

Universidad de Salamanca
Instituto Universitario de Biología Molecular y Celular del Cáncer



TESIS DOCTORAL

**Análisis funcional de proteínas implicadas en el mantenimiento de la
estabilidad cromosómica en mamíferos**

CRISTINA GUTIÉRREZ CABALLERO

Salamanca, 2012

Universidad de Salamanca
Instituto Universitario de Biología Molecular y Celular del Cáncer



**Análisis funcional de proteínas implicadas en el mantenimiento de la
estabilidad cromosómica en mamíferos**

CRISTINA GUTIÉRREZ CABALLERO

Licenciada en Biología

Director: Alberto M. Pendás

Co-directora: Elena Llano Cuadra

Salamanca, 2012



El Dr. Alberto M. Pendás, investigador principal del Instituto Universitario de Biología Molecular y Celular del Cáncer, y la Dra. Elena Llano Cuadra, investigadora Ramón y Cajal de la Universidad de Salamanca,

certifican que: **Cristina Gutiérrez Caballero** ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral titulado:

Análisis funcional de proteínas implicadas en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica en mamíferos

Revisado el presente trabajo, consideran que reúne todos los méritos necesarios para su presentación y defensa con el fin de optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Dr. Alberto M. Pendás

Dra. Elena Llano Cuadra

Resumen

En vertebrados, la liberación secuencial de los complejos de cohesinas es esencial para llevar a cabo correctamente la segregación cromosómica durante la mitosis y la meiosis. Para ello, es imprescindible la función protectora que las shugoshinas ejercen sobre las cohesinas centroméricas durante la ruta profásica y la primera división meiótica. Asimismo, la acción proteolítica de Separasa sobre las kleisinas que cierran estos complejos es esencial para su disociación del DNA durante la anafase mitótica y la división reduccional.

En el presente trabajo hemos abordado la función mitótica de una de las shugoshinas de mamíferos, SGOL2, mediante la generación de un modelo murino deficiente en esta proteína. Tras el análisis del fenotipo de este ratón y el estudio en detalle de la mitosis de células primarias de estos animales hemos determinado que SGOL2 es prescindible para la protección de la cohesión centromérica durante la ruta profásica y para la correcta segregación de los cromosomas en mitosis. Seguidamente, en un análisis transcriptómico del modelo meiótico de pérdida prematura de cohesión centromérica por ausencia de SGOL2 hemos identificado a *Hdac11* como uno de los genes que se encuentran reprimidos en este modelo. Mediante la depleción constitutiva de esta histona desacetilasa en ratón hemos evidenciado que HDAC11 no interfiere en la progresión de la meiosis pero modula la expresión en testículos de genes implicados en la transducción de estímulos olfativos. Posteriormente, hemos abordado la búsqueda de nuevos parálogos de cohesinas, la cual nos ha conducido a la identificación y caracterización bioquímica de un nuevo miembro de la familia de las kleisinas que forma parte de un complejo de cohesinas específico de meiosis que colocaliza con los elementos axiales del complejo sinaptonémico de los meiocitos. Finalmente, hemos determinado que Separasa desempeña una función protectora frente a la progresión de tumores inducidos químicamente en piel.

Abreviaturas

AE/LE axial element/lateral element

APC/C anaphase-promoting complex/cyclosome

ATP adenosine triphosphate

bp base pair

BrdU bromodeoxyuridine

BSA bovine serum albumin

cDNA complementary DNA

CPC chromosomal passenger complex

CE central element

DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMBA 7,12-dimethylbenz[α]anthracene

DNA deoxyribonucleic acid

dpc days post coitum

DTT 1,4-dithiothreitol

EDTA ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA ethylene glycol tetraacetic acid

ES embryonic stem

FBS fetal bovine serum

FITC fluorescein isothiocyanate

GFP green fluorescent protein

Gy gray

HAT histone acetyl transferases

HDAC histone deacetylase

HDACIs HDAC inhibitors

HEPES 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

IF immunofluorescence

kb kilobase

kDa kilodalton

KSP kinesin spindle protein

KSPi KSP inhibitor

MEF mouse embryonic fibroblast

mRNA messenger RNA

OIS oncogene-induced senescence

OR olfactory receptor

ORF open reading frame

PBS phosphate buffered saline

PCR polymerase chain reaction

p-H3 phospho-Histone 3 (Ser10)

PMSF phenylmethylsulfonyl fluoride

PSCS premature sister chromatid separation

PSG penicillin streptomycin glutamine

qPCR quantitative PCR

RFLP restriction fragment length polymorphism

RNA ribonucleic acid

RT-PCR reverse transcriptase PCR

SAC spindle assembly checkpoint

SC synaptonemal complex

SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SEM standard error medium

siRNA small interfering RNA

TBS-T tris buffered saline-Tween 20

TE tris-EDTA

TPA 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate

TRITC tetramethyl rhodamine isothiocyanate

Índice

INTRODUCCIÓN

1. Cohesinas y segregación cromosómica durante la mitosis.....	1
1.1. Mitosis	1
1.2. Complejo de cohesinas	2
1.2.1. Carga de las cohesinas y establecimiento de la cohesión	4
1.3. Liberación secuencial de los complejos de cohesinas durante la mitosis de vertebrados.....	6
1.3.1. Separasa.....	8
1.3.2. Protección de la cohesión centromérica	9
1.4. Acetilación/Desacetilación de proteínas y progresión de la mitosis	12
1.4.1. Desacetilación de histonas y regulación transcripcional.....	14
2. División reduccional	14
2.1. Acetilación de histonas durante la división reduccional	18
3. Otras funciones de las cohesinas.....	19
3.1. Cohesinas y reparación de daños en el DNA.....	19
3.2. Cohesinas y regulación de la expresión génica	20
4. Segregación cromosómica e inestabilidad cromosómica	21

MATERIAL

1. Ratones.....	33
2. Células empleadas.....	33
3. Enzimas	33

MÉTODOS

1. Generación de ratones mutantes por recombinación homóloga.....	34
1.1. Construcción de un vector de reemplazamiento knock-in regulable por tetraciclina para <i>Separasa</i>	34
1.2. Construcción de un vector de reemplazamiento knock-out inducible para <i>Hdac11</i>	35
1.3. Electroporación de células madre embrionarias	35
1.4. Generación de células ES mutantes	35
2. Confirmación de la mutación insercional en el gen <i>Sgol2</i>.	36
3. Cariotipado de células ES	36
4. Desarrollo de los ratones mutantes	37
4.1. <i>Separasa</i> y HDAC11	37
4.2. <i>Sgol2</i>	38
4.3. Mantenimiento de la colonia.....	38
5. Experimentación con ratones	38
5.1. Carcinogénesis química en piel	38
5.2. Análisis histológico	39
5.3. Inmunohistoquímica	39
6. Cultivos celulares	39
6.1. Tipos celulares y condiciones de cultivo	39
6.2. Obtención de fibroblastos embrionarios de ratón.....	40
6.3. Obtención de fibroblastos adultos de oreja	40
6.4. Curvas de proliferación celular.....	40

6.5. Índice mitótico.....	40
6.6. Cultivo seriado 3T3.....	42
6.7. Evaluación de la “re-entrada” en el ciclo celular por FACs	42
6.8. Transfección de cultivos celulares con DNA plasmídico	43
6.8.1. Transfección transitoria mediada por fosfato cálcico.....	43
6.8.2. Transfección transitoria mediada por lípidos catiónicos	43
6.9. Transducción retroviral	43
6.10. Cariotipado de MEFs.....	43
6.11. Tratamiento con drogas estabilizadoras y desestabilizadoras de microtúbulos. 44	
6.12. Inducción de daño en el DNA mediante irradiación gamma	44
6.13. Ensayo de formación de colonias por E1A-hRasV12.....	44
6.14. Protocolo de formación de focos por H-RasV12	45
6.15. Evaluación de la inducción de senescencia por RAS oncogénico	45
6.16. Extracción, cultivo y cariotipado de timocitos de ratón	45
7. Técnicas de biología molecular	45
7.1. Extracción de DNA genómico.....	45
7.2 Southern Blot.....	46
7.3. Estudio de la expresión génica.....	46
7.3.1. Northern Blot.....	46
7.3.2. Transcripción Reversa-PCR (RT-PCR)	47
7.3.3. Análisis de expresión génica diferencial mediante microarrays de DNA.....	47
7.3.4. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	47

7.4. Identificación y clonación de <i>Rad21</i>	48
7.5. Construcción de vectores de expresión en eucariotas.....	48
7.6. Construcción de mutantes mediante mutagénesis dirigida.....	48
7.7. Inmunoprecipitación de proteínas.....	50
7.8. Western Blot.....	50
7.9. Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF.....	51
7.10. Fraccionamiento de cromatina.....	51
7.11. Generación de una línea celular con expresión inducible de <i>Rad21</i> o <i>Rad21</i> ..	51
7.12. Traducción de proteínas <i>in vitro</i>	52
7.13. Digestión con Separasa.....	52
7.14. Esparcido de espermatozoides (<i>spreading</i>).....	52
7.15. Esparcidos de oocitos en paquitena.....	53
7.16. Aplastado de túbulos seminíferos (<i>squash</i>).....	53
7.17. Inmunofluorescencia.....	53
7.18. Obtención de anticuerpos policlonales.....	54
8. Análisis filogenético.....	56

RESULTADOS

1. Caracterización funcional de SGOL2 en la mitosis de ratón.....	59
1.1. Generación de un modelo murino knock-out para <i>Sgol2</i>	59
1.2. Análisis de la expresión de <i>Sgol2</i> y caracterización del alelo mutante <i>in vivo</i>	60
1.3. Caracterización fenotípica del ratón y de las células deficientes en SGOL2.....	62
1.4. Esperanza de vida de los ratones <i>Sgol2</i> ^{-/-}	68

1.5. Depleción de SGOL2 en ratones knock-out para p53.....	68
1.6. Análisis comparativo de la expresión génica de individuos silvestres y knock-out para <i>Sgol2</i>	69
2. Caracterización funcional de HDAC11	70
2.1. Generación de un modelo murino knock-out condicional para <i>Hdac11</i>	70
2.2. Caracterización del alelo mutante de <i>Hdac11</i>	74
2.3. Caracterización del modelo animal deficiente en HDAC11	28
2.4 Análisis de la expresión génica en ratones knock-out para <i>Hdac11</i>	75
3. Identificación y caracterización bioquímica de RAD21L	76
3.1. Identificación y clonación de <i>Rad21l</i>	76
3.2. Análisis de expresión de <i>Rad21l</i>	78
3.3. Localización subcelular	79
3.4. Caracterización bioquímica de RAD21L.....	80
3.5. Localización de RAD21L en células meióticas.....	84
3.6. Procesamiento proteolítico de RAD21L por Separasa.....	85
3.7. Análisis filogenético de las kleisinas.....	86
4. Implicación de Separasa en la iniciación y la progresión tumoral	88
4.1. Generación de un ratón knock-out para <i>Separasa</i>	88
4.2. Evaluación del fenotipo celular de MEFs heterocigotos para <i>Separasa</i>	89
4.3 Efecto de la disminución de los niveles de Separasa <i>in vivo</i> en la tumorigénesis	93
 DISCUSIÓN	
1. SGOL2 no es esencial para la mitosis de ratón.....	101
2. HDAC11 reprime la expresión génica	104

3. RAD21L, una nueva kleisina específica de meiosis	106
4. Separasa protege frente a la iniciación y progresión de tumores químicamente inducidos.....	110
CONCLUSIONES	115
BIBLIOGRAFÍA	119
ANEXO	147

Introducción

1. Cohesinas y segregación cromosómica durante la mitosis

1.1. Mitosis

Durante el ciclo celular, tras la duplicación del material genético, cada cromosoma está formado por dos copias idénticas de la misma hebra de DNA. Estas dos copias, denominadas cromátidas hermanas, son separadas y repartidas equitativamente a las dos células hijas durante la mitosis. La palabra mitosis proviene del griego *mitos* que significa hebra o filamento, y fue acuñada hace más de un siglo por Walther Flemming haciendo referencia a la forma de los cromosomas durante la división celular (revisado en Mitchison & Salmon, 2001). La fase M, que comprende la mitosis seguida de la citocinesis, es una de las fases más espectaculares del ciclo celular y se caracteriza por una profunda reorganización de la arquitectura de la célula. La condensación del material genético en cromosomas, la separación longitudinal de las dos cromátidas hermanas y la organización filamentosa del huso mitótico fueron descritas por primera vez a finales del siglo XIX y comienzos del XX. Posteriormente, las primeras grabaciones *in vivo* de células en división han contribuido a establecer las bases mecánicas de la mitosis (revisado en Mitchison & Salmon, 2001).

Al comienzo de la mitosis (profase), el material genético se condensa en cromosomas formados por dos cromátidas hermanas unidas por el centrómero, sobre el cual se ensambla el cinetocoro. Simultáneamente, empiezan a reorganizarse los microtúbulos que emanan de los centrosomas para formar el huso mitótico, el cual está constituido por tres tipos de microtúbulos: astrales (interaccionan con la corteza celular), polares (se entrecruzan entre los dos polos del huso) y cinetocóricos (interaccionan con el cinetocoro). El alargamiento que sufren los microtúbulos existentes entre los dos centrosomas ocasiona la migración de ambos a polos opuestos de la célula, estableciéndose así la bipolaridad de la célula en división. Seguidamente, la membrana nuclear se disgrega y finaliza la formación del huso mitótico y su unión a los cinetocoros (prometáfase), lo que permite que los cromosomas comiencen a alinearse en el plano ecuatorial de la célula o placa metafásica. En metafase, los cromosomas se encuentran alineados en la placa metafásica y los microtúbulos cinetocóricos ejercen una fuerza sobre cada cinetocoro hermano hacia polos opuestos de la célula. Ello provoca que cada cromátida hermana oriente hacia un polo (biorientación). Cuando todos los cromosomas se encuentran perfectamente biorientados, las dos cromátidas hermanas se separan y se dirigen hacia los polos opuestos debido a la tracción ejercida por los microtúbulos (anafase). Finalmente, los microtúbulos del huso se despolimerizan, los cromosomas se descondensan, la membrana nuclear se reorganiza de nuevo alrededor del material genético (telofase), y tiene lugar la citocinesis, la cual en las células animales se lleva a cabo a través de la formación de un anillo contráctil que estrangula el citoplasma (Fededa & Gerlich, 2012).

Para asegurar una segregación fiel de los cromosomas existe un mecanismo de control denominado “*checkpoint* del ensamblaje del huso” o SAC (*spindle assembly checkpoint*). El SAC permanece activo en ausencia de tensión entre los cinetocoros hermanos impidiendo la progresión de la mitosis. Una vez que todos los cromosomas han biorientado y los cinetocoros hermanos se encuentran en tensión, el *checkpoint* se inactiva permitiendo la activación del APC/C (*anaphase promoting complex/cyclosome*) y en consecuencia, la transición a anafase y segregación de las cromátidas hermanas (Silva et al., 2011). Para coordinar este proceso, es esencial la intervención del Complejo Pasajero del Cromosoma (CPC, *Chromosomal Passenger Complex*), el cual incluye una kinasa (Aurora B) y varias subunidades reguladoras (INCENP, Survivina y Borealina). Cuando los cinetocoros no están sometidos a tensión debido a defectos en su unión a los microtúbulos, Aurora B fosforila diferentes sustratos. Como resultado de esta fosforilación las uniones anómalas se desestabilizan y en consecuencia, se retrasa la entrada en anafase permitiendo la corrección de los errores (Lampson & Cheeseman, 2010).

1.2. Complejo de cohesinas

Para generar tensión entre los cinetocoros hermanos es crucial la existencia de una fuerza opuesta a la ejercida por los microtúbulos (Nicklas, 1988). La existencia de esta fuerza fue inferida por primera vez de observaciones citológicas de los quiasmas (Maguire, 1974) y confirmada posteriormente en estudios de dinámica de los cromosomas (Nicklas, 1989). Dicha fuerza es debida a la asociación física de las cromátidas hermanas desde la replicación del DNA en la fase S hasta su separación en anafase. A esta asociación física de las cromátidas hermanas se le ha denominado cohesión.

Mediante un cribado de mutantes de *S. cerevisiae* con pérdida de cohesión entre las cromátidas hermanas (PSCS, *premature sister chromatid separation*) y con letalidad tras un arresto en mitosis o incapacidad para separar las cromátidas en ausencia de la activación del APC/C (Guacci et al., 1997; Michaelis et al., 1997), se identificaron las primeras proteínas responsables de la cohesión: Smc1, Smc3 y Rad21/Scs1. Estas proteínas fueron denominadas cohesinas y forman parte de dos familias muy conservadas desde bacterias a organismos superiores. Concretamente, Smc1 y Smc3 pertenecen a la familia de proteínas SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*) y Rad21 a la familia de las kleisin. Previamente a su identificación como cohesinas, Smc1 había sido propuesta como una proteína esencial en la división celular (Strunnikov et al., 1993), y el ortólogo de Scs1 en levaduras de fisión (Rad21) había sido caracterizado como un gen implicado en la reparación del DNA (Birkenbihl & Subramani, 1992). Seguidamente, se demostró que los ortólogos de estas cohesinas en *X. laevis* conservaban su función ya que su depleción en extractos de huevos impide la asociación de las cromátidas hermanas (Losada et al., 1998).

En un nuevo cribado de mutantes de *S. cerevisiae* se identificó una proteína con dominio de repetición HEAT denominada Scs3/STAG (*stromal antigen*), la cual es esencial para el

mantenimiento de la cohesión entre las cromátidas hermanas (Tóth et al., 1999). En las células somáticas de vertebrados esta proteína presenta dos parálogos (STAG1 y STAG2) que interaccionan con la subunidad RAD21 del complejo de cohesinas (Sumara et al., 2000; Haering et al., 2002).

Posteriormente, se realizaron las primeras aproximaciones a la arquitectura molecular de las cohesinas a través de ensayos bioquímicos (Haering et al., 2002) y de reconstrucciones por microscopía electrónica de los complejos de cohesinas purificados mediante cromatografía de afinidad o exclusión molecular (Anderson et al., 2002; Haering et al., 2002). De acuerdo con estos estudios, las cohesinas SMC1 y SMC3 forman un heterodímero que exhibe una estructura en forma de V o Y en las micrografías electrónicas tanto de vertebrados (células humanas y de *X. laevis*) como de *S. cerevisiae* (Anderson et al., 2002; Haering et al., 2002). Estas proteínas SMC se caracterizan por presentar un dominio globular bisagra flanqueado por dos dominios α -hélice que se enrollan sobre sí mismos. De esta forma, los extremos amino y carboxilo terminal se juxtaponen formando un dominio ATPasa. SMC1 y SMC3 dimerizan entre sí a través del dominio bisagra formando la estructura en forma de "V". Esta estructura se cierra mediante la unión de RAD21 a los dominios ATPasa de SMC1 y SMC3 a través de los dominios carboxilo y amino terminal, respectivamente. Estos dominios se encuentran muy conservados en todos los miembros de la familia de las α -kleisinas, así denominadas por su capacidad de cerrar dímeros de proteínas SMC (del griego *kleisimo*, cerrar; Haering et al., 2002; Gruber et al., 2003; Schleiffer et al., 2003). A su vez, RAD21 se asocia a la subunidad STAG (Haering et al., 2002; Sumara et al., 2000). Por tanto, las cohesinas forman un complejo multiproteico constituido por 4 subunidades muy conservadas a lo largo de la evolución (Figura 1; Tabla I). Actualmente, el modelo más aceptado para explicar cómo las cohesinas unen las dos cromátidas hermanas, es el denominado "modelo de anillo", según el cual las cohesinas forman un anillo que envuelve las dos cromátidas hermanas manteniéndolas unidas (Haering et al., 2008; revisado en Nasmyth, 2011).

Además de estas subunidades estructurales del complejo de cohesinas, existen proteínas reguladoras que interaccionan con él modulando su dinámica y función. En la actualidad se han identificado en vertebrados tres subunidades reguladoras: WAPAL, PDS5 y Sororina (Figura 1; Sumara et al., 2000; Kueng et al., 2006; Rankin et al., 2005, Losada et al., 2005; revisado en Peters et al., 2008). WAPAL fue identificada por primera vez en *D. melanogaster* como una proteína implicada en la formación de heterocromatina (Perrimon et al., 1985; Verni et al., 2000). En *S. cerevisiae* existe un ortólogo lejano de esta proteína denominada Rad61 que, si bien su secuencia no está muy conservada, también interacciona con las cohesinas (Ben-Shahar et al., 2008). WAPAL se asocia al complejo de cohesinas a través de RAD21 y STAG1/2 (Kueng et al., 2006; Gandhi et al., 2006) e interacciona a su vez con PDS5 (Kueng et al., 2006; Gandhi et al., 2006). A diferencia de WAPAL, la secuencia de PDS5 está altamente conservada y se caracteriza por presentar numerosas repeticiones del dominio HEAT

(Panizza et al., 2000). En vertebrados existen dos parálogos de PDS5 denominados PDS5A y PDS5B, los cuales son capaces de asociarse a complejos constituidos tanto por STAG1 como por STAG2 (Sumara et al., 2000; Losada et al., 2005). PDS5 interactúa a su vez con Sororina, la cual sólo ha sido identificada en vertebrados. En estos organismos, Sororina es necesaria para la cohesión entre las cromátidas hermanas (Nishiyama et al., 2010).

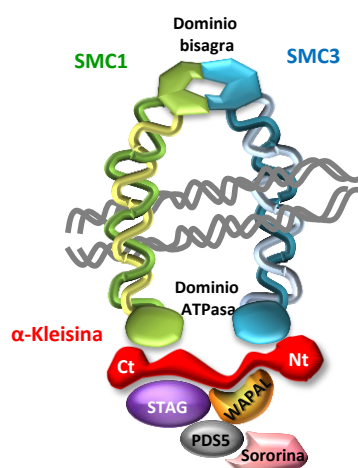


Figura 1. Representación del complejo de cohesinas según el modelo de anillo. El dímero formado por SMC1 y SMC3 se cierra mediante la unión de una α -kleisina la cual interactúa con una subunidad STAG. WAPAL, PDS5 y Sororina son subunidades reguladoras del complejo. La doble hélice gris representa las cromátidas hermanas.

Tabla I. Subunidades estructurales del complejo de cohesinas y subunidades reguladoras en varios organismos.

Mamíferos	<i>D. melanogaster</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>
SMC1 α /SMC1 β	Smc1	Smc1	Psm1
SMC3	Smc3	Smc3	Psm3
RAD21/REC8	DRad21/C(2)M	Sccl/Rec8	Rad21/Rec8
STAG1/2/3	DSTAG1/2	Sccl	Psc3/Rec11
PDS5A/B	PDS5	Pds5	Pds5
WAPAL	WAPAL	Rad61	Wapal
Sororina	Dalmatian?	-	-

Mitosis Meiosis

1.2.1. Carga de las cohesinas y establecimiento de la cohesión

Los complejos de cohesinas son cargados en el DNA en vertebrados durante la telofase (Losada et al., 1998; Sumara et al., 2000) y en levaduras durante la fase G1/S (Guacci et al., 1997; Michaelis et al., 1997). La carga de los complejos depende de dos proteínas denominadas NIPBL/Sccl y MAU2/Sccl4 e implica el reclutamiento de las cohesinas al DNA pero no la generación de cohesión entre las cromátidas (Tonkin et al., 2004; Seitan et al., 2006; Watrin et

al., 2006). A pesar de que la función que desempeñan estos factores de carga de las cohesinas está muy conservada, se desconoce el mecanismo por el cual el complejo de cohesinas es cargado en el DNA. Los resultados obtenidos por dos laboratorios independientes sugieren que la apertura y posterior carga del anillo en la cromatina depende de la hidrólisis de ATP por el dominio ATPasa del heterodímero SMC (Arumugan, 2003; Weitzer, 2003). Existen dos modelos que predicen los cambios conformacionales que provocaría la hidrólisis del ATP en el anillo de cohesinas para permitir su carga en el DNA. Según uno de ellos, la hidrólisis de ATP ocasionaría la relajación de la interacción del dominio ATPasa con RAD21 permitiendo la entrada del DNA (Woo et al., 2009). El otro modelo sostiene que la hidrólisis de ATP provocaría la apertura por el dominio globular bisagra de SMC1 y SMC3 por el cual accedería el DNA (Gruber et al., 2006; Kurze et al., 2011). Según ambos modelos, una vez cargado en la cromatina, el anillo se cerraría de nuevo al unir una nueva molécula de ATP (Figura 2).

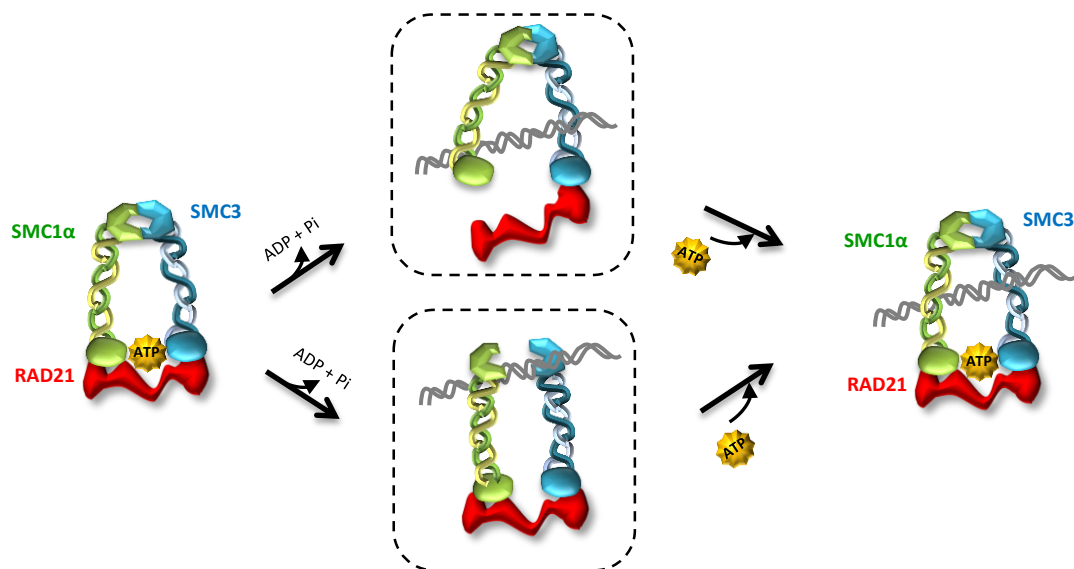


Figura 2. Modelos de carga del complejo de cohesinas por hidrólisis de ATP en el dominio ATPasa del heterodímero SMC1-SMC3. Representación esquemática de dos modelos que predicen los cambios conformacionales que sufrirían los complejos de cohesinas tras la hidrólisis de ATP permitiendo el acceso del DNA al anillo de cohesinas. Las hélices grises simbolizan el DNA.

La carga del complejo de cohesinas con el DNA no es, sin embargo, suficiente para mantener las cromátidas hermanas unidas. Para ello es necesario un segundo proceso denominado “establecimiento de la cohesión”, el cual tiene lugar durante la replicación del DNA en la fase S. El establecimiento de la cohesión en mamíferos es dependiente de la acetilación de la subunidad SMC3 por la acetiltransferasa ESCO1 o ESCO2 (Zhang et al., 2008; Nishiyama et al., 2010). Las subunidades reguladoras del complejo de cohesinas también participan en el establecimiento de la cohesión, aunque aún no se ha determinado el mecanismo molecular

subyacente a esta función. En levaduras, *D. melanogaster* y *C. elegans* PDS5 es esencial para la cohesión durante la fase G2/M (Hartman et al., 2000; Panizza et al., 2000; Tanaka et al., 2001; Stead et al., 2003; Wang et al., 2003; Dorsett et al., 2005), mientras que la depleción de PDS5A o B en vertebrados apenas afecta a la cohesión entre las cromátidas (Losada et al., 2005; Zhang et al., 2007). Por el contrario, la depleción de WAPAL dificulta la liberación de las cohesinas y su sobreexpresión ocasiona defectos en la cohesión durante la mitosis (Kueng et al., 2006; Gandhi et al., 2006). Por tanto, PDS5 desempeñaría un papel promotor de la cohesión mientras que WAPAL ejercería una función desestabilizadora sobre las cohesinas. No obstante, en levaduras diversos estudios han demostrado que el complejo formado por ambas proteínas antagoniza la acetilación de SMC3 y el establecimiento de la cohesión (Rowland et al., 2009; Feytout et al., 2011). En vertebrados, el establecimiento de la cohesión depende también de Sororina (Rankin 2005). Su depleción en células HeLa genera pérdida de cohesión en la fase S y G2. En este sentido, se ha propuesto que la acetilación de SMC3 permite la interacción de Sororina con PDS5, lo cual ocasionaría un cambio conformacional que contrarresta la capacidad desestabilizadora de WAPAL sobre los complejos (Nishiyama et al., 2010; Figura 3).

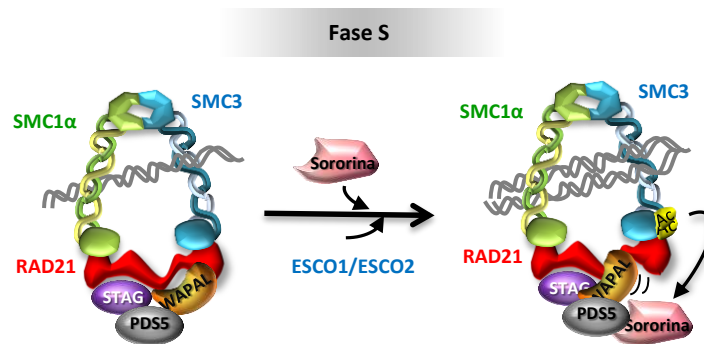


Figura 3. Representación del mecanismo molecular implicado en el establecimiento de la cohesión durante la fase S en vertebrados.

1.3. Liberación secuencial de los complejos de cohesinas durante la mitosis de vertebrados

Como ya se ha comentado anteriormente, los complejos de cohesinas mantienen las cromátidas hermanas unidas hasta su segregación durante la mitosis. En levaduras, las cohesinas permanecen en los brazos y en el centrómero de los cromosomas hasta el comienzo de anafase, momento en el que la proteólisis de RAD21/Scc1 por una proteasa denominada Separasa ocasiona la apertura y disociación de los complejos. A diferencia de en levaduras, en los organismos superiores las cohesinas están sujetas a una liberación secuencial en dos

etapas. Durante la primera etapa, la cual tiene lugar en profase, la mayoría de los complejos de cohesinas asociados a los brazos de los cromosomas se liberan por un mecanismo poco conocido mediado por la fosforilación de STAG2 por la kinasa PLK1 (polo-kinasa 1) en la denominada “ruta profásica” (Figura 4 y 5; Hauf et al., 2005; Waizenegger et al., 2000). El reclutamiento de PLK1 a los brazos cromosómicos, y por consiguiente la fosforilación de STAG2, es facilitado por la fosforilación de Sororina por Cdk1/Ciclina B (Zhang et al., 2011). Asimismo, esta liberación de los complejos durante la ruta profásica es dependiente de la interacción de WAPAL con el complejo de cohesinas (Sumara et al., 2002; Kueng et al., 2006; Gandhi et al., 2006). En relación con esto, se ha propuesto que la Sororina fosforilada en mitosis se disocia de PDS5 permitiendo a WAPAL desestabilizar la asociación de las cohesinas con el DNA (Nishiyama et al., 2010). Posiblemente, la fosforilación conjunta de STAG2, Sororina, PDS5 y WAPAL contribuya a la disociación del anillo durante la ruta profásica (Figura 5; revisado en Nasmyth, 2011).

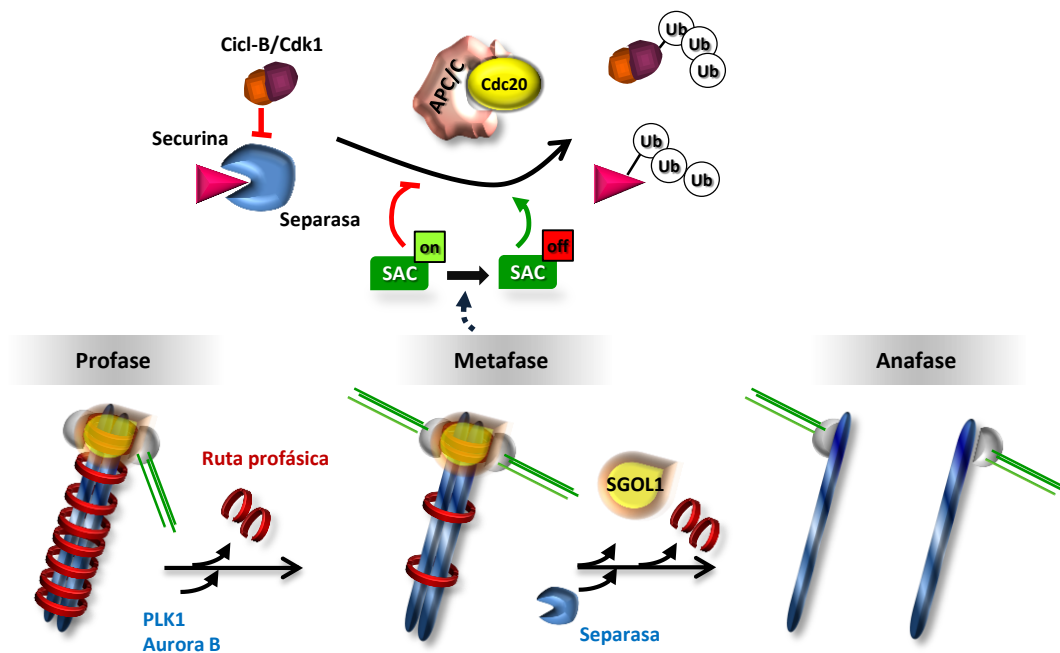


Figura 4. Representación esquemática de la liberación secuencial de los complejos de cohesinas durante la mitosis de vertebrados. Los anillos rojos representan los complejos de cohesinas y las barras azules las cromátidas hermanas. Los microtúbulos y los cinetocoros están simbolizados como líneas verdes y medias esferas grises, respectivamente. Cicl-B: Ciclina B. Ub: Ubiquitina.

La pequeña fracción residual de cohesinas no disociadas durante la ruta profásica que permanece en los centrómeros es eliminada a través de una segunda etapa dependiente de la proteasa Separasa en la transición metafase/anafase. Esta proteasa permanece inhibida durante la mayor parte del ciclo celular por la chaperona Securina, la cual impide su unión al sustrato

(Zachariae, 1999; Uhlmann et al., 2000; Waizenegger et al., 2002), y por fosforilación dependiente del complejo CDK1/Ciclina B en vertebrados (Stemmann et al., 2001; Gorr et al., 2005; Huang et al., 2005 y 2008). Cuando los cromosomas se alinean correctamente en la placa metafásica Separasa se activa gracias a la ubiquitinación y consecuente degradación de sus inhibidores por el APC/C, el cual es activado mediante su unión con CDC20 tras la inactivación del SAC (revisado en Barford, 2011). Separasa, una vez activada, ejerce su acción proteolítica sobre RAD21 en dos motivos conservados E-x-x-R (Hauf et al., 2001; Uhlmann et al., 1999; Buonomo 2000). La proteólisis de RAD21 provoca la apertura y liberación de los complejos de cohesinas centroméricos y en consecuencia, la segregación de las cromátidas hermanas (Figura 4 y 5; Waizenegger et al., 2000; Hauf et al., 2001).

1.3.1. Separasa

La función catalítica de esta cisteín-proteasa se encuentra evolutivamente muy conservada (Stemmann et al., 2001; Waizenegger et al., 2002) y es imprescindible para la segregación cromosómica desde levaduras hasta mamíferos pasando por *C. elegans*, *D. melanogaster* y pez cebra (Siomos et al., 2001; Jäger H et al., 2001; Shepard et al., 2007; Waizenegger et al., 2002; Chestukhin et al., 2003; Kumada et al., 2006; Wirth et al., 2006). En líneas celulares humanas, la expresión de un mutante de RAD21 incapaz de ser procesado por Separasa, ocasiona defectos en la proliferación y aparición de figuras mitóticas aberrantes (Hauf et al., 2001). Asimismo, la ausencia de Separasa tanto en células humanas como de ratón bloquea la separación de las cromátidas hermanas en mitosis y da lugar a la formación de células poliploides, puentes anafásicos y husos multipolares (Waizenegger et al., 2002; Chestukhin et al., 2003; Kumada et al., 2006; Wirth et al., 2006). Además, los ratones deficientes en Separasa son inviables puesto que su depleción ocasiona letalidad durante el desarrollo embrionario temprano (Kumada et al., 2006; Wirth et al., 2006).

Por otra parte, diferentes estudios han sugerido que Separasa actúa de forma similar sobre los complejos de cohesinas que mantienen unidos ambos centriolos del centrosoma, si bien el mecanismo molecular no ha sido determinado (Nakamura et al., 2009; Schöckel et al., 2011). Así, se comprobó que la fracción centrosómica de RAD21 es procesada proteolíticamente por Separasa al final de anafase (Nakamura et al., 2009). Además, la activación ectópica de Separasa ocasiona una separación prematura de los centriolos, la cual es contrarrestada por la expresión de una forma no degradable de RAD21 (Schöckel et al., 2011). De cualquier forma, la función específica de las cohesinas y Separasa en los centriolos no es fácil de determinar debido a la dificultad de analizar la cohesión entre las cromátidas hermanas y la cohesión de los centriolos de manera independiente.

La ruta Securina-Separasa, además de participar en la liberación de los complejos de cohesinas centroméricos, ha sido involucrada en la eliminación de los complejos de cohesinas

que se cargan como consecuencia del daño genético en *S. pombe*. Así, en *S. pombe* Separasa interviene en la reparación de daño en el DNA inducido por radiación (Nagao et al., 2004). De hecho, los mutantes de Cut2/Securina presentan defectos en la reparación del daño debido a la no liberación de las cohesinas por Separasa (Nagao et al., 2004). Estudios adicionales en *S. pombe* indican que esta función de Separasa en reparación podría estar relacionada con la liberación de los complejos de cohesinas que contienen la subunidad Rad21 fosforilada por ATR tras la reparación del DNA (Adachi et al., 2008). La conservación de esta función no ha sido demostrada por el momento en otros eucariotas incluyendo *S. cerevisiae* y humanos. En el caso de *S. cerevisiae*, los mutantes deficientes en Pds1/Securina también son sensibles a la radiación, pero en este caso, el defecto está asociado a fallos en la activación del *checkpoint* de daño (Yamamoto et al., 1996, Sanchez et al., 1999).

1.3.2. Protección de la cohesión centromérica

Para asegurar el mantenimiento de la cohesión en el centrómero hasta metafase debe existir un mecanismo que proteja a los complejos de cohesinas de su liberación prematura durante la ruta profásica. El estudio de diferentes organismos modelo ha permitido la identificación de una familia de proteínas funcionalmente muy conservadas e implicadas en el mantenimiento de la cohesión denominadas “shugoshinas”, que en japonés significa “guardián del espíritu” (Kitajima et al., 2004; Rabitsch et al., 2004). La familia de las shugoshinas consta de un solo miembro en *D. melanogaster* (Mei-S322) y en *S. cerevisiae* (Sc-Sgo1), mientras que en *S. pombe* existen dos parálogos, Sp-Sgo1 y Sp-Sgo2 (Kitajima et al., 2004; Rabitsch et al., 2004). En todos los organismos vertebrados estudiados se han identificado dos miembros de esta familia, SGOL1 y SGOL2 (*SGO-like 1 ó 2*; Salic, A. et al., 2004; Kitajima et al., 2006; Rivera et al., 2012).

Las shugoshinas de levaduras no desempeñan ninguna función en la protección de la cohesión durante la mitosis, lo cual no es sorprendente puesto que en la mitosis de estos organismos no existe la denominada “ruta profásica” (Kitajima et al., 2004; Rabitsch et al., 2004; Katis et al., 2004; revisado en Gutiérrez-Caballero et al., 2012).

En mamíferos, la función de ambos parálogos ha sido abordada mediante siRNA en líneas celulares. De esta forma se ha determinado que SGOL1 es esencial para el mantenimiento de las cohesinas en los centrómeros durante la mitosis, puesto que su depleción ocasiona una pérdida prematura de cohesión centromérica y errores en la segregación de las cromátidas hermanas (Salic et al., 2004; McGuinness et al., 2005; Kitajima et al., 2005). Asimismo, su ortólogo en *X. laevis*, XI-SGOL1, es imprescindible para mantener la cohesión centromérica en extractos mitóticos (Rivera & Losada, 2008). Respecto al otro miembro de las shugoshinas en mamíferos, SGOL2, su depleción en células HeLa mediante siRNA da lugar a pérdida prematura de cohesión centromérica (Kitajima et al., 2006). Por el contrario, estudios más recientes empleando otro siRNA diferente, no apoyan los defectos en la cohesión de las

cromátidas hermanas aunque sí describen un ligero incremento en la frecuencia de “chromosome lagging” (Huang et al., 2007). En conclusión, los resultados obtenidos en cuanto a la función de SGOL2 en la mitosis de mamíferos no son concluyentes y se encuentran sometidos a un intenso debate (Kitajima et al., 2006; Huang et al., 2007).

