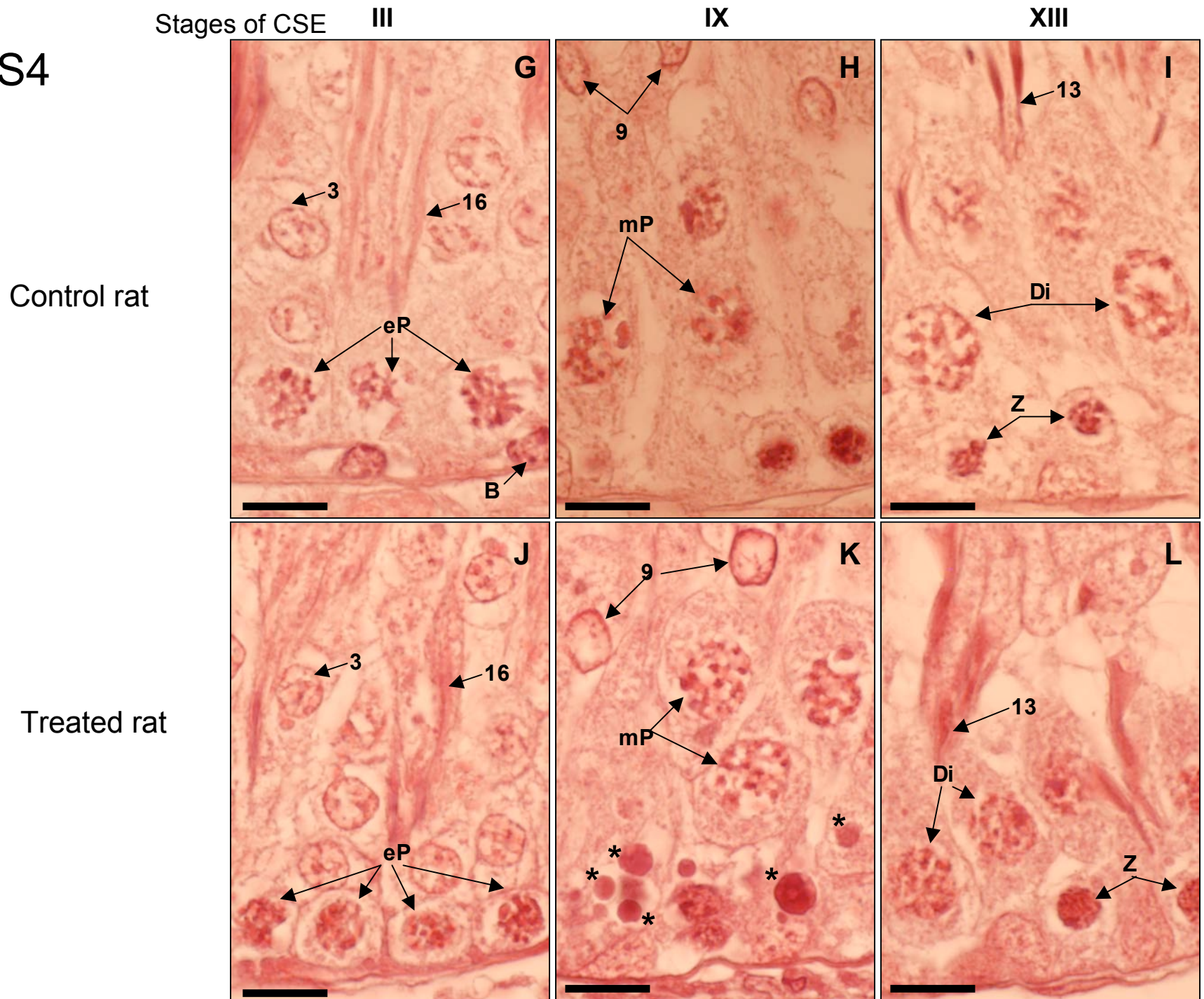


Fig. S5