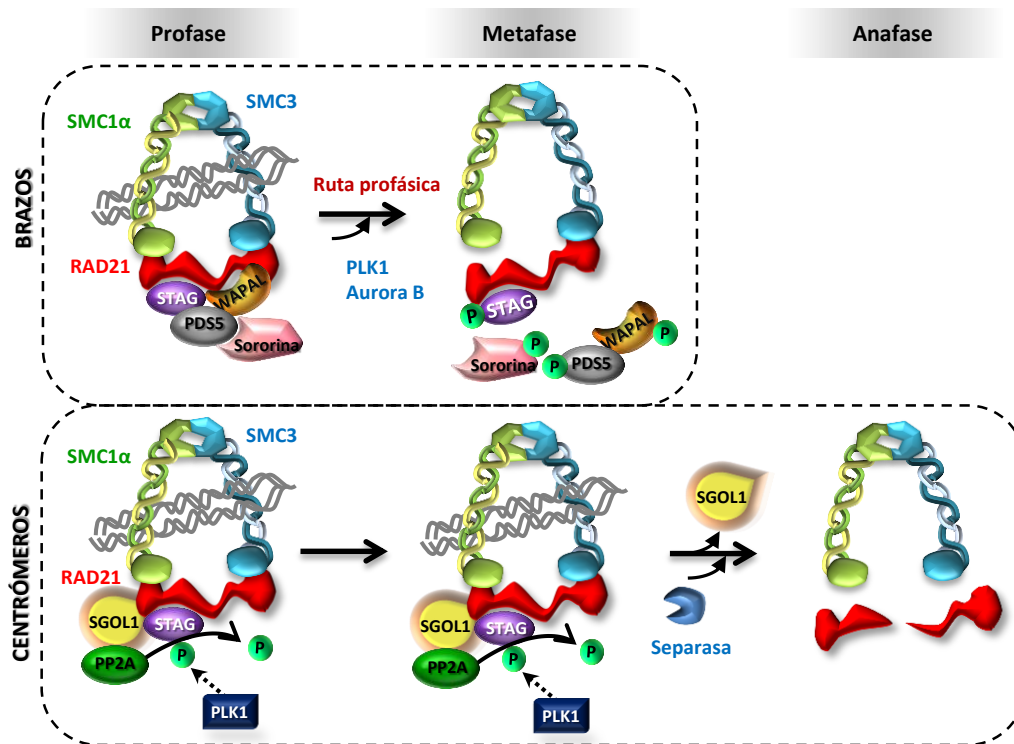


Figura 5. Esquema de las rutas moleculares implicadas en la disociación de los complejos de cohesinas de los brazos y de los centrómeros de las cromátidas hermanas. El panel superior representa la liberación de los complejos de cohesinas de los brazos durante la ruta profásica. El panel inferior describe la protección de los anillos centroméricos por SGOL1 de su liberación durante la ruta profásica y su posterior disociación de los centrómeros por el corte de Separasa sobre RAD21. Las hélices grises representan las cromátidas hermanas y las esferas verdes simbolizan la fosforilación.

El mecanismo por el cual SGOL1 protege los complejos de cohesinas centroméricos es dependiente de su asociación con PP2A. Las proteínas PP2A son serina-treonina fosfatasas constituidas por tres subunidades que forman un complejo heterotrimérico que colocaliza con SGOL1 en los centrómeros (Tang et al., 2006; Kitajima et al., 2006). Esta fosfatasa es requerida para la localización de Hs-SGOL1 en el centrómero, mientras que el reclutamiento de PP2A al centrómero y su actividad catalítica es independiente de SGOL1 (Tang et al., 2006; Xu et al., 2009; Kitajima et al., 2006). PP2A es capaz de defosforilar *in vitro* la subunidad STAG y es necesaria para el mantenimiento de la cohesión centromérica, lo que sugiere que podría impedir la liberación de las cohesinas al contrarrestar la fosforilación de la subunidad STAG2 por PLK1

(Figura 5; Kitajima et al., 2006; Tang et al., 2006). No obstante, la depleción de SGOL1 en células HeLa ocasiona PSCS aun cuando PP2A se encuentra localizado en el centrómero. Esta discrepancia podría ser explicada por el hecho de que SGOL1 y SGOL2 interactúan con diferentes complejos heterotriméricos de PP2A, por lo que los complejos de PP2A que permanecen asociados a los centrómeros en las células deplecionadas de SGOL1 podrían tener una función diferente a las asociadas con SGOL1 (Xu et al., 2009).

Otras funciones de las shugoshinas durante la segregación cromosómica

Además de su función canónica como “guardián de la cohesión”, cada vez son más numerosas las observaciones que relacionan a la familia de las shugoshinas con otros mecanismos fundamentales en la correcta segregación de los cromosomas. Entre estos mecanismos destacan la monitorización de la tensión entre las cromátidas hermanas en levaduras y la regulación de la dinámica de los microtúbulos tanto en levaduras como en vertebrados. La depleción de Hs-SGOL1 en células HeLa afecta a la estabilidad de los microtúbulos cinetocóricos (Salic et al., 2004) y disminuye la afinidad por el cinetocoro de PLK1, una kinasa clave en la regulación de la segregación a través de sus funciones en la unión entre cinetocoro y microtúbulo, el alineamiento de los cromosomas en la placa metafásica y la cascada de señalización en respuesta a la tensión (Pouwels et al., 2007). El otro miembro de las shugoshinas en humanos, Hs-SGOL2, es necesario para la asociación al centrómero de MCAK (*mitotic centromere-associated kinesin*), una microtúbulo depolimerasa implicada en la corrección de uniones anormales entre cinetocoro y microtúbulos (Huang et al., 2007).

En levaduras, la familia de las shugoshinas también participa en funciones mitóticas no relacionadas con la cohesión retrasando la activación del APC/C en ausencia de suficiente tensión entre los microtúbulos y los cinetocoros (Indjeian et al., 2005). En la mitosis de *S. pombe*, Sp-Sgo2 participa en la corrección de uniones anormales durante un arresto mitótico prolongado (Vanoosthuyse et al., 2007; Kawashima et al., 2007).

Estas funciones adicionales de las shugoshinas podrían estar mediadas por su función como adaptadores en el reclutamiento y/o actividad de los miembros del CPC. En *S. pombe*, Sp-Sgo2 recluta el CPC a los centrómeros a través de la fosforilación de Survivina/Bir1 por Cdc2 (Kawashima et al., 2007; Vanoosthuyse et al., 2007; Tsukahara et al., 2010). De manera similar, Hs-SGOL1 y SGOL2 reclutan Aurora B a los centrómeros en un mecanismo dependiente de la fosforilación de Borealina por CDK1 (Boyarchuk et al., 2007). No obstante, es necesaria la depleción de ambas shugoshinas para deslocalizar Aurora B de los centrómeros (Huang et al., 2007; Tsukahara et al., 2010, Pouwels et al., 2007). En *X. laevis*, XI-SGOL1 es necesaria para el reclutamiento de la subunidad INCENP mientras que XI-SGOL2 promueve la activación de Aurora B (Rivera et al., 2012). El único miembro de las shugoshinas en *D. melanogaster*, Mei-S322, no es necesario para el reclutamiento de Aurora B pero sí para su actividad en los centrómeros (Resnick et al., 2006).

Esta función adaptadora de las shugoshinas con el CPC no es unidireccional, puesto que miembros del CPC también participan en el reclutamiento de las shugoshinas al centrómero en diferentes organismos. En concreto, en *D. melanogaster* la localización de Mei-S322 en los centrómeros depende de INCENP y de la fosforilación de Aurora B (Resnick et al., 2006). En *S. pombe*, el reclutamiento de Sp-Sgo2 es dependiente de la subunidad Survivina/Bir1 (Kawashima et al., 2007) y en vertebrados, el reclutamiento de Hs-SGOL1 y Hs-SGOL2 es mediado por Aurora B (Huang et al., 2007, Boyarchuk et al., 2007, Takata et al., 2007).

Además, la localización de las shugoshinas también depende de uno de los componentes conservados del SAC, BUB1 (Kitajima et al., 2004, Kitajima et al., 2005, Tang et al., 2004). El reclutamiento al centrómero de las shugoshinas tanto de levaduras como de mamíferos depende de la fosforilación de la histona H2A por BUB1 en el residuo S121 –levaduras- o T120 –mamíferos- (Kawashima et al., 2010). En mamíferos, esta modificación epigenética junto con la proteína de la heterocromatina HP1 α asociada a H3K9me3, determinan la localización centromérica de SGOL1 (Yamagishi et al., 2008; Kawashima et al., 2010; Perera & Taylor 2010). Además, el reclutamiento de Hs-SGOL1 a los centrómeros es dependiente de la desacetilación de H3K4 por la histona desacetilasa HDAC3 (Eot-Houllier et al., 2008).

1.4. Acetilación/Desacetilación de proteínas y progresión de la mitosis

Además de las marcas epigenéticas que determinan el reclutamiento de las shugoshinas al centrómero, el balance de la acetilación/desacetilación de proteínas implicadas en la progresión de la mitosis es clave para que la segregación cromosómica se lleve a cabo adecuadamente. Este balance está determinado por los enzimas responsables de la acetilación/desacetilación de residuos lisina, denominados histona acetil transferasas/desacetilasas (HAT y HDAC) por ser las histonas sus primeros sustratos identificados. Sin embargo, la lista de sustratos susceptibles de sufrir esta modificación postraducciona reversible ha aumentado considerablemente en la última década. Entre estos sustratos, se encuentran factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto, chaperonas y enzimas metabólicas, así como proteínas que intervienen en la reparación, la recombinación y la replicación del DNA entre otros (revisado en Yang & Seto, 2007). Dada la gran diversidad de sustratos, HAT y HDAC intervienen en numerosos procesos celulares como son la diferenciación celular, el metabolismo, la supervivencia celular y la apoptosis (revisado en Yang & Seto, 2007; Peserico & Simone, 2011).

Respecto a los niveles de acetilación de las histonas, la mitosis se caracteriza por un estado general de hipoacetilación. El descenso en la acetilación de las histonas comienza al principio de la mitosis, alcanza valores mínimos en metafase-anafase y aumenta de nuevo al final de mitosis (Valls et al., 2005; Xu et al., 2009). La importancia de la función de las HDACs durante la segregación cromosómica se ha demostrado mediante el empleo de inhibidores químicos de

su actividad catalítica, los cuales inducen separación prematura de las cromátidas hermanas y defectos en el SAC (Magnaghi-Jaulin et al., 2007).

Hasta el momento se han identificado 18 HDACs en mamíferos divididas en dos familias en función del cofactor requerido para su actividad: Sirtuinas o desacetilasas dependientes de NAD⁺ y la familia Rpd3/Hda1 dependientes de zinc. Desde un punto de vista filogenético pueden agruparse en 4 clases (Gregoretti et al., 2004). La clase I corresponde a las HDACs que presentan homología con la desacetilasa de levaduras Rpd3 e incluye HDAC1, -2, -3 y -8, todas ellas proteínas nucleares. La clase II a su vez se divide en dos subclases: IIa, que engloba a HDAC4, -5, -7, y -9 y la subclase IIb, formada por HDAC6 y -10, todas ellas homólogas a Hda1 y presentes en el citoplasma y el núcleo. La clase III corresponde a la familia de las sirtuinas, de SIRT1 a SIRT7, ortólogas a Sir2 y la clase IV recoge un único enzima, HDAC11 (Gao et al., 2002), descrito en todos los eucariotas excepto en hongos, que posee características intermedias entre las desacetilasas de la clase I y la clase II (Tabla II).

Tabla II. Clasificación de las HDACs de mamíferos.

Familia	Clase	Miembros	Ortólogos en levaduras
Rpd3/Hda1 Zn-dep	Clase I	HDAC1, -2, -3, -8	Rpd3
	Clase IIa	HDAC4, -5, -7, -9	Hda1
	Clase IIb	HDAC6, -10	
	Clase IV	HDAC11	-
Sirtuinas NAD⁺-dep	Clase III	SIRT1-7	Sir2

Respecto a la función individual de estos enzimas durante la mitosis, HDAC3, además de contribuir a las marcas epigenéticas implicadas en el reclutamiento de SGOL1, es responsable de la hipoacetilación general de las histonas durante dicha fase. Además, su actividad desacetilasa está implicada en la correcta unión entre los microtúbulos del huso y los cinetocoros, y su depleción, además de impedir la desacetilación de histonas, induce pérdida prematura de cohesión y activación del SAC (Ishii et al., 2008; Eot-Houllier et al., 2008).

Otra desacetilasa estrechamente relacionada con la progresión de la mitosis es SIRT2, la cual ejerce su acción sobre coactivadores del APC/C (Kim, et al., 2011). Su homólogo en levaduras Sir2 es esencial para el reclutamiento de las cohesinas a las regiones genómicas silenciadas en *S. cerevisiae*, de manera independiente de su actividad desacetilasa (Wu et al., 2011). Es importante destacar que algunos miembros del SAC también están sujetos a regulación por acetilación. Así, la acetilación de BUBR1, kinasa del SAC esencial para la

señalización del checkpoint, inhibe su degradación por el APC/C durante la prometafase prolongando la acción inhibitoria de BUBR1 sobre el APC/C hasta anafase (Choi, 2009).

Por otro lado, los ciclos de acetilación –por ESCO1/2- y posterior desacetilación de la subunidad SMC3 son esenciales para llevar a cabo el establecimiento de la cohesión (Beckouët et al., 2010; Borges et al., 2010). En *S. cerevisiae* la desacetilación de SMC3 es llevada a cabo por Hos1 (Borges et al., 2010) y en mamíferos por HDAC8 (datos no publicados, revisado en Nasmyth, 2011).

Por lo tanto, los enzimas HAT y HDAC desempeñan funciones que repercuten en la segregación cromosómica, las cuales abarcan desde el establecimiento de la cohesión previa a la mitosis y la determinación de los niveles de acetilación de histonas durante la fase de división, hasta la regulación de la maquinaria mitótica incluyendo el SAC, el APC/C y las shugoshinas.

1.4.1. Desacetilación de histonas y regulación transcripcional

Además de su más reciente implicación en la segregación cromosómica, las HDACs a través de la desacetilación de histonas regulan la actividad transcripcional del genoma. En términos generales, se asocia la acetilación de histonas con regiones genómicas transcripcionalmente activas, y la desacetilación de histonas con la represión y el silenciamiento de la expresión (revisado en Spange et al., 2009). Sin embargo, esta relación entre la desacetilación y la represión génica no siempre se cumple. Por ejemplo, en células humanas, varias HDACs se encuentran asociadas con genes transcripcionalmente activos (Wang et al., 2009). Asimismo, la inhibición de HDACs, que induce acetilación global de las histonas, ocasiona activación y supresión de la expresión de genes a partes iguales (revisado en Spange et al., 2009). Una de las explicaciones a estas excepciones viene dada por el efecto de la acetilación sobre otros sustratos no histónicos como los factores de transcripción cuya capacidad de unión al DNA es regulada en algunos casos por esta modificación postraduccional (revisado en Spange et al., 2009; Haberland et al., 2009). Además, las marcas epigenéticas de acetilación constituyen en sí mismas sitios de reconocimiento para otras proteínas, entre las que se incluyen complejos remodeladores de la cromatina (revisado en Peserico & Simone, 2011).

2. División reduccional

A diferencia de la mitosis, la meiosis (del griego *meio*, que significa reducción; Farmer & Moore, 1905) es un tipo de división celular especializada en la que tienen lugar dos rondas sucesivas de segregación cromosómica (meiosis I y II) tras una única ronda de replicación del DNA, obteniéndose así gametos o esporas haploides a partir de una célula precursora diploide. La división reduccional es posible gracias a la existencia de una profase meiótica (profase I) en la cual participan complejos de cohesinas específicos de meiosis. Concretamente, en la meiosis de mamíferos existen parálogos de SMC1 α , y STAG1/2 que son SMC1 β y STAG3, respectivamente,

así como de RAD21 que coexiste en los meiocitos con una α -kleisina específica de meiosis denominada REC8 (Klein et al., 1999; Parisi et al., 1999; Revenkova et al., 2001; Prieto et al., 2001). Por tanto, como se aprecia en la figura 6, el número posible de complejos de cohesinas en meiosis es mayor que en mitosis (Figura 6, Tabla I).

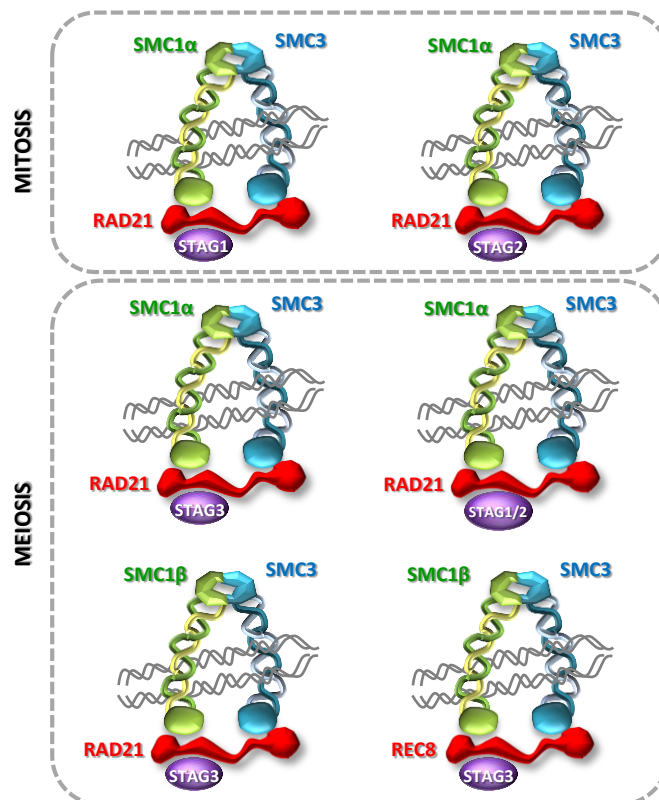


Figura 6. Complejos de cohesinas existentes en células somáticas y meióticas de mamíferos. Las hélices grises simbolizan las cromátidas hermanas.

Durante la profase I los cromosomas homólogos se reconocen entre sí (apareamiento), se asocian físicamente (sinapsis) y tiene lugar un intercambio de material genético entre los mismos (recombinación homóloga) gracias a la formación de un complejo proteico denominado complejo sinaptonémico (SC, *synaptonemal complex*; Petronczki et al., 2003). El SC es una estructura proteica tripartita formada por dos elementos axiales (AE, *axial element*) y un elemento central (CE, *central element*). Los AE forman un eje sobre cada par de cromátidas hermanas y tras el apareamiento de los AE de cada homólogo, son denominados elementos laterales (LEs) sobre los cuales se asocian los componentes del CE formando el SC que crece bidireccionalmente hasta que los cromosomas homólogos se encuentran completamente sinapsados (Figura 7; Henderson & Keeney, 2005). La sinapsis tiene lugar a lo largo de todo el cromosoma en el caso de los cromosomas autosómicos y en la región pseudoautosómica de los

cromosomas sexuales. En mamíferos se han caracterizado diferentes proteínas que forman parte del SC. Concretamente se han identificado SYCP2, SYCP3 (*Synaptonemal Complex Protein*), y HORMAD1 como proteínas constituyentes de los AEs/LEs (Lammers et al., 1994; Schalk et al., 1998; Parra et al., 2004; Shin et al., 2010) y SYCP1 como componente mejor caracterizado del CE (Meuwissen et al., 1992; Liu et al., 1996).

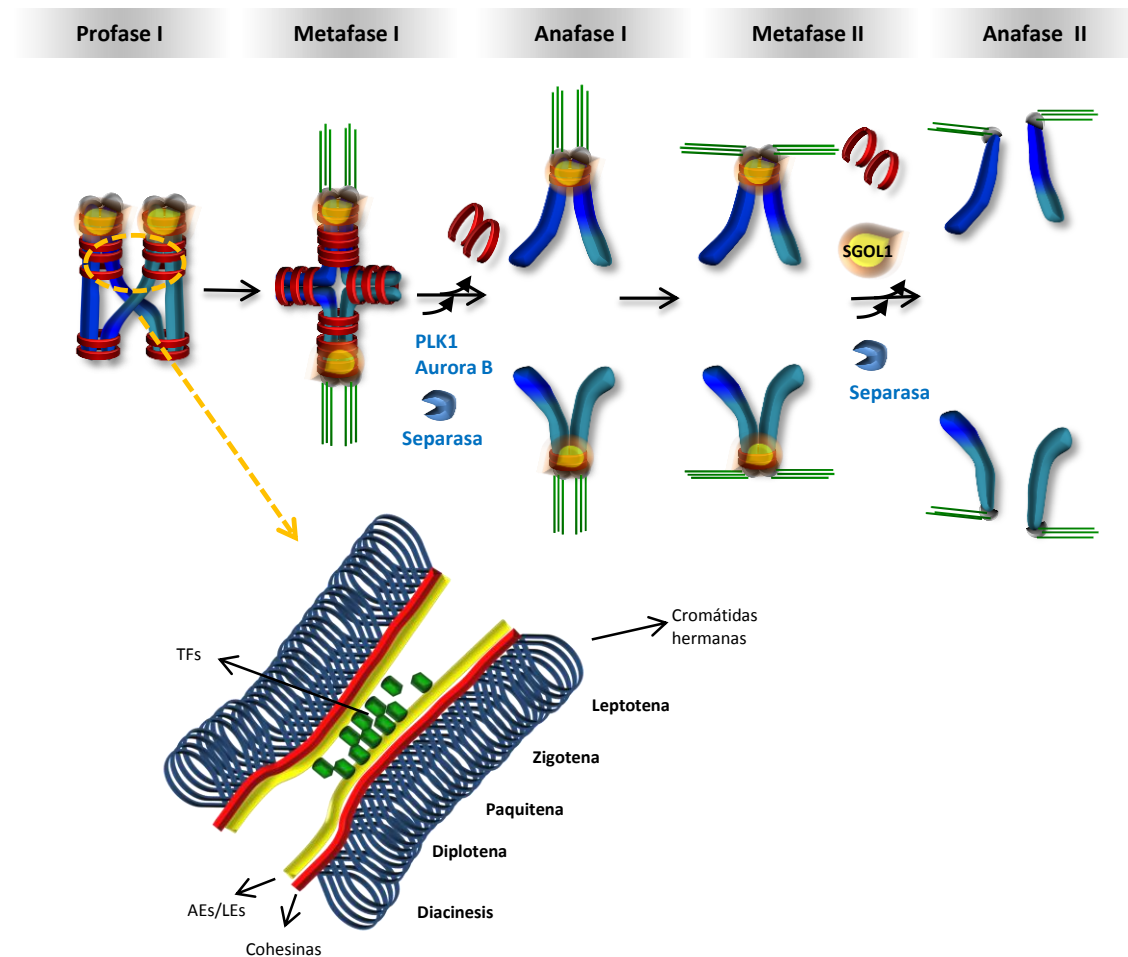


Figura 7. Representación gráfica de la liberación secuencial de los complejos de cohesinas durante la meiosis y del ensamblaje del complejo sinaptonémico durante la profase. Las barras azules representan las cromátidas y los anillos rojos los complejos de cohesinas. Los microtúbulos se representan como líneas verdes y los cinetocoros como medias esferas grises. En la ampliación del SC las barras rojas simbolizan las cohesinas, las barras amarillas indican los AEs/LEs y los rectángulos verdes el CE.

Durante la profase meiótica los complejos de cohesinas intervienen en el ensamblaje de los AEs/LEs. De hecho, las levaduras deficientes en Rec8 o Smc3 presentan defectos en la formación de los AEs (Klein et al., 1999). En el mismo sentido, la depleción conjunta de las tres kleisin existentes en la meiosis de *C. elegans* impide el ensamblaje de los AEs (REC8, COH-3, COH-4; Severson et al., 2009). En ratón, la ausencia de REC8, si bien no altera el ensamblaje de

los AEs, ocasiona discontinuidades en la sinapsis entre los cromosomas homólogos (Bannister et al., 2004). De forma similar, en los meiocitos de ratón deficientes en SMC1 β la formación de los AEs y la sinapsis es incompleta (Revenkova et al., 2004). Por el contrario, los elementos del SC no son necesarios para el reclutamiento de las cohesinas meióticas. De hecho, la depleción simultánea de SYCP1 y SYCP3 no impide la carga de dichas cohesinas (Kouznetsova et al., 2011). La formación de este SC permite la yuxtaposición de los cromosomas homólogos y la unión física de los mismos a través de los quiasmas, donde tiene lugar el sobrecruzamiento. El inicio de la recombinación requiere la generación de DSB (*double strand break*) mediante la nucleasa SPO11 al inicio de la profase meiótica -leptotena- (Mahadevaiah et al., 2001). Esto desencadena una cascada de señalización en respuesta al daño mediada por DNA recombinasas (superfamilia de recombinasas RecA/Rad51) que promueven el apareamiento y recombinación de las cromátidas no hermanas (Kagawa & Kurumizaka, 2010). La ausencia de Rec8 en levaduras y en ratón conlleva a defectos en el procesamiento de las DSB (Klein et al., 1999; Xu et al., 2005) lo que indica que las cohesinas meióticas son necesarias para dicho procesamiento.

Las cohesinas, asimismo, sustentan los quiasmas manteniendo los cromosomas homólogos unidos (tétradas o bivalentes), lo cual es esencial para la biorientación de los mismos en la metafase I (Buonomo et al., 2000; Hodges et al., 2005). En metafase I, esta correcta biorientación de los cromosomas homólogos genera la tensión entre los centrómeros homólogos que provoca la degradación de Securina y ciclina B1 y en consecuencia la activación de Separasa (Herbert et al., 2003). Seguidamente, Separasa libera los anillos de cohesinas de los brazos de los cromosomas mediante la proteólisis de la α -kleisina Rec8, la cual ha sido previamente fosforilada -por las kinasas CK1 (casein-kinase-1) y DDK (Dbf4-dependent Cdc7 kinase) al menos en *S. cerevisiae* (Katis et al., 2010; Ishiguro et al., 2010; Rumpf et al., 2010; revisado en Gutiérrez-Caballero et al., 2012). Esto ocasiona la resolución del quiasma y la segregación de los cromosomas homólogos hacia polos opuestos de la célula debido a la unión de los cinetocoros hermanos a microtúbulos del huso del mismo polo (Buonomo et al., 2000, Haering & Nasmyth 2003, Kitajima et al., 2003; Kudo et al., 2006 y 2009).

Por el contrario, las cohesinas centroméricas resisten esta primera fase de eliminación de complejos de cohesinas, lo cual es esencial para mantener la cohesión entre las cromátidas hermanas necesaria para su biorientación en la segunda división (Figura 7; Page & Hawley, 2003; Hauf & Watanabe, 2004). Por tanto, al igual que en la mitosis de vertebrados, es necesaria la existencia de factores que protejan las cohesinas centroméricas de su liberación por Separasa hasta la anafase II. En *D. melanogaster* y en levaduras esta protección es llevada a cabo por las shugoshinas Mei-S322 y Sgo1, respectivamente. En cuanto al mecanismo implicado en la protección de la digestión por Separasa, Sc-Sgo1 y Sp-Sgo1 interactúan con una variante específica de la fosfatasa PP2A que contrarresta la fosforilación de Rec8 en los centrómeros necesaria para su proteólisis por Separasa. Al comienzo de esta Tesis, la proteína implicada en

el mantenimiento de la cohesión centromérica en la meiosis de mamíferos aún se desconocía. Más adelante, nuestro grupo de investigación demostró que SGOL2 es responsable de la protección de REC8 en los centrómeros de los cromosomas murinos durante la meiosis I (Llano et al., 2008).

La cohesión que persiste en los centrómeros es la responsable de que se produzca la tensión que contrarresta la fuerza del huso cuando las cromátidas hermanas biorientan durante la metafase II. En la transición de metafase a anafase II, la proteólisis por Separasa de la kleisina Rec8 centromérica permite la segregación de las cromátidas hermanas (Figura 7; Kudo et al., 2009; Buonomo et al., 2000). A continuación, en telofase, se descondensa la cromatina y se constituye de nuevo la membrana nuclear. Finalmente, tras los procesos de diferenciación y especialización correspondientes, las células haploides se transformarán en gametos/esporas funcionales.

2.1. Acetilación de histonas durante la división reduccional

Al igual que ocurre durante la mitosis, el patrón de acetilación de las histonas está sometido a modificaciones a lo largo de la meiosis. Si bien aún se desconoce la función específica de estos cambios epigenéticos, podrían estar asociados a modificaciones en la arquitectura u organización cromosómica específica del material genético en meiosis (revisado en Gu et al., 2010).

En términos generales, las histonas H2A, H2B y H4 se encuentran hiperacetiladas en espermatogonias y pre-leptotena y se desacetilan a partir de leptotena hasta la formación de las espermátidas redondas (Hazzouri et al., 2000). Asimismo, las H3 y H4 se desacetilan durante la meiosis de oocitos y son acetiladas de nuevo tras la fertilización (Kim et al., 2003). La desacetilación tanto en oocitos como en espermátocitos es inhibida mediante inhibidores químicos de HDACs (HDACIs, *HDAC inhibitors*), lo que sugiere que es llevada a cabo por estas enzimas, al igual que en mitosis (Hazzouri et al., 2000; Kim et al., 2003).

La relación entre esta regulación epigenética y la segregación cromosómica en meiosis se deduce tras el tratamiento con HDACIs en oocitos durante su maduración, el cual da lugar a aneuploidías y letalidad embrionaria (Akiyama et al., 2006). Además, un mayor nivel de acetilación de la histona H3 durante la maduración de oocitos *in vitro* se ha asociado con defectos en el huso metafásico (Huang et al., 2012). Asimismo, al aumentar la edad materna incrementan los defectos en la desacetilación de la histona H4 en humanos, los cuales están asociados con una mayor proporción de defectos en el alineamiento de los cromosomas (van den Berg et al., 2011). El mecanismo que subyace a esta relación entre desacetilación de

histonas y segregación cromosómica aún no ha sido demostrado. No obstante, el hecho de que las modificaciones epigenéticas del centrómero sean esenciales para la formación de un cinetocoro funcional sugiere que la acetilación de histonas pueda alterar la heterocromatina del centrómero ocasionando defectos en la interacción cinetocoro-microtúbulo (revisado en Gu et al., 2010). Por otro lado, es probable que, al igual que en mitosis, exista un ciclo de acetilación/desacetilación de SMC3 en meiosis para lo cual se requeriría una HDAC por ahora desconocida, que permita disponer de la subunidad SMC3 desacetilada para establecer la cohesión en las subsiguientes mitosis tras la fertilización.

3. Otras funciones de las cohesinas

Las cohesinas, además de su función canónica en el mantenimiento de la cohesión entre las cromátidas hermanas durante la mitosis, desempeñan un papel fundamental en otros procesos celulares claves para la homeostasis celular como son los mecanismos de reparación de roturas en el DNA y la regulación de la expresión génica.

3.1. Cohesinas y reparación de daños en el DNA

Las células están constantemente expuestas a agentes deletéreos que ocasionan DSB en el DNA como la radiación, agentes químicos y ciertos subproductos metabólicos. Existen mecanismos de detección y reparación de DSB desde organismos unicelulares hasta mamíferos que son esenciales para el mantenimiento de la integridad del genoma. Tras la replicación del DNA las DSBs son reparadas preferentemente mediante el mecanismo de recombinación homóloga utilizando la cromátida hermana como molde (revisado en Symington & Gautier, 2011).

Desde un punto de vista evolutivo, el papel de las cohesinas en reparación es probablemente su función original y por tanto, la más conservada. De hecho, la proteína Rad21 se aisló y caracterizó por primera vez, antes de conocer su implicación en cohesión, en unos mutantes de *S. pombe* incapaces de reparar el daño en el DNA inducido por radiación (Birkenbihl et al., 1992). Igualmente, las proteínas SMC1 y SMC3 de mamíferos se caracterizaron en primer lugar como subunidades del complejo de recombinación RC-1 (Jessberger et al., 1996).

Tanto en células humanas como en levaduras, la generación de DSB en la fase postreplicativa provoca un reclutamiento de cohesinas y establecimiento de cohesión *de novo* a través de todo el genoma. Este proceso es dependiente de proteínas implicadas en el establecimiento de la cohesión y de miembros del *checkpoint* de daño en el DNA (Ström et al., 2007; Unal et al., 2007; Kim et al., 2010). Así, en células humanas las cohesinas son reclutadas mediante un mecanismo dependiente de la fosforilación de SMC3 por la kinasa ATM y de su acetilación por ESCO1 (Kim et al., 2010). Las cohesinas también son reclutadas específicamente a sitios de rotura del DNA. Concretamente, en *S. cerevisiae* las cohesinas son reclutadas a las DSBs tras la fosforilación de H2AX (γ H2AX; Unal et al., 2004). En mamíferos, SMC1 y SMC3 son

fosforiladas por ATM en sitios de rotura del DNA mediante un mecanismo dependiente de H2AX, 53BP1 y MDC1, las cuales son proteínas mediadoras de la respuesta a daño en el DNA (Bauerschmidt et al., 2011). Recientemente, se ha reportado que en células humanas el reclutamiento de cohesinas está restringido a los sitios de DSB y delimita la distribución de γ H2AX (Caron et al., 2012).

Una evidencia *in vivo* del papel fundamental que juegan las cohesinas en reparación de las roturas en el DNA viene dada por los ratones haploinsuficientes para *Rad21*, los cuales son más sensibles a la radiación que los animales silvestres debido a defectos en la reparación (Xu et al., 2010). Esta función de las cohesinas no sólo depende de su capacidad de asociar las cromátidas hermanas (Sjogren & Nasmyth, 2001; Schmitz et al., 2007), sino que también está sustentada en su capacidad para reclutar proteínas del *checkpoint* de daño facilitando la activación de los *checkpoints* de las fases S y G2/M (Watrin & Peters, 2009).

3.2. Cohesinas y regulación de la expresión génica

Durante la última década, numerosas observaciones han sugerido que las cohesinas participan en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo y la diferenciación celular en diferentes organismos. En *D. melanogaster*, la proteína Nipped-B, está directamente relacionada con la activación de genes homeobox y de la ruta Notch, mientras que DSTAG1 ejerce un efecto opuesto al impedir la activación de *cut* (Rollins et al., 1999 y 2004). Los embriones del pez cebra mutantes para *Rad21* o *Smc3* exhiben una disminución en los niveles de los factores transcripcionales RUNX, proteínas clave en la hematopoyesis y el desarrollo del sistema nervioso (Horsfield et al., 2007). Recientemente, el análisis de la localización genómica de los complejos de cohesinas formados por STAG1, reveló que estos se acumulan particularmente en regiones promotoras (Remeseiro et al., 2012). Además, la ausencia de STAG1 en fibroblastos embrionarios conlleva a la desregulación de diversos genes implicados en importantes procesos biológicos como apoptosis, fagocitosis, o en el desarrollo de diferentes órganos (Remeseiro et al., 2012). Asimismo, la depleción de cualquiera de los dos parálogos de PDS5 -PDS5A y PDS5B- en ratón genera alteraciones durante el desarrollo, si bien no existe pérdida visible de la cohesión entre cromátidas (Zhang et al., 2007 y 2009). De la misma forma, en humanos existe un conjunto de enfermedades hereditarias denominadas cohesinopatías que son debidas a mutaciones en genes que codifican cohesinas o proteínas implicadas en la carga del complejo o en el establecimiento de la cohesión. Estas enfermedades se caracterizan por retraso mental y del crecimiento, y en ocasiones malformaciones de las extremidades (revisado en Liu & Krantz, 2009). La cohesinopatía más frecuente es el denominado síndrome de Cornelia de Lange, el cual se debe en el 60% de los casos a mutaciones en *Nipbl* en heterocigosis (Krantz et al., 2004; Tonkin et al., 2004) y en menor proporción a mutaciones en las subunidades SMC1 α o SMC3 (Musio et al., 2006; Deardorff et al., 2007). Recientemente, se han reportado en individuos con características similares al síndrome de Cornelia de Lange dos mutaciones

puntuales o ablación en heterocigosis de *Rad21* (Deardorff et al., 2012). Otra cohesinopatía denominada Síndrome de Roberts se debe a mutaciones en la acetiltransferasa ESCO2 (Vega et al., 2005). Sin embargo, la mayoría de estas mutaciones no provocan defectos en la cohesión, lo que indicaría que estas proteínas desempeñan funciones adicionales (Liu & Krantz, 2009; Dorsett, 2011). De hecho, los análisis de la expresión génica de las células de estos pacientes por microarrays revelan patrones de expresión alterados, lo que sugiere una relación funcional entre los complejos de cohesinas y la regulación de la transcripción (Liu & Krantz, 2009). Al igual que los pacientes con mutaciones en *Nipbl*, los ratones portadores de un alelo nulo para dicho gen fenocopian a los individuos con Cornelia de Lange y presentan alteraciones en los niveles de expresión génica en sus células (Kawauchi et al., 2009).

Uno de los mecanismos por el que los complejos de cohesinas regulan la expresión génica en células diferenciadas, es a través de su interacción con el factor CTCF (CCCTC-binding factor), un factor de unión al DNA con actividad reguladora de la transcripción (Wendt et al., 2008; Parelho et al., 2008). Por otro lado, las cohesinas también son reclutadas por factores de transcripción específicos de tejido e independientes de CTCF, lo que sugiere que desempeñan una función específica de tejido en la regulación transcripcional (Schmidt et al., 2010). En células pluripotentes el patrón de distribución de las cohesinas es diferente al de las células diferenciadas. En células madre embrionarias las cohesinas colocalizan con factores de transcripción involucrados en pluripotencia de forma independiente a CTCF y regulan la expresión de genes implicados en pluripotencia en colaboración con el complejo Mediator (Kagey et al., 2010; Nitzsche et al., 2011).

4. Segregación cromosómica e inestabilidad cromosómica

El mantenimiento de la integridad del genoma depende de que la segregación cromosómica durante la división celular se lleve a cabo de forma coordinada en el espacio y en el tiempo, asegurando la correcta transmisión del material genético de la célula madre a sus dos células hijas (Yuen et al., 2005; Holland & Cleveland, 2009). La desregulación de este proceso contribuye a la aparición de aneuploidías e inestabilidad genómica, lo cual está estrechamente ligado con la carcinogénesis (Rajagopalan & Lengauer, 2004; Weaver & Cleveland, 2009; revisado en Fang & Zhang, 2011). Una evidencia directa de esta afirmación es la reciente demostración de que los micronúcleos generados como consecuencia de errores en la segregación acumulan daños en el DNA debido a errores en la replicación y/o defectos en la reparación. Posteriormente, estos micronúcleos pueden ser incorporados nuevamente en el núcleo de las células hijas contribuyendo a la acumulación de anomalías en el genoma (Crastra et al., 2012). Asimismo, la inestabilidad cromosómica durante la división puede dar lugar a aberraciones estructurales en los cromosomas de las células hijas (Janssen et al., 2011). Igualmente, en levaduras se ha demostrado que la aneuploidía promueve la inestabilidad

genómica puesto que la presencia de un cromosoma extra favorece la aparición de mutaciones puntuales, pérdida de cromosomas, y defectos en la reparación del DNA (Sheltzer et al., 2011).

Como ya hemos comentado anteriormente, las cohesinas, shugoshinas y Separasa desempeñan una función esencial para la fidelidad de la segregación cromosómica, por lo que su desregulación podría estar relacionada directa o indirectamente con la inestabilidad cromosómica. Por otro lado, las cohesinas también están implicadas en la regulación de la transcripción génica y en la reparación de DSB lo que supone otro vínculo de estas proteínas con los procesos desregulados durante la progresión tumoral (revisado en Rhodes et al., 2011; y en Xu et al., 2011). En los últimos años se han descrito mutaciones y desregulación en la expresión de genes que codifican cohesinas o factores reguladores del complejo en diversos tipos de tumores (revisado en Xu et al., 2011). Concretamente, *Rad21* se encuentra amplificado y sobreexpresado en tumores de próstata (Porkka et al., 2004) y su sobreexpresión en tumores de mama se ha relacionado con una peor prognosis y mayor resistencia a la quimioterapia (Xu et al., 2011). Asimismo, se ha identificado un SNP (*single nucleotide polymorphism*) en un intrón de este mismo gen asociado a una mayor susceptibilidad al cáncer de mama (Kammerer et al., 2004). También se han descrito mutaciones en las subunidades SMC1 α , SMC3 y STAG3, y en el factor de carga NIPBL en diferentes tumores colorrectales con inestabilidad cromosómica (Barber et al., 2008). Respecto a las subunidades reguladoras, se ha descrito que la sobreexpresión de *Wapal* ocasiona aberraciones cromosómicas y aneuploidías en células HeLa (Ohbayashi et al., 2007) y puede desempeñar un papel importante en la progresión del cáncer cervical (Oikawa et al., 2004). Asimismo, el gen de la acetiltransferasa *Esco2* se encuentra sobreexpresado en los melanomas más agresivos (Ryu et al., 2007). Si bien todos estos datos representan evidencias tan sólo indirectas de la implicación de las cohesinas en tumorigénesis, dos estudios recientes demuestran una relación causal entre mutaciones en cohesinas y la carcinogénesis humana. Así, se ha descrito que la inactivación de STAG2 ocasiona aneuploidías en tumores (Solomon et al., 2011) y se ha reportado una mutación en SMC3 que se comporta como “conductora” en la leucemia mieloide aguda (Ding et al., 2012). Además en el ratón, la ablación de un alelo de STAG1 promueve la aparición espontánea de tumores y la depleción total de esta subunidad ocasiona aneuplodización por defectos en la replicación de los telómeros (Remeseiro et al., 2012b).

En cuanto al inhibidor de Separasa, Securina, fue identificado inicialmente como un oncogén humano (PTTG, *pituitary tumor transforming gene*, Pei & Melled 1997; Zou et al., 1999) lo que sugiere que la ruta Securina-Separasa pueda estar implicada en la formación de tumores. De hecho, en el pez cebra, Separasa se ha propuesto como un gen supresor de tumores que desempeña un papel protector frente a la progresión de tumores epiteliales químicamente inducidos (Shepard, et al., 2007). En este mismo sentido, la disminución de los niveles de Separasa en ratones con un fondo genético nulo de p53 coopera en el desarrollo de leucemias y linfomas agresivos de células B y T, posiblemente desencadenados por la

acumulación de aberraciones cromosómicas y aneuploidías (Mukherjee et al., 2011). Sin embargo, Separasa se comporta como un oncogén en células epiteliales de mama mutantes para p53, en las que su sobreexpresión ocasiona PSCS, formación de puentes anafásicos, *chromosome lagging* y aneuploidización (Zhang et al., 2008).

En humanos, el gen de Separasa se encuentra sobreexpresado en diferentes tipos de tumores sólidos, incluyendo mama y próstata donde está correlacionado con una peor prognosis (Zhang et al., 2008; Meyer et al., 2009), lo cual junto con los resultados anteriores ha llevado a estos autores a considerar a Separasa como un posible oncogén (Zhang et al., 2008; revisado en Pati, 2008).

Las shugoshinas también presentan alteraciones en su expresión en algunos tumores. Por ejemplo, en cáncer colorrectal los niveles de expresión de *Hs-Sgol1* son menores, y en líneas celulares de cáncer colorrectal el descenso en los niveles de mRNA de *Sgol1* da lugar a inestabilidad cromosómica (Iwaizumi et al., 2009). Además, recientemente se ha identificado en cáncer de colon, una nueva variante de Hs-SGOL1 denominada SGOL1-P1, cuya sobreexpresión en células HCT116 inhibe el reclutamiento de SGOL1 al centrómero provocando PSCS y retraso mitótico (Kahyo et al., 2011). Es necesario destacar además, que Hs-SGOL1 fue identificado inicialmente antes de conocerse su pertenencia a la familia de las Shugoshinas, como un antígeno sobreexpresado en el 90% de los carcinomas de mama (Scanlan et al., 2001).

Los errores durante la segregación cromosómica en la meiosis pueden dar lugar a abortos, infertilidad y a la aparición de enfermedades congénitas en la descendencia. La mayoría de estos errores están relacionados con la edad materna y tienen lugar durante la meiosis I, aunque un pequeño porcentaje son debidos a fallos en la meiosis II (Hassold & Hunt, 2001). En este sentido, diferentes estudios han demostrado que la regulación y la adecuada función de las cohesinas, shugoshinas y Separasa son esenciales para evitar defectos en la división reduccional del material genético (Bannister et al., 2004; Revenkova, et al., 2004; Vogt et al., 2008; Kudo et al., 2006; Huang et al., 2008; Xu et al., 2011). Entre estos estudios, los modelos murinos deficientes en cohesinas meióticas revelan la importancia de estas proteínas en la formación de gametos viables. Concretamente, la ausencia de REC8 o de SMC1 β (Bannister et al., 2004; Revenkova et al., 2004) provoca esterilidad en ambos sexos debido a defectos en la sinapsis y recombinación entre los cromosomas homólogos que dan lugar a un arresto en paquitena, o en el caso de las hembras *Smc1 β ^{-/-}*, a pérdida prematura de cohesión en metafase II.

En mamíferos, los oocitos se encuentran arrestados en la sub-etapa profásica diplotena – dictiata- desde el desarrollo embrionario hasta su ovulación durante la madurez sexual, lo cual en humanos puede suponer un periodo de hasta 40 años durante los cuales las cohesinas cargadas en la fase S (desarrollo embrionario) deben mantener la cohesión cromosómica necesaria para segregar los cromosomas y las cromátidas en el momento de la ovulación (revisado en Jessberger, 2012). El modelo murino deficiente en SMC1 β supuso la primera evidencia directa

de un descenso en la cohesión de las cromátidas hermanas en oocitos asociado a la edad (Revenkova et al., 2004). De acuerdo con esto, Chiang et al., describieron que la distancia entre los cinetocoros de las cromátidas hermanas aumenta con la edad en oocitos de ratón, debido a un descenso de la cohesión y de REC8 en los cromosomas (Chiang et al., 2010). El análisis de oocitos de cepas de ratón de esperanza de vida larga sugiere que el envejecimiento de las hembras va acompañado de un descenso en las cohesinas, lo cual provoca un relajamiento de la asociación entre los centrómeros de las cromátidas hermanas que a su vez impide la correcta segregación cromosómica durante la meiosis I (Lister et al., 2010). Es interesante destacar que esta pérdida de cohesinas está asociada con un descenso en los niveles de Mm-SGOL2, lo cual amplifica la disminución de las cohesinas durante la prometafase (Lister et al., 2010). En oocitos humanos, se ha demostrado que los defectos en la protección de las cohesinas centroméricas de su proteólisis prematura por Separasa, puede dar lugar a fallos en la segregación de los cromosomas durante la meiosis (Vogt et al., 2008).

En cuanto a Separasa, su ausencia en oocitos de ratón provoca infertilidad debido a la imposibilidad de resolver los quiasmas (Kudo et al., 2006). En humanos, estos errores en la resolución del quiasma conllevan a la aparición de aneuploidías implicadas en infertilidad, abortos y Síndrome de Down entre otros (Hassold & Hunt, 2001). Por otro lado, la mutación puntual del residuo S1121 de Separasa, cuya fosforilación permite su inhibición por Ciclina B1, provoca esterilidad en ambos sexos debido a defectos proliferativos de la línea germinal embrionaria durante el desarrollo embrionario del ratón (Huang et al., 2008; Xu et al., 2011). Asimismo, la regulación estricta de Separasa durante la división reduccional de los oocitos es crítica puesto que la desregulación de sus dos rutas de inhibición *in vitro* provoca separación prematura de los bivalentes y las cromátidas en metafase I (Chiang et al., 2011). En este sentido, los defectos en cohesión generados por la activación constitutiva de Separasa son mayores en oocitos viejos, lo cual apoya el descenso de cohesinas asociado a la edad (Chiang et al., 2011). Por tanto, la adecuada expresión y actividad de Separasa son fundamentales para la formación de gametos viables.

Objetivos

Durante los últimos años, nuestro grupo se ha centrado en el análisis funcional de proteínas involucradas en el establecimiento y protección de la cohesión cromosómica en mamíferos. En este ámbito, y para profundizar en el conocimiento de estos procesos, decidimos abordar la caracterización funcional de una de las shugoshinas de mamíferos, SGOL2, cuya función al inicio de esta Tesis Doctoral estaba sometida a un intenso debate, y la identificación de nuevos miembros de la familia de las kleisinas. Más adelante, tras determinar que el gen de la histona desacetilasa *Hdac11* se encuentra reprimido en un modelo de pérdida de cohesión centromérica en meiosis por deficiencia de SGOL2, nos propusimos determinar la implicación de este potencial modificador epigenético en dicho proceso. Por otro lado, dada la función oncogénica que la inestabilidad cromosómica desempeña y el papel crucial que sobre ésta ejerce Separasa, decidimos estudiar su posible función en la tumorigénesis.

Los objetivos concretos de este trabajo fueron los siguientes:

1. Análisis funcional *in vivo* de la shugoshina SGOL2 en mitosis.
2. Caracterización funcional de la histona desacetilasa HDAC11 en ratón.
3. Identificación de nuevos miembros de la familia de las kleisinas en mamíferos.
4. Caracterización bioquímica de la nueva kleisina identificada RAD21L.
5. Determinación de la implicación de la proteasa Separasa en la iniciación y progresión tumoral en ratón.

Material y Métodos

Material

1. Ratones

Ratones transgénicos Sox2-CRE. Estos ratones portan el gen de la recombinasa CRE con el promotor del gen *Sox2* (Hayashi et al., 2002). Dichos animales fueron cedidos amablemente por la Dra. Irene García Higuera (IBMCC, Salamanca).

Ratones transgénicos pCAG-FLPe que expresan la recombinasa Flipasa (FLP) bajo regulación del promotor constitutivo CAG (Rodríguez et al., 2000). Estos animales han sido cedidos generosamente por el Dr. Isidro Sánchez-García (IBMCC, Salamanca).

Ratones knock-out para p53 (Jacks et al., 1994) cedidos por el Dr. Isidro Sánchez-García (IBMCC, Salamanca).

2. Células empleadas

Células G4: Células madre embrionarias de ratón (células ES, *embryonic stem*) derivadas de blastocistos obtenidos de un cruce entre hembras 129S6 con machos C57BL6 (George et al., 2007). Por tanto, son células con un fondo genético mixto 129/BL6. Estas células fueron cedidas por el Dr. Andras Nagy (Hospital Monte Sinaí, Canada).

MEFs (*mouse embryonic fibroblast*) inactivos resistentes a Neomicina. Las células ES se cultivaron sobre una monocapa de fibroblastos portadores de un casete de resistencia a Neomicina. Además de servir como soporte para el crecimiento de las células ES, constituyen una fuente de factores de crecimiento. Antes de ser utilizados para tal fin, se inactivó su proliferación mediante inhibición de la síntesis de DNA con Mitomicina C (10 µg/ml, ROCHE).

Células HeLa: línea celular humana de adenocarcinoma cervical.

Células 293T-HEK: sublínea de la línea tumoral de riñón embrionario 293-HEK (*Human Embryonic Kidney*) transformadas con el antígeno T del virus SV40.

Células HeLa Tet-Off®: sublínea de células HeLa modificadas genéticamente para expresar transactivadores que activan la expresión de promotores con elementos de respuesta a tetraciclina (elementos TRE) en ausencia de doxiciclina (análogo de la tetraciclina).

Células CHO (*chinese hamster ovary*): Para la producción del Factor Inhibidor de Leucemia (LIF, *leukemia inhibitory factor*) se utilizó esta línea celular derivada de ovario de hámster, transfectada con el cDNA codificante para el LIF humano (Godard et al., 1992).

3. Enzimas

Los diferentes enzimas utilizados, tanto los enzimas de restricción como los enzimas empleados para la amplificación y clonaje de fragmentos de DNA (T4-polinucleótido quinasa, T4-DNA ligasa, T4-DNA polimerasa, Fosfatasa alcalina intestinal bovina, *Expand Long Template Taq*

DNA Polymerase, Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, etc.) fueron suministrados por Takara Bio, New England Biolabs y Roche.

Métodos

1. Generación de ratones mutantes por recombinación homóloga

1.1. Construcción de un vector de reemplazamiento knock-in regulable por tetraciclina para *Separasa*

El alelo mutante para *Separasa* se construyó utilizando como esqueleto el plásmido TriTAUBi-Bd (Hayakawa et al., 2006) que contiene el casete tTA, en el que previamente se había clonado en *AscI* (hecho romo) el gen de la toxina diftérica (DTA, *diphtheria toxin A*) sacado como fragmento PmeI/EcoRV del plásmido pDTA. El casete regulador tTA contiene tres módulos funcionales. El primero codifica una proteína de fusión (rtTS, transrepressor controlado por tetraciclina) formada por rTetR (repressor de tetraciclina) fusionado con el repressor de cromatina KRAB. Tras una secuencia IRES se encuentra la secuencia codificante para la proteína transactivadora de tetraciclina (tTA). A continuación presenta un gen de resistencia a Neomicina, un promotor del gen timidina kinasa (TK) y el gen de levaduras URA2, todo ello flanqueado por dos sitios *loxP* para su escisión mediada por la recombinasa CRE. El último módulo contiene el operón de tetraciclina y 5 copias del promotor mínimo del citomegalovirus (tetO CMV).

Los dos brazos de homología del gen *Separasa* se amplificaron por PCR a partir del BAC bMQ-207P6 solicitado al Instituto Sanger. El *brazo 5'* (4,2 kb) contiene el sitio de inicio de la transcripción, y el *brazo 3'* (7,3 kb) contiene el sitio de inicio de la traducción, el cual se encuentra localizado en el segundo exón del locus (Tabla III). Los brazos 5' y 3' se clonaron en el plásmido TriTAUBi-Bd en los sitios de restricción de *SfiI* y *AflII* respectivamente, previamente hechos romos mediante la T4-DNA polimerasa. Así, ambos brazos de homología flanquean el casete tTA, de manera que dicho casete se encuentra entre el sitio de inicio de la transcripción y el sitio de inicio de la traducción. Se utilizó una diana de restricción de *NotI* presente en el plásmido para la linealización de la construcción antes de su electroporación.

Según este diseño para el alelo mutante, el promotor endógeno de *Separasa* dirige la coexpresión de rtTS y tTA. En ausencia de doxiciclina (análogo de la tetraciclina), el tTA se une a la secuencia tetO e induce la expresión de *Separasa*. Por el contrario, en presencia de doxiciclina, rtTS se une a la secuencia tetO e inhibe la expresión.

1.2. Construcción de un vector de reemplazamiento knock-out inducible para *Hdac11*

La construcción del alelo mutante de *Hdac11* se realizó utilizando como esqueleto el plásmido pDELBOY-3X (elaborado por el Dr. Derrick J. Rossi y Dr. Tomi Mäkelä en el Instituto Haartman, Universidad de Helsinki). Este plásmido consta de un gen de resistencia a Neomicina regulado por el promotor de la fosfoglicerokinasa (PGK) flanqueado por dos secuencias *FRT* que permiten su escisión mediante la recombinasa Flipasa. A continuación presenta dos secuencias *loxP* y un gen TK del virus herpes simplex con el promotor de la PGK. Este gen TK se sustituyó por restricción por el gen que codifica la toxina diftérica A (DTA). En el plásmido resultante, se clonaron dos brazos de homología de 5.3 kb (brazo 5') y 8 kb (brazo 3'), y la región a floxear, un fragmento de 1 kb que comprende el exón 3 y parte de las regiones intrónicas adyacentes. Las regiones genómicas de *Hdac11* se amplificaron por PCR utilizando como molde el BAC bMQ-221E5 solicitado al Instituto Sanger empleando los oligonucleótidos descritos en la Tabla III. En primer lugar, se clonó la región que comprende el exón 3 en el sitio de restricción *KpnI*. A continuación se subclonó el brazo 3' en el sitio *Sall* y mediante el oligonucleótido *sentido* se eliminó una diana *BglII* existente en el alelo silvestre. Por último, se subclonó en *XhoI* el brazo 5', en cuyo oligonucleótido *antisentido* se introdujo una diana *EcoRI* que se empleó para el genotipado por Southern Blot. Igualmente, se introdujo en el oligonucleótido *sentido* del mismo brazo una diana *AscI* con el fin de linealizar la construcción.

1.3. Electroporación de células madre embrionarias

Para electroporar los vectores de reemplazamiento en las células ES, se emplearon 2 placas de 15 cm de células para cada construcción. Las células se tripsinizaron, se lavaron en PBS y se sedimentaron mediante centrifugación durante 5 minutos a 1.200 rpm. Las células se resuspendieron en 0,8 ml de PBS por placa, se transfirieron 0,8 ml de la suspensión celular a cada cubeta de electroporación (cubeta Gene Pulser®Cuvette, con 1,4 cm de separación entre electrodos, Bio-Rad) y se añadieron 30 µg de la construcción correspondiente linealizada. Pasados 5 minutos de incubación en hielo, se sometieron a una descarga eléctrica con un voltaje de 240 V, capacitancia 500 µF y resistencia 480 Ω, en un electroporador *BTX Electro Cell Manipulator 600*. Se incubaron nuevamente en hielo durante 5 minutos y finalmente se sembraron las células de cada electroporación en placas de 15 cm con MEFs inactivos sobre gelatina 0,5%.

1.4. Generación de células ES mutantes

Los vectores de reemplazamiento se electroporaron en células ES G4 como se describe en el apartado 1.3, y posteriormente se seleccionaron positivamente con Geneticina (G418

Sigma; 240 µg/ml) durante 10 días. Debido al gen DTA se seleccionaron de forma negativa aquellos clones en los que hubiera tenido lugar recombinación homóloga. Los clones resistentes se individualizaron, se expandieron y se extrajo su DNA genómico. Para seleccionar los clones recombinantes, el DNA genómico se digirió con el enzima de restricción correspondiente según el gen reemplazado y se procesó mediante Southern Blot. Se emplearon sondas externas a los brazos de homología que permiten diferenciar mediante RFLPs el alelo mutante del silvestre. Así, en el caso de *Separasa*, el DNA se digirió con el enzima de restricción *EcoRV* y se utilizó una sonda externa al brazo 3' obtenida por PCR (Tabla III) lo que diferencia el alelo silvestre (16 kb) del alelo mutante (12 kb). En cuanto a la construcción de *Hdac11*, en primer lugar se examinó la recombinación homóloga por el extremo 5', para lo cual el DNA se digirió con *EcoRI*, que permite distinguir fácilmente el alelo *silvestre* (7,6 kb) del alelo mutado (6 kb) gracias a la nueva diana *EcoRI* introducida en el oligonucleótido *antisentido* del brazo 5'. Para confirmar la recombinación por el extremo 3' se digirió el DNA de los clones positivos para la recombinación por el extremo 5' con *BglII*, lo cual da lugar a un RFLP de 10,6 kb para el alelo mutante y de 9,4 kb para el silvestre.

2. Confirmación de la mutación insercional en el gen *Sgol2*.

La inserción del casete rFlpROSA-βgeo (Schnütgen et al., 2005) en el gen *Sgol2* del clon de células madre D025B05 (GGTC), fue confirmado mediante PCR. Se amplificó la región genómica existente entre el exón 1 de *Sgol2* y el gen LacZ del casete con los oligonucleótidos *Exón 1 S* 5'-ACCCTTCTCGGTAGCCACTCCTG-3' y el universal *LacZ AS*, 5'-GTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG-3', utilizando como molde el DNA genómico del clon de ES y la polimerasa *Expand long template PCR polymerase* (Roche). Con el objetivo de comprobar el sitio de integración, el producto amplificado se clonó en el sitio *EcoRV* del plásmido pBS (Stratagene) y se secuenció el inserto usando los oligonucleótidos universales *Reverse* y *Forward*.

3. Cariotipado de células ES

Los clones de ES recombinantes y el clon D025B05 (GGTC) se cariotiparon con el fin de confirmar su estabilidad cromosómica. Para ello, las células se cultivaron en presencia de colchicina (1µg/ml; SIGMA) durante 4-5 horas, se tripsinizaron, se recogieron por centrifugación, sometieron a un choque hipotónico con KCl al 0,56% y a sucesivas rondas de fijación con metanol-acético en proporción 3:1. Por último, se extendieron en un portaobjetos y se montaron con Vectashield® y DAPI. Se analizaron al menos 50 metafases de cada clon.

Tabla III. Oligonucleótidos empleados en las construcciones y genotipado de los modelos murinos.

Fragmento	Oligonucleótidos	Región genómica	Tamaño (bp)
Sonda 3' Sgol2	S 5'- CTGTTACCTCTGGAATTCAGAG -3' AS 5'- CACTTGGCTCTCCTTGGCATAACC -3'	(1+) 58054970 58055831	861
Brazo 5' Separasa	S 5'- ATACGCAGAGGAACCCTGTTTCAA -3' AS 5'- ATGGCAAAGTCTAGATAACAACGA -3'	(15+) 102123053 102127202	4149
Brazo 3' Separasa	S 5'- ACTTTTGCCATGAGGAACTTCAAA -3' AS 5'- TTACCCAGTTTCTCAAACCTCTCC -3'	(15+) 102127192 102134433	7241
Sonda 3' Separasa	S 5'- CTTAAGTGTATCTTCTACAGC -3' AS 5'- ATCTAGTCATTCTTAAGGTTAAC -3'	(15+) 102136075 102137226	1151
Brazo 5' Hdac11	S (XhoI/AscI) 5'-GTACTCGAGGGCGCGCGGATGCCAGGCCCTGCTGGAGT-3' AS (XhoI/EcoRI) 5'-TTGCTCGAGAATTCTGGCTCAGGATGGTGTGGCCTTT-3'	(6+) 91103543 91108808	5266
Brazo 3' Hdac11	S (Sall) 5'- TGCACGTCGACTTCCCTCCCATATGGGCTGTGT -3' AS (Sall) 5'- TTGTCGTCGACCACTGGAGCAGTGGTGAAGCCA -3'	(6+) 91109733 91117824	8092
Exón 3 Hdac11	S (KpnI) 5'- TCGGTACCTGTGGAGGGAGAGTTGCTCTG -3' AS (KpnI) 5'- TCGGTACCGATCTTCTGCAGCACACCCC -3'	(6+) 91108809 91109732	920
Sonda 5' Hdac11	S 5'- TTGGTTAAGTAATCTACACAGAAGG -3' AS 5'- GGATGCTCTTTGAAGAAGGAAGG -3'	(6+) 91101607 91103543	1936
Sonda 3' Hdac11	S 5'- GCAGACATCACTGGCTATCAAG -3' AS 5'- CCAGGGTAGATGTGGCGGTTGTA -3'	(6+) 91117851 91119469	1618
Sonda C	S 5'- TACCCTGATTCTGAATGTAC -3' AS 5'- TTCTCAGAGCTCAGACCATGGCT -3'	(6+) 91109999 91110480	481

Los números entre paréntesis indican el cromosoma y la hebra.

4. Desarrollo de los ratones mutantes.

4.1. Separasa y HDAC11

Las células ES seleccionadas se agregaron en mórulas que fueron transferidas a hembras CD1 pseudopreñadas. De la progenie obtenida, se escogieron los individuos con mayor porcentaje de quimerismo y se cruzaron con hembras CD1 para determinar fenotípicamente la transmisión por línea germinal del alelo mutado. En el caso de *Hdac11*, los heterocigotos fueron cruzados con ratones transgénicos pCAG-FLPe con el objetivo de delecionar el casete de Neomicina que se encuentra flanqueado por dos *FRT*. El siguiente paso fue delecionar el exón flanqueado por dos *loxP* utilizando la cepa Sox2-CRE (Hayashi et al., 2003). Los individuos resultantes se cruzaron entre sí para conseguir el alelo mutante en homocigosis. De manera similar, los heterocigotos para el alelo mutante de *Separasa* se cruzaron con ratones transgénicos Sox2-CRE, lo que permitió delecionar el casete de Neomicina. A continuación, los heterocigotos así obtenidos, se cruzaron entre sí con el fin de llevar la mutación a homocigosis.

El genotipado de los ratones mutantes de *Hdac11* y *Separasa* se llevó a cabo por Southern Blot del DNA extraído de las colas de los animales, empleando las estrategias descritas para el cribado de los clones de células ES (apartado 1.4).

4.2. Sgol2

El clon de células madre D025B05 (GGTC), de la cepa 129S2/SvPas, se microinyectó en blastocitos de hembras C57BL/6. Se obtuvieron dos machos que presentaban un alto porcentaje de quimerismo, los cuales fueron cruzados con hembras C57BL/6 con el fin de transmitir el alelo mutado de *Sgol2* por línea germinal. Finalmente, los ratones heterocigotos para la mutación se cruzaron entre sí para obtener la mutación en homocigosis.

El genotipado de los ratones knock-out para *Sgol2* se llevó a cabo mediante Southern Blot utilizando como sonda un fragmento de DNA genómico de 870 bp amplificado por PCR usando los oligonucleótidos *Exón 2 S*, 5'-CTGTTACCTCTGGAATTCAGAG-3' e *Intrón 2 AS*, 5'-CACTTGGCTCTCCTTGGCATACC-3', que abarca el exón 2 y parte del intrón 2 adyacente. Esta sonda, tras digerir el DNA genómico con *EcoRV*, reconoce una RFLP de 13 kb en el caso del alelo silvestre y de 7 kb en el alelo mutante debido a una diana *EcoRV* localizada en el casete β Geo.

La agregación y microinyección de células madre fueron llevadas a cabo en el servicio de Transgénesis de la Universidad de Salamanca. Todas las colonias de ratones estudiadas durante el desarrollo del presente trabajo se han mantenido en un fondo genético mixto C57BL6:129/Sv.

4.3. Mantenimiento de la colonia

El mantenimiento de los ratones se ha llevado a cabo en el estabulario libre de patógenos de la Universidad de Salamanca. El cuidado y tratamiento de los animales se ha realizado de acuerdo con la normativa vigente seguida por las instituciones CSIC/USAL.

5. Experimentación con ratones

5.1. Carcinogénesis química en piel

Se indujeron papilomas en piel de ratón utilizando un protocolo de carcinogénesis química "multi-etapa", siguiendo las recomendaciones descritas en Abel et al., (2009). En primer lugar, se afeitó el lomo de ratones de unas 8 semanas de edad. Transcurridas 24 horas se aplicó tópicamente una única dosis del carcinógeno 7,12-dimetil-benz(a)antraceno (DMBA; SIGMA) disuelto en acetona sobre el lomo de los ratones, siendo 25 μ g la cantidad total aplicada a cada individuo. Tras 48 horas, se realizó una primera aplicación de 12,4 μ g de 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA; SIGMA) disuelto en acetona, que se repitió 2 veces por semana durante 20 semanas.

5.2. Análisis histológico

En las necropsias, tras una inspección macroscópica general externa e interna de las cavidades cefálica, torácica y abdominal, los órganos de los ratones o los tumores se analizaron histológicamente. Para ello las muestras fueron fijadas con formol al 10% durante 24 horas y a continuación fueron embebidas en parafina. Se realizaron cortes seriados de 5 μm que posteriormente fueron teñidos con hematoxilina-eosina siguiendo los protocolos convencionales, lo cual ha sido llevado a cabo en colaboración con el servicio de Patología del Banco de Tumores del Centro de Investigación del Cáncer (Salamanca). Las preparaciones fueron estudiadas junto a un patólogo experto (Dr. Enrique de Álava).

5.3. Inmunohistoquímica

Una hora y media antes de sacrificar los animales, se realizó una inyección intraperitoneal con 34 μg de bromodeoxiuridina (BrdU) por gramo de peso corporal disuelto en 200 μl de PBS. Los tumores enbebidos en parafina se desparafinaron e hidrataron con xiloles, alcoholes y agua destilada. Tras tres lavados en PBS de 10 minutos, se desnaturalizó el DNA (1 hora HCl 2N a 37°C; 3 lavados en tampón borato 0,1 M pH=8,5; 3 lavados en PBS). El bloqueo se realizó con PBS al 2% de leche y 0,1% Tritón durante 40 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron con un anticuerpo frente a BrdU conjugado con FITC (Tabla IVa) durante toda la noche a 4°C y 40 minutos a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario-FITC.

6. Cultivos celulares

6.1. Tipos celulares y condiciones de cultivo

Durante los experimentos realizados en la presente Tesis Doctoral se han utilizado diferentes líneas celulares humanas, cultivos primarios de fibroblastos de ratón, así como células madre embrionarias de ratón (Ver materiales). Todas las células se cultivaron en placas de cultivo (BD FALCON), en incubadores a 37°C y en una atmósfera húmeda con un contenido de CO₂ del 7%.

Las líneas celulares humanas HeLa y 293T-HEK se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS *Fetal Bovine Serum*, GIBCO) y 1X de penicilina/estreptomicina/glutamina (PSG, GIBCO).

Los fibroblastos se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de FBS, 1X de PSG y piruvato de sodio 1,2 mM (Gibco).

Las células ES fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 15% de FBS, 1x de PSG, piruvato de sodio 1,2 mM (Gibco), 60 μM β -Mercaptoetanol, 10 mM HEPES, 1X de aminoácidos no esenciales, y LIF. El cultivo de estas células se realizó en placas cubiertas con

una monocapa de MEFs resistentes a Neomicina inactivados con Mitomicina C sobre una capa de gelatina al 0,5%.

6.2. Obtención de fibroblastos embrionarios de ratón.

Se extrajeron los embriones de hembras preñadas a los 13.5 días post coito (dpc). Una vez desprovistos de la cabeza y vísceras, se disgregaron con una hoja de bisturí en una placa de cultivo con 0.5 ml de PBS y se transfirieron a una placa de 10 cm con medio de cultivo. Tras 24 horas de incubación a 37°C, se eliminó el medio, se lavaron los fibroblastos con PBS y se añadió medio nuevo. Cuando las células llegaron a confluencia (generalmente 3 días desde el inicio de la preparación) se tripsinizaron y se transfirieron a una placa de 15 cm. Cuando el cultivo llegó a confluencia, se tripsinizaron de nuevo y se congelaron en medio DMEM con 10% de DMSO (Calbiochem) y 20% de FBS. Estas células son consideradas de pase 0.

6.3. Obtención de fibroblastos adultos de oreja

En primer lugar se lavaron las orejas con etanol 70%, se cortaron y se colocaron en un tubo de 10 ml con PBS y 4X penicilina/estreptomicina. Seguidamente, se pasó cada oreja a una placa de 6 cm y se añadieron 100 µl de colagenasa/disypasa (4mg/ml preparado en DMEM). Posteriormente, se disgregaron con la ayuda de dos bisturís y se añadieron 500 µl más de colagenasa/disypasa. Tras 45 minutos en el incubador se añadieron 3 ml de medio de cultivo con 5X PSG y se incubaron hasta el día siguiente. El medio con los agregados se transfirió a un tubo con PBS, se centrifugó y se lavó nuevamente con PBS. Tras eliminar el PBS, se incubó el pellet 10 minutos con 200 µl de tripsina tras lo cual se inactivó con 200 µl de medio. La suspensión resultante se disgregó con una micropipeta p1000 y se transfirió a una placa de 6 cm con medio de cultivo. Después de 2 días de incubación el medio fue reemplazado por medio fresco. Cuando llegaron a confluencia, las células fueron divididas 1:3. En este momento se consideran en pase 1.

6.4. Curvas de proliferación celular

Para estudiar la proliferación de los MEFs se sembraron en placas de 12 pocillos y se realizó un conteo manual del número total de células cada día durante una semana. Se realizaron curvas de proliferación a baja y a alta densidad, sembrando 2.5×10^4 ó 4×10^4 células por pocillo, respectivamente.

6.5. Índice mitótico

Para calcular el índice mitótico de los MEFs, se sembraron 2×10^5 células de pase 1 sobre un cubreobjetos en placas de 3,5 cm. Tras 16 horas, aproximadamente, se fijaron con

paraformaldehído al 4% y se realizó inmunofluorescencia (IF) con anti-p-H3 (ver Tabla IV de Anticuerpos).

Tabla IVa. Anticuerpos primarios.

Proteína	Anticuerpo	Origen	Tipo	Dilución			Proveedor
				IF	WB	IP	
SGOL2	K1059	conejo	suero	1:100	-	-	Dr. JL Barbero
p-H3 (Ser10)	#06-570	conejo	IgG	1:400	-	-	Upstate Biot
γH2AX	#07-164	conejo	IgG	1:200	-	-	Millipore
MCAK	MCAK	oveja	IgG	1:200	-	-	Dr. L. Wordeman
centroméricas	ACA 15-235	humano	IgG	1:5	-	-	Antibodies Inc.
SYCP3	sc-74569	ratón	IgG	1:100	-	-	Santa Cruz Biot.
RAD21L	RAD21L-ARP	conejo	IgG	1.5*/1:1.000**	1:10.000	1:500	-
RAD21L	RAD21L-AP	conejo	IgG	1.5*/1:1.000**	1:8.000	1:500	-
RAD21	k-854	conejo	IgG	1.5*/1:1.000**	1:10.000	1:500	Dr. JL Barbero
SMC1α	k-988	conejo	suero	-	1:10.000	1:250	Dr. JL Barbero
SMC1β	k-974	conejo	suero	-	1:10.000	-	Dr. JL Barbero
SMC3	k-987	conejo	suero	-	1:8000	1:250	Dr. JL Barbero
STAG3	k-403	conejo	suero	-	1:10000	-	Dr. JL Barbero
Lamina A/C	Manlac-1	ratón	IgG	-	1:100	-	Dr. G. Morris
Flag	F1804	ratón	IgG	1:2000	1:10.000	5μg ¹	Sigma-Aldrich
Flag	F7425	conejo	IgG	-	1:800	-	Sigma-Aldrich
Myc	#06-549	conejo	IgG	-	-	4 μg ¹	Millipore
Myc	9E10.2	ratón	sobrenadante	1:2	1:5	-	Hibridoma myc-1-9E10.2 ATCC
HA	αHA.11	ratón	IgG	-	-	10μg ¹	Covance
HA	H6908	conejo	IgG	-	1:1.000	-	Sigma-Aldrich
SMC1α	S300-055	conejo	IgG-agarosa	-	-	5μg ¹	Bethyl
SMC3	S300-060	conejo	IgG-agarosa	-	-	5μg ¹	Bethyl
BrdU	347583	ratón	IgG	1:400	.	.	Becton Dickinson

IF: Inmunofluorescencia; WB: Western Blot; IP: Inmunoprecipitación

*: Inmunofluorescencias de esparcidos; **: Inmunofluorescencias de líneas celulares o cultivos primarios.

¹: μg de anticuerpo por mg de extracto porteico utilizado.

Tabla IVb. Anticuerpos secundarios.

Anticuerpo	Origen	Dilución	Proveedor
Anti-Ig conejo FITC	cabra	1:100	Jackson ImmunoResearch
Anti-Ig conejo TRITC	cabra	1:100	Jackson ImmunoResearch
Anti-Ig humano Texas Rojo	burro	1:100	Jackson ImmunoResearch
Anti-Ig ratón TRITC	oveja	1:100	Jackson ImmunoResearch
Anti-Ig oveja TRITC	burro	1:100	Jackson ImmunoResearch
Anti-Ig ratón HRP	oveja	1:10.000	GE Healthcare
Anti-Ig conejo HRP	cabra	1:2.000	Cell Signaling

6.6. Cultivo seriado 3T3

Con el fin de analizar la capacidad de inmortalización de los cultivos primarios, se sembraron 1 millón de células de cada genotipo en placas de 10 cm. Cada 3,5 días se tripsinizaron, se contó el número total y se volvió a sembrar 1 millón. Este proceso se repitió hasta aproximadamente 25 pases. El incremento del nivel de duplicación de la población (Δ PDL, *population doubling level*) fue calculado de acuerdo con la fórmula:

$$\Delta\text{PDL} = \log(n_f/n_o)/\log 2$$

donde n_f es el número final de células y n_o es el número inicial.

6.7. Evaluación de la “re-entrada” en el ciclo celular por FACs

Se plaquearon 1×10^5 MEFs por placa de 3,5 cm y se les privó de FBS durante 72 horas en cultivo (suero al 0,1%) para inducir un estado de quiescencia (fase G0). A continuación, se les suplementó suero al 10% para promover su re-entrada en el ciclo celular. Se recogieron células a tiempo 0, 4, 8, 16, 20 y 24 horas tras añadir el suero. Se lavaron 2 veces con PBS por centrifugación y se resuspendieron en 330 μ l de PBS a 4°C sobre el que se añadieron, gota a gota, 600 μ l de etanol 100% a -20°C. Se incubaron las muestras a 4°C durante 30 minutos y se centrifugaron 5 minutos. Finalmente, se resuspendieron en 2 ml de PBS, se centrifugaron y se resuspendieron en 1 ml de PBS con RNAsa (0.1 mg/ml) y yoduro de propidio (15 μ g/ml). La evolución de la entrada en el ciclo celular se llevó a cabo mediante citometría de flujo, utilizando un citómetro FACSCalibur y los datos se procesaron utilizando el programa informático Cell-Quest (Becton Dickinson). Se registraron al menos 2×10^4 eventos. La distribución del ciclo celular se analizó utilizando el programa ModFit LT versión 2.0. Los experimentos de ciclo celular se realizaron en al menos dos individuos por cada genotipo.

6.8. Transfección de cultivos celulares con DNA plasmídico

6.8.1. Transfección transitoria mediada por fosfato cálcico

Para transfectar células 293T-HEK, se sembraron 4×10^5 células por placa de 3,5 cm. Al día siguiente se reemplazó el medio 2 horas antes de proceder con la transfección. Se añadieron 4 μg de DNA a 62 μl de CaCl_2 0.25 M a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 62 μl de HBS (0.28 M NaCl, 0.05 M HEPES sal de sodio SIGMA, 1-5 mM Na_2HPO_4 ajustado a pH 7-7,15 con NaOH) gota a gota mientras se burbujeaba la solución con la ayuda de un pipeteador eléctrico. Tras dos minutos a temperatura ambiente, se añadió la mezcla gota a gota sobre el cultivo, el cual se incubó con los precipitados durante una noche. Antes de las 20 horas de la transfección se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco.

6.8.2. Transfección transitoria mediada por lípidos catiónicos

Las células HeLa fueron transfectadas utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Para ello se sembraron $6,6 \times 10^5$ células por placa de 3,5 cm. Al día siguiente se sustituyó el medio normal por medio sin antibiótico y se transfectaron siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

6.9. Transducción retroviral

Se infectaron MEFs con partículas retrovirales producidas en células 293T-HEK transfectadas de forma transitoria con vectores retrovirales. Para generar dichas partículas, se sembraron $2,5 \times 10^6$ células 293T-HEK en placas de 10 cm y se transfectaron con el plásmido de interés junto con el plásmido pCL-Eco que codifica para las proteínas de la cápsula, polimerasa del virus y envuelta ecotrópica. Posteriormente, se recogió el sobrenadante de las células 293T-HEK, que contiene las partículas virales, a las 48, 60 y 72 horas, y se filtró (45 μm). El día previo a la infección se sembraron 8×10^5 MEFs por placa de 10 cm. Los MEFs se incubaron con los sobrenadantes recogidos a los 3 tiempos mencionados con polibreno a 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y finalmente, las células infectadas se seleccionaron en presencia de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Puomicina (SIGMA).

La línea celular humana de células HeLa Tet-Off® se infectó siguiendo el mismo protocolo con la salvedad de que se sustituyó el plásmido pCL-Eco por pCL-Ampho que a diferencia del anterior, codifica para una envuelta de virus con tropismo para todas las células mamíferas excepto las de hámster (anfotrópico).

6.10. Cariotipado de MEFs

MEFs de pase 4-5 se sembraron en placas de 15 cm a una densidad de $1-2 \times 10^6$ células por placa el día previo a ser tratadas con colchicina a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 5 horas. El protocolo de

choque hipotónico y fijación a seguir fue el mismo que el descrito para el cariotipado de células ES. La tinción de los cromosomas se realizó con DAPI o con Giemsa al 5% en tampón fosfato de Sorensen a pH 6.8. Para analizar la distribución cariotípica se analizaron al menos 50 metafases por cultivo.

6.11. Tratamiento con drogas estabilizadoras y desestabilizadoras de microtúbulos

Se sembraron $1,5 \times 10^5$ MEFs en placas de 3,5 cm y al día siguiente se incubaron con taxol (estabilizador de microtúbulos) o nocodazol (despolimerizador) a 1 $\mu\text{g/ml}$ y 0,1 $\mu\text{g/ml}$ en el medio de cultivo, respectivamente. En ambos casos, tras un periodo de 16 horas, se cuantificó el índice mitótico mediante IF frente a p-H3. Se evaluaron dos cultivos de cada genotipo con un tamaño muestral de 200 células.

6.12. Inducción de daño en el DNA mediante irradiación gamma

Se realizaron dos tipos de experimentos. En ambos casos se plaquearon el día anterior $1,5 \times 10^5$ MEFs en placas de 3,5 cm y se evaluaron dos cultivos de cada genotipo empleando un tamaño de muestra de 200 células.

Experimento 1: Las células se irradiaron con 5 Gy de radiación gamma. Se dejaron recuperar durante una hora tras la cual se bloquearon en mitosis con nocodazol a 0,2 $\mu\text{g/ml}$ en el medio de cultivo. A las 8 horas de incubación con nocodazol, se llevó a cabo la IF frente a p-H3 y se contabilizaron las células en mitosis y las células arrestadas en G2.

Experimento 2: Se irradiaron los fibroblastos con 10 Gy de radiación gamma y se mantuvieron en condiciones normales de cultivo durante una y seis horas tras la radiación. Estas células se procesaron mediante IF frente a γ -H2AX (histona H2AX fosforilada en la serina 139).

6.13. Ensayo de formación de colonias por E1A-hRasV12

Se sembraron $2,8 \times 10^5$ fibroblastos en placas de 6 cm y se infectaron el día siguiente con retrovirus portadores del plásmido pLPC E1A-hRasV12. Tras 3 días de selección con Puromicina a 2 $\mu\text{g/ml}$ se plaquearon 4.000 MEFs E1A-RasV12 en placas de 10 cm. Trece días después se fijaron los focos formados con formaldehído al 37% (MERCK) directamente sobre el medio (1 ml por cada 3 ml de medio) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para visualizar los focos se tiñeron durante 30 minutos con Giemsa (SIGMA) al 0.02% en PBS, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. El ensayo se realizó con dos cultivos de cada genotipo.

6.14. Protocolo de formación de focos por H-RasV12

Se sembró 1 millón de células de cada cultivo en placas de 10 cm y se transfectaron con 10 µg de pBABE H-RasV12, siguiendo el protocolo descrito anteriormente con fosfato cálcico. A las 24 horas se tripsinizaron las células y cada placa se distribuyó equitativamente en 3 placas de 10 cm. A los 21 días, durante los cuales se reemplazaba el medio cada 3, se fijaron los focos con formaldehído y se tiñeron con Giemsa de forma similar que en el ensayo de formación de colonias. Se analizaron dos cultivos de cada genotipo utilizándose como control positivo del experimento fibroblastos deficientes en p53.

6.15. Evaluación de la inducción de senescencia por RAS oncogénico

Se plaquearon 2.6×10^5 MEFs en placas de 6 cm y se infectaron el día siguiente con partículas retrovirales que portaban el plásmido pBABE H-RasV12, tras lo cual se seleccionaron con Puomicina a 2µg/ml durante 3 días. A los 6 días de la infección se fotografiaron y se analizó su morfología. Se evaluaron dos individuos de cada genotipo.

6.16. Extracción, cultivo y cariotipado de timocitos de ratón

Se extrajeron los timos de ratones de entre 5 y 6 semanas de edad (cuando el tamaño y la celularidad del timo son máximas) y se disgregaron con ayuda de un separador celular de nylon (*cell strainer*, BD Falcon) en 10 ml de medio RPMI completo (medio RPMI, 10% FBS, 1 mM piruvato sódico, 2 mM L-glutamina, 10 mM HEPES pH 7.5, 1X aminoácidos no esenciales, 1X penicilina/estreptomicina, 50 µM β-mercaptoetanol). Se sembraron 10^6 células por ml en medio suplementado con TPA a 50 ng/ml y se cultivaron durante 72 horas. Para estudiar el cariotipo de los timocitos, se arrestaron en metafase con colchicina (SIGMA) a 0,1 mg/ml durante 2 horas. Tras recoger las células por centrifugación, se les sometió a un tratamiento hipotónico de 30 min a 37°C con una solución 0.03 M de citrato sódico. La fijación se realizó mediante 5 lavados consecutivos en metanol:acético 3:1 previamente enfriado a -20°C y se extendieron en portaobjetos humedecidos con una capa de ácido acético al 45%. Los cromosomas se tiñeron con Giemsa al 5% en buffer fosfato de Sorensen pH 6.8 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se analizaron alrededor de 100 metafases por cultivo.

7. Técnicas de biología molecular

7.1. Extracción de DNA genómico

Se utilizó un protocolo de extracción con fenol/cloroformo que permite purificar el DNA eliminando un alto porcentaje de proteínas y polisacáridos. En primer lugar se incubaron los fragmentos de rabo de ratón en 500 µL de buffer de lisis (0.1 M Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M EDTA,

0.5% SDS) a 55°C durante 12-20 horas. Se añadieron 200 µL de fenol equilibrado con TE y 200 µl de cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 24:1, se mezcló por inversión y se centrifugó 5 minutos a 13.000 rpm. A continuación se recogió la fase superior acuosa donde se encuentra disuelto el DNA y se añadieron 200 µl de acetato amónico a 7.5 M y 700 µl de isopropanol con el objetivo de precipitar el DNA, tras lo cual se eliminó el sobrenadante y se lavó el DNA con etanol al 70%. Una vez retirado el etanol, se dejó secar el DNA y se resuspendió en TE.

7.2 Southern Blot

El análisis del DNA genómico extraído de las colas de los ratones o de los clones de ES se realizó mediante Southern Blot. En primer lugar, los fragmentos de DNA genómico resultantes de la digestión con un enzima de restricción se separaron en geles de agarosa al 0,5%. Una vez concluida la electroforesis, los geles se trataron durante 15 minutos con HCl 0,25 M para despurinizar el DNA y 30 minutos con NaOH 0,4 N para desnaturalizar el DNA. A continuación el DNA se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon (Genescreen Plus™, PerkinElmer) durante toda la noche, tal y como describen Sambrook et al., (1989). Finalmente el DNA se fijó a la membrana utilizando radiación ultravioleta en un equipo UV-Stratalinker 2400 (Stratagene®). El filtro se hibridó con la sonda de DNA correspondiente marcada con [α -³²P]dCTP mediante *random priming* y se sometió a autorradiografía con películas fotográficas (AGFA) o pantalla digital (FUJIFILM).

7.3. Estudio de la expresión génica

7.3.1. Northern Blot

El RNA total de los tejidos o de los cultivos celulares se aisló utilizando un buffer de lisis de tiocianato de guanidinio 4M (FLUKA) y un protocolo de extracción con fenol-cloroformo. 30-40 µg de RNA se resolvieron en geles de agarosa al 2% tras lo cual se lavó el gel con agua destilada durante 10 minutos. A continuación, los geles se incubaron durante 30 minutos con NaOH 50 mM y nuevamente 10 minutos con agua destilada. Finalmente se trataron los geles con SCC 10X durante 20 minutos y se transfirió el RNA a membranas de nylon (Genescreen Plus™, PerkinElmer) por capilaridad. El RNA se fijó a la membrana mediante luz ultravioleta (UV-Stratalinker 2400 (Stratagen®). Las membranas con el RNA se hibridaron con la sonda específica marcada con [α -³²P]dCTP y finalmente se expuso durante 3 días a películas de autorradiografía (AGFA). Para todos los genes analizados se empleó como sonda el cDNA completo correspondiente.

7.3.2. Transcripción Reversa-PCR (RT-PCR)

El patrón de expresión en el caso de *Rad21*, también fue determinado mediante RT-PCR a partir del RNA de diferentes tejidos. Para ello 5 µg de RNA se transcribieron de manera reversa a cDNA empleando oligo-dT y un kit comercial (INVITROGEN). A continuación se amplificó un fragmento del cDNA de *Rad21*, comprendido entre los exones 1 y 4 (352 bp) utilizando los oligonucleótidos S2 5'-TGGCTTGCAGCTCACTGGGA-3' y AS2 5'-GGTTCTGAGCAAGGGGCTCCG-3'. En el caso de *Sgo2* la metodología empleada fue la misma y se utilizaron los oligonucleótidos Exón 1 5'-ACCCTTCTCGGTAGCCACTCCTG y Exón-3 5'-CTAAGGGCCCGCGCTAATGCTC, obteniéndose un amplicón de 355 bp. Como control de ambos experimentos se amplificó el cDNA de β-actina empleando para ello los oligonucleótidos Act S 5'-GCTCCGGCATGTGCAA-3' y Act AS 5'-AGGATCTTCATGAGGTAGT-3'.

7.3.3. Análisis de expresión génica diferencial mediante microarrays de DNA

En primer lugar, se purificó el RNA de testículos, el cual previa transcripción reversa a DNA de hebra simple y marcaje con biotina, se hibridó en microarrays *GeneChip™ Gene 1.0 ST Array* (Affymetrix). El tratamiento del RNA y la hibridación fueron realizados por el Servicio de Genómica del IBMCC, Salamanca. El procesamiento de los datos fue diferente en función del número de muestras analizadas. En el caso de *Hdac11*, el análisis consistió en la normalización y cálculo de la señal con el algoritmo RMA (Irizarry et al., 2003; Irizarry et al., 2003b; Bolstad et al., 2003) y en la obtención de un ratio entre las dos muestras. Dicho análisis se llevó a cabo en el lenguaje de programación R y se emplearon los paquetes *Bioconductor*. En el estudio de la expresión de los testículos *Sgo2*^{-/-} se utilizó el algoritmo SAM para detectar expresión diferencial (Tusher et al., 2001) y FDR para calcular el error global (Benjamini & Hochberg, 1995). Los resultados se procesaron en colaboración con el Servicio de Bioinformática del IBMCC, Salamanca.

7.3.4. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Previamente a la qPCR, el cDNA de testículo de ratón se obtuvo mediante RT-PCR a partir de 5 µg de RNA. Se utilizó 1 µl de una dilución 1:20 del cDNA así obtenido como molde para la reacción de qPCR, para la cual se empleó el kit comercial *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) y los oligonucleótidos OLFR767 S 5'-CTCACGGATGTCCCTGAACT-3'; OLFR767 AS; 5'-AGGAGAAGTTCCGGAGGAAG-3'; OLFR1380 S 5'-TCTCAGACTGGCCTCACGTA-3'; OLFR1380 AS 5'-TAGCAGAGGTCCAGGAAGGA-3'.

7.4. Identificación y clonación de *Rad21*

La búsqueda *in silico* de nuevos parálogos de las kleisinas se llevó a cabo con el programa tBlastn comparando las secuencias proteicas con las bases de datos genómicas GenBank™, EMBL Data Bank, DDBJ (DNA Data Bank of Japan) y PDB (Protein Data Bank), tanto humanas como murinas. La ORF (*open reading frame*, pauta de lectura de abierta) de *Rad21* fue amplificada por RT-PCR a partir del RNA de testículos de ratón usando los siguientes oligonucleótidos: S1 5'- ATGTTCTACACTCATGTGCTTATG-3' y AS1 5'- TCACATCTTATAGAACATTGGTCCC-3'. La ORF humana de *Rad21* fue obtenida por RT-PCR a partir del RNA total de la línea celular MCF7 usando los oligonucleótidos S2 5'- CAGGCAACATGTTCTACACACATGT-3' y AS2 5'-CAGAAATTCCAGTGATGCCATAAAT-3'.

7.5. Construcción de vectores de expresión en eucariotas

Los cDNA que codifican *Rad21l*, *Rad21* y *Wapal* fueron amplificados a partir de RNA de testículos de ratón mediante RT-PCR. Los cDNA de *Smc1 β* y *Stag1* fueron obtenidos por restricción a partir de un clon de la librería de cDNA IMAGE. Los diferentes cDNA fueron clonados en los vectores de expresión de mamíferos pcDNA3, pcDNA3 2xFlag, pCEFL-HA o pcDNA3.1 Myc-His (-). Los plásmidos pRevTRE 9Myc-*Rad21*, Myc-*Smc1 α* & Flag-*Stag2* fueron generosamente cedidos por el Dr. J. Gregan (Max F. Perutz Laboratories, Universidad de Viena), Dr. M. B. Kastan (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis) y Dr. D. Pati (Texas Children's Hospital), respectivamente. Los cDNA de *Hdac11* de individuos silvestres y mutantes se obtuvieron mediante RT-PCR a partir del RNA de testículos utilizando los oligonucleótidos detallados en la Tabla V. Tras purificar y fosforilar el producto de amplificación de la PCR, los fragmentos fueron clonados en el sitio de restricción *KpnI* hecho romo del vector de expresión pcDNA3 Flag, quedando el epítipo en el extremo carboxilo terminal de HDAC11 (Ver Tabla III de vectores de expresión).

7.6. Construcción de mutantes mediante mutagénesis dirigida

Las mutaciones puntuales de las secuencias de corte por Separasa en RAD21L fueron generadas por PCR mediante mutagénesis dirigida. Se diseñaron oligonucleótidos que permitieran amplificar el plásmido pcDNA 2xFlag Rad21l introduciendo simultáneamente la mutación. El producto de la PCR se sometió a digestión con el enzima de restricción *DpnI* para eliminar las moléculas de DNA utilizado como molde. Tras ser incorporados en bacterias *E. coli* mediante transformación química, los plásmidos aislados fueron secuenciados para confirmar la existencia de la mutación (Tabla VI).

Los cDNAs en los que se delecionó la región de interacción de RAD21 con STAG1 y su homóloga en RAD21L se generaron asimismo mediante mutagénesis dirigida sobre los vectores pcDNA3 2xFlag Rad21 y pcDNA3 2xFlag Rad21l utilizando los oligonucleótidos indicados en la

Tabla VI. En este caso los amplicones, una vez tratados con *DpnI*, fueron incubados con el enzima T4-polinucleótido quinasa y se religaron previamente a su transformación en *E. coli*.

Tabla V. Vectores de expresión.

Vector de expresión	Inserto	Origen del inserto	Plásmido resultante	Oligonucleótidos
pcDNA3 2xFlag	cDNA mRad21	RT-PCR de ARN de testículos de ratón	2xFlag-Rad21	S 5'- ATGTTCTACGCACATTTTGTCTCCTC -3' AS 5'- ACACATCTAGCTCCTCAGATA -3'
pRevTRE	cDNA mRad21	Dr. Juraj Gregan	x9Myc-Rad21 retroviral	-
pcDNA3 2xFlag	cDNA mRad21	RT-PCR de ARN de testículos de ratón	2xFlag-Rad21	S 5'-ATGTTCTACACTCATGTGCTTATG-3' AS 5'- TCACATCTTATAGAACATTGGTCCC-3'
pcDNA3.1 Myc-His (-)	cDNA mRad21	RT-PCR de ARN de testículos de ratón	Rad21-Myc	S 5'-ATGTTCTACACTCATGTGCTTATG-3' AS 5'- TCACATCTTATAGAACATTGGTCCC-3'
pcDNA3	cDNA mRad21	RT-PCR de ARN de testículos de ratón	Rad21	S 5'-ATGTTCTACACTCATGTGCTTATG-3' AS 5'- TCACATCTTATAGAACATTGGTCCC-3'
pRevTRE- x13Myc*	cDNA mRad21	RT-PCR de ARN de testículos de ratón	Rad21-13xMyc retroviral	S 5'-ATGTTCTACACTCATGTGCTTATG-3' AS 5'- TCACATCTTATAGAACATTGGTCCC-3'
pcDNA3	cDNA hSmc1α	Dr. Michael B. Kastan	cMyc-Smc1α	-
pcDNA3 2xFlag	cDNA mSmc1β	Restricción a partir de un clon IMAGE	2xFlag-Smc1β	-
pCEFL-HA	cDNA hStag1	Restricción a partir de un clon IMAGE	HA-Stag1	-
pFlag CMV2	cDNA hStag2	Dr. Debananda Pati	Flag-Stag2	-
pcDNA3 2xFlag	cDNA hWapal	RT-PCR de RNA de MDA-MB231	2xFlag-Wapal	S 5'- CTGGTGTCAAAATGACATCCAGA-3' AS 5'-TAAAGCAGCTAGCAATGTTCCAAA-3'
pBS	cDNA mHDAC11	RT-PCR de testículos de ratón	pBS-HDAC11	S 5'- GAGGCGTGTCTCTCGTA-3' AS 5'- ATGTTCTGTGAGTAGCCGTC-3'
pcDNA3 Flag	cDNA mHDAC11 silvestre	RT-PCR de testículos de ratón silvestre	HDAC11 wt-Flag	S 5'-TCCCAGCGCCATGGAGGCGTGT-3' AS 5'-AGGCACAGCACAGGAAAGCAGGG-3'
pcDNA3 Flag	cDNA mHDAC11 knock-out	RT-PCR de testículos de ratón knock-out	HDAC11 ko-Flag	S 5'-TCCCAGCGCCATGGAGGCGTGT-3' AS 5'-AGGCACAGCACAGGAAAGCAGGG-3'
pGEX-4T-3-HEV	cDNA mHDAC11	Restricción a partir de pBS-mHDAC11	pGEX-4T-3-HEV HDAC11	-

aa: aminoácidos; h: humano; m: murino; wt: silvestre; ko: knock-out; * pREVIRE donde previamente se había clonado 13 Myc en *Hpal*.

Tabla VI: Vectores de expresión de proteínas mutantes.

Vector de expresión	Mutación resultante	Plásmido resultante	Oligonucleótidos PCR
pcDNA3 x2Flag Rad21	Delección 372-392 aa	x2Flag- $\Delta_{372,392}$ Rad21	S 5'- CTTACCCCACTTGTACCAGAAG -3' AS 5'- CTTTCCACTCCTCTGTCTCT -3'
pcDNA3 x2Flag Rad21	R166A	x2Flag-Rad21 ^{R166A}	S 5'-GGGATGAACCTGAAATCCTCGAAGACATAGCTTCTTTGATG-3' AS 5'-CATCAAAGAAGCTATGCTTTCGAGGATTTCCAGTTTATCCC 3'
pcDNA3 x2Flag Rad21 ^{R166A}	R166A+R383A	x2Flag Rad21 ^{R166A+R383A}	S 5'-GACACTGAAGGAGTCAGTAGCGAAAGAAGTGGGAAACCAG-3' AS 5'-CTGTTTCCCACTTCTTTCGCTACTGACTCCTTCAGTGTC -3'
pcDNA3 x2Flag Rad21	Delección 345-365 aa	x2Flag- $\Delta_{345,365}$ Rad21	S 5'- CATATCCACTCCTCCCCCTTCT -3' AS 5'- TTCCTGCTCTGACTATAAACT -3'
pcDNA3.1 Myc-His (-) Rad21	Delección 345-365 aa	$\Delta_{345,365}$ Rad21-Myc	S 5'- CATATCCACTCCTCCCCCTTCT -3' AS 5'- TTCCTGCTCTGACTATAAACT -3'

aa: aminoácidos; h: humano; m: murino.

7.7. Inmunoprecipitación de proteínas

Las células 293T-HEK fueron transfectadas de forma transitoria con fosfato cálcico. A las 24-48 horas de la transfección se obtuvo el extracto proteico total con buffer de lisis D (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100) suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete EDTA-free*, ROCHE). La concentración de proteínas se cuantificó usando el kit *BioRad Dc Protein Assay*. Se bloqueó 1 mg de extracto total de proteína con microesferas de sefarosa unidas a proteína G (*GammaBind™ G Sepharose™*, GE Healthcare) durante una hora. El extracto bloqueado se incubó con el anticuerpo correspondiente durante 2 horas en un orbital (ver Tabla IV de anticuerpos). Los complejos formados por el anticuerpo y las proteínas fueron capturados con nuevas microesferas de sefarosa unidas a proteína G durante una hora en rotación. Todo este proceso se realizó a 4 °C. Tras cinco lavados con buffer de lisis, las microesferas se hirvieron 10 minutos en 2X tampón de carga de proteínas Laemmli en un bloque térmico a 100°C. Finalmente, el 50% de cada muestra se resolvió en geles al 8% de poliacrilamida-SDS y fueron analizadas o bien por Western Blot o bien por espectrometría de masas.

En el estudio de las interacciones con WAPAL, se añadió al cultivo celular ditiobis(propionato de succinimidilo) a 1 mg/ml (DSP, SIGMA) 10 minutos antes de realizar la extracción de proteínas, para estabilizar las uniones interproteicas lábiles. La extracción de proteína total en este caso se realizó con el buffer de lisis P (20mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 20mM B-Glicerofosfato, 5mM MgCl₂, 1mM NaF, 0.2% ND P-40, 0.5mM DTT) suplementado con inhibidores de proteasas, con ayuda de un homogeneizador Dounce.

Para las inmunoprecipitaciones de proteínas endógenas de testículos, una vez extraídos los órganos se retiró la túnica albugínea que rodea los testículos con la ayuda de unas pinzas quirúrgicas y se homogenizaron en el buffer de extracción L (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM β-mercaptoetanol) suplementado con inhibidores de proteasas. Tras sonicar la solución se centrifugó a 200.000 g a 4°C durante 30 minutos en una ultracentrífuga (BECKMAN). El sobrenadante así obtenido fue usado para realizar la inmunoprecipitación como se ha descrito anteriormente, con la salvedad de que se emplearon 2 mg de extracto total.

Como controles negativos de las inmunoprecipitaciones se utilizaron IgG de ratón o conejo (5 µg/1mg extracto proteico; ChromPure IgG de ratón 015-000-003, ChomPure IgG de conejo 011-000-003, Jackson ImmunoResearch).

7.8. Western Blot

Las muestras a analizar se resolvieron en geles de poliacrilamida-SDS siguiendo el método descrito por Laemmli (1970). A continuación el gel fue transferido a membranas de nitrocelulosa (*Hybond ECL; GE Healthcare*) durante 1 hora a 68 V en un soporte Mini-

PROTEAN® II (*Bio-Rad*). Una vez finalizada la transferencia, se bloqueó la membrana de nitrocelulosa con leche en polvo desnatada al 5% en TBS-T durante una hora, tras la cual se incubó la membrana con el anticuerpo primario correspondiente diluido en TBS-T con leche al 2,5%, durante otra hora a temperatura ambiente. A continuación se realizaron 3 lavados de 5 minutos en TBS-T y se incubó la membrana con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, en las condiciones anteriores. Tras lavar de nuevo la membrana con TBS-T, la detección de proteína se realizó por quimioluminiscencia mediante un sustrato quimioluminiscente HRP (Immobilon™ Western, MILLIPORE) y posterior exposición en películas fotográficas AGFA.

7.9. Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF

Las muestras obtenidas tras la inmunoprecipitación de extractos proteicos, se resolvieron en geles de poliacrilamida-SDS como se ha descrito anteriormente. Una vez teñidas con plata, las bandas de interés fueron cortadas manualmente y digeridas con tripsina. Los péptidos resultantes fueron analizados con un espectrómetro de masas *Bruker Ultraflex MALDI-TOF* y las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias existentes en la base de datos del NCBI. Los *score* con un valor mayor de 66 fueron considerados significativos ($p < 0.05$). El trabajo de espectrometría fue realizado en colaboración con el Laboratorio de Proteómica del IBMCC, miembro de ProteoRed, Genoma España.

7.10. Fraccionamiento de cromatina

Para extraer las proteínas asociadas a la cromatina, en primer lugar se extrajeron los núcleos de las células en cultivo con el Kit *ProteoJET Cytoplasmic & Nuclear Protein Extraction Kit* (Fermentas), siguiendo el protocolo detallado en dicho kit comercial. A continuación se incubaron los núcleos 15 minutos con el buffer de lisis aportado por el kit, suplementado con 30mM EDTA, 2mM EGTA y 10 mM DTT. Tras centrifugar 20 minutos a 1.700 g, el sobrenadante corresponde a la fracción soluble de las proteínas nucleares, y el pellet restante está constituido por la cromatina y las proteínas asociadas. Para extraer dichas proteínas, el pellet se resuspendió en buffer de cromatina (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10% glicerol, 1mM CaCl₂, 1mM EDTA), suplementado con inhibidores de proteasas y 5 unidades de nucleasa micrococcal. Se incubó 45 minutos a 37°C y se detuvo la reacción añadiendo EGTA a 1mM. Para el análisis de las proteínas por Western Blot cargamos la tercera parte de cada muestra así obtenida en un gel de poliacrilamida-SDS.

7.11. Generación de una línea celular con expresión inducible de *Rad21* o *Rad21I*

En primer lugar, se clonaron las ORF de *Rad21* y de *Rad21I* en el vector de expresión inducible por tetraciclina pRevTRE (Tabla IV). Se produjeron partículas retrovirales portadoras de

los vectores pRevTRE x13Myc-Rad21 o pRevTRE 9Myc Rad21I en las células 293T-HEK como se ha descrito en el apartado 6.9. Con estos sobrenadantes se infectaron células HeLa Tet-Off®, las cuales expresan transactivadores que se unen y activan la expresión de los promotores con elementos TRE (elementos de respuesta a tetraciclina) en ausencia de doxiciclina. Por tanto, para inhibir la expresión de *Rad21/Rad21I* añadimos doxiciclina (Hiclato de Doxiciclina, SIGMA) a 1 µg/ml al medio de cultivo y para inducir la expresión retiramos la doxiciclina del medio.

7.12. Traducción de proteínas *in vitro*

Se utilizó el sistema de transcripción y traducción *in vitro* (TNT, *Transcription/Translation System*) suministrado por el kit comercial *TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate Systems* (Promega) con el que se transcribe el cDNA mediante una T7 RNA polimerasa a RNA, el cual es traducido mediante un lisado de reticulocitos de conejo. La reacción fue suplementada con una mezcla de todos los aminoácidos excepto metionina, que fue añadida en forma radiactiva, marcada con ³⁵S. Las reacciones se llevaron a cabo según el protocolo comercial, empleando 0,5 µg del cDNA clonado en un vector de expresión con el promotor T7 (pcDNA3) y 20 µCi de metionina marcada con ³⁵S (PerkinElmer).

7.13. Digestión con Separasa

Con el objetivo de digerir con Separasa las proteínas traducidas mediante *TNT*, 2 µl de la reacción de *TNT* se incubaron a 37°C durante 90 minutos con 1 µl de Separasa activa o inactiva en un buffer específico (20 mM HEPES a pH 7.7, 100 mM KCl, 11 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 10 mM NaF, 0.5 µM microcystin-LR, 1 mM PMSF). En los experimentos en los que RAD21L es fosforilada previamente con PLK1, se realizó una incubación con 1 µl de GST-PLK1 durante 30 minutos a 37 °C anterior a la incubación con Separasa. Las proteínas Separasa y PLK1 fueron cedidas generosamente por el Dr. Olaf Stemmann (Instituto Max-Planck de Bioquímica, Alemania).

7.14. Esparcido de espermatozoides (*spreading*)

Para realizar estudios de la meiosis mediante IF en esparcidos de espermatozoides, se utilizó el protocolo previamente descrito por Peters et al., (1997) sobre el cual se realizaron pequeñas modificaciones. Los testículos de ratón, una vez desprovistos de la túnica albugínea, se trituraron con ayuda de un bisturí en una placa de Petri con una gota de PBS. La suspensión celular resultante, previa unicelularización con una micropipeta p1000, se centrifugó en PBS a 600 rpm durante 10 segundos para retirar los fragmentos no disociados y restos de tejido. A continuación, la suspensión se centrifugó de nuevo a 1.200 rpm durante 8 minutos y el pellet así obtenido se lavó nuevamente por centrifugación en 6 ml de PBS. Tras el lavado, el pellet se incubó 7 minutos a temperatura ambiente en 75-350 µl de sacarosa 100 mM en agua MQ y se

extendió en varios portaobjetos previamente desengrasados con etanol 100% (Merck). Para ello, se añadieron 300 µl de fijador (1% paraformaldehído, 3,5 mM NaOH, 0,05% PBS 1x, 0,15% Tritón X-100, 2,5 mM de tetraborato sódico, pH final 7,15-9,5) a 4°C en el lateral del portaobjetos, sobre los cuales se mezclaron 10-20 µl de la muestra y se expandió la mezcla por la superficie moviendo el portaobjetos manualmente. Tras 2 horas a temperatura ambiente en una cámara húmeda, se lavaron las preparaciones con Photo-Flo (Kodak) al 0,08% en agua MQ y permanecieron a temperatura ambiente hasta su completo secado. Finalmente los esparcidos se lavaron tres veces en PBS y se procesaron mediante técnicas de IF.

7.15. Esparcidos de oocitos en paquitenia

Ovarios de embriones de 17,5 dpc se dispusieron individualmente en placas de 24 pocillos con 50 µl de colagenasa a 50 mg/ml (Sigma-Aldrich) y se incubaron 20-30 minutos a 37°C. A continuación, los ovarios se incubaron con una solución hipotónica (30 mM de Tris-HCl pH 8,2, 50 mM de sacarosa, 17 mM de citrato sódico, 5 mM de EDTA, 0,5 mM de DTT, 1 mM de PMSF) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Tras transferir los ovarios a un nuevo pocillo con 60 µl de sacarosa 100 mM a pH 8,2, se unicelularizaron con una micropipeta p100 (lo cual se monitorizó con un microscopio). Posteriormente, 10 µl de la suspensión se añadieron sobre 40 µl de fijador a pH 9,2 (1 % de PFA, 5 mM de tetraborato sódico, 0,15 % de Triton X-100, 3 mM de DTT) en un círculo delimitado con *rubber cement* en un portaobjetos. Mediante movimiento manual del portaobjetos se esparcieron las células por el círculo. Tras 3 horas de incubación con el fijador se procesaron mediante IF.

7.16. Aplastado de túbulos seminíferos (*squash*)

Para realizar el aplastado de túbulos seminíferos seguimos el protocolo descrito en Parra et al., (2002). Se extrajeron y fijaron los túbulos seminíferos en fijador (2% Formaldehído Merck, 0,1% Tritón X-100 en PBS) durante 10 minutos. En portaobjetos previamente desengrasados con etanol y cubiertos con poli-L-lisina 1 mg/ml (Sigma-Aldrich) se dispusieron fracciones de túbulos y una gota de fijador, sobre los cuales se colocó un cubreobjetos 22 x 22 mm, se pasó un lápiz para disgregarlos y se aplastaron con la yema del pulgar. A continuación se introdujo el portaobjetos 10 segundos en nitrógeno líquido, se retiró el cubreobjetos y se lavó la preparación 3 veces con PBS durante 5 minutos cada lavado.

7.17. Inmunofluorescencia

Las IFs de los cultivos celulares se llevaron a cabo sembrando las células en pocillos de 3,5 cm sobre cristales cubreobjetos cubiertos de gelatina porcina (0,5%, Sigma) para aumentar la adherencia de las células. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS a 4°C durante 7 minutos. Tras lavar con PBS, fueron permeabilizadas con Triton X-100 (Sigma) al 0.2%

en buffer KB (0,1 M NaCl, 20 mM Tris pH 7.5, 0,1% BSA). El bloqueo se realizó con PBS al 7% de FBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario diluido en PBS con un 7% de FBS durante una hora a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS antes de incubar una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo (Jackson ImmunoResearch) diluido 1:100 en PBS al 7% de FBS.

En el caso de los esparcidos y aplastados de espermatozoides y esparcidos de oocitos, el protocolo de IF se llevó a cabo con pequeñas modificaciones. En concreto, el proceso de extracción con Triton X-100 es opcional y el bloqueo con FBS no es necesario. Los anticuerpos tanto primario como secundario se diluyeron en PBS sin FBS y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente.

Para analizar de forma específica las metafases de células HeLa Tet-Off® mediante IF, se empleó un protocolo específico. Se sembraron 4×10^5 células en placas de 3,5 cm. Tras inducir durante 48 horas la expresión de los vectores mediante la retirada de tetraciclina en el cultivo, se trataron las células con colchicina a 1 $\mu\text{g/ml}$ durante 3 horas tras las cuales se recogieron las metafases sacudiendo la placa de cultivo de forma brusca (técnica “*shake-off*”). Las células se centrifugaron 5 minutos a 1.200 rpm y se resuspendieron en PBS (3×10^4 células en 0,5 ml). A continuación se centrifugaron en una centrífuga CitoSpin durante 4 minutos a 1.000 rpm, quedando las células extendidas en el portaobjetos. La permeabilización se realizó con Tritón X-100 al 1% en buffer PEM (80 mM PIPES potasio pH 6,8, 5 mM EGTA, 2mM MgCl_2) durante 5 minutos y se realizaron 2 lavados de 1 minuto en el mismo buffer. A continuación se fijaron 15 minutos en paraformaldehído al 4% en buffer PEM a temperatura ambiente y se lavaron en PEM 6 minutos repartidos en 3 lavados. Se incubaron 5 minutos en NH_4Cl 50 mM preparado en PEM y se repitieron los lavados en PEM. Se permeabilizó de nuevo con Tritón X-100 durante 10 minutos y tras tres lavados de 3 minutos se bloqueó con BSA al 1% en PEM durante una hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos se diluyeron en la misma solución empleada para bloquear y los lavados tras las incubaciones se realizaron en PBS con Tween 20 al 0,1%.

En todos los experimentos realizados, el DNA nuclear fue teñido con DAPI diluido en Vectashield (Vector Laboratories) y las imágenes fueron tomadas con un microscopio *LEICA CTR6000* y capturadas con una cámara digital *Hamamatsu ORCA-ER*.

7.18. Obtención de anticuerpos policlonales

Se generaron dos anticuerpos policlonales en conejo, frente a antígenos diferentes de la proteína RAD21L. El anticuerpo RAD21L-AP fue diseñado para reconocer el péptido CNSHSELDQPQDWKD, localizado en la región menos conservada. El anticuerpo RAD21L-ARP fue generado frente a una proteína recombinante de 14 kDa expresada en *E. coli*, correspondiente a la región comprendida entre los aminoácidos 344 y 552, localizada en el extremo carboxilo terminal. En los experimentos presentados en esta tesis, han sido utilizados

tanto los sueros como las IgG purificadas, las cuales fueron obtenidas empleando un kit comercial de purificación de IgG (Amersham). La producción de anticuerpos se llevó a cabo en colaboración con la empresa biotecnológica Immunostep (RAD21L-AP) y con el Dr. José Luis Barbero (RAD21L-ARP; CIB Madrid).

Para testar la funcionalidad de ambos anticuerpos y descartar que reconocieran RAD21 de forma inespecífica se realizaron IFs y Western Blot con RAD21-AP y RAD21-ARP en células 293T-HEK transfectadas con el cDNA de 2x-Flag-Rad21 y 2x-Flag-Rad21l. Ninguno de los dos anticuerpos reaccionó de forma inespecífica (Figura 8). Se comprobó la transfección realizando IF frente al epítipo. Tanto RAD21-AP como RAD21-ARP se usaron para validar los resultados de IFs e inmunoprecipitaciones presentados a lo largo de este trabajo.

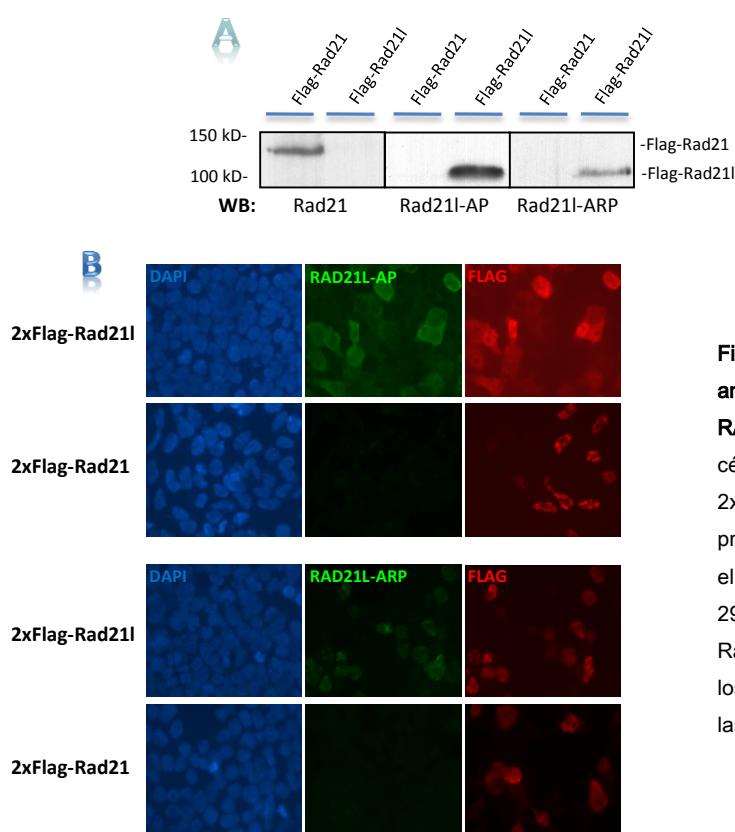


Figura 5. Especificidad de los anticuerpos generados frente a RAD21L. **A**, Extractos proteicos de células 293T-HEK transfectadas con 2xFlag-Rad21 o 2xFlag-Rad21l procesados por Western Blot (WB) con el anticuerpo indicado. **B**, IF de células 293T-HEK transfectadas con 2xFlag-Rad21 o 2xFlag-Rad21l realizadas con los anticuerpos señalados. El núcleo de las células está teñido con DAPI.

Se generaron también anticuerpos policlonales frente a HDAC11. Para ello, el cDNA completo de *Hdac11* murino, obtenido del plásmido pBS-mHdac11 mediante restricción con BamHI/XhoI, se clonó en el plásmido de expresión bacteriano pGEX-4T-3-HEV en las dianas *BamHI-XhoI*. Tras inducir su expresión en bacterias *E. coli* se purificó la proteína con la cual se inmunizaron dos conejos. La producción de estos anticuerpos fue llevada a cabo por el laboratorio del Dr. José Luis Barbero (CIB, Madrid).

8. Análisis filogenético

Las proteínas ortólogas de RAD21L fueron identificadas usando el programa TBLASTN comparando su secuencia proteica con las secuencias genómicas existentes en la base de datos Genbank y otros servidores como Ensembl. Los ortólogos seleccionados aparecen recogidos en la Tabla VII. Los alineamientos de las secuencias aminoacídicas se realizaron con el programa informático ClustalW, empleando los parámetros que aparecen por defecto. El árbol filogenético fue construido siguiendo el método de “*Neighbor-joining*” y una corrección de Poisson para las distancias. En todos los casos se llevó a cabo un análisis de *bootstrap* con 1.000 réplicas para determinar el grado de soporte estadístico de los agrupamientos con el programa informático MEGA4.

Tabla VII: Organismos utilizados para la construcción del árbol filogenético de la familia de las α -kleisin

Grupo	Especie	Rad21l	Rad21	Rec8
Humanos	<i>Homo sapiens (Hs)</i>	+/HQ603827	+/O60216	+/Q8C5S7
Roedores	<i>Mus musculus (Mm)</i>	+/HQ603828	+/Q61550	+/O95072
Artiodáctilos	<i>Sus scrofa (Ss)</i>	+/ENSSSCP00000007658	+/ENSSSCP00000006424	+/ENSSSCP00000002187
Marsupiales	<i>Monodelphis domestica (Md)</i>	+/ENSMODP00000024381	+/XM_001369965	+/ENSMODP00000034072
Aves	<i>Gallus gallus (Gg)</i>	+/ENSGALG00000006186	+/Q5ZLK3	-----
Aves	<i>Taeniopygia guttata (Tg)</i>	+/ENSTGUP00000007091	+/ENSTGUP00000012686	-----
Aves	<i>Meleagris gallopavo (Mg)</i>	+/ENSMGAP00000008199	+/ENSMGAP00000013148	-----
Reptiles	<i>Anolis carolinensis (Ac)</i>	P/ENSACAP00000008231	+/ENSACAP00000010827	P/ENSACAP00000003857
Anfibios	<i>Xenopus tropicalis (Xt)</i>	-----	+/ENSXETP000000044903	+/ENSXETG00000014620
Peces	<i>Danio rerio (Dr)</i>	+/ENSARP000000074083	+/Q7ZW30	+/ENSARP000000091417
Peces	<i>Oryzias latipes (Ol)</i>	+/ENSORLP00000018323	+/ENSORLG00000005535	pp
Peces	<i>Takifugu rubripes (Tr)</i>	+/ENSTRUP00000007429	+/ENSTRUP00000017209	pp
Tunicados	<i>Ciona intestinalis (Ci)</i>	-----	+/ENSCINP00000022121	p/ENSCINP00000021677
Tunicados	<i>Ciona savignyi (Cs)</i>	-----	p/ENSCSAVP00000001613	p/ENSCSAVG00000004732
Equinodermos	<i>Strongylocentrotus purpuratus (Sp)</i>	-----	+/XP_001176016	+/XP_001200458

“+”: la secuencia genómica descrita codifica la proteína completa. “p”: gran parte de la proteína está codificada en la secuencia genómica existente. “pp”: la secuencia genómica existente sólo codifica una pequeña parte de la proteína. Estas secuencias no se emplean en el alineamiento. “-----”: no existe secuencia genómica.

Resultados

1. Caracterización funcional de SGOL2 en la mitosis de ratón

Las shugoshinas participan en el mantenimiento de la estabilidad genómica a través de sus funciones en la protección de la cohesión centromérica y/o la monitorización de la tensión ejercida por los microtúbulos en el cinetocoro. La familia de las shugoshinas consta de dos miembros en mamíferos, SGOL1 encargado del mantenimiento de la cohesión entre cromátidas hermanas durante la mitosis, y SGOL2, cuya función al comienzo de la presente Tesis Doctoral permanecía sin determinar debido a los resultados contradictorios en su papel como protector de la cohesión centromérica (Kitajima et al., 2006; Huang et al., 2007). Dado el interés de nuestro grupo de investigación en determinar los mecanismos encargados de asegurar la estabilidad cromosómica, nos centramos en caracterizar la función que desempeña SGOL2 durante la mitosis de los mamíferos.

1.1. Generación de un modelo murino knock-out para *Sgol2*

Con el fin de determinar el papel de SGOL2 en la mitosis de mamíferos hemos desarrollado un modelo murino con un alelo potencialmente nulo de *Sgol2*. Para ello, elegimos una mutación insercional que interrumpiera la transcripción del gen *Sgol2* del *International Gene Trap Consortium* (<http://www.knockoutmouse.org>). Escogimos el clon de células madre embrionarias D025B05 (GGTC), en el cual el casete rFlpROSA- β geo (Schnütgen et al., 2005) se encuentra insertado en el primer intrón del gen *Sgol2*, entre el inicio de la transcripción y el inicio de la traducción. De esta forma, la transcripción del gen *Sgol2* quedaría potencialmente interrumpida al transcribirse un terminador de la transcripción localizado en el extremo 3' del casete (Figura 9a). Para verificar el sitio de integración del casete en el clon de células ES (*embryonic stem*) seleccionado, amplificamos y clonamos la región genómica donde se encuentra insertado dicho casete. Mediante secuenciación del producto amplificado verificamos que la mutación insercional se ubica en la región genómica indicada (Figura 9a). Las células ES de este clon se utilizaron para generar ratones quiméricos mediante su microinyección en blastocitos. Los ratones heterocigotos obtenidos al cruzar los machos quimeras con hembras C57BL/6 se identificaron mediante Southern Blot (Figura 9b) y se cruzaron entre sí con el fin de obtener ratones homocigotos. La frecuencia genotípica obtenida en la descendencia (*silvestres* 30,4%, heterocigotos 44% y homocigotos para la mutación 25,6%) se ajustaba a un carácter mendeliano (1:2:1; Figura 9c).

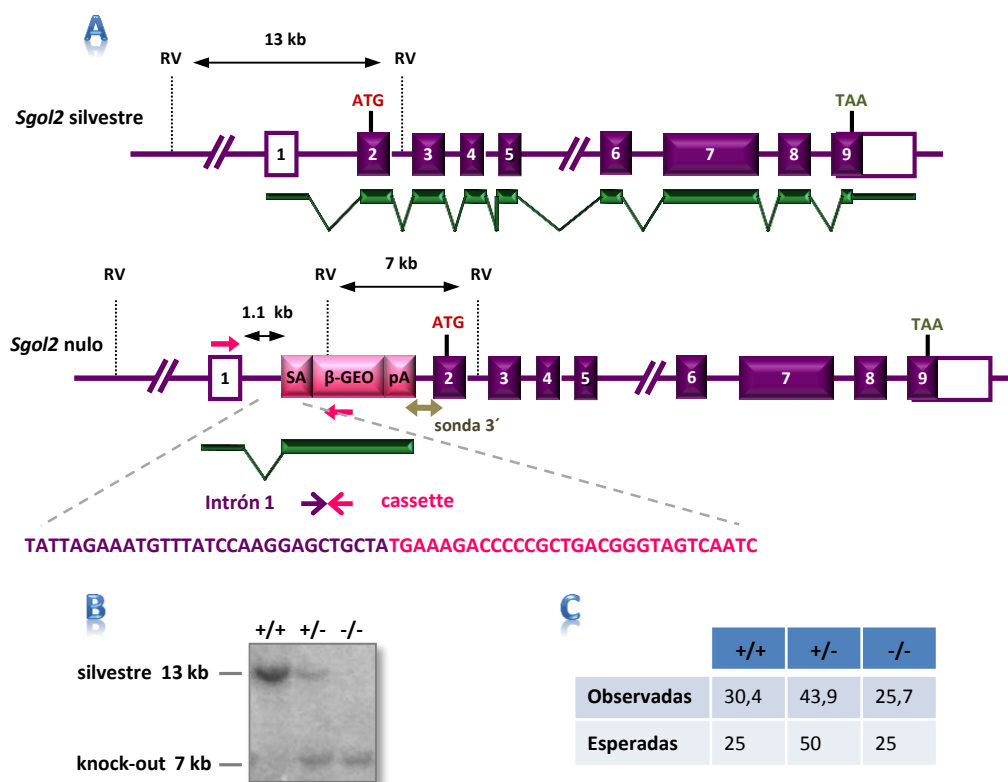


Figura 9. Generación de un ratón mutante constitutivo para *Sgol2*. **A**, Representación esquemática del alelo silvestre de *Sgol2* y de la mutación insercional del casete rFlpROSA-βgeo. Los exones codificantes y no codificantes se indican como rectángulos morados y blancos, respectivamente. El transcrito esperado (línea verde gruesa) y los codones de inicio (ATG) y fin de la traducción (TAA) están señalados. Se indican la sonda 3' utilizada para el Southern Blot (flecha de doble sentido gris), los oligonucleótidos empleados para amplificar la región de la inserción (flechas rosas), las dianas de restricción de *EcoRV* (RV), y la secuencia nucleotídica de la unión entre el intrón 1 y el comienzo del casete rFlpROSA-βgeo en el clon de células ES D025B05. SA: *splice acceptor*; β-GEO: gen bacteriano β-galactosidasa fusionado con gen de resistencia a Neomicina; pA: señal de poliadenilación. **B**, Southern Blot de DNA genómico digerido con *EcoRV* e hibridado con la sonda 3'. El tamaño de los RFLPs correspondientes a los alelos silvestre y mutante es de 13 y 7 kb, respectivamente. +/+ : silvestre; +/- : heterocigoto; -/- : homocigoto para el alelo nulo. **C**, Porcentajes de los genotipos obtenidos en 12 camadas de cruces entre heterocigotos, con un tamaño muestral de 148 individuos.

1.2. Análisis de la expresión de *Sgol2* y caracterización del alelo mutante *in vivo*

Seguidamente, y con el objetivo de caracterizar el alelo mutante, analizamos la transcripción de *Sgol2* mediante Northern Blot del RNA de diferentes tejidos de ratones homocigotos para la mutación (*Sgol2*^{-/-}), heterocigotos (*Sgol2*^{+/-}) y silvestres (*Sgol2*^{+/+}). Como se muestra en la Figura 10a, se detecta expresión abundante de *Sgol2* en testículo y timo silvestres mientras que no se detecta transcrito en ningún tejido *Sgol2*^{-/-} y los niveles son intermedios en los testículos heterocigotos. Además de en testículo y timo, apenas se detecta transcrito por Northern Blot en ningún otro tejido analizado. Sin embargo, mediante RT-PCR amplificamos un fragmento de 355 bp comprendido entre el exón 1 y el exón 3 de *Sgol2* en todos estos tejidos

silvestres (Figura 10b). Estos resultados indican que *Sgol2* se expresa de forma ubicua en el ratón, si bien su expresión es mayoritaria en testículo y timo.

A continuación, se analizó si la ausencia de transcripción de *Sgol2* en los ratones mutantes conlleva una deficiencia de la proteína. Para ello llevamos a cabo IFs en MEFs *Sgol2*^{-/-} y *Sgol2*^{+/+} utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce la región carboxilo terminal de SGOL2 (Figura 10c). En los fibroblastos silvestres, SGOL2 se localiza en los centrómeros de los cromosomas metafásicos como se ha descrito con anterioridad en células HeLa (Lee et al., 2008). Sin embargo, en las células *Sgol2*^{-/-} no se detecta señal de SGOL2. Esto indica que la mutación insercional ocasiona la interrupción de la transcripción de *Sgol2* y en consecuencia, provoca la deficiencia de su expresión.

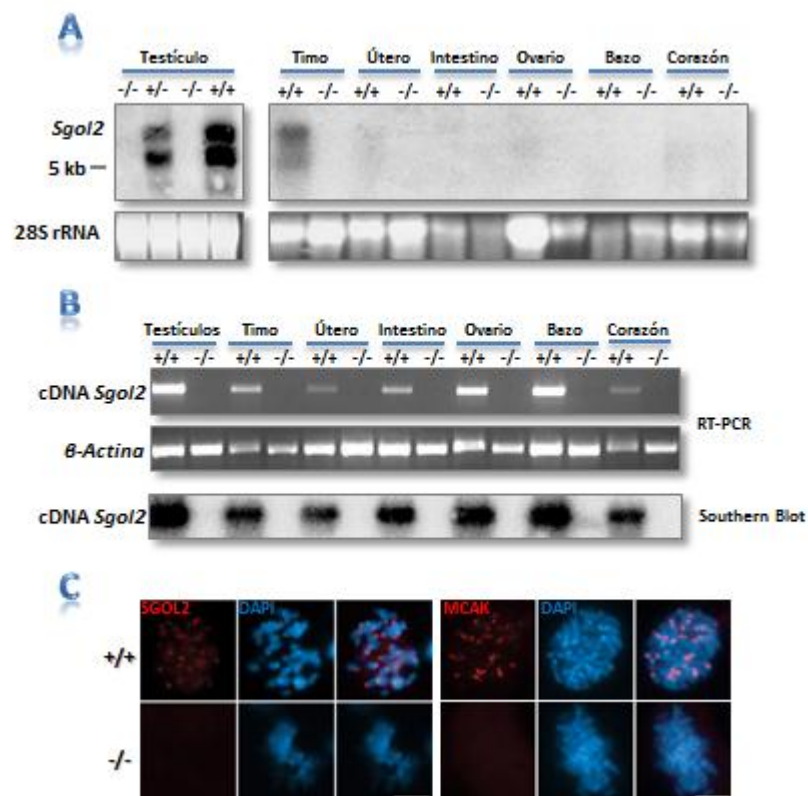


Figura 10. El alelo mutante de *Sgol2* se comporta como un alelo nulo. **A**, Northern Blot de diferentes tejidos de individuos silvestres (+/+), heterocigotos (+/-) y homocigotos (-/-) para el alelo mutante de *Sgol2*, utilizando como sonda el cDNA completo de *Sgol2*. El RNA ribosomal 28S teñido con bromuro de etidio se empleó como control de carga. **B**, Análisis de expresión de *Sgol2* en tejidos silvestres y homocigotos mediante RT-PCR amplificando un fragmento del cDNA de 355 bp comprendido entre el exón 1 y el exón 3 de *Sgol2*. La amplificación de β -Actina fue empleada como control. Southern Blot de la RT-PCR empleando como sonda el producto amplificado (panel inferior). **D**, IF de mitosis de MEFs silvestres y knock-out para *Sgol2* con los anticuerpos indicados. Se empleó DAPI para teñir el DNA. Barras: 10 μ m.

Dado que SGOL2 es necesario para el reclutamiento de la kinesina MCAK a los centrómeros de los cromosomas mitóticos en mamíferos (Huang et al., 2007), analizamos su localización en MEFs deficientes en SGOL2. Los resultados muestran que en las células silvestres MCAK se localiza en el dominio interno de los centrómeros. Por el contrario, en los fibroblastos *Sgol2*^{-/-} MCAK no se detecta en los centrómeros. Por tanto, la deslocalización de MCAK en los fibroblastos mutantes confirma la pérdida de función de SGOL2 (Figura 10c).

1.3. Caracterización fenotípica del ratón y de las células deficientes en SGOL2

A pesar de la ubicuidad de la expresión de *Sgol2*, los individuos *Sgol2*^{-/-} se desarrollan con normalidad y no presentan ninguna anomalía somática, presentando pesos y tallas similares a los controles *Sgol2*^{+/+}. Asimismo, los individuos mutantes no desarrollan malformaciones en ningún tejido somático (datos no mostrados). No obstante, la ausencia de SGOL2 provoca infertilidad, tanto en ratones macho como hembra, debido a la formación de gametos aneuploides (Llano et al., 2008).

Como se ha mencionado anteriormente, la función que SGOL2 desempeña en la protección de la cohesión centromérica en líneas celulares es controvertida (Kitajima et al., 2006; Huang et al., 2007). Por un lado, la depleción de *Sgol2* con siRNA en células HeLa ocasiona pérdida de la cohesión centromérica (Kitajima et al., 2006). Sin embargo, en un estudio posterior con un siRNA diferente, si bien se observa un ligero incremento de *chromosome lagging*, este no es debido a una pérdida prematura de cohesión (Huang et al., 2007). Por ello, el siguiente objetivo consistió en analizar el fenotipo mitótico de células primarias deficientes en SGOL2, atendiendo a su proliferación, mantenimiento de la cohesión entre cromátidas hermanas, segregación cromosómica, estabilidad del cariotipo y capacidad de immortalización.

Para evaluar la proliferación, se contó el número total de MEFs mutantes y silvestres durante 5 días consecutivos a partir de dos densidades celulares diferentes. Como se detalla en la figura 11a, no se observan diferencias significativas entre las células silvestres y las mutantes en su capacidad proliferativa.

Los defectos en la segregación pueden alterar el índice mitótico puesto que dan lugar a un arresto en mitosis mediado por el SAC, o bien, en el caso de que las células consigan deslizarse sobre el SAC y finalizar la mitosis, ocasionan un arresto en G1 mediado por el *checkpoint* de dicha fase (Margolis et al., 2003). Por ello decidimos analizar el índice mitótico, para lo cual utilizamos la histona H3 fosforilada en la serina 10 como marcador (p-H3; Hendzel et al., 1997). Los índices mitóticos obtenidos mediante IFs fueron muy similares para ambos genotipos (1,4% y 1,5% el de los cultivos silvestres y knock-out respectivamente). Por tanto, estos resultados sugieren que la ausencia de SGOL2 no provoca alteraciones significativas en el índice mitótico (Figura 11b).

La pérdida prematura de cohesión entre las cromátidas hermanas durante la mitosis disminuye la tensión ejercida por los microtúbulos en los centrómeros, lo cual conlleva un retraso

en la entrada en anafase, errores en la segregación cromosómica y finalmente, da lugar a aneuploidías (Nasmyth, 2002). Por ello, para determinar si la ausencia de SGOL2 provoca defectos en la cohesión analizamos las distintas etapas de la mitosis en las espermatogonias de *Sgol2^{-/-}* mediante IF frente a ACA (*Anti-centromere antibodies*). En las células knock-out, al igual que en las silvestres, no existen figuras mitóticas anormales, como puentes anafásicos (*anaphase bridges*), separación prematura visible de las cromátidas hermanas, ni *chromosome lagging* (Figura 11c). Paralelamente, se estudiaron los cromosomas de los MEFs *Sgol2^{-/-}* atendiendo a su morfología, defectos en cohesión, y la distribución del cariotipo. Los resultados obtenidos muestran que las células mutantes no presentan aberraciones cromosómicas ni pérdida prematura de cohesión. Además, la distribución cariotípica es similar entre ambos genotipos, lo cual indica que no existe inestabilidad cromosómica ni aneuploidías (Figura 12a).

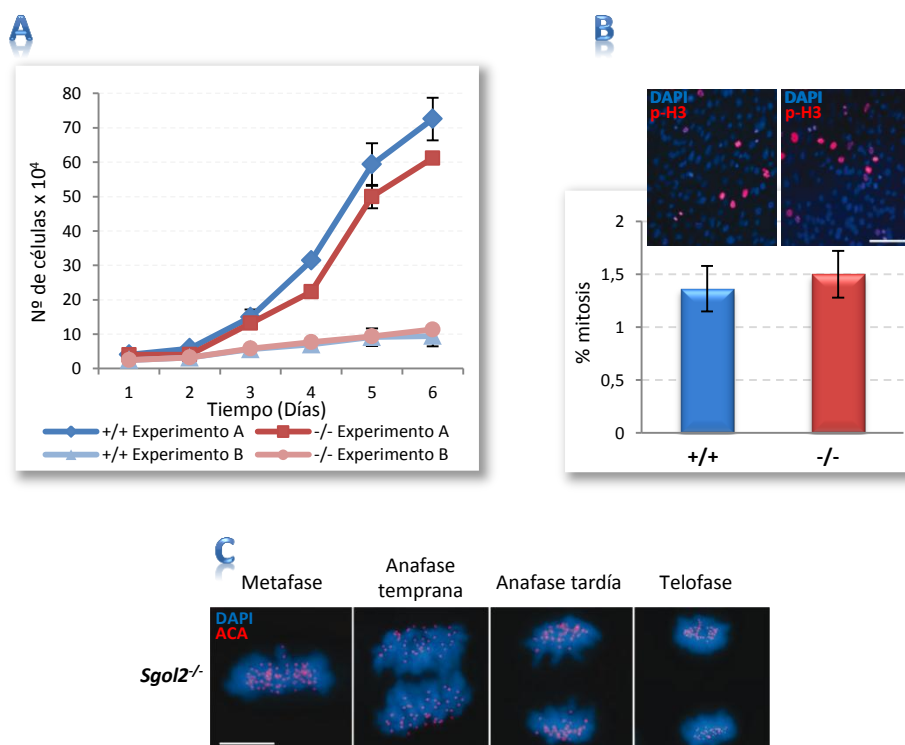


Figura 11. La ausencia de SGOL2 en células somáticas no afecta la progresión de la mitosis. **A**, Curvas de proliferación de MEFs *Sgol2^{+/+}* y *Sgol2^{-/-}* a partir de dos densidades celulares diferentes (Experimento A: 4×10^4 ; Experimento B: 2.5×10^4). **B**, Índice mitótico de MEFs *Sgol2^{+/+}* y *Sgol2^{-/-}* calculado mediante IF con α -p-H3 (Ser10). Cada punto en **A**, y **B**, representa la media \pm el error estándar de la media (SEM) de cuatro experimentos con MEFs extraídos de diferentes embriones. **C**, IF de espermatogonias de ratones knock-out en diferentes fases de la mitosis, utilizando ACA para marcar los centrómeros y DAPI para teñir la cromatina. Barras: B, 100 μ m; C, 10 μ m.

Los MEFs son cultivos primarios que presentan una capacidad replicativa limitada. Estas células envejecen a lo largo de las divisiones celulares y finalmente, entran en un estado de parada proliferativa total denominado senescencia (Peacocke & Campisi, 1991; Sherr & DePinho, 2000). Sin embargo, aunque en baja frecuencia, los fibroblastos pueden immortalizarse de forma espontánea, adquiriendo la capacidad de dividirse indefinidamente (Todaro & Green, 1963). Con la finalidad de determinar el posible efecto que puede provocar la ausencia de SGOL2 en estos procesos llevamos a cabo un ensayo 3T3 en fibroblastos silvestres y mutantes. Como se muestra en la figura 12b las curvas de duplicación son similares entre cultivos silvestres y knock-out, entrando en senescencia en un número de pases similar. De este ensayo concluimos que la ausencia de SGOL2 no altera la entrada en senescencia ni la capacidad de immortalización.

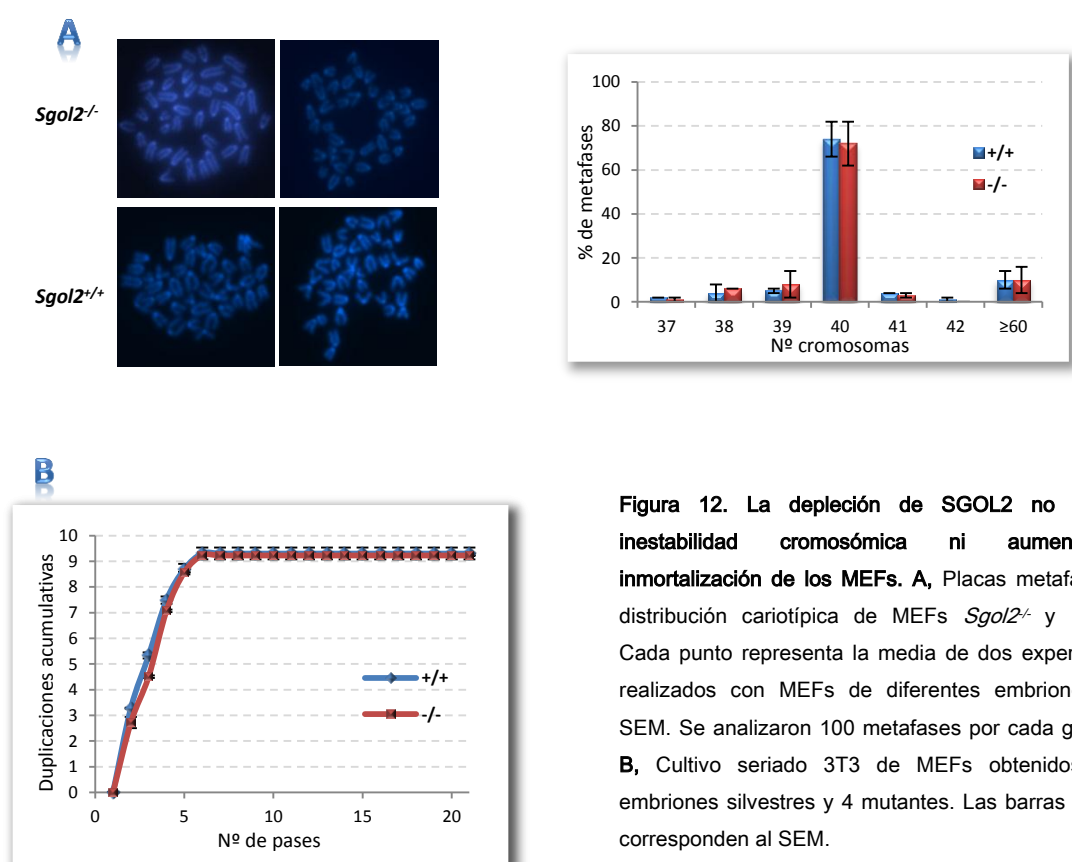


Figura 12. La depleción de SGOL2 no provoca inestabilidad cromosómica ni aumenta la immortalización de los MEFs. **A,** Placas metafásicas y distribución cariotípica de MEFs *Sgol2*^{-/-} y *Sgol2*^{+/+}. Cada punto representa la media de dos experimentos realizados con MEFs de diferentes embriones y el SEM. Se analizaron 100 metafases por cada genotipo. **B,** Cultivo seriado 3T3 de MEFs obtenidos de 4 embriones silvestres y 4 mutantes. Las barras de error corresponden al SEM.

Para determinar si la ausencia de anomalías mitóticas en los MEFs *Sgol2*^{-/-} es extrapolable a células somáticas adultas *Sgol2*^{-/-}, estudiamos el índice mitótico y cariotipo de timocitos puesto que presentan una expresión abundante de *Sgol2* (Figura 13a). La distribución cariotípica de los timocitos deficientes en SGOL2 no presenta anomalías respecto al cariotipo de las células silvestres (Figura 13b). Asimismo, los cromosomas metafásicos de los timocitos mutantes no exhiben pérdida prematura visible de cohesión. El índice mitótico de los

timocitos, calculado a partir del porcentaje de mitosis en las preparaciones utilizadas para estudiar el cariotipo, es igual en MEFs silvestres y mutantes (Figura 13c). Por tanto, y al igual que los MEFs, los timocitos deficientes en SGOL2 no presentan defectos en la cohesión y mantienen la misma capacidad proliferativa que los controles silvestres.

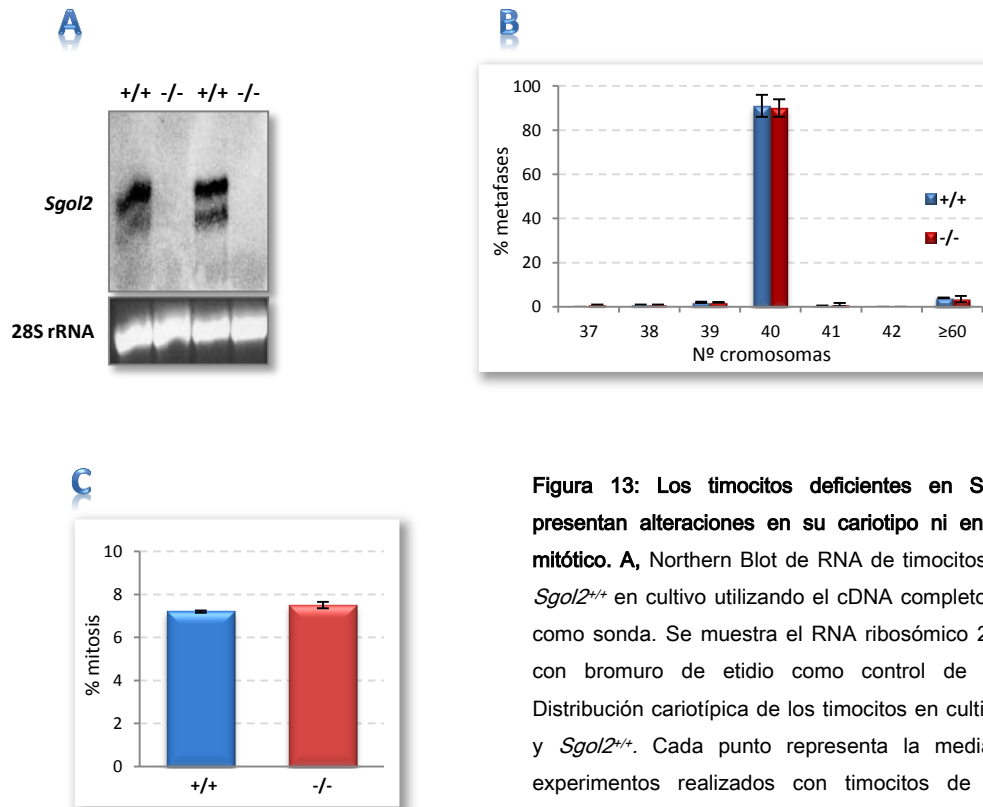


Figura 13: Los timocitos deficientes en SGOL2 no presentan alteraciones en su cariotipo ni en el índice mitótico. **A**, Northern Blot de RNA de timocitos *Sgol2^{-/-}* y *Sgol2^{+/+}* en cultivo utilizando el cDNA completo de *Sgol2* como sonda. Se muestra el RNA ribosómico 28S teñido con bromuro de etidio como control de carga. **B**, Distribución cariotípica de los timocitos en cultivo *Sgol2^{-/-}* y *Sgol2^{+/+}*. Cada punto representa la media de tres experimentos realizados con timocitos de diferentes individuos. Se analizaron 100 metafases por cultivo. **C**, Índice mitótico obtenido de los mismos timocitos en cultivo. Las barras de error en B y C representan el SEM.

En conjunto, todos estos resultados proporcionan la primera evidencia *in vivo* de que SGOL2 es prescindible para el mantenimiento de la cohesión centromérica entre las cromátidas hermanas en mitosis, la progresión del ciclo celular y la proliferación de células somáticas en condiciones fisiológicas. El siguiente paso fue evaluar el efecto de su depleción durante situaciones de estrés mitótico.

Dado que las shugoshinas están implicadas en la regulación de la tensión y de la unión cinetocoro-microtúbulo en levaduras (Indjeian et al., 2005; Vanoosthuyse et al., 2007; Kawashima et al., 2007) y que Hs-SGOL2 participa en la corrección de uniones anormales entre cinetocoro y microtúbulos mediante el reclutamiento de MCAK a los centrómeros (Huang et al., 2007), decidimos analizar si la ausencia de SGOL2 podría estar afectando a estos procesos. Para ello, se trataron fibroblastos silvestres y knock-out con dos drogas antagónicas: nocodazol, que ocasiona su despolimerización y taxol que, por el contrario, provoca su estabilización. En ambos

casos, se induce la activación del SAC impidiéndose la transición a anafase. Los resultados muestran que ambos compuestos incrementan significativamente el índice mitótico de los cultivos tanto *Sgol2^{-/-}* como *Sgol2^{+/+}* (Figura 14a). Por tanto, la ausencia de SGOL2 no compromete la activación del SAC en estas condiciones.

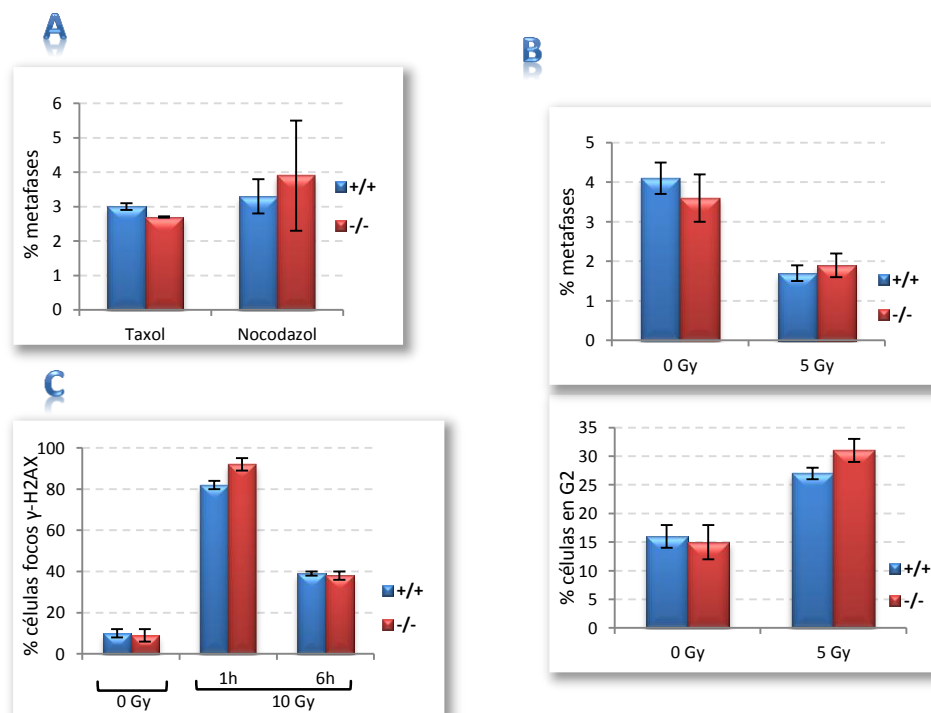


Figura 14. La ausencia de SGOL2 no afecta a la activación del SAC por fallos en la dinámica de los microtúbulos ni a la respuesta al daño inducido en el DNA. A, Medida del índice mitótico mediante IFs con α -p-H3 de MEFs silvestres (+/+) y knock-out (-/-) tratados con taxol y nocodazol. B, Porcentaje de células en mitosis (panel superior) o arrestadas en G2 (panel inferior) medido mediante IF con α -p-H3 en MEFs *Sgol2^{-/-}* y *Sgol2^{+/+}* irradiadas (1h, 5 Gy) y sin irradiar. C, Porcentaje de células con focos de γ H2AX en MEFs de ambos genotipos irradiadas (1 h y 6 h, 10 Gy) y sin irradiar. Cada punto en A-C representa la media y el SEM de MEFs de 4 embriones de cada genotipo.

Las funciones que desempeñan el SAC y el *checkpoint* de daño en el DNA pueden estar parcialmente solapadas. En este sentido, el SAC puede ser activado en respuesta a daño en el DNA por un mecanismo dependiente de ATM y ATR, ocasionando un bloqueo antes de anafase (Kim & Burke, 2008). Por tanto, el SAC coopera con el *checkpoint* de daño en el DNA para impedir la perpetuación de daños en el genoma. Dada la inter-relación de las shugoshinas con el SAC y la estrecha relación entre éste y el *checkpoint* de daño, decidimos evaluar si la depleción de SGOL2 afecta a la respuesta al daño en el DNA. Para inducir daño en el DNA y analizar la capacidad de bloqueo en G2 de las células mutantes utilizamos radiación gamma, la cual genera roturas en el DNA que, cuando se producen en fase S, desencadenan un arresto en G2 por el *checkpoint* G2/M de daño en el DNA (Xu et al., 2002). Los resultados obtenidos mediante IFs con p-H3 indican que tanto la disminución del índice mitótico como el aumento de células en G2 es

similar en ambos genotipos (Figura 14b). Por otro lado, llevamos a cabo un estudio de la cinética de reparación de daño en el DNA evaluando a una y seis horas después de la irradiación, la fosforilación de H2AX en la serina 139 inducida por DSB. Tras una hora de la irradiación, entre el 80 y el 90% de los MEF *Sgol2^{+/+}* y *Sgol2^{-/-}* exhiben focos de γ -H2AX y por tanto, roturas en el DNA (Rogakou et al., 1998 y 1999). Seis horas después de ser irradiadas, el porcentaje de células con daño en el DNA se reduce a la mitad, tanto en los cultivos silvestres como en los mutantes (Figura 14c). Por tanto, los resultados sugieren que SGOL2 es prescindible para la respuesta al daño en el DNA en células somáticas.

1.4. Esperanza de vida de los ratones *Sgol2^{-/-}*

Como ya hemos indicado, los ratones nulos para *Sgol2* no exhiben ningún fenotipo somático aparente. Para analizar si la ausencia de SGOL2 afecta a la viabilidad post-natal y/o longevidad de los ratones, realizamos una curva de supervivencia de 24 individuos knock-out frente a 25 animales silvestres monitoreando su viabilidad durante 165 semanas. Como se observa en la curva, no existen diferencias significativas entre los individuos mutantes y silvestres en relación a su viabilidad y longevidad (Figura 15). Por tanto, la ausencia de SGOL2 en el ratón no modifica su esperanza media de vida.

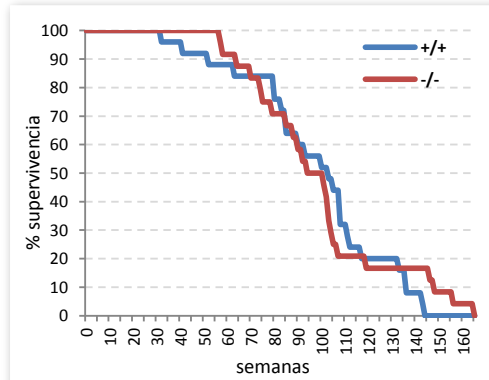


Figura 15. La esperanza de vida de los ratones deficientes en SGOL2 es similar a la de los individuos silvestres. La gráfica representa la viabilidad de 25 ratones silvestres vs 24 individuos knock-out durante 165 semanas. Cada punto corresponde a animales que murieron de forma natural o que fueron sacrificados debido a enfermedad.

1.5. Depleción de SGOL2 en ratones knock-out para p53

Los resultados obtenidos muestran que, en células somáticas de ratón, el mantenimiento de la cohesión en los centrómeros es independiente de SGOL2. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la depleción de SGOL2 en células HeLa ocasiona, en un estudio, defectos en la cohesión centromérica y en otro, un leve aumento de *chromosome lagging* (Kitajima et al., 2006; Huang et al., 2007). Esta línea celular está transformada por la desregulación de genes importantes en la progresión del ciclo celular incluyendo, entre otras, la

inactivación de Rb y p53 por las proteínas virales E7 y E6, respectivamente (Scheffner et al., 1990, 1991 y 1993; Schwarz et al., 1985; DeFilippis et al., 2003). El supresor tumoral p53 está estrechamente relacionado con el SAC al controlar la transcripción de la quinasa BubR1 (Oikawa et al., 2005). Además, la activación de p53 mediada por el SAC durante las mitosis anormales es esencial para activar el *checkpoint* en G1 e impedir la entrada en fase S de las células que se deslizan sobre el SAC sin segregar las cromátidas (Vogel et al., 2004). Dada esta inter-relación entre el SAC y p53 nos planteamos si los defectos en la segregación cromosómica descritos en células HeLa deficientes en *Sgol2* podrían estar relacionados con la inactivación de p53 en dichas células. Para abordarlo, generamos ratones knock-out dobles para *Sgol2* y *p53* (*Sgol2*^{-/-}/*p53*^{-/-}) a partir de cruzamientos entre animales heterocigotos para *Sgol2* y *p53* (*Sgol2*^{+/-}/*p53*^{+/-}). Las diferencias observadas en las frecuencias genotípicas obtenidas respecto a las esperdas no son significativas lo cual sugiere que la depleción conjunta de SGOL2 y p53 no provoca letalidad embrionaria (Figura 16a).

Para evaluar si la deficiencia de SGOL2 en ausencia de p53 provoca pérdida de cohesión analizamos las mitosis de fibroblastos de oreja de ratones adultos *Sgol2*^{+/-}/*p53*^{-/-} y *Sgol2*^{-/-}/*p53*^{-/-}. Cuantificamos las figuras mitóticas aberrantes teniendo en cuenta células en metafase y anafase que mostrasen defectos tales como fallos en el alineamiento de cromosomas, husos poliastrales y puentes anafásicos. Como se muestra en el gráfico comparativo, las células de ambos genotipos presentan un porcentaje elevado de defectos en segregación (Figura 16b). Sin embargo, la ausencia de SGOL2 no incrementa significativamente esta proporción.

Finalmente, analizamos la esperanza de vida de los individuos *Sgol2*^{+/-}/*p53*^{-/-} y *Sgol2*^{-/-}/*p53*^{-/-} para determinar si la depleción de SGOL2 disminuye la viabilidad de los individuos *p53*^{-/-}. A pesar de la dificultad que supone el estudio comparativo de la supervivencia de los ratones *p53*^{-/-} debido a su disminuida longevidad por el desarrollo de linfomas de timo (Jacks et al., 1994), no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia entre los ratones *Sgol2*^{+/-}/*p53*^{-/-} y *Sgol2*^{-/-}/*p53*^{-/-} (Figura 16c). La gráfica 16c representa la curva de supervivencia de los animales *Sgol2*^{+/-}/*p53*^{-/-} vs *Sgol2*^{-/-}/*p53*^{-/-} en la cual se refleja una disminución similar del número de individuos y que la mayoría de los animales muere antes de alcanzar las 25 semanas de edad independientemente de su genotipo. Tampoco se encontraron diferencias en la causa de la muerte, siendo ésta principalmente el desarrollo de timomas en ambos genotipos (Jacks et al., 1994). Estos resultados, tanto *in vitro* como *in vivo*, indican que SGOL2 no es esencial para el mantenimiento de la cohesión entre cromátidas hermanas ni para la correcta segregación cromosómica en ausencia de p53.

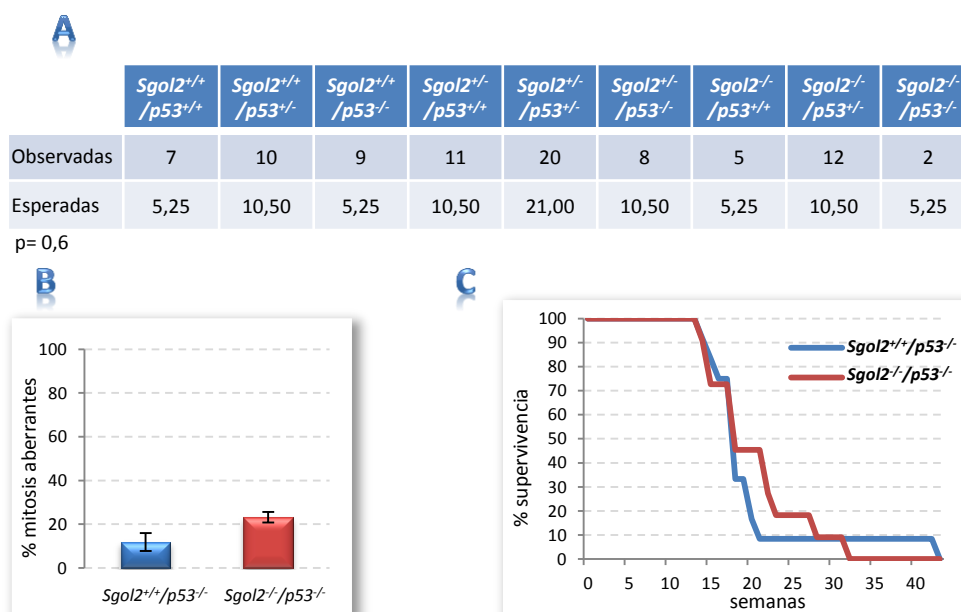


Figura 16: La depleción simultánea de p53 y SGOL2 no altera la viabilidad de los ratones ni la mitosis de cultivos primarios adultos. **A**, Número de individuos observados y esperados por cada genotipo en la descendencia de varios cruzamientos entre ratones *Sgol2*^{+/+}/*p53*^{+/-} en un total de 84 individuos correspondientes a 8 camadas. Las diferencias obtenidas no son significativas tras el análisis estadístico chi cuadrado (p= 0,6). **B**, Porcentaje de mitosis con husos poliastrales, puentes anafásicos y defectos en el alineamiento de cromosomas de fibroblastos adultos *Sgol2*^{+/+}/*p53*^{-/-} y *Sgol2*^{-/-}/*p53*^{-/-}. Cada punto constituye la media de tres experimentos; las barras de error representan la SEM. **C**, Efecto de la ausencia de SGOL2 y p53 en la supervivencia de los ratones. Comparación de la longevidad de 12 de individuos *Sgol2*^{+/+}/*p53*^{-/-} vs 12 *Sgol2*^{-/-}/*p53*^{-/-} monitoreada durante 43 semanas.

1.6. Análisis comparativo de la expresión génica de individuos silvestres y knock-out para *Sgol2*

Durante el transcurso de esta tesis, nuestro grupo determinó que la ausencia de SGOL2 en meiosis provoca una liberación prematura de REC8 de los centrómeros en anafase I que se manifiesta citológicamente en una pérdida completa de cohesión centromérica en metafase II y una separación precoz de las cromátidas hermanas. En consecuencia, se produce una activación permanente del SAC debido a la falta de tensión entre los cinetocoros hermanos por lo que las células permanecen arrestadas en metafase II (Llano et al., 2008). Sin embargo, una fracción de éstas se desliza sobre el SAC dando lugar finalmente a gametos aneuploides, lo que se traduce fisiológicamente en infertilidad. En busca de un posible modelo que permita explicar cómo las células son capaces de deslizarse sobre el SAC llevamos a cabo un análisis diferencial de la expresión génica de los testículos knock-out y silvestres para *Sgol2*. Así, se analizó el patrón de transcripción génica de testículos de tres individuos knock-out y dos silvestres mediante un *microarray* de expresión.

De todos los genes con alteraciones de la expresión en los animales mutantes, la histona desacetilasa *Hdac11* nos atrajo poderosamente debido a su implicación en la estabilidad

genómica de las células de *C. elegans* (Pothof et al., 2003), la relación de la familia de HDACs en la segregación cromosómica durante la meiosis (revisado en Gu et al., 2010) y la acetilación/desacetilación a la que están sometidas las cohesinas. Según el microarray realizado, la expresión de *Hdac11* se encuentra reprimida 3-4 veces en los testículos *Sgol2*^{-/-}. El primer paso fue comprobar mediante Northern Blot si el transcrito de *Hdac11* disminuye en otros tejidos de los individuos *Sgol2*^{-/-}. Como se observa en la imagen se detecta transcripción de *Hdac11* en corazón, ovario, útero y testículo de los animales silvestres. Sin embargo, la expresión de *Hdac11* en testículos *Sgol2*^{-/-} es menor en comparación con los silvestres, si bien las diferencias en el resto de los tejidos no son tan acusadas (Figura 17).

El hecho de que la expresión de *Hdac11* esté disminuida en la gametogénesis de los ratones *Sgol2*^{-/-} y que se desconozca su función pese a estar muy conservada desde bacterias hasta mamíferos, junto con su papel en estabilidad genómica en *C. elegans* (Pothof et al., 2003), nos llevó a abordar la caracterización funcional *in vivo* de esta histona desacetilasa.

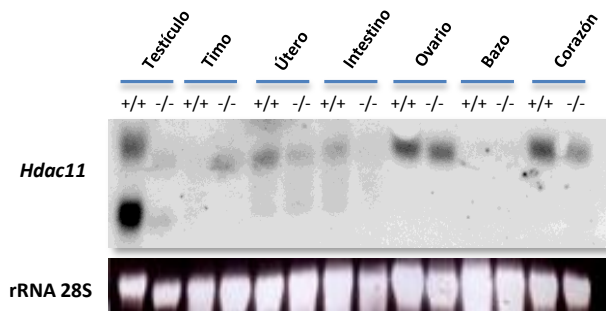


Figura 17: Los testículos *Sgol2*^{-/-} tienen reducida la expresión de HDAC11. Análisis de la expresión de *Hdac11* por Northern Blot en tejidos de animales silvestres y *Sgol2*^{-/-}. Se muestra el RNA ribosómico 28S teñido con bromuro de etidio como control de carga.

2. Caracterización funcional de HDAC11

El siguiente objetivo consistió en caracterizar *in vivo* la función biológica que desempeña la histona desacetilasa HDAC11, para lo cual decidimos generar un modelo murino knock-out condicional para el gen que codifica el enzima.

2.1. Generación de un modelo murino knock-out condicional para *Hdac11*

El vector de reemplazamiento utilizado para generar un alelo condicional de *Hdac11* se ha construido mediante la clonación, en el plásmido pDELBOY-3X, de dos brazos de homología (brazo 5' de 5,3 kb que abarca el exón 1 y 2; brazo 3' de 8 kb que comprende el exón 4, 5 y parte del 6) y la región a floxear correspondiente al exón 3 y parte de la secuencia intrónica aguas arriba y abajo del exón (ver Material y Métodos; Figura 18).

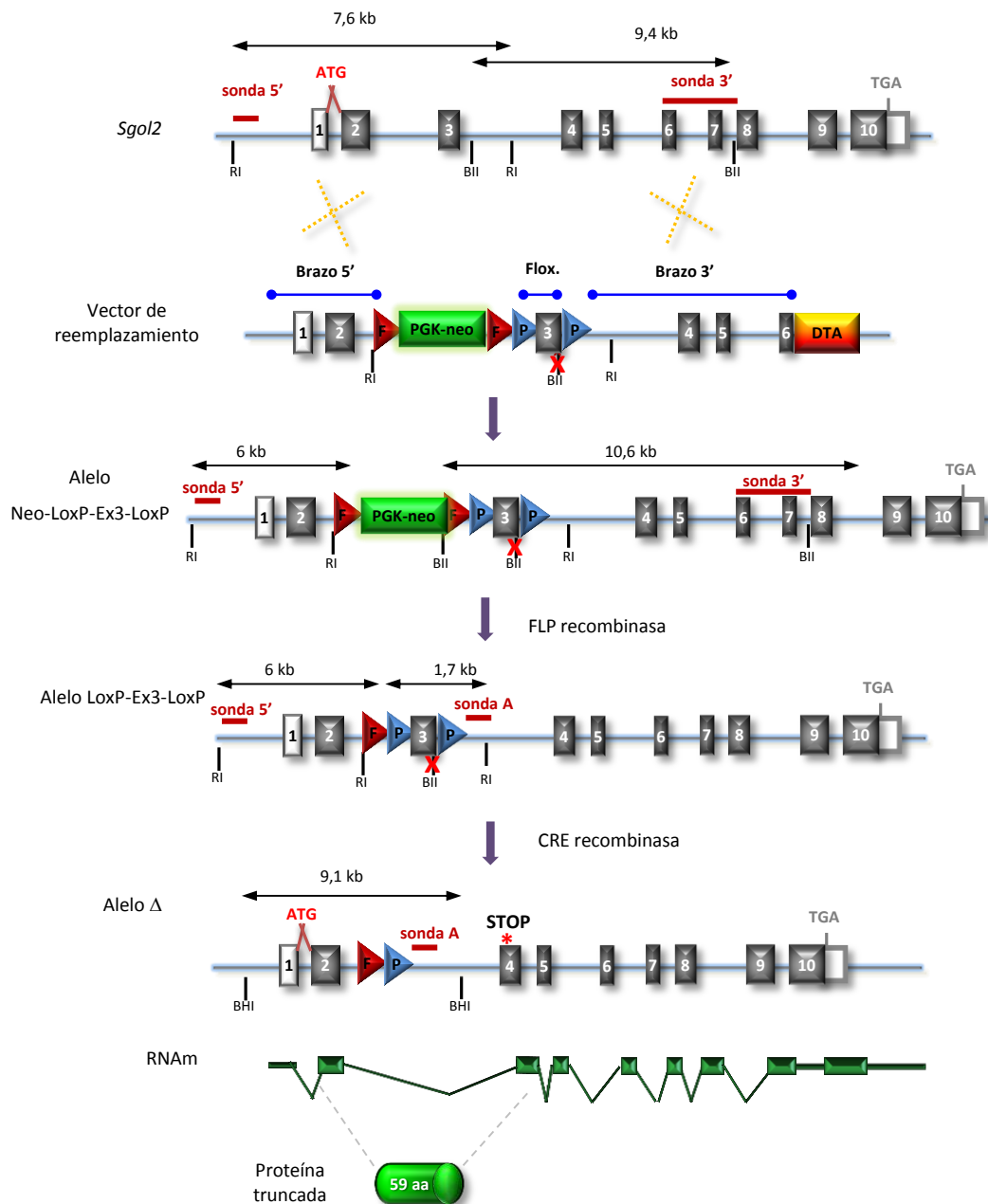


Figura 18. Estrategia de *gene targeting* en el locus de *Hdac11*. Representación del locus *Hdac11* y del alelo condicional mutante (Neo-LoxP-Ex3-LoxP) en el que se muestran los exones codificantes (recuadros coloreados), los exones no codificantes (recuadros blancos), los brazos de homología y los codones de inicio (ATG) y fin de la traducción (TGA). Se indican las sondas empleadas para el Southern Blot (línea roja), las dianas de restricción de *EcoRI* (RI), *BglII* (BII) y *BamHI* (BHII), los sitios *loxP* (triángulo azul P) y sitios *FRT* (triángulo rojo F). Se muestran los alelos generados tras la escisión del casete de Neomicina (LoxP-Ex3-LoxP) y tras la escisión del exón 3 floreado (alelo Δ). La línea verde gruesa corresponde al transcrito generado. La proteína truncada esperada (cilindro verde) tiene un tamaño de 59 aminoácidos frente a los 349 aminoácidos de la proteína silvestre. PGK-neo: gen Neomicina con promotor de la PGK; DTA: gen codificante para la toxina diftérica.

Tras la electroporación de dicho vector en células ES se comprobó mediante Southern Blot que aproximadamente el 6% de los clones había integrado la construcción por recombinación homóloga. Una vez nos aseguramos que los clones recombinantes tenían un cariotipo estable, se generaron ratones quimeras mediante la agregación del clon seleccionado en mórulas de hembras CD1. Mediante cruzamientos de estos individuos quimera con hembras silvestres se obtuvieron ratones heterocigotos para el alelo mutante (+/Neo LoxP Ex3 LoxP; Figura 19a). Estos individuos se cruzaron con ratones transgénicos pCAG-FLPe con el fin de deletar el casete de resistencia a Neomicina que se encuentra flanqueado por dos secuencias FRT. Así se obtuvieron individuos heterocigotos +/LoxP-Ex3-LoxP (Figura 19b) que se cruzaron entre sí para conseguir individuos homocigotos LoxP-Ex3-LoxP/LoxP-Ex3-LoxP.

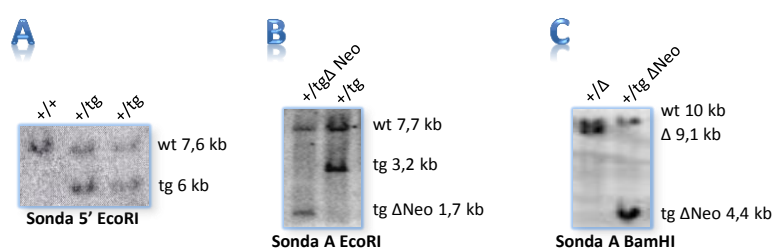


Figura 19: Genotipado de los ratones mutantes para *Hdac11*. Southern Blot del DNA genómico de rabo de ratón con las sondas y enzimas indicadas. **A**, RFLPs de individuos silvestres (+/+) y heterocigotos (+/tg) para el alelo mutante Neo-LoxP-Ex3-LoxP (tg). **B**, Southern Blot de individuos mutantes heterocigotos para el alelo Neo-LoxP-Ex3-LoxP (+/tg) o para el alelo sin casete de Neomicina (+/tg ΔNeo). **C**, RFLPs de individuos heterocigotos para el alelo sin Neomicina (+/tg ΔNeo) o sin Neomicina ni Exón 3 (+/Δ). tg ΔNeo: LoxP-Ex3-LoxP; wt: alelo silvestre.

Para comprobar que el alelo condicional generado se comporta de forma similar al silvestre y descartar posibles interferencias de la inserción de los sitios FRT y LoxP en la transcripción, se realizó un análisis Northern Blot de diferentes tejidos de individuos silvestres y homocigotos para el alelo LoxP-Ex3-LoxP o alelo floxeado (Figura 20). Como se observa en la figura, tanto los niveles de expresión como el tamaño del transcrito en individuos silvestres y mutantes son idénticos, lo cual sugiere que el alelo floxeado es transcripcionalmente análogo al silvestre. Asimismo, del análisis Northern Blot se concluye que la expresión de *Hdac11* es muy elevada en cerebro y moderada en hígado, pulmón y riñón (Figura 20). Este resultado, junto con el análisis tisular mostrado en el apartado 1.6/Figura 17, indica que *Hdac11* se expresa mayoritariamente en testículo y cerebro y de forma más moderada en ovario, corazón, riñón, hígado y pulmón. Al igual que en humanos (Gao et al., 2002), en los tejidos de ratón se detectan dos transcritos de diferente tamaño de *Hdac11* aunque existen diferencias específicas de tejido, puesto que el transcrito pequeño es mayoritario en testículos, mientras que en el resto de tejidos apenas es detectado.

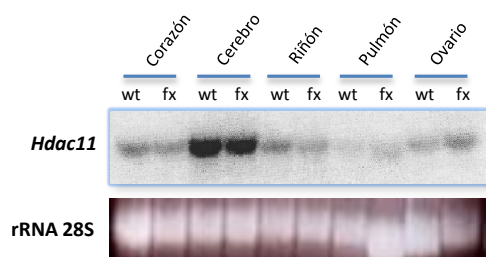


Figura 20. La expresión del alelo floxeado de *Hdac11* es igual que la del alelo silvestre. Northern Blot de RNA de diversos tejidos de individuos silvestres (wt) y homocigotos para el alelo floxeado sin Neomicina “LoxP-Ex3-LoxP” (fx). El RNA ribosómico 28S se muestra como control de carga.

Según el diseño del alelo mutado *in silico*, la escisión del exón 3 del gen *Hdac11* ocasiona un cambio en la fase de lectura que da lugar a la aparición de un codón de parada en el exón 4 (Figura 18). Para escindir el exón floxeado mediante la recombinasa CRE y obtener un alelo potencialmente nulo, los descendientes heterocigotos *Hdac11*^{+/LoxP-Ex3-LoxP} se cruzaron con un ratón transgénico Sox2-CRE (Hayashi et al., 2003). Así se obtuvieron individuos heterocigotos *Hdac11*^{+/ Δ} (Figura 19c) que fueron cruzados entre sí, obteniéndose descendientes homocigotos para la mutación (*Hdac11* ^{Δ / Δ}), heterocigotos (*Hdac11*^{+/ Δ}) y silvestres (*Hdac11*^{+/+}) en las frecuencias mendelianas esperadas (Figura 21).

	+/+	+/ Δ	Δ / Δ
Observadas	23,75	47,5	23,75
Esperadas	25	50	25

Figura 21: La depleción de HDAC11 no afecta al desarrollo embrionario. Frecuencias mendelianas observadas vs esperadas en la descendencia de cruzamientos entre individuos heterocigotos *Hdac11*^{+/ Δ} , en un total de 95 individuos correspondientes a 12 camadas.

2.2. Caracterización del alelo mutante de *Hdac11*

Para demostrar que el alelo resultante tras la delección del exón 3 se comporta funcionalmente como un alelo nulo, abordamos la detección de HDAC11 endógeno mediante Western Blot e IFs en los tejidos de los individuos mutantes y silvestres. Sin embargo, esto no fue posible probablemente debido a que los anticuerpos empleados (comerciales y policlonales generados en el laboratorio) no son capaces de reconocer la proteína HDAC11 endógena. Por ello, la estrategia adoptada para verificar la funcionalidad del alelo escindido de manera indirecta fue analizar, en una línea celular, el comportamiento del cDNA de *Hdac11* escindido en comparación con el cDNA silvestre. Para ello, amplificamos el cDNA de *Hdac11* a partir de ratones *Hdac11*^{+/+} y *Hdac11* ^{Δ / Δ} y lo clonamos en fase con un epítipo Flag en el extremo carboxilo terminal. En primer lugar, secuenciamos el cDNA de *Hdac11* escindido confirmándose que su secuencia se corresponde con la esperada tras la delección del exón 3. Seguidamente, se transfectaron ambos vectores de expresión en células 293T-HEK y se realizaron IFs con un anticuerpo frente al epítipo Flag. Las células transfectadas con el cDNA silvestre presentaban

fluorescencia mientras que en las células transfectadas con el cDNA mutante no se detectaba señal. Por tanto, podemos concluir que el alelo mutante generado se comporta en células 293T-HEK como un alelo nulo para HDAC11 (Figura 22).

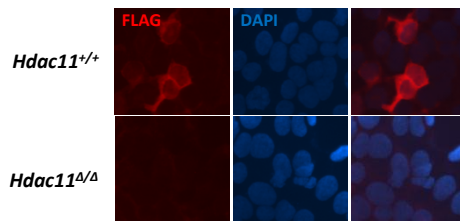


Figura 22. La transcripción de alelo *Hdac11*^{ΔΔ} codifica una proteína truncada. IF con α-FLAG de 293T-HEK transfectadas con el cDNA de *Hdac11* de individuos silvestres o knock-out para *Hdac11* clonado en fase con un epítipo FLAG. Se utilizó DAPI para teñir el núcleo.

2.3. Caracterización del modelo animal deficiente en HDAC11

Los animales *Hdac11*^{ΔΔ} son viables (Figura 21), se desarrollan normalmente y no presentan ningún fenotipo somático anormal. Dada la disminución de la expresión de *Hdac11* en la gametogénesis de ratones *Sgol2*^{-/-}, la posible implicación de HDAC11 en estabilidad genómica (Pothof et al., 2003) y de las HDACs en la progresión de la meiosis, decidimos caracterizar la meiosis en ausencia de HDAC11. En primer lugar, analizamos la fertilidad de las hembras y machos *Hdac11*^{ΔΔ} en comparación con controles silvestres. Para ello se cruzaron hembras y machos *Hdac11*^{ΔΔ} con machos y hembras silvestres, respectivamente y se calculó la media de descendientes por camada. Los valores así obtenidos no muestran diferencias significativas en fertilidad en comparación con individuos silvestres (datos no mostrados). Para profundizar en el desarrollo de la meiosis realizamos IFs en esparcidos de testículos con anticuerpos frente a SYCP3 y analizamos las diferentes figuras meióticas. Los resultados recogidos sugieren que la meiosis es normal en los individuos mutantes, no presentando defectos en la progresión de la profase meiótica ni en la cohesión entre cromátidas hermanas en metafase I y II (Figura 23).

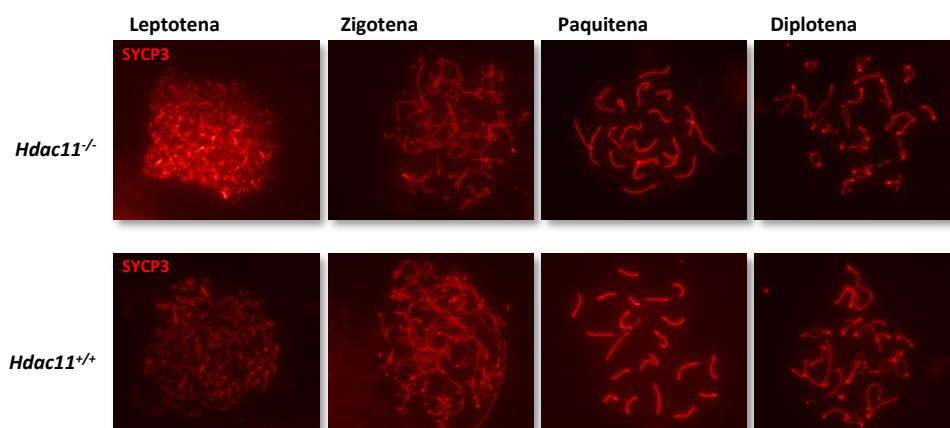


Figura 23. La meiosis de espermatocitos deficientes en HDAC11 no presenta alteraciones significativas. IF con α-SYCP3 sobre esparcidos de espermatocitos silvestres y knock-out para *Hdac11* en diferentes fases de la profase I meiótica.

2.4 Análisis de la expresión génica en ratones knock-out para *Hdac11*

Dada la función de las histonas desacetilasas como reguladores de la expresión génica (Yang & Seto, 2008) y concretamente, la implicación de HDAC11 en la regulación transcripcional de IL-10 (Villagra et al., 2009; Lian et al., 2012), tratamos de determinar si la ausencia de HDAC11 conlleva una desregulación del patrón transcripcional. Puesto que *Hdac11* se expresa abundantemente en testículo, analizamos la expresión génica de los testículos *Hdac11*^{+/+} y *Hdac11*^{Δ/Δ} mediante el microarray "Mouse Gene 1.0 ST Array". En el diagrama de cajas, que muestra los valores relativos de expresión, se observa un ligero incremento en los niveles de transcripción en los testículos *Hdac11*^{Δ/Δ} respecto a los testículos silvestres (Figura 24a).

De todos los genes analizados en el microarray, atrajo nuestra atención la ligera sobreexpresión en los testículos *Hdac11*^{Δ/Δ} de numerosos miembros de la familia de los receptores olfativos. En el mismo sentido, en los testículos mutantes también se encuentran sobreexpresados otros genes involucrados en la transmisión de los estímulos olfativos, como son el enzima adenilato ciclasa III (*Adcy3*) y el canal cerrado de nucleótidos cíclicos alfa 2 (*Cnga2*, cyclic nucleotide gated channel alpha 2). A continuación, procedimos a validar estos resultados mediante qPCR a partir del RNA de testículo de tres individuos silvestres y tres knock-out. Para ello analizamos dos de los receptores más sobreexpresados en los individuos mutantes denominados *Olfir767* y *Olfir1380*. Así, comprobamos que la expresión de *Olfir767* y *Olfir1380* es ligeramente superior en los testículos de los individuos *Hdac11*^{Δ/Δ} en comparación con los tejidos silvestres (Figura 24b). Es de destacar que los genes que codifican los receptores olfativos están sometidos a regulación epigenética a través de metilación de las histonas (Magklara et al., 2011; Faulk & Kim, 2009). Por tanto, de forma muy preliminar, estos resultados sugieren que HDAC11 podría actuar como un regulador epigenético de una ruta de transducción de señales implicadas en la percepción olfativa.

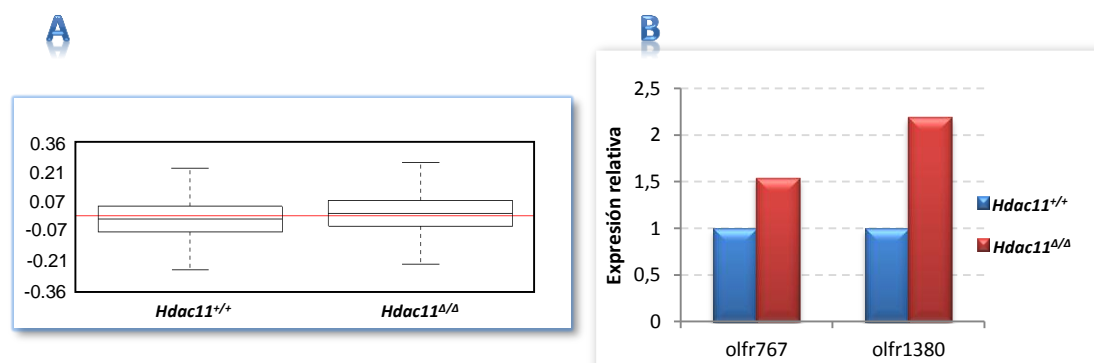


Figura 24. El análisis transcriptómico en testículos knock-out de *Hdac11* muestra un ligero incremento en sus niveles transcripcionales globales y concretamente, en los de receptores olfativos. **A**, Diagrama de cajas que representa la expresión relativa en logaritmo base 2 de testículos silvestres y *Hdac11*^{Δ/Δ}. **B**, Expresión relativa de *Olfir767* y *Olfir1380* determinada mediante qPCR en testículos silvestres y knock-out para *Hdac11*. Los valores de expresión relativa se calcularon mediante la fórmula $2^{\Delta\Delta Ct}$, siendo $\Delta\Delta Ct$ la diferencia de los ciclos de amplificación entre las muestras silvestres y knock-out previa normalización con su actina correspondiente. Cada barra representa la media de 3 individuos.

3. Identificación y caracterización bioquímica de RAD21L

En los meiocitos de mamíferos se han descrito parálogos para la mayoría de las proteínas que forman el complejo de cohesinas. Concretamente, existen parálogos de SMC1 α , STAG1-2, y de la α -kleisina RAD21 durante la meiosis que son SMC1 β , STAG3 y REC8, respectivamente. Dada esta diversidad de cohesinas en mamíferos, decidimos explorar la existencia de miembros adicionales en la familia de las kleisinas.

3.1. Identificación y clonación de *Rad21l*

Con el fin de identificar secuencias genómicas en mamíferos que codifiquen potencialmente parálogos de RAD21 y REC8, comparamos *in silico* sus dominios conservados amino y carboxilo-terminal frente a las bases de datos genómicos humanas y murinas. De esta forma se identificaron, dos potenciales exones separados entre sí por 23 kb y 26 kb en ratón y en humanos respectivamente, que mantienen una elevada identidad y codifican los posibles codones ATG y STOP. Estas regiones se localizan en el cromosoma 2 de ratón y en el brazo pequeño del cromosoma 20 de humanos (Figura 25a).

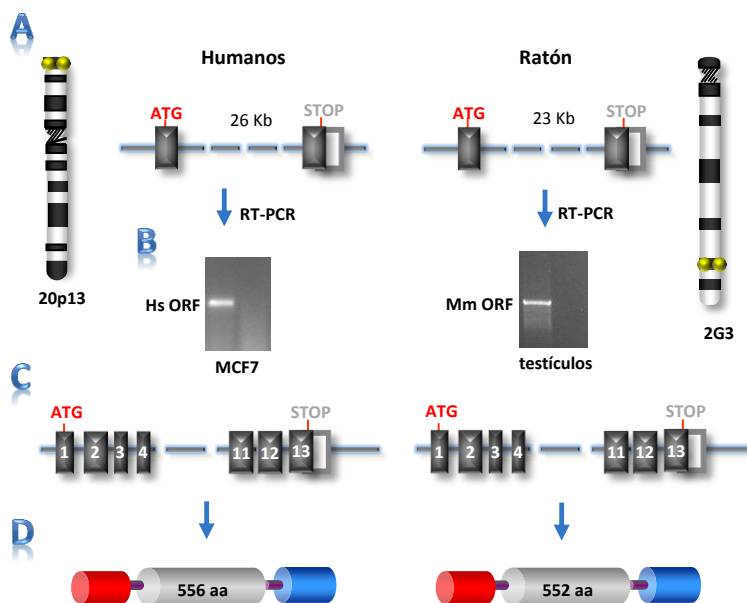


Figura 25. Identificación de la nueva kleisina RAD21L. **A**, Esquema y localización cromosómica de las regiones identificadas en el genoma de humanos y ratón con homología a los dominios conservados en RAD21 y REC8. **B**, cDNA de *Rad21l* obtenido por RT-PCR a partir de RNA de la línea celular MCF7 y de testículo de ratón. **C**, Representación del gen de RAD21L; se muestran los exones como cuadrados oscuros. **D**, Proteína codificada por el cDNA de *Rad21l*. Los dominios conservados amino y carboxilo terminal se presentan en rojo y azul, respectivamente.

Dado que en el análisis transcripcional *in silico* no encontramos ninguna EST (*expressed sequence tag*), se realizó una RT-PCR utilizando oligonucleótidos diseñados en las regiones correspondientes al codón iniciador y de parada para determinar si estas secuencias genómicas se transcriben *in vivo*. Así, se obtuvieron unas ORF de aproximadamente 1,7 kb empleando como molde el RNA de la línea tumoral MCF7 y el RNA total de testículo de ratón (Figura 25b). A continuación, mediante secuenciación del cDNA amplificado y posterior alineamiento con la secuencia genómica, se determinó que el gen consta de 13 exones que codifican una proteína de 556 y 552 aminoácidos en humanos y ratón respectivamente (Figura 25c y 26). Esta proteína contiene los dos dominios característicos de las α -kleisinas localizados en los extremos amino y carboxilo, a través de los cuales interaccionan con los dominios ATPasa de las proteínas SMC cerrando el complejo de cohesinas. Puesto que la proteína identificada presenta un mayor porcentaje de similitud en su secuencia aminoacídica con RAD21 (56%) que con REC8 (35,7%), la hemos denominado RAD21-like o RAD21L.

3.2. Análisis de expresión de *Rad21l*

A continuación, determinamos el patrón de expresión de *Rad21l* amplificando, mediante RT-PCR a partir del RNA de diferentes tejidos, un amplicón de 352 bp comprendido entre los exones 1 y 4. Como se muestra en la figura 27a, se detecta transcripción en testículo, intestino, médula ósea, cerebro, cerebelo y ovario. No obstante, puesto que la RT-PCR es una técnica no cuantitativa, se analizó la expresión de *Rad21l* en estos tejidos mediante Northern Blot. Los resultados recogidos en este análisis indican que la transcripción de *Rad21l* es muy abundante en los testículos (Figura 27b). No podemos excluir la posibilidad de que en oocitos la expresión también sea notable a pesar de que el transcrito no sea detectado por Northern Blot en ovario total. En resumen, de los datos mostrados se concluye que si bien existe una ligera expresión en diferentes tejidos, la expresión de *Rad21l* se halla prácticamente restringida a testículo.

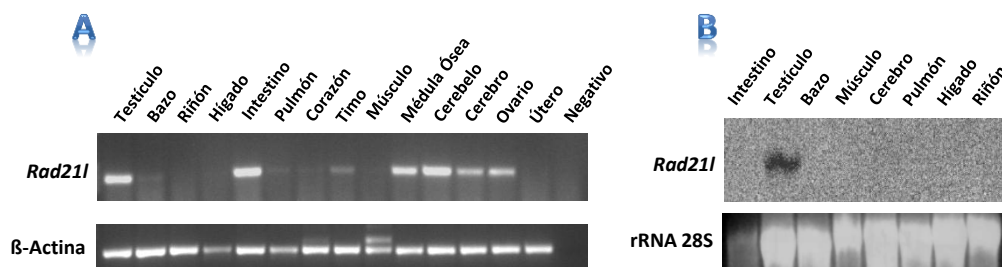


Figura 27. *Rad21l* se expresa fundamentalmente en testículos. A, RT-PCR a partir de RNA de diferentes tejidos de ratón amplificando un fragmento de 352 bp comprendido entre los exones 1 y 4 de *Rad21l*. B, Northern Blot de tejidos de ratón empleando como sonda el cDNA completo de *Rad21l*. Se muestra el RNA ribosomal 28S como control de carga.

3.3. Localización subcelular

Seguidamente abordamos la localización subcelular de RAD21L, para lo cual transfectamos el vector de expresión Myc-Rad21l en células HeLa. Las IFs realizadas tanto con un anticuerpo frente a Myc como con anticuerpos policlonales que generamos frente a RAD21L (cuya especificidad fue validada por IFs y Western Blot; ver Material y Métodos), indican una localización nuclear de esta proteína (Figura 28a).

Posteriormente, para determinar si la nueva proteína RAD21L se halla asociada a la cromatina o en la fracción soluble del núcleo, aislamos la cromatina de células 293T-HEK transfectadas con Flag-RAD21L. Mediante Western-Blot comprobamos que RAD21L sólo es detectado en la fracción cromatínica y no en la fracción soluble donde se encuentra Lamina A/C, una proteína nuclear no asociada a la cromatina que empleamos como control interno del experimento (Figura 28b). En conclusión, RAD21L es una proteína nuclear asociada a la cromatina.

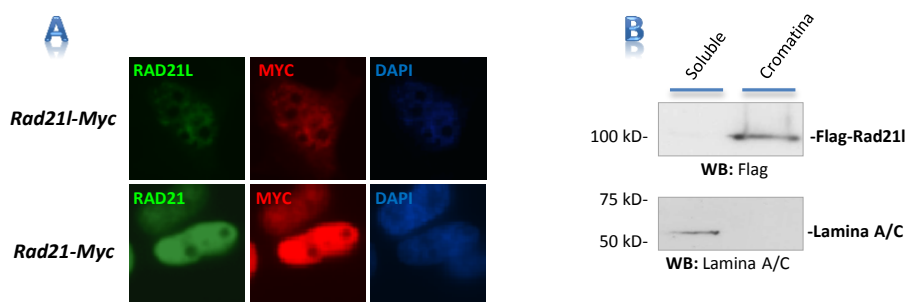


Figura 28. RAD21L es una proteína nuclear asociada a la cromatina. **A**, IF con los anticuerpos indicados de células HeLa transfectadas con Rad21l-Myc o Rad21-Myc. El DNA está teñido con DAPI. **B**, Western Blot con α -FLAG y α -LAMINA A/C de la fracción soluble y cromatínica de células 293T-HEK transfectadas con Flag-Rad21L.

Puesto que RAD21 se localiza en los centrómeros de los cromosomas metafásicos (Lee et al., 2008) decidimos determinar la localización de RAD21L en mitosis. Para ello, utilizamos dos líneas estables de células HeLa Tet-Off en las que es posible regular la expresión de Myc-Rad21L o Myc-Rad21 con doxiciclina dada la toxicidad celular que provoca la sobreexpresión de estas proteínas. Mediante IF frente a Myc, determinamos que a diferencia de RAD21, RAD21L no es detectado en ningún centrómero de los cromosomas en mitosis (Figura 29). Del experimento se deduce, por tanto, que la nueva proteína RAD21L no es capaz de localizarse en los cromosomas durante la mitosis en células HeLa.

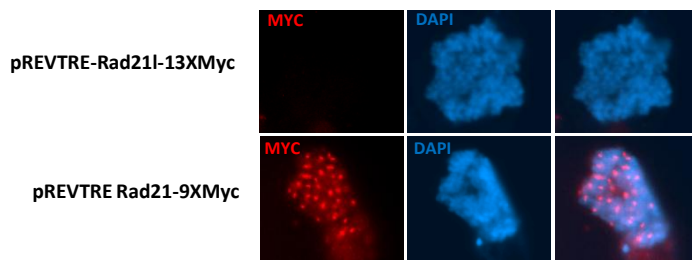


Figura 29. RAD21L no es reclutado a los centrómeros de los cromosomas en células somáticas. IF con α -MYC de células HeLa Tet-Off con expresión inducible de pREVTRE Rad21I-Myc o pREVTRE Rad21-Myc en metafase. El DNA se tiñó con DAPI.

3.4. Caracterización bioquímica de RAD21L

Teniendo en cuenta el alto grado de identidad de RAD21L con las kleisin RAD21 y REC8, su localización nuclear y su asociación a la cromatina, el siguiente objetivo fue estudiar si RAD21L forma parte del complejo de cohesinas. Para abordar su caracterización bioquímica, y debido a la ausencia de líneas celulares germinales que permitan el estudio *in vivo* de las interacciones proteicas de RAD21L, se utilizó el sistema heterólogo de sobreexpresión en células 293T-HEK. En todos los análisis se empleó RAD21 como control positivo de las interacciones.

El primer paso en la caracterización bioquímica de RAD21L fue identificar sus interactores mediante análisis por espectrometría de masas de las proteínas que inmunoprecipitan conjuntamente con esta proteína. Para ello, se transfectaron células 293T-HEK con el vector 2xFlag-Rad21I o el control 2xFlag-Rad21 y una vez obtenido el extracto proteico total se inmunoprecipitó RAD21L o RAD21 con el anticuerpo α -Flag. La tinción con plata del gel de poliacrilamida donde se resolvieron los inmunoprecipitados, permitió la detección de dos bandas muy prominentes de aproximadamente 150 kDa que precipitaban tanto con RAD21L como con RAD21. Dichas bandas fueron identificadas mediante espectrometría de masas como SMC1 α y SMC3 (Figura 30a). Asimismo, procesamos los inmunoprecipitados por Western Blot empleando anticuerpos que reconocen específicamente las proteínas endógenas SMC1 α y SMC3 (Figura 30b), detectándose ambas en los inmunocomplejos de RAD21L y RAD21. Igualmente, al realizar el experimento inverso, es decir, inmunoprecipitando las proteínas SMC1 α y SMC3 endógenas y analizando la presencia de RAD21L y RAD21 por Western Blot, se detectan ambas proteínas (Figura 30c).

Para determinar si RAD21L es capaz de interactuar también con la isoforma específica de meiosis SMC1 β se transfectaron conjuntamente los vectores de expresión Flag-Smc1 β y Rad21I (o Myc-Rad21 como control positivo). Tanto en los inmunoprecipitados de RAD21 como de RAD21L, se detecta una banda correspondiente a la subunidad SMC1 β . Asimismo, cuando efectuamos el experimento recíproco inmunoprecipitando SMC1 β , se detecta RAD21L en los inmunocomplejos (Figura 31a).

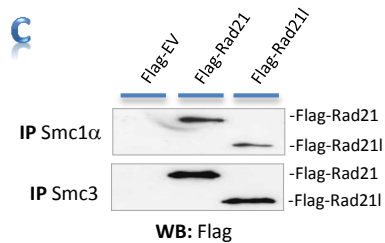
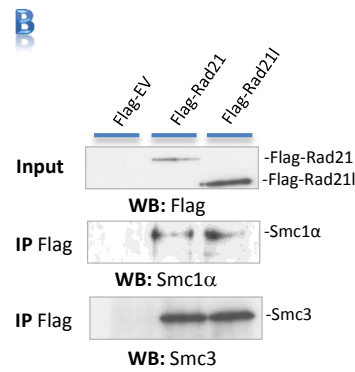
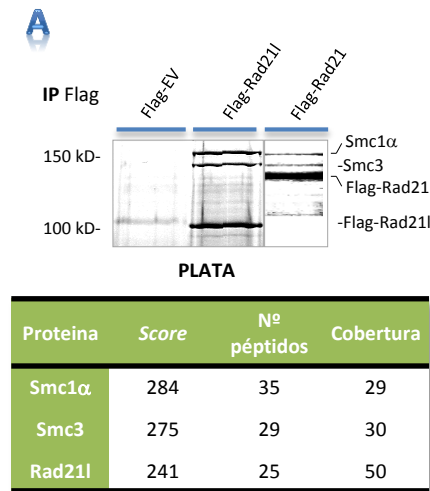


Figura 30. RAD21L interacta con SMC1α y SMC3. **A**, Tinción de plata y espectrometría de masas de las proteínas inmunoprecipitadas con α-FLAG en extractos de células 293T-HEK transfectadas con Flag-Rad21L o Flag-Rad21. **B**, Inmunoprecipitados de **A** procesados mediante Western Blot con los anticuerpos indicados. **C**, Inmunoprecipitación de las subunidades SMC1α y SMC3 endógenas de células 293T-HEK transfectadas con los vectores de expresión Flag-Rad21L o Flag-Rad21 y detección por Western Blot con α-FLAG. IP, inmunoprecipitación; WB, Western Blot; EV, empty vector.

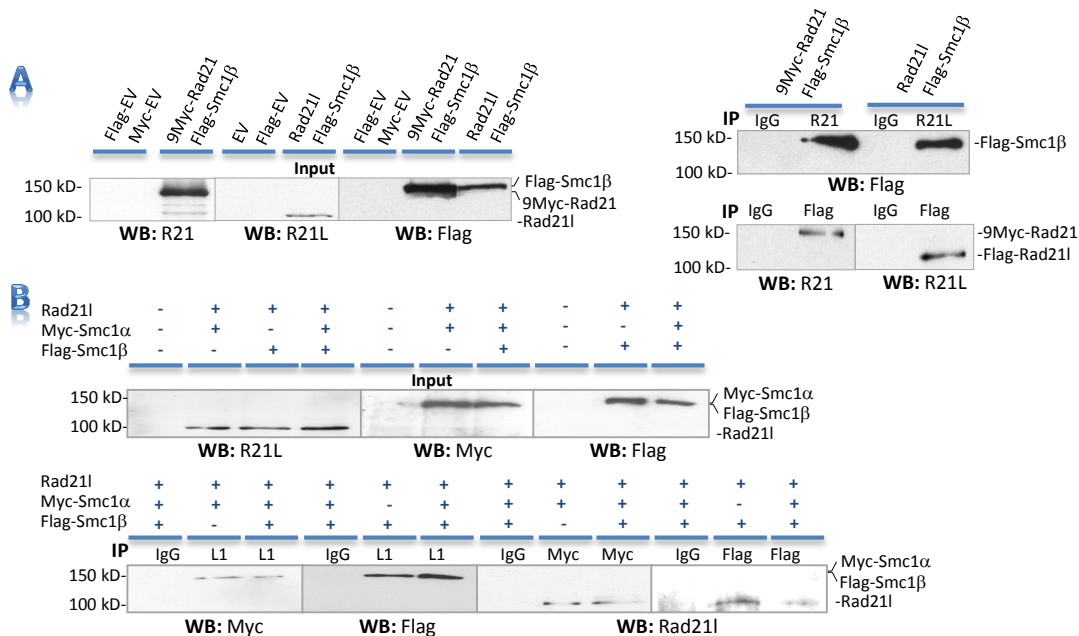


Figura 31: RAD21L interacta con la subunidad SMC1β. **A**, Inmunoprecipitación y Western Blot con los anticuerpos indicados de lisados de 293T-HEK cotransfectadas con Flag-Smc1β y Rad21L o 9Myc-Rad21. **B**, Inmunoprecipitaciones y Western Blot con los anticuerpos señalados de extractos de células cotransfectadas con Rad21L y Myc-Smc1α y/o Flag-Smc1β. R21L: α-RAD21L; R21: α-RAD21; IP: inmunoprecipitación; WB: Western Blot; EV: empty vector.

Si bien RAD21L interacciona tanto con SMC1 α como con SMC1 β , nos preguntamos si la presencia conjunta de ambas SMCs afectaría a la interacción de RAD21L con cada una de ellas. Con el objetivo de responder a este planteamiento, co-transfectamos Rad21l junto con Myc-Smc1 α , Flag-Smc1 β o Myc-Smc1 α y Flag-Smc1 β simultáneamente. La cantidad de RAD21L que detectamos al inmunoprecipitar SMC1 α es independiente de si SMC1 α es transfectado solo o junto con SMC1 β . El mismo resultado se obtuvo al estudiar la interacción con SMC1 β . Cuando realizamos la inmunoprecipitación recíproca, la cantidad detectada de ambas SMCs no es modificada por la transfección conjunta de ambos parálogos (Figura 31b).

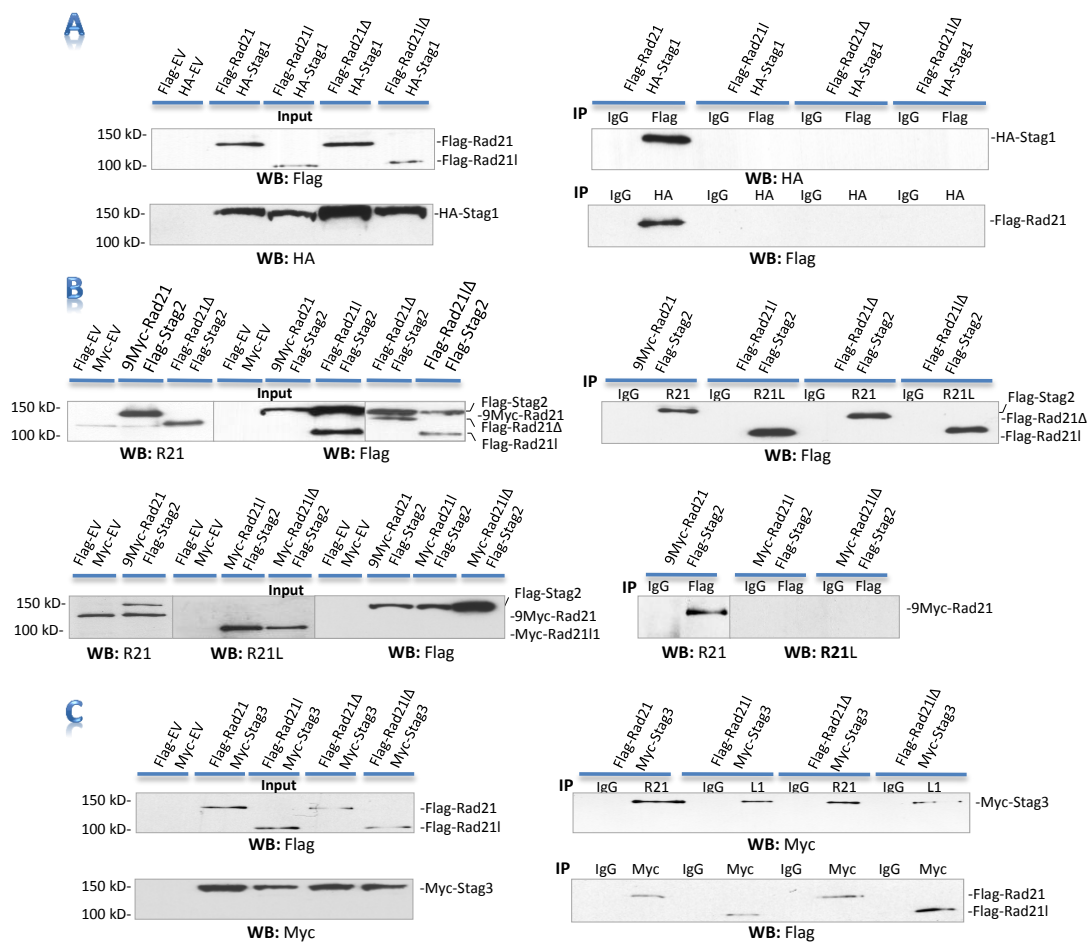


Figura 32. RAD21L no interacciona con STAG1 y STAG2 pero sí con STAG3. Las células 293T-HEK son co-transfectadas con los vectores de expresión señalados y los extractos proteicos son sometidos a inmunoprecipitación con el anticuerpo indicado. Los inmunoprecipitados se resuelven por WB. La inmunoprecipitación de Flag- $\Delta_{372,392}$ RAD21 se utiliza como control negativo de la interacción con STAG1 y STAG2. Flag-RAD21L no inmunoprecipita con HA-STAG1 (A), y Flag-STAG2 (B), pero inmunoprecipita con STAG3 (C). EV: Empty vector, IP: Inmunoprecipitación; WB: Western Blot. R21: α -RAD21; R21L: α -RAD21L. IgG: control negativo con IgG de ratón o conejo; Rad21 Δ : $\Delta_{372,392}$ RAD21. Rad21 Δ : $\Delta_{345,365}$ RAD21L

RAD21, además de interactuar con SMC1 y SMC3, también lo hace con la subunidad STAG, que en mamíferos presenta tres parálogos STAG1, STAG2 y STAG3. Dado que la región de interacción de RAD21 con STAG1 se localiza entre los residuos 372 y 392 (Shintomi & Hirano, 2009), deletamos dicha región mediante mutagénesis dirigida ($\Delta_{372,392}$ RAD21) para disponer de un adecuado control negativo. Asimismo, generamos un mutante de RAD21L que careciera de la secuencia homóloga a dicha región ($\Delta_{345,365}$ RAD21L). Para determinar con que subunidad STAG interactúa RAD21L, obtuvimos extractos proteicos de células cotransfectadas con Rad21, Rad21L, $\Delta_{372,392}$ Rad21 o $\Delta_{345,365}$ Rad21L, junto con Stag1, Stag2 o Stag3. Los inmunocomplejos de RAD21L no contienen STAG1 ni STAG2 pero si STAG3 a diferencia de los inmunocomplejos de RAD21 que contienen las tres subunidades. Los inmunoprecipitados de los mutantes $\Delta_{372,392}$ RAD21 o $\Delta_{345,365}$ RAD21L tampoco contienen STAG1/2 pero si STAG3. En las inmunoprecipitaciones recíprocas, al inmunoprecipitar STAG1 o STAG2 se detecta RAD21 pero no RAD21L ni los mutantes $\Delta_{372,392}$ RAD21 o $\Delta_{345,365}$ RAD21L (Figura 32a-b). Sin embargo, en los inmunocomplejos de STAG3 detectamos tanto RAD21 como RAD21L y sus respectivos mutantes por Western Blot (Figura 32c).

Finalmente analizamos la interacción de RAD21L con una de las subunidades reguladoras del complejo de cohesinas, denominada WAPAL. Para ello se cotransfectaron nuevamente células 293T-HEK con WAPAL y RAD21 o RAD21L y se llevaron a cabo inmunoprecipitaciones. El análisis por Western Blot de los inmunoprecipitados reveló que en los inmunocomplejos de RAD21L no se detecta WAPAL, a diferencia de lo que ocurre en el caso de RAD21. Igualmente en los inmunoprecipitados de WAPAL se detecta RAD21 pero no RAD21L (Figura 33).

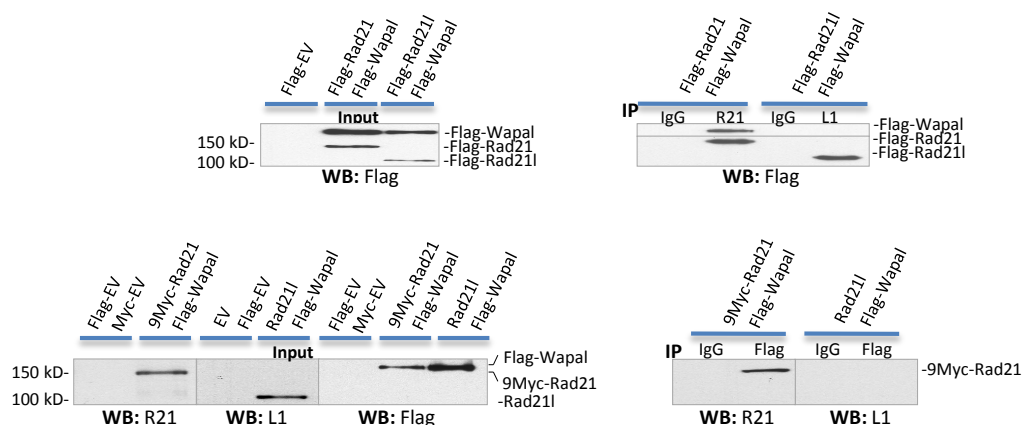


Figura 33. RAD21L no interactúa con WAPAL en 293T-HEK. Los vectores de expresión indicados se transfectan en células 293T-HEK. A partir de los lisados celulares se inmunoprecipitan las proteínas con los anticuerpos correspondientes. Los inmunoprecipitados se analizaron por WB con los anticuerpos indicados. EV: *Empty vector*; IP: Inmunoprecipitación; WB: Western Blot. R21: α -RAD21; R21L: α -RAD21L1. IgG: control negativo con IgG de ratón o conejo.

Como acabamos de mostrar, en células 293T-HEK transfectadas con *Rad21l* y las diferentes subunidades del complejo de cohesinas, la nueva proteína RAD21L es capaz de interactuar con SMC1, SMC3 y con la subunidad específica de meiosis STAG3. Con la finalidad de validar *in vivo* estas interacciones, llevamos a cabo inmunoprecipitaciones de RAD21L y de subunidades de cohesinas endógenas en testículos de ratón. En primer lugar inmunoprecipitamos RAD21L con un anticuerpo específico frente a esta proteína y analizamos por Western Blot las cohesinas presentes en los inmunocomplejos. Al igual que en los experimentos realizados en las células 293T-HEK, las subunidades SMC1 β , SMC3 y STAG3 son detectados por Western Blot en inmunocomplejos de RAD21L. Por el contrario, STAG1 nunca es detectado en los mismos inmunoprecipitados (Figura 34a). Al realizar las inmunoprecipitaciones recíprocas, RAD21L es detectado en los inmunocomplejos obtenidos tanto con α -SMC1 α como con α -SMC3 (Figura 34b). Por tanto, en testículo, RAD21L se encuentra formando un complejo de cohesinas con las subunidades SMC1 α o SMC1 β , SMC3 y STAG3 (Figura 34c).

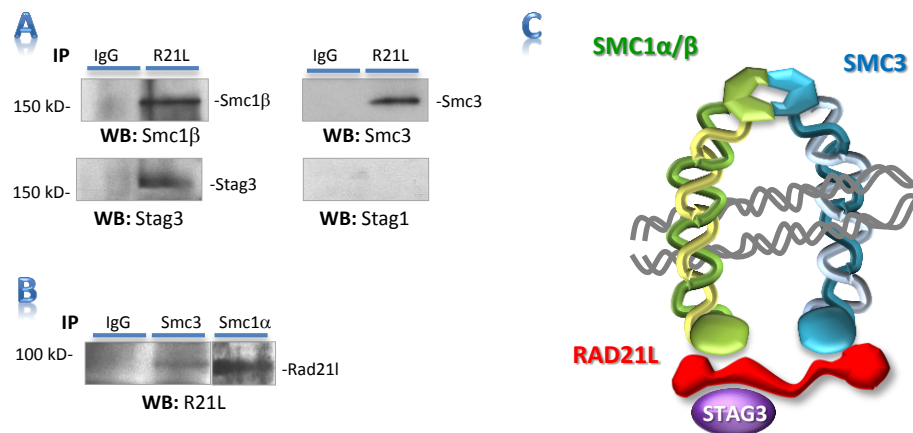


Figura 34. RAD21L interacta con la mayoría de las subunidades de los complejos de cohesinas endógenos en testículos pero no con STAG1 y STAG2. Inmunoprecipitaciones de distintas cohesinas endógenas en extractos proteicos totales de testículos. **A**, IP con α -SMC3 o α -SMC1 α y detección por Western Blot de RAD21L. **B**, IP de RAD21L endógena y análisis por Western Blot de los inmunoprecipitados con los anticuerpos señalados. IP: Inmunoprecipitación. WB: Western Blot. R21L, α -RAD21L; IgG: control negativo con IgG de conejo. **C**, Modelo propuesto del complejo de cohesinas que formaría RAD21L en testículos siguiendo la configuración más aceptada de anillo, en el cual RAD21L interacta con SMC1 α /SMC1 β , SMC3 y STAG3. Las hélices grises representan las cromátidas hermanas.

3.5. Localización de RAD21L en células meióticas

La elevada expresión de *Rad21l* en los testículos y su interacción específica con la subunidad meiótica STAG3, nos condujo a examinar su distribución subcelular en los meiocitos. Con esta finalidad, realizamos IFs en esparcidos de testículos y en oocitos, utilizando los anticuerpos generados frente a RAD21L y un marcador del elemento lateral del complejo sinaptonémico SYCP3, que permite distinguir las diferentes fases meióticas (Lammers et al.,

1994). Las IFs muestran que RAD21L colocaliza con los elementos laterales del complejo sinaptonémico tanto en espermatocitos como en oocitos (Figura 35), de forma similar a las kleisinas REC8 y RAD21 (Eijpe et al., 2000; Prieto et al., 2001).

Considerando los resultados en conjunto, la nueva proteína identificada RAD21L es la α -kleisina de un nuevo complejo de cohesinas meiótico formado por SMC1 α/β , SMC3 y STAG3, que forma parte de los elementos laterales del complejo sinaptonémico.

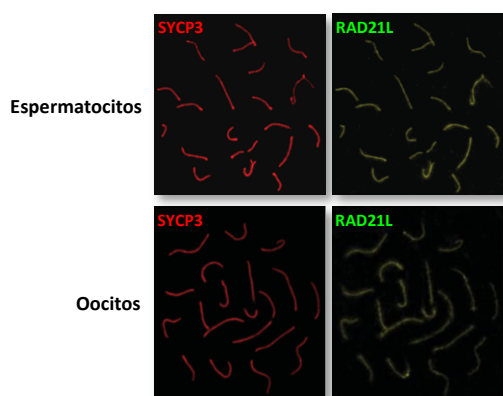


Figura 35. RAD21L colocaliza con los AE/LEs en meiocitos. IF sobre esparcidos de espermatocitos y oocitos en paquitena con α -SYCP3 y α -RAD21L.

3.6. Procesamiento proteolítico de RAD21L por Separasa

Para que tenga lugar la segregación de las cromátidas hermanas en anafase durante la mitosis así como la resolución del quiasma y la segregación de bivalentes y cromátidas durante la meiosis, RAD21 o REC8 deben ser digeridos por la cisteín-proteasa Separasa, respectivamente. Ello ocasiona la apertura y liberación del complejo de cohesinas (Hauf et al., 2001; Kudo et al., 2006 y 2009). Puesto que, según los resultados anteriormente descritos, RAD21L es una kleisina del complejo de cohesinas, nuestro interés se centró en determinar si RAD21L también es susceptible de ser cortada por Separasa.

Para ello, empleamos un sistema de transcripción-traducción *in vitro* (TNT) con metionina marcada radiactivamente con ^{35}S para sintetizar RAD21 o RAD21L. A continuación, incubamos la proteína así obtenida con una forma activa de Separasa, la cual no puede ser fosforilada en los residuos serina 1126 o treonina 1346 (Stemmann et al., 2001). Como control negativo se utilizó un mutante inactivo de la proteasa en el cual el residuo catalítico cisteína¹¹²⁹ es reemplazado por una serina (Stemmann et al., 2001) y como control positivo del sustrato se empleó RAD21. Los resultados obtenidos en la digestión de RAD21 muestran tres fragmentos resultantes del corte por Separasa en los residuos $^{167}\text{EIMR}$ y $^{451}\text{EPSR}$ (Stemman et al., 2001; Hauf et al., 2001), mientras que en la digestión de RAD21L aparece una única banda muy tenue de unos 70 kDa (Figura 36a). Puesto que la fosforilación de REC8 por PLK1 incrementa su susceptibilidad a ser cortada por Separasa, decidimos incubar RAD21L con PLK1 (Kudo et al., 2009). Al analizar el

producto de su digestión se observan dos bandas intensas y definidas, una de ellas de 70 kDa, que se corresponde con el fragmento observado anteriormente y otra de 30 kDa (Figura 36b). Este resultado indica que, al menos *in vitro*, la fosforilación de RAD21L por PLK1 incrementa la efectividad de su proteólisis por Separasa. Para corroborar que los fragmentos obtenidos son resultado de un procesamiento específico por Separasa, decidimos mutar los posibles sitios de corte. Las secuencias diana de corte por Separasa en RAD21 y REC8 han sido definidas previamente como una secuencia de 4 aminoácidos: E-X-X-R y la mutación de esta arginina dificulta su digestión (Hauf et al., 2001; Buonomo et al., 2000). Identificamos dos posibles dianas de corte en RAD21L, localizadas en posiciones equivalentes a las de RAD21 (Figura 26), y la modificamos mediante mutagénesis dirigida sobre el vector de expresión reemplazando la arginina por alanina. La proteína RAD21L doble mutante fue sometida al ensayo de digestión por Separasa, no detectándose los fragmentos que se visualizan tras la digestión de la proteína silvestre ni ningún fragmento adicional a los que se observan en el control negativo (Figura 36b). Por tanto, RAD21L además de ser una subunidad canónica de los complejos de cohesinas, es susceptible de ser digerida *in vitro* por Separasa al igual que las kleisin RAD21 y REC8.

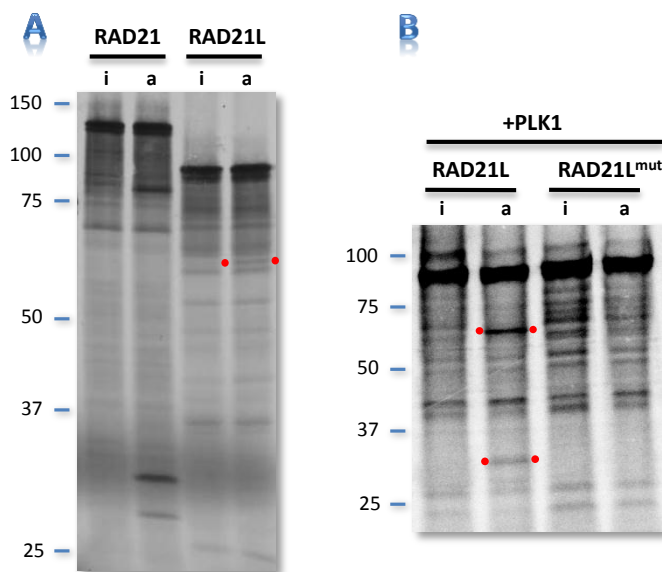


Figura 36. RAD21L es digerida *in vitro* por Separasa. Auto-radiografía del producto de la digestión con Separasa activa (a) o inactiva (i) de RAD21 marcada con ³⁵S mediante TNT. **A**, Digestión de RAD21 y RAD21L en ausencia de PLK1. **B**, Digestión de RAD21L silvestre y RAD21L mutante (RAD21L^{mut}; R166A+R383A) en presencia de PLK1. Los puntos rojos señalan las bandas resultantes de la digestión.

3.7. Análisis filogenético de las kleisin

Finalmente, profundizamos en las relaciones filogenéticas existentes entre la proteína RAD21L y sus parálogos RAD21 y REC8 para determinar el momento de su aparición en la evolución. Para ello realizamos una comparación *in silico* de las secuencias genómicas de las tres kleisin dentro del superfilo de deuteróstomos, incluyendo desde la clase de los equinoideos (erizos de mar) pertenecientes al filo de los equinodermos, hasta humanos, pasando por el subfilo de los tunicados y vertebrados. Así, elaboramos un árbol filogenético que muestra

las relaciones evolutivas existentes entre las secuencias estudiadas (Figura 37). Las secuencias correspondientes a cada kleisina se agrupan en tres ramas claramente definidas y el análisis evolutivo sugiere que RAD21L es probablemente un parálogo de RAD21. *Rad21l* se encuentra presente sólo en vertebrados, si bien dentro de este subfilo no existe ninguna secuencia genómica de *Rad21l* en los anfibios secuenciados hasta el momento. Por tanto, el análisis evolutivo de las kleisinas sugiere que *Rad21l* apareció inmediatamente antes de vertebrados y posteriormente se perdió en el grupo de los anfibios. Es interesante destacar que *Rec8* está ausente en el linaje de las aves, lo cual indica que quizás RAD21L pueda reemplazar la función meiótica de REC8 en estos individuos.

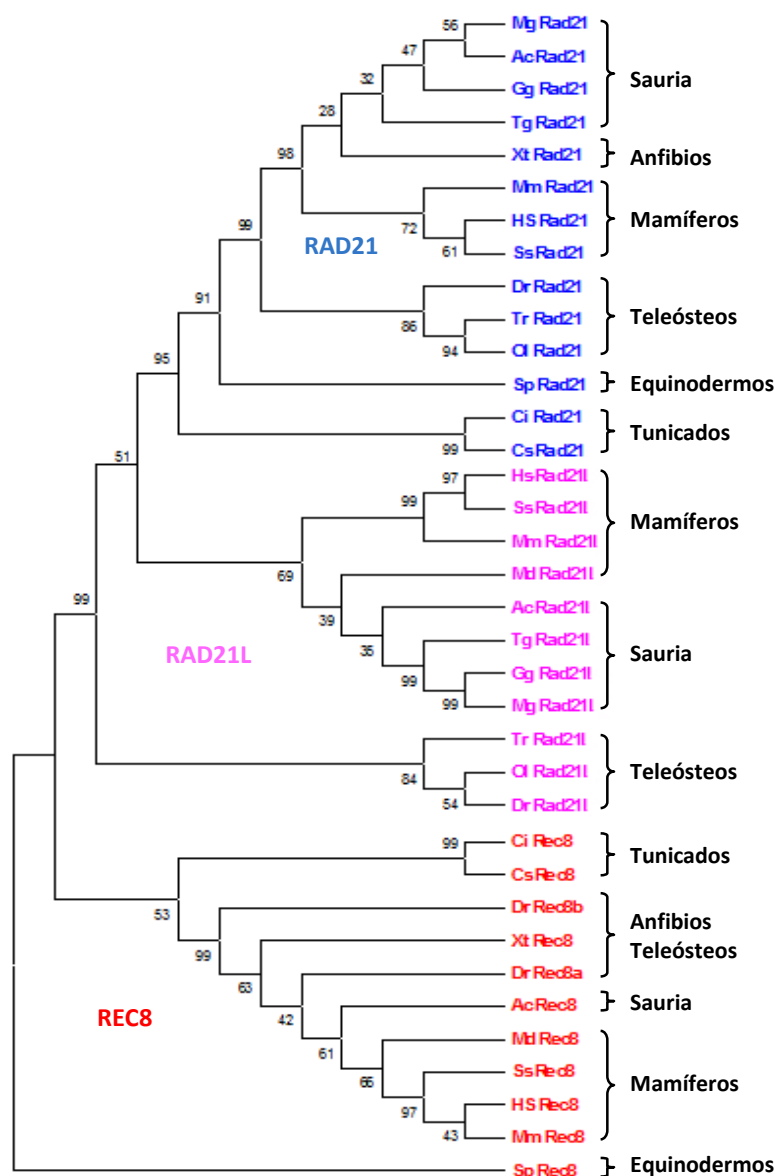


Figura 37. Árbol filogenético de los ortólogos de RAD21L, RAD21 y REC8 en deuterostomos. El número de acceso de cada proteína está recogido en la Tabla VII (Material y Métodos). Los números sobre las ramas representan el valor de límite de confianza mediante *bootstrap*.

4. Implicación de Separasa en la iniciación y la progresión tumoral

4.1. Generación de un ratón knock-out para *Separasa*

Como hemos explicado anteriormente, *Separasa* cataliza la digestión de las kleisinas RAD21 y REC8 permitiendo la liberación de las cohesinas centroméricas durante la mitosis y de los complejos centroméricos y de los brazos de los cromosomas durante la división reduccional (Hauf et al., 2001; Kudo et al., 2009). Además, los resultados obtenidos en la digestión de RAD21L sugieren que esta nueva kleisina también es susceptible de ser digerida por esta proteasa (apartado 3.6).

Dado este papel fundamental en la segregación cromosómica, nos interesamos en profundizar en la función de *Separasa* a través de su depleción regulable en un modelo animal. Con esta finalidad diseñamos un alelo con expresión inducible por tetraciclina para el gen *Separasa*, que permitiera la regulación de su expresión mediante la administración *ad libitum* de doxiciclina en el agua de bebida (ver Material y Métodos; Figura 38). En primer lugar generamos el vector de reemplazamiento mediante subclonación en el plásmido TriTAUBi-Bd (Hayakawa et al., 2006) de dos brazos de homología: brazo 5' (4,2 kb), que contiene el sitio de inicio de la transcripción y brazo 3' (7,3 kb), que contiene el sitio de inicio de la traducción localizado en el exón 2 (Figura 38). A continuación el vector de reemplazamiento se electroporó en células ES y mediante Southern Blot se eligieron los clones en los que había tenido lugar la recombinación homóloga entre el vector de reemplazamiento y el alelo silvestre. Tras confirmar que el clon de células madre seleccionado presentaba un cariotipo estable, se agregó en mórulas procedentes de hembras CD1 pseudo-preñadas obteniéndose varios animales quiméricos. Del cruzamiento de estos individuos con hembras CD1, se obtuvieron ratones heterocigotos para la mutación que fueron cruzados con ratones Sox2-CRE para delectar el casete de Neomicina flanqueado por dos LoxP, y así evitar posibles interferencias en la transcripción (Figura 39a). Los animales heterocigotos resultantes se cruzaron entre sí para generar individuos con el alelo mutante en homocigosis. Sin embargo, nunca se obtuvieron individuos homocigotos para la mutación (Figura 39b), a pesar de que el alelo había sido diseñado para expresar *Separasa* según el patrón de expresión espacial y temporal del promotor endógeno en ausencia de doxiciclina (Figura 38). Esta ausencia de individuos homocigotos sugiere que el alelo generado es un alelo nulo. Por ello, y para evaluar la transcripción del alelo mutante, analizamos la transcripción de *Separasa* en MEFs *Separasa*^{+/-}. Los resultados obtenidos por Northern Blot muestran que en los individuos heterocigotos los niveles de transcripción son inferiores a los de los individuos silvestres, de lo que se deduce que el alelo mutante se comporta como un alelo nulo aún en ausencia de doxiciclina (Figura 39c). Por tanto, y teniendo en cuenta que la depleción de *Separasa* provoca letalidad embrionaria (Kumada et al., 2006; Wirth et al., 2006), no es posible obtener individuos homocigotos para el alelo generado.

A pesar de que los individuos heterocigotos presentan una disminución de la expresión de *Separasa*, sus frecuencias en la descendencia corresponde con las frecuencias mendelianas esperadas (Figura 39d).

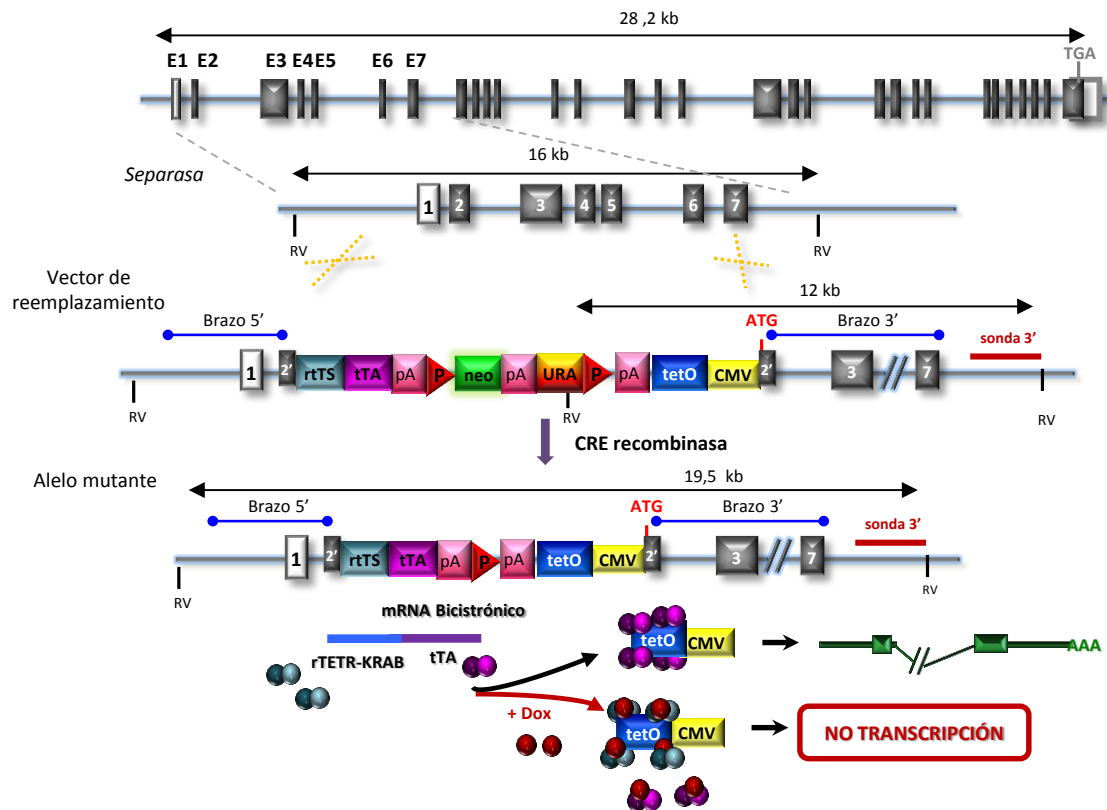


Figura 38. Estrategia de *gene targeting* en el locus de *Separasa* para introducir un casete regulador. Esquema del locus de *Separasa* y detalle de la región reemplazada y la construcción generada. Los rectángulos oscuros y blancos representan exones codificantes y no codificantes, respectivamente. Se detallan los brazos de homología, la sonda utilizada para Southern Blot (línea roja), las dianas *EcoRV* (RV) y los sitios de inicio y fin de la traducción (ATG y TGA, respectivamente). rtTS: proteína de fusión formada por rTetR (represor de tetraciclina) y KRAB (*Krüppel-associated box*); tTA: transactivador de tetraciclina; Neo: gen de resistencia a Neomicina; URA: gen de levaduras URA2; Triángulo rojo P: sitios *loxP*; tetO: operón de tetraciclina; CMV: 5 copias del promotor mínimo del citomegalovirus; Dox: doxiciclina.

4.2. Evaluación del fenotipo celular de MEFs heterocigotos para *Separasa*.

Para determinar el potencial efecto que conlleva la disminución de *Separasa* en el ciclo celular, analizamos diferentes parámetros proliferativos en MEFs silvestres y heterocigotos. En primer lugar se estudió la proliferación celular de los fibroblastos de pase temprano (pase 0) en cultivo durante una semana en condiciones normales de suero. Paralelamente, se evaluó su proliferación en condiciones restrictivas de suero (5%) y la proliferación de fibroblastos de pase tardío (pase 5). En ninguna de las condiciones estudiadas se observaron diferencias en las curvas de proliferación de los MEFs mutantes en comparación con los silvestres (Figura 40).

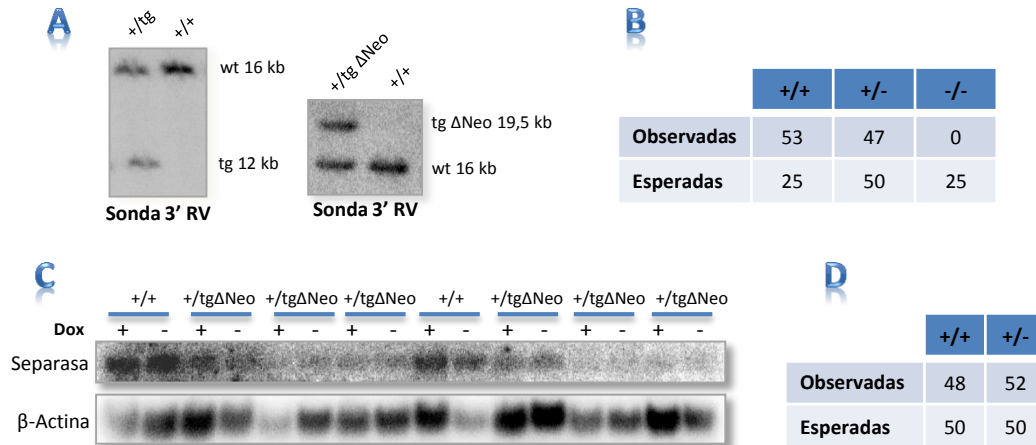


Figura 39. La mutación knock-in regulable generada en el locus de *Separasa* da lugar a un alelo nulo aún en presencia de doxiciclina. **A**, Southern Blot de DNA genómico de descendientes de un cruce entre heterocigotos para el alelo generado (panel izquierdo) y de un cruzamiento de un ratón heterocigoto con un individuo transgénico Sox2-CRE (panel derecho). El DNA está digerido con *EcoRV* (RV) e hibridado con la sonda 3'. **B**, Porcentajes genotípicos observados y esperados en la descendencia de un cruce entre ratones heterocigotos *Separasa*^{+/*tg ΔNeo*} (*Separasa*^{+/-}) en un total de 156 individuos distribuidos en 10 camadas. **C**, Northern Blot de RNA de MEFs silvestres (+/+) y heterocigotos para el alelo mutante de *Separasa* (+/*tg ΔNeo*) hibridado con el cDNA completo de *Separasa*. Los MEFs se cultivaron en presencia (+) y ausencia (-) de doxiciclina en el medio. La β-Actina se utilizó como control de carga. **D**, Frecuencias genotípicas obtenidas y esperadas en la descendencia de un cruzamiento de un ratón silvestre con un individuo *Separasa*^{+/*tg ΔNeo*} en un total de 121 individuos correspondientes a 15 camadas. wt: alelo silvestre; tg: alelo mutante; tg ΔNeo: alelo mutante tras la escisión del casete de Neomicina-Uracilo.

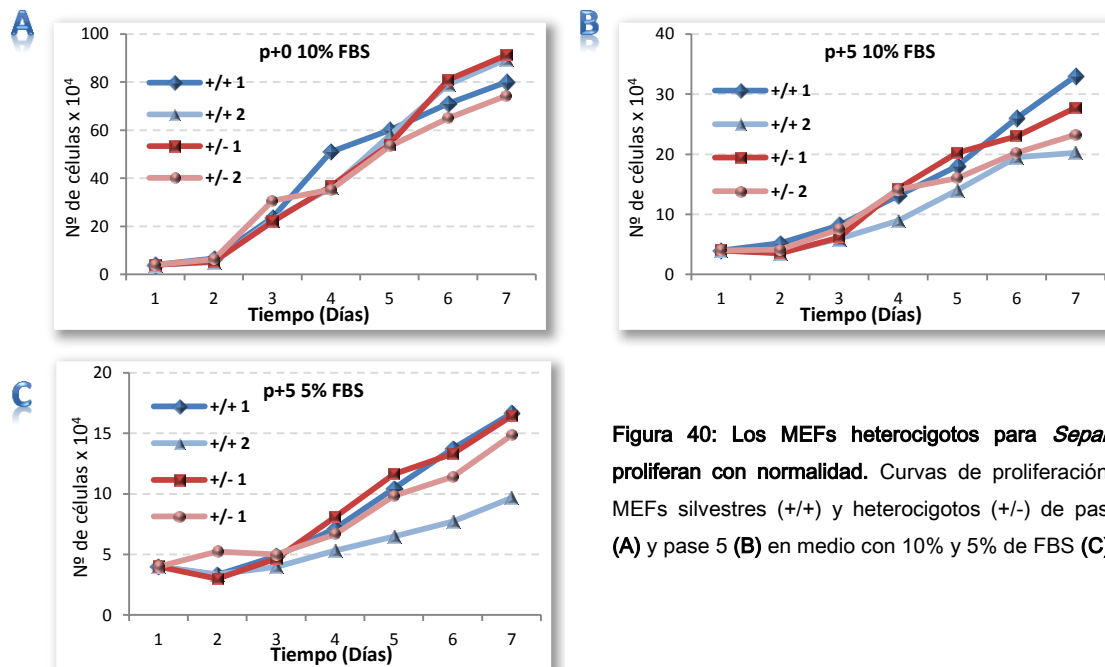


Figura 40: Los MEFs heterocigotos para *Separasa* proliferan con normalidad. Curvas de proliferación de MEFs silvestres (+/+) y heterocigotos (+/-) de pase 0 (A) y pase 5 (B) en medio con 10% y 5% de FBS (C).

A continuación, comparamos la re-entrada en fase S de células quiescentes, silvestres y mutantes, estimuladas con suero. El análisis del ciclo celular reveló que los fibroblastos *Separasa*^{-/-} muestran una cinética de re-entrada en ciclo celular comparable a las células *Separasa*^{+/+} (Figura 41), lo que sugiere que el descenso de *Separasa* no afecta a la entrada en ciclo celular de manera significativa.

Como ya hemos comentado previamente, la capacidad proliferativa de los MEFs disminuye de forma progresiva entrando finalmente en senescencia (Peacocke & Campisi, 1991; Sherr & DePinho, 2000). No obstante, aunque en baja frecuencia, los MEFs sometidos a proliferar durante varias generaciones pueden immortalizarse de forma espontánea (Todaro & Green, 1963), lo cual es una característica fundamental en los procesos de transformación y tumorigénesis. Para analizar cómo afecta el descenso de la proteasa a los procesos de senescencia e immortalización realizamos un ensayo 3T3 de MEFs mutantes y silvestres. Las curvas de duplicación obtenidas para dos cultivos de cada genotipo son similares (Figura 42a), por lo que concluimos que la disminución parcial en los niveles de *Separasa* no afecta a la entrada en senescencia o a la susceptibilidad a la immortalización.

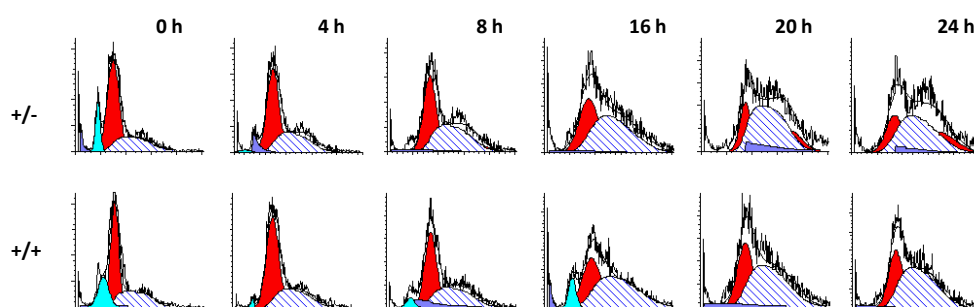


Figura 41. La disminución de *Separasa* no afecta a la re-entrada en el ciclo celular de células quiescentes. Análisis por FACs de la entrada en ciclo celular de MEFs silvestres y heterocigotos quiescentes estimulados con suero. Se muestra un ejemplo representativo de cada genotipo a 0, 4, 8, 16, 20 y 24 horas tras la adición de suero. El experimento se realizó con MEFs extraídos de dos embriones de cada genotipo.

Para estudiar si la entrada inducida en senescencia por oncogenes está afectada por la disminución de los niveles de expresión de *Separasa*, infectamos MEFs con retrovirus que portaban el cDNA de H-RasV12 (Serrano et al., 1997). Trascurridos 6 días desde la infección, las células silvestres y mutantes presentaban el mismo fenotipo senescente, que se caracteriza por una morfología extendida y plana, un núcleo agrandado y un aumento de la vacuolización (Figura 42b).

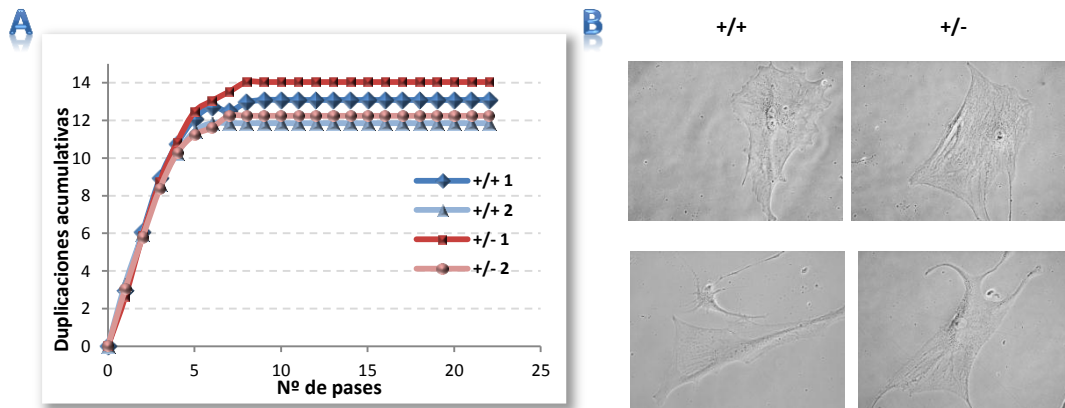


Figura 42. La entrada en senescencia espontánea e inducida por Ras oncogénico no está afectada por la disminución de Separasa. A, Duplicaciones acumulativas de la población en un cultivo seriado 3T3 de MEFs extraídos de dos embriones silvestres (+/+) y dos heterocigotos para *Separasa* (+/-). **B,** Imágenes representativas de la morfología senescente de MEFs silvestres y heterocigotos transducidos con Ras oncogénico.

Mientras que la expresión de Ras oncogénico en cultivos primarios induce senescencia, su expresión en células de ratón deficientes en p53 o Arf induce su transformación (Kamijo et al., 1997; Harvey et al., 1993). Para analizar el efecto de la disminución de Separasa en la capacidad de immortalización y de transformación oncogénica, realizamos un ensayo de formación de focos con MEFs transfectados con H-RasV12. Tras tres semanas de incubación, no observamos colonias en ninguno de los cultivos analizados, salvo en el cultivo de MEFs *p53*^{-/-} transfectados con H-RasV12 que utilizamos como control positivo de la formación de focos (datos no mostrados).

La co-expresión de Ras oncogénico conjuntamente con otros oncogenes como c-Myc o la proteína adenoviral E1A es capaz de inducir transformación neoplásica (Latres et al., 2000; Lowe et al., 1994). Empleamos dos proteínas oncogénicas, E1A y H-RasV12, para inducir transformación en fibroblastos silvestres y mutantes y determinar si existen diferencias en relación a su capacidad de transformación mediante un ensayo de formación de focos. Como se muestra en la figura, la capacidad formadora de focos de los MEFs *Separasa*^{+/-} es significativamente mayor que la de sus controles silvestres (Figura 43), de lo que se concluye que la disminución en los niveles de Separasa incrementa la susceptibilidad a la transformación neoplásica de los cultivos primarios transducidos con los dos oncogenes E1A y H-RasV12.

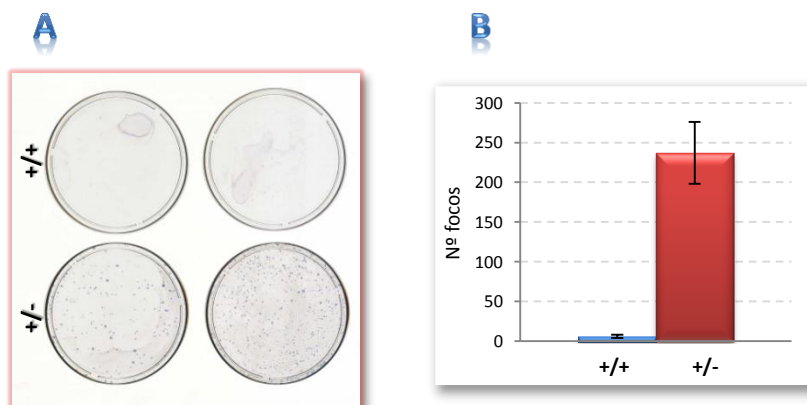


Figura 43. Los MEFs *Separasa*^{-/-} son más susceptibles que los MEFs *Separasa*^{+/-} a la transformación inducida por dos oncogenes cooperantes. **A**, Fotografía de los focos formados por MEFs silvestres y heterocigotos transducidos con E1A y H-RasV12 tras el experimento de formación de colonias. **B**, Media del número de focos formados por MEFs extraídos de dos embriones de cada genotipo. Las barras de error muestran el SEM.

4.3 Efecto de la disminución de los niveles de *Separasa* *in vivo* en la tumorigénesis

Teniendo en cuenta los defectos en la segregación cromosómica que ocasiona la depleción de *Separasa* (Waizenegger et al., 2002; Chestukhin et al., 2003; Kumada et al., 2006; Wirth et al., 2006), y la correlación entre el descenso de la proteasa y la capacidad de transformación oncogénica de los fibroblastos transformados con E1A/H-RasV12, nuestro interés se dirigió a determinar la susceptibilidad tumoral *in vivo* de los individuos heterocigotos para el alelo nulo de *Separasa*.

La esperanza de vida de los ratones *Separasa*^{+/-} es similar a la de los animales silvestres (Figura 44) y los datos preliminares sugieren que los ratones *Separasa*^{+/-} no presentan predisposición a la tumorigénesis espontánea. Por ello, el siguiente paso fue analizar la iniciación y progresión tumoral de los individuos *Separasa*^{+/-} mediante carcinogénesis inducida.

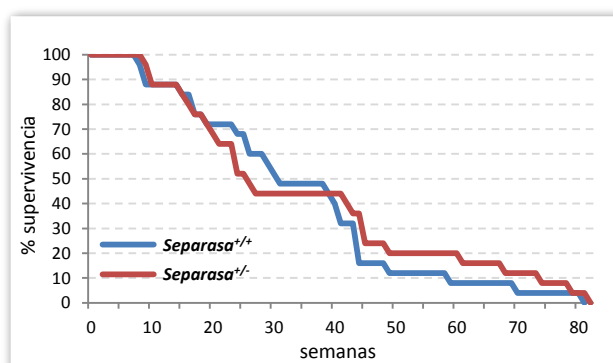


Figura 44. Los ratones *Separasa*^{+/-} presentan una longevidad similar a los individuos silvestres. Curva de supervivencia de 25 ratones silvestres vs 25 ratones heterocigotos para el alelo nulo de *Separasa*.

Dado que el carcinógeno DMBA induce mutaciones principalmente en H-Ras (Quintanilla et al., 1986; Nelson, 1992) y que la sobreexpresión de Ras oncogénico y E1A induce mayor transformación en MEFs *Separasa*^{+/-}, decidimos emplear DMBA como inductor tumoral. Así, elegimos un protocolo clásico de carcinogénesis química en piel “en dos etapas” basado en el empleo de DMBA como inductor y del mitógeno TPA como promotor tumoral. Este protocolo permite estudiar la iniciación, promoción y progresión de los tumores en la piel del ratón (Abel et al., 2009). En la fase de iniciación, la exposición de los queratinocitos de la piel al carcinógeno induce mutaciones. En la siguiente fase, denominada fase de promoción, el agente promotor estimula la señalización celular, aumenta la producción de factores de crecimiento y genera estrés oxidativo e inflamación del tejido (revisado en Rundhaug & Fischer, 2010). Durante esta última fase, la población de células con mutaciones se expande clonalmente, perpetuando las mutaciones (Abel et al., 2009).

Los primeros papilomas surgieron en la séptima semana tras el inicio del tratamiento, tanto en los individuos mutantes como en los silvestres. Sin embargo, los resultados tras varias semanas de seguimiento difirieron en el número de lesiones por individuo y en el tamaño de las mismas. En los individuos silvestres, la media de papilomas por ratón en la semana 12 de tratamiento era de 2,7 mientras que en los individuos mutantes alcanzó los 6 (2.2 veces superior). La semana 28 tras el inicio del tratamiento, los animales silvestres presentaban de media 1,7 papilomas por ratón y los mutantes 4,4 papilomas (2,6 veces superior; Figura 45).

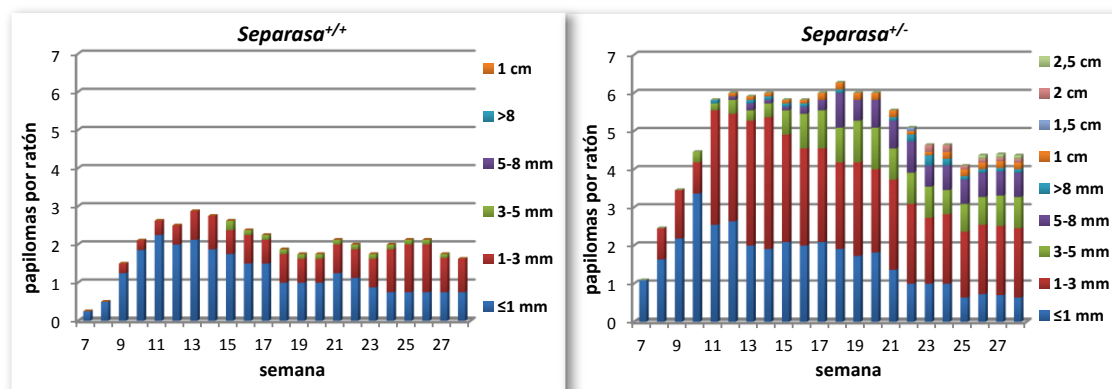


Figura 45. Separasa se comporta como un supresor tumoral frente a la progresión de tumores químicamente inducidos en piel. Media del número y tamaño de los papilomas inducidos con DMBA/TPA en los ratones silvestres y heterocigotos para Separasa. Tamaño de la muestra: 8 individuos silvestres vs 11 heterocigotos.

Asimismo, existe una gran diferencia en el tamaño de los tumores entre los ratones *Separasa^{+/+}* y los *Separasa^{+/-}* desde su aparición hasta que los ratones fueron sacrificados. La mayoría de los papilomas de individuos silvestres (95%) no sobrepasaron los 3 mm y ninguno superó los 5 mm. Sin embargo, aproximadamente el 25% de los papilomas de los individuos *Separasa^{+/-}* presentaban un tamaño mayor de 5 mm y el 2% alcanzaron 2,5 cm de diámetro (Figura 45). Por tanto, los ratones mutantes presentan una mayor susceptibilidad a la iniciación y la progresión de tumores químicamente inducidos en piel.

Los papilomas generados durante los protocolos de carcinogénesis en dos etapas pueden progresar a carcinomas de células escamosas (SCC), dependiendo del fondo genético de los individuos y de la dosis de los agentes carcinógenos y promotores empleados (revisado en Abel et al., 2009). Para definir el grado de malignidad de los papilomas, al finalizar el experimento se analizaron histológicamente los tumores. En el caso de los tumores de individuos silvestres, un elevado porcentaje (62.5%) se corresponden con ligeras hiperplasias de la epidermis o bien, con pequeñas hiperplasias del tejido glandular, que denominaremos papilomas glandulares. El porcentaje restante (37.5%) se denominaron papilomas benignos y en ningún caso se encontraron focos de carcinoma escamoso. Por el contrario, una alta proporción de los tumores que desarrollan los ratones *Separasa^{+/-}* se corresponden con papilomas benignos (77.5%) y tan solo un pequeño porcentaje (16.3%) con pequeñas hiperplasias glandulares o de la epidermis. Además, dos de los tumores (4%) se corresponden con lesiones malignas. Uno de ellos presenta un foco de inicio de SCC y el otro se corresponde con un SCC bien diferenciado (Figura 46).

En conclusión, la disminución de los niveles de Separasa conlleva, no sólo a una mayor proliferación de los papilomas inducidos por carcinogénesis química en piel, si no también a una mayor susceptibilidad a la transformación maligna de los mismos.

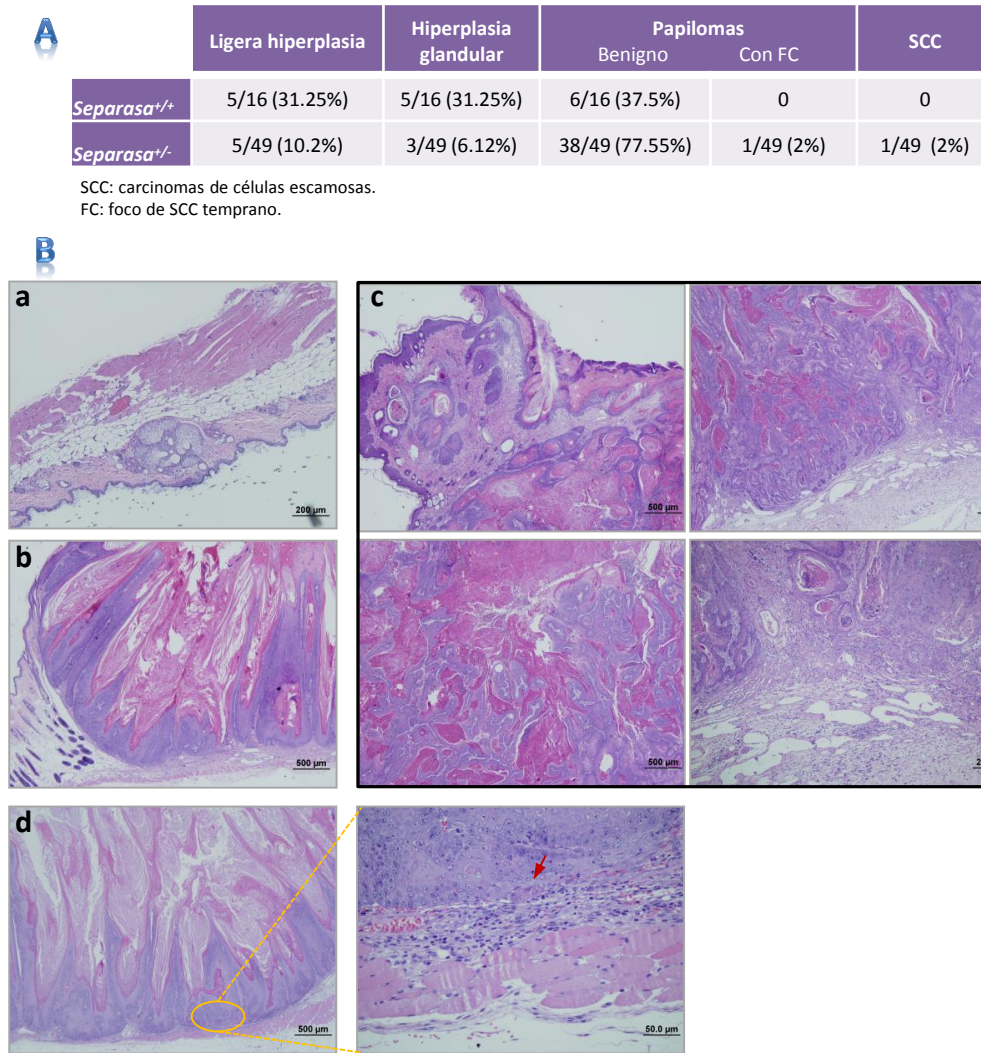


Figura 46. La disminución de *Separasa* promueve la malignización de los papilomas. A, Clasificación histológica de los papilomas de ratones silvestres y heterocigotos. **B,** Tinción hematoxilina-eosina representativa de cada tipo de papiloma incluido en la clasificación. **a,** hiperplasia glandular; **b,** papiloma benigno; **c,** Carcinoma de células escamosas. **d,** papiloma con un foco de carcinoma (FC) y ampliación del FC.

Uno de los marcadores utilizados para cuantificar la proliferación celular en los papilomas, es la incorporación de BrdU en el DNA de los queratinocitos. Para llevar a cabo esta cuantificación, a los individuos sometidos al protocolo de carcinogénesis se les inyectó bromodeoxiuridina (BrdU) previamente a su eutanasia y se realizaron inmunohistoquímicas de los papilomas con un anticuerpo α -BrdU marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Los papilomas analizados, tanto mutantes como silvestres, se caracterizaban por presentar un alto porcentaje de células positivas en cuanto a incorporación de BrdU. Comparando los resultados obtenidos en el conteo de núcleos positivos entre regiones similares de papilomas de ambos

genotipos no se observan diferencias significativas en sus índices de proliferación celular (Figura 47).

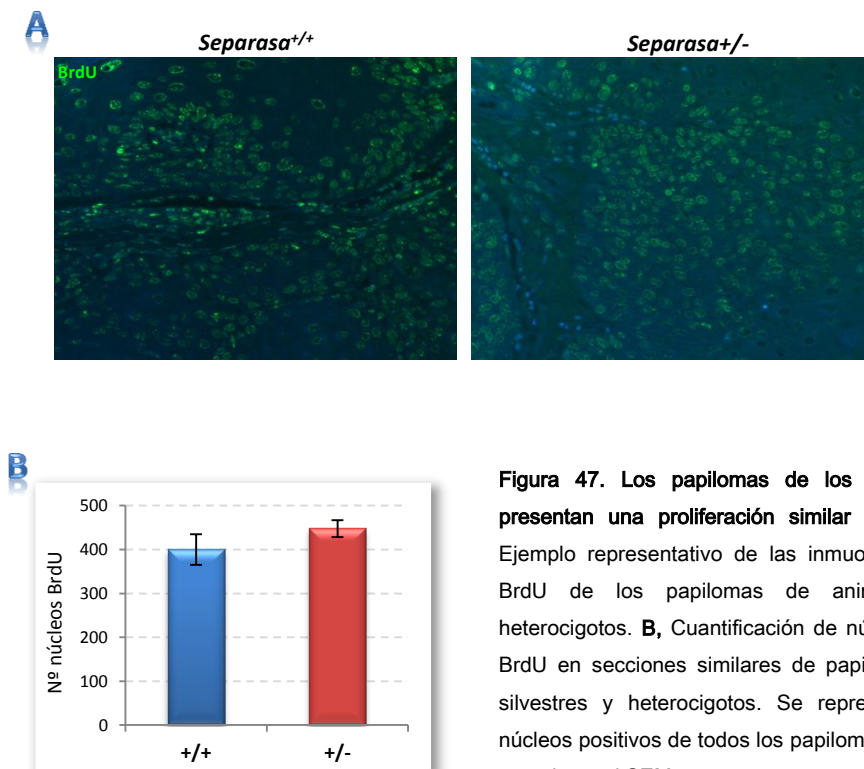


Figura 47. Los papilomas de los ratones *Separasa^{+/-}* presentan una proliferación similar a los silvestres. **A**, Ejemplo representativo de las inmunohistoquímica con α -BrdU de los papilomas de animales silvestres y heterocigotos. **B**, Cuantificación de núcleos positivos para BrdU en secciones similares de papilomas de individuos silvestres y heterocigotos. Se representa la media de núcleos positivos de todos los papilomas benignos de cada genotipo y el SEM.

Discusión

1. SGOL2 no es esencial para la mitosis de ratón

En vertebrados, la familia de las shugoshinas consta de dos parálogos, SGOL1 y SGOL2. En mamíferos, se ha demostrado que una de las funciones de SGOL1 es proteger a las cohesinas centroméricas de su liberación prematura durante la ruta profásica (Salic et al., 2004; McGuinness et al., 2005; Kitajima et al., 2005) mientras que la función de SGOL2 al comienzo de esta tesis estaba sometida a un intenso debate. A pesar de que la función de SGOL2 había sido abordada anteriormente mediante su silenciamiento con siRNA en células HeLa, las conclusiones obtenidas como protector de cohesinas eran opuestas, puesto que unos autores describían pérdida de cohesión como consecuencia del silenciamiento de *Sgol2*, mientras que otro estudio reportaba un aumento de *chromosome lagging* no asociado a defectos de cohesión (Kitajima et al., 2006; Huang et al., 2007). Por ello, para determinar *in vivo* la función de SGOL2 se generó un modelo murino deficiente para esta shugoshina.

El análisis del ratón deficiente en SGOL2 reveló la dispensabilidad de esta shugoshina en el desarrollo normal del ratón y en su homeostasis (Figuras 9; 11-15). La ausencia de defectos en la cohesión entre cromátidas hermanas y en la progresión de la mitosis tanto en MEFs como en timocitos deficientes en SGOL2 demuestra que esta shugoshina no es necesaria *in vivo* para asegurar la correcta segregación cromosómica en células somáticas (Figuras 11-13). Estos resultados apoyan la ausencia de defectos en cohesión en células HeLa deficientes en SGOL2 recogidos por Huang et al., y se contradicen con la pérdida prematura de cohesión descrita por el grupo del Dr. Watanabe (Kitajima et al., 2006; Huang et al., 2007; Tanno et al., 2010). Recientemente, un tercer trabajo (Orth et al., 2011) ha determinado que los dos siRNA empleados por Huang et al., y Tanno et al., provocan una disminución similar de SGOL2, pero que tan sólo este último induce un arresto en mitosis con pérdida de cohesión. Esto indica probablemente que el siRNA utilizado por Tanno et al., provoca un efecto inespecífico no deseado silenciando uno o varios genes desconocidos. Por tanto, y a pesar de los resultados contradictorios, la ausencia de defectos en cohesión en células HeLa descrita en estos estudios (Huang et al., 2007; Orth et al., 2011), y especialmente la ausencia de defectos mitóticos en MEFs y timocitos *Sgol2*^{-/-}, indican que SGOL2 no protege la cohesión centromérica durante la mitosis de mamíferos. En concordancia con estos resultados, se ha descrito recientemente que la depleción de XI-SGOL2 en extractos de huevos de *X. laevis* no ocasiona pérdida prematura de cohesión entre las cromátidas hermanas ni disminución de las cohesinas centroméricas de cromosomas metafásicos (Rivera et al., 2012). Por tanto, SGOL2 no participa en la protección de la cohesión centromérica en vertebrados.

La viabilidad y longevidad observada en los ratones deficientes en SGOL2 sugiere que esta proteína no es esencial para el mantenimiento de la homeostasis en células somáticas (Figuras 9c y 15). No obstante, podría argumentarse la existencia de mecanismos

compensatorios por parte de SGOL1, si bien para poder determinarlo sería necesario desarrollar un doble mutante *Sgol1/Sgol2* condicional, dada la letalidad embrionaria del mutante constitutivo de *Sgol1* (Lee et al., 2008). De cualquier forma, parece improbable que la ausencia de defectos somáticos en el ratón *Sgol2*^{-/-} sea debida a un efecto compensatorio de SGOL1 ya que, al menos en gametogénesis, estas proteínas no muestran redundancia funcional.

Además de la supuesta función protectora de la cohesión centromérica de SGOL2 en mitosis, su deficiencia provoca la deslocalización *in vivo* de MCAK de los centrómeros (Figura 10c) lo cual, en células HeLa, incrementa ligeramente la proporción de anafases con *chromosome lagging* debido a uniones anómalas entre microtúbulos y cinetocoros (Huang et al., 2007). Igualmente, la depleción de XI-SGOL2 en *X. laevis* provoca defectos en el reclutamiento de MCAK al centrómero y en el balance entre MCAK activo/inactivo sobre los brazos de los cromosomas lo que interfiere en el ensamblaje del huso y en el alineamiento de los cromosomas (Rivera et al., 2012). Sin embargo, en un trabajo reciente en células HeLa deplecionadas de SGOL2 mediante siRNA (Orth et al., 2011), no se detectaron estos defectos, lo cual es consistente con la segregación cromosómica normal observada en los MEFs y timocitos *Sgol2*^{-/-}. Las diferencias entre los resultados reportados en células HeLa y *X. laevis* en comparación con los obtenidos en MEFs deficientes en SGOL2, pueden ser debidas en parte a diferencias en los sistemas celulares empleados. Así, la línea celular HeLa presenta inactivación de las rutas de p53 y Rb debido a las proteínas virales E6 y E7, respectivamente (DeFilippis et al., 2003). Dada la interrelación entre p53 y el SAC a través de la regulación transcripcional directa de BUBR1 y de su activación dependiente del SAC en mitosis anormales (Oikawa et al., 2005; Vogel et al., 2004), la pérdida de función de p53 podría potenciar los efectos de la disminución de SGOL2 en células HeLa frente a MEFs. Con el fin de comprobarlo, se generó un ratón doble mutante *Sgol2/p53* constitutivo. La ausencia de SGOL2 y p53 fue dispensable para el desarrollo y supervivencia de los ratones y es consistente con la ausencia de defectos en la cohesión o en errores mitóticos en sus fibroblastos primarios, lo que sugiere que SGOL2 es prescindible para la segregación cromosómica aún en ausencia de p53 (Figura 16). Por tanto los defectos reportados en células HeLa deficientes en SGOL2 no parecen estar asociados con la inactivación de p53. No obstante, no puede descartarse que la proteína viral E7 pueda promover defectos en la maquinaria mitótica independientes de p53 como es la deslocalización de dineína y NuMa (*nuclear mitotic apparatus protein 1*) de los microtúbulos del huso, la cual daría lugar a errores en el alineamiento de los cromosomas en metafase que puedan potenciar los efectos del silenciamiento de *Sgol2* (Nguyen & Mürnger, 2009). Por otro lado, el sistema de extractos de oocitos de *X. laevis* es un sistema mitótico reconstruido, por lo que al no reproducir fielmente todas las condiciones fisiológicas de una célula mitótica, los resultados no son siempre fielmente extrapolables.

Dada la deslocalización de MCAK de los centrómeros en los MEFs *Sgol2^{-/-}*, y que las shugoshinas participan también como proteínas adaptadoras en los centrómeros (Figura 10c, revisado en Gutiérrez-Caballero et al., 2012), su deficiencia podría por tanto dar lugar a inestabilidad genómica a través del SAC en presencia de drogas que afectan a la dinámica de microtúbulos (nocodazol y taxol) o en la parada de entrada en mitosis mediada por daño inducido en el DNA (irradiación gamma). La ausencia de defectos en todos los experimentos que se llevaron a cabo para determinarlo (Figura 14), sugiere que SGOL2 no es esencial para la activación del SAC en situaciones de anomalía en la dinámica de los microtúbulos ni para la respuesta al daño inducido en el DNA. De acuerdo con esto, la ausencia de SGOL2 en células HeLa tampoco perturba el arresto en mitosis mediado por el SAC en presencia de nocodazol (Orth et al., 2011).

Finalmente, sería interesante determinar si la deslocalización observada de MCAK de los centrómeros en células procedentes de ratones mutantes *Sgol2^{-/-}* podría afectar a la respuesta de las células al tratamiento con drogas que actúan sobre la polaridad del huso (Mayer et al., 1999; Kapoor et al., 2000), dado que la depleción de MCAK potencia los defectos en la bipolaridad del huso generados por la inhibición de Hs-Eg5/KSP (*kinesin spindle protein*) con monastrol (Kollu et al., 2009). A diferencia de los antimitóticos clásicos que actúan directamente sobre la tubulina del huso, los KSPi (*KSP inhibitors*) actúan específicamente sobre las kinesinas motoras (Hs-Eg5/KSP) que dirigen la separación de los centrosomas permitiendo el establecimiento de husos bipolares (revisado en Komlodi-Pasztor et al., 2012). Por ello, y a diferencia de los antitumorales clásicos, presentan baja neurotoxicidad y un nuevo perfil de resistencia por lo que ya están siendo empleados en ensayos clínicos en fase I y II de tumores sólidos y leucemias (<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=ksp>). MCAK constituye asimismo una atractiva diana antitumoral, sin embargo, su silenciamiento en células humanas provoca muerte celular (Tanno et al., 2010). Por otro lado, se ha sugerido que la depleción de MCAK podría actuar sinérgicamente con los fármacos que alteran la dinámica de los microtúbulos del huso (por ejemplo, paclitaxel o taxol) potenciando los defectos en el huso e induciendo errores mitóticos irreversibles y apoptosis en células tumorales (revisado en Sanhaji et al., 2011). Por tanto, y dado que la deslocalización centromérica de MCAK no genera toxicidad en células de mamífero (esta tesis), es tentador especular con la posible intervención terapéutica conjunta de SGOL2 y los antitumorales antimitóticos (KSPi o paclitaxel) para que puedan ejercer un mayor efecto antiproliferativo.

Si bien SGOL2 no es necesario para el desarrollo de los tejidos somáticos, es esencial para la formación de gametos viables (Llano et al., 2008). SGOL2 protege a REC8 en los centrómeros de su proteólisis por Separasa durante su primera ronda de activación en metafase I (Llano et al., 2008). Recientemente se ha reportado que SGOL2 interacciona con el componente del SAC MAD2, y que esta interacción es esencial para la localización sub-centromérica de

SGOL2 en mitosis (Orth, et al., 2011). Si bien la ausencia de SGOL2 en los centrómeros no da lugar a defectos en la activación del SAC en células somáticas (Figura 14a; Orth et al., 2011), la capacidad de los espermatocitos *Sgol2*^{-/-} con defectos en la cohesión de las cromátidas hermanas para deslizarse sobre el SAC y formar gametos aneuploides podría deberse a esta relación de SGOL2 con el SAC a través de MAD2 (Llano et al., 2008). Para abordar posibles mecanismos implicados en este deslizamiento sobre el SAC, se llevó a cabo un análisis transcriptómico de testículos deficientes en SGOL2. Entre los genes más desregulados que se obtuvieron en este análisis se encontró HDAC11, una histona desacetilasa cuya función se desconocía. Dada la relación entre este enzima y la estabilidad genómica en un cribado efectuado en *C. elegans* (Pothof et al., 2003) y la relación de las HDACs en la progresión de la meiosis (Hazzouri et al., 2000; Kim et al., 2003; Akiyama et al., 2006), se planteó la posibilidad de que HDAC11 estuviese implicada en la viabilidad gamética de los espermatocitos deficientes en SGOL2 a pesar de su elevado grado de inestabilidad cromosómica (aneuploidías). Para responder a esta pregunta, se desarrolló y analizó un ratón nulo constitutivo para *Hdac11*.

2. HDAC11 reprime la expresión génica

La familia de desacetilasas Rpd3/Hda1, a la cual pertenece HDAC11, presenta una extraordinaria diversidad funcional debido a la heterogeneidad de sus sustratos. Esto aparece reflejado en los fenotipos de los modelos murinos nulos para las diferentes HDACs, que abarcan desde letalidad embrionaria hasta la ausencia casi total de fenotipo, pasando por anomalías craneoencefálicas y defectos cardiovasculares (Haberland et al., 2009). Tanto en humanos como en ratón, *Hdac11* se expresa específicamente en testículo, músculo esquelético, corazón, riñón y cerebro (Figura 17 y 20; Gao et al., 2002; Liu et al., 2008), lo que sugiere que esta desacetilasa desempeña una función específica de tejido. El hecho de que HDAC11 esté tan conservada desde *C. elegans* y *D. melanogaster* hasta humanos y de que existan ortólogos en bacterias y plantas (HDA2 de *A. thaliana*), sugiere que el papel que desempeña esta desacetilasa es fundamental para la homeostasis celular. Sin embargo, los ratones deficientes en HDAC11 de forma constitutiva generados a partir del cruzamiento del ratón con el alelo floxeado con una cepa Sox2-CRE, fueron viables y se desarrollaron con normalidad. La ausencia de anomalías en estos ratones indicó que HDAC11 es, por tanto, dispensable para el desarrollo y homeostasis del ratón. Los ratones mutantes constitutivos en *Hdac11* no presentaron, asimismo, defectos aparentes en la gametogénesis lo que sugiere que esta desacetilasa no está implicada en la segregación cromosómica en meiosis. No podemos descartar que la redundancia funcional de otros miembros de la familia de HDACs sea responsable de la ausencia de un fenotipo anormal. Dado que la construcción diseñada permite la escisión espacial y temporal del exón floxeado, sería interesante generar un mutante condicional de *Hdac11* para evitar la aparición de posibles mecanismos compensatorios.

Para determinar posibles alteraciones transcriptómicas en los testículos de los ratones deficientes en HDAC11 se analizaron mediante microarrays sus perfiles de expresión génica, obteniéndose un incremento notable en la transcripción de genes relacionados con la transducción de estímulos olfativos. Estos resultados sugerían que HDAC11 pudiese estar actuando, al menos en parte, como una histona desacetilasa canónica. De acuerdo con esta función de HDAC11 como regulador de la expresión génica, recientemente se ha descrito que HDAC11 participa en la regulación de la respuesta inmune en mamíferos a través de la inhibición de la expresión de Interleukina-10 en células presentadoras de antígenos (Villagra, et al., 2009) y en macrófagos del hígado o células de Kupffer (Lian et al., 2012). Además de regular la expresión génica, HDAC11 puede actuar como una lisina desacetilasa regulando la formación de orígenes de replicación mediante la desacetilación del factor de replicación CDT1 lo cual promueve su ubiquitinación y consecuente degradación (Glozak & Seto, 2009).

La recepción olfativa es un proceso bioquímico complejo que se señala a través de receptores transmembrana que se encuentran acoplados a proteína G. Una vez activados por sus ligandos, la señal se transduce a través de la proteína G α olf y la adenilato ciclasa III (Adcy3) lo que provoca la producción de AMPc, desencadenándose la apertura de canales de membrana iónicos denominados CNG (cyclic nucleotide-gated), entre los que se incluyen CNGA2, CNGA4, y CNGB1b (Kato & Touhara, 2009). El hecho de que varias de las proteínas que intervienen en esta ruta estén ligeramente sobreexpresadas en ausencia de HDAC11 (OLFR767, OLFR1380, ADCY3, CNGA2; Figura 24) indicaría que este enzima regula transcripcionalmente esta cascada de señalización.

La familia de estos receptores olfativos (ORs, *Olfactory receptors*) en el ratón está formada por cerca de 1300 genes los cuales se expresan principalmente en células del epitelio olfativo. En cada neurona olfativa de dicho epitelio sólo se expresa un OR y además su expresión es monoalélica (revisado en Shykind et al., 2005). Esta fina regulación transcripcional es llevada a cabo, en parte, por metilación de histonas (Magklara et al., 2011). Además, estos receptores presentan en su región exónica codificante varios motivos de unión a la proteína Yin Yang 1 (YY1; Faulk & Kim, 2009). Esta proteína es capaz de activar o reprimir la expresión génica en función de su unión a otras proteínas entre las que se incluyen enzimas modificadoras de histonas como HDAC1 o HDAC2 (He et al., 2009; Luke et al., 2006). Por ello, se ha sugerido que la transcripción de estos receptores también pueda estar regulada por un mecanismo dependiente de YY1.

Además de en el epitelio olfativo, determinados ORs se expresan en otras células como espermatozoides, donde pueden desempeñar una función quimiosensora (Fukuda et al., 2001; Spehr et al., 2006). En estas células la activación de los enzimas adenilato ciclasas participa en la señalización dependiente de OR y constituye un nexo entre la función de los ORs y determinadas propiedades de los espermatozoides como la quimiotaxis, la capacidad de

natación y el batido flagelar (Spehr et al., 2004), lo que explicaría la detección de estos transcritos en nuestro análisis. Dada la compleja regulación transcripcional en neuronas olfativas de los ORs, sujeta en parte a regulación epigenética, la ausencia de HDAC11 podría desempeñar un papel fundamental en su regulación. Dicha función podría ejercerse tanto de forma directa a través de la desacetilación de histonas como indirecta a través de la desacetilación de factores de transcripción u otros modificadores/reguladores.

Pese a que estos resultados son aún muy preliminares, abren la puerta al estudio de la regulación de la transducción de señales dependientes de ORs por HDAC11. Sería interesante abordar la funcionalidad de la respuesta quimiotáctica del espermatozoide o la detección olfativa en los ratones *Hdac11*^{-/-} generados.

3. RAD21L, una nueva kleisina específica de meiosis

Al inicio del presente trabajo, se conocían dos miembros de la familia de las α -kleisinas en mamíferos: RAD21 y REC8. El análisis *in silico* del genoma humano y murino nos permitió identificar una potencial kleisina que denominamos RAD21L. La caracterización bioquímica de RAD21L como una nueva subunidad del complejo de cohesinas de mamíferos, con una identidad próxima al 56% con RAD21 y al 36% con REC8, amplía esta familia a tres miembros con características y propiedades bien definidas.

La expresión de *Rad21l* en ratón está prácticamente restringida a testículos (Figura 27b) y es similar a la de la kleisina meiótica *Rec8* cuya transcripción también se encuentra limitada a testículo y se expresa en pequeña proporción en tejidos somáticos como el timo (Parisi et al., 1999; www.symatlas.org). La expresión de *Rad21l* detectada en intestino, médula ósea, cerebro y cerebelo mediante RT-PCR (Figura 27a) no se ha reportado en los otros dos trabajos en los que simultáneamente se identificó esta misma proteína (Ishiguro et al., 2011; Lee et al., 2011). Estas discrepancias pueden ser debidas en parte a diferencias en la sensibilidad de la RT-PCR (Ishiguro et al., 2011) o a una menor concentración de cDNA molde utilizado en la qPCR (Lee et al., 2011). A pesar de que *Rad21l* se expresa en estos tejidos somáticos, sus niveles de expresión son muy reducidos comparativamente con el observado en testículos. Para determinar si al igual que RAD21, RAD21L puede localizarse en los centrómeros de los cromosomas de líneas celulares y poder ejercer allí su función kleisina, llevamos a cabo un experimento de sobreexpresión regulada por doxiciclina en células HeLa. A diferencia de lo observado con RAD21, RAD21L no se localiza en este sistema experimental en el centrómero de los cromosomas mitóticos (Figura 29). Sin embargo, su localización nuclear en células interfásicas al igual que RAD21 y su asociación a la cromatina en 293T-HEK sugieren que se trata de una proteína nuclear (Figura 28). En este mismo sentido, es de destacar que cuando se expresa SYCP3 en líneas celulares, si bien forma estructuras filamentosas en células interfásicas (Yuan et al., 1998), no es capaz de ensamblarse en los cromosomas mitóticos ni formar ninguna

estructura que se asemeje a los AEs de los meiocitos. Igualmente, REC8 no se localiza en los centrómeros mitóticos de células transfectadas (datos no mostrados). Todo ello sugiere que para que estas proteínas se localicen y carguen adecuadamente en los cromosomas meióticos se requieren numerosos cofactores específicos de meiosis que actúen de adaptadores.

Seguidamente, se abordó la caracterización bioquímica de la nueva proteína RAD21L. Para ello, y dada la inexistencia de líneas celulares germinales donde poder realizar análisis funcionales, se empleó un sistema heterólogo de sobreexpresión mediante transfección en células 293T-HEK. Mediante este procedimiento se definió la capacidad de RAD21L de interactuar con SMC1 α , SMC1 β , SMC3 y con STAG3 pero no con STAG1 y STAG2 (Figuras 30-32), lo que demuestra que esta proteína constituye una nueva subunidad canónica del complejo de cohesinas con propiedades bioquímicas de interacción específicas únicas. Para determinar si la especificidad de la interacción con STAG3 se lleva a cabo a través de la misma región con la que RAD21 interactúa con STAG1 (Shintomi & Hirano, 2009), se deletionó esta región y su correspondiente región homóloga en RAD21L (residuos 372-392 en RAD21 y 345-365 en RAD21L). La delección de estas regiones no impidió la interacción de las kleisinas con STAG3, lo que evidencia que esta interacción es mediada por otra región distinta. Asimismo, la incapacidad de RAD21L de interactuar con WAPAL (Figura 33) es congruente dado que la interacción de RAD21 con WAPAL se realiza a través de STAG1. Sería interesante determinar si RAD21L es capaz de interactuar con WAPAL a través de STAG3 transfectando las 3 proteínas simultáneamente en 293T-HEK.

La validación de estos resultados en un sistema más fisiológico se llevó a cabo mediante inmunoprecipitaciones de las proteínas endógenas a partir de extractos totales de homogeneizados de testículos de ratón. Mediante este procedimiento, se comprobó que los complejos que RAD21L forma con el resto de subunidades en células 293T-HEK (SMC1 α , SMC1 β , SMC3 y con STAG3) se forman también entre RAD21L y las cohesinas endógenas de testículo (Figura 34), por lo que RAD21L formaría parte de un nuevo complejo de cohesinas específico de meiosis. Este nuevo complejo estaría formado por una estructura en forma de "V" constituida por SMC1 α o SMC1 β y SMC3, que se cerraría con la unión de RAD21L, la cual interactuaría a su vez con la subunidad específica de meiosis STAG3 (Figura 34c). A esta conclusión han llegado simultáneamente otros dos estudios (Ishiguro et al., 2011, Lee et al., 2011). Al igual que los complejos formados por RAD21 y REC8 (Eijpe et al., 2000; Prieto et al., 2001), el complejo de cohesinas formado por RAD21L colocaliza con los LE/AEs del complejo sinaptonémico a lo largo del dominio intercromatídico desde leptotena hasta diplotena temprana y en los centrómeros hasta anafase I (Figura 35; Herrán et al., 2011).

Mientras que durante la meiosis de levaduras Rec8 es la única kleisina que forma parte de los complejos de cohesinas, en la meiosis de mamíferos tres kleisinas participan formando complejos de cohesinas, RAD21, REC8 y RAD21L. La diferente distribución durante la meiosis

de estas tres kleisinas y la diferente versatilidad en la interacción con otras subunidades del complejo de cohesinas, indica que estas proteínas desempeñan funciones específicas (Gutiérrez-Caballero et al., 2011; Herrán et al., 2011; Lee et al., 2011; Ishiguro et al., 2011). Actualmente, la función de RAD21 durante la profase meiótica es aún desconocida pero se ha sugerido que es responsable del establecimiento de la cohesión entre las cromátidas hermanas en la fase S previa a la meiosis (Herrán et al., 2012).

En cuanto a REC8 se refiere, basándose en el fenotipo de los mutantes nulos para *Rec8* en diferentes especies (Klein et al., 1999; Bannister et al., 2004; Xu et al., 2005; Severson et al., 2009) y los resultados obtenidos en ratón del estudio de mutantes de REC8 no susceptibles al corte por Separasa o susceptibles a ser digeridos artificialmente por la proteasa TEV (Kudo et al., 2009; Tachibana-Konwalski et al., 2010), se considera que REC8 es la kleisina necesaria para la cohesión centromérica entre las cromátidas hermanas en mamíferos. Además del aceptado papel de REC8 en el mantenimiento de la cohesión centromérica, del análisis genético en levaduras de *Rec8* se deduce que es, asimismo, imprescindible para la sinapsis, la recombinación entre cromosomas homólogos y la formación/ensamblaje de los AEs (Klein et al., 1999; Watanabe & Nurse, 1999; Brar et al., 2009). En mamíferos, sin embargo, la ablación genética de *Rec8* no impide la formación de los AEs, los cuales se ensamblan sólo hasta el estadio de zigotena tardía o paquitena temprana probablemente por defectos en la sinapsis y en la formación de los quiasmas en los espermatoцитos (Bannister et al., 2004; Xu et al., 2005).

En relación con la función que RAD21L desempeña, nuestro grupo de investigación ha reportado recientemente que el complejo de cohesinas formado por esta nueva proteína, también es esencial para que tenga lugar la sinapsis entre los cromosomas homólogos durante la profase meiótica y que en consecuencia, su delección ocasiona un arresto en zigotena durante la espermatogénesis de ratón (Herrán et al., 2011). Este fenotipo es similar al ocasionado por la ablación de *Rec8* o *Smc1 β* , que se caracteriza también por un arresto en zigotena o paquitena temprana con defectos en la sinapsis (Bannister et al., 2004; Revenkova et al., 2004). Sin embargo, y a diferencia de REC8, RAD21L no es esencial para la oogénesis ya que las ratonas deficientes en RAD21L son fértiles y no muestran defectos en la cohesión de las cromátidas hermanas ya que sus oocitos en metafase I presentan 20 bivalentes unidos por un quiasma los cuales dan lugar a oocitos funcionales (Herrán et al., 2011).

Al igual que en *C. elegans*, donde es necesaria la eliminación de todas las kleisinas meióticas (REC8, COH-3, COH-4) para provocar un defecto en el ensamblaje de los AEs (Severson et al., 2009), los ratones deficientes en ambas kleisinas meióticas (REC8 y RAD21L) presentan espermatoцитos bloqueados en leptotena que son incapaces de progresar en el ensamblaje de sus AEs (Herrán et al., 2012). Además, estos espermatoцитos mutantes dobles de *Rec8* y *Rad21l*, aunque son capaces de iniciar las DSB por la nucleasa SPO11 necesarias para iniciar la recombinación, presentan interrumpida la reparación de las roturas (Herrán et al., 2012).

Sin embargo, la ablación de *Sycp3* y *Sycp2* en ratón no supone defectos en el reclutamiento de los complejos de cohesinas meióticas ni en el inicio de la recombinación entre cromosomas homólogos, de lo cual se deduce que los complejos de cohesinas son necesarios para iniciar el ensamblaje de los AE/LEs pero no a la inversa (Kouznetsova et al., 2011). Si bien en la última década no existía consenso acerca de si las cohesinas de mamíferos formaban parte estructural de los AEs (Eijpe et al., 2003) o si constituían un estructura independiente (Pelttari et al., 2001), los datos recientes sugieren que las cohesinas forman parte constitutiva de los AE/LEs desde levaduras hasta mamíferos, puesto que el andamiaje de los complejos de cohesinas meióticos en el ratón es necesario para iniciar el ensamblaje de otras proteínas de los AE/LEs como SYCP3 y SYCP2 (Klein et al., 1999; Watanabe & Nurse, 1999; Brar et al., 2009; Severson et al., 2009; Yurema et al., 2012). Por tanto, una de las funciones más conservadas de las cohesinas conjuntamente con la cohesión cromosómica y la reparación del DNA sería su participación en el ensamblaje del SC.

Una de las propiedades comunes a todos los miembros de la familia de las α -kleisinas subyace en ser sustratos de Separasa. Para determinar si la nueva RAD21L constituye una kleisina canónica capaz de ser digerida por Separasa, se llevaron a cabo ensayos de digestión con Separasa purificada de la proteína recombinante RAD21L silvestre y mutada en los sitios de digestión mediante el empleo del sistema de traducción y expresión *in vitro* TNT. La susceptibilidad de RAD21L silvestre a ser digerida por Separasa, pero no la del mutante en el que se mutaron sus dos secuencias E-X-X-R, apoya que RAD21L constituye un miembro canónico de esta familia de proteínas (Figura 36). Esta capacidad para ser digerida por Separasa se incrementó notablemente cuando RAD21L fue fosforilada previamente por PLK1 (Figura 36b). Al igual que REC8, el hecho de que la fosforilación de RAD21L por PLK1 aumente su efectividad de corte proteolítico por Separasa sugiere que la disociación de los complejos de cohesinas formados por RAD21L del DNA puede ser potencialmente dependiente de Separasa. Es posible además que, al igual que REC8, RAD21L sea protegida de la primera ronda de activación de Separasa en los centrómeros parcialmente por SGOL2 usando un mecanismo similar dependiente de defosforilación por PP2A, puesto que en los espermatoцитos *Sgol2*^{-/-} RAD21L disminuye durante metafase I y desaparece en metafase II (Herrán et al., datos no publicados).

Con la identificación de esta nueva α -kleisina, podemos considerar la posible coexistencia en meiocitos de mamíferos de seis tipos diferentes de complejos de cohesinas (Figura 48; revisado en Jessberger, 2011). Esta diversidad en los complejos meióticos puede, además, verse incrementada teniendo en cuenta que las subunidades reguladoras WAPAL, PDS5A/B y Sororina parecen también desempeñar funciones en meiosis dada su colocalización con los elementos del SC (Kuroda et al., 2005; Zhang et al., 2008; Fukuda et al., 2010).

Finalmente, la imposibilidad de rastrear en las bases de datos de genomas secuenciados a *Rad21l* por debajo de teleosteos en la escala evolutiva, sugiere que este nuevo parálogo surgió

como consecuencia de una duplicación segmental de *Rad21* o como consecuencia de una de las poliploidizaciones globales que sufrieron los genomas de los teleósteos durante su evolución. Mediante este análisis filogenético de la familia de las kleisinas, surgieron además nuevas observaciones de interés para entender la función que desempeña esta familia de proteínas en vertebrados. Por un lado, la pérdida de *Rec8* del genoma de las aves, aunque difícil de asumir, sugiere que su función haya sido reemplazada por la recientemente surgida RAD21L. De la misma forma, es también sorprendente dada su función esencial en la gametogénesis de ratón, que los anfibios carezcan de *Rad21* posiblemente como consecuencia de una pérdida posterior a la duplicación. Dada la posible implicación de RAD21L en la formación del cuerpo sexual y la inactivación de los cromosomas sexuales (MSCI, *meiotic sex chromosome inactivation*; Herrán et al., 2011) es posible especular que la dispensabilidad de RAD21L en estos organismos esté relacionada con la ausencia de MSCI en anfibios.

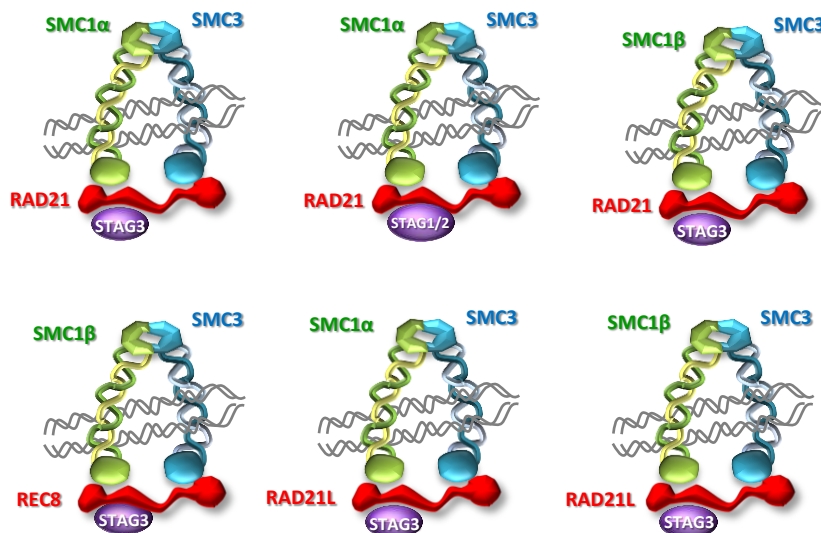


Figura 48. En meiocitos coexisten al menos seis complejos de cohesinas distintos. Las hélices grises representan las cromátidas hermanas.

4. Separasa protege frente a la iniciación y progresión de tumores químicamente inducidos

Separasa desempeña un papel fundamental en la segregación cromosómica dado que su acción proteolítica sobre las kleisinas permite la disociación de los complejos de cohesinas del DNA. De hecho, la ablación génica de *Separasa* impide la separación de las cromátidas hermanas ocasionando poliploidización y retraso en la proliferación, y es letal durante el

desarrollo embrionario (Waizenegger et al., 2002, Kumada et al., 2006; Wirth et al., 2006). Con el fin de analizar el efecto de la disminución de Separasa sobre la carcinogénesis y el envejecimiento prematuro, dos patologías muy sensibles a defectos en la segregación cromosómica (Rajagopalan & Lengauer 2004; Weaver & Cleveland 2009; Tanaka & Hirota, 2009, Lushnikova et al., 2011, Fang & Zhang, 2011), se llevó a cabo el desarrollo y análisis de un modelo murino *Separasa*^{+/-}. La disminución parcial de sus niveles de expresión en el ratón *Separasa*^{+/-} no afecta a la proliferación celular ni a la viabilidad y el desarrollo del ratón (Figuras 39d y 40; Kumada et al., 2006), ya que la presencia de una sola copia funcional de *Separasa* es suficiente para promover la separación de las cromátidas hermanas (Kumada et al., 2006). Asimismo, el que los ratones portadores de un alelo nulo de *Separasa* no sean haploinsuficientes en la segregación cromosómica, límite replicativo (senescencia) y capacidad para inmortalizarse por RAS oncogénico (Figura 36 y datos no mostrados) sugiere que su función se encuentra tremendamente tamponada frente a cambios en los niveles de expresión. Esta robustez contrasta, sin embargo, con la mayor sensibilidad de los MEFs *Separasa*^{+/-} en la formación de focos transducidos por los dos oncogenes cooperantes E1A y H-RasV12 (Figura 43). Con el fin de determinar si esta mayor predisposición a la transformación de las células *Separasa*^{+/-} tiene un reflejo en la susceptibilidad tumoral en los ratones *Separasa*^{+/-}, se analizó su longevidad, carcinogénesis espontánea y carcinogénesis inducida. Los resultados que se obtuvieron indicaron que la disminución de Separasa no promueve la aparición de envejecimiento prematuro ni un aumento en la incidencia de tumores espontáneos (Figura 44). Sin embargo, si promueve la progresión de tumores inducidos por el carcinógeno DMBA, el cual genera mutaciones principalmente en RAS (Q61L, Quintanilla et al., 1986; Nelson, 1992). En este sentido, el descenso de los niveles de Separasa ocasiona no sólo un incremento en la incidencia de tumores, sino también una mayor proliferación de los mismos y una predisposición a progresar hacia una lesión maligna (Figuras 45 y 46). Posiblemente la diferencia observada en la malignidad de los tumores en ratones silvestres y mutantes se acentúe con el tiempo, si bien no pudimos comprobarlo dado que el tamaño de los tumores nos impidió llevar a término el experimento.

Esta función protectora que desempeña Separasa frente a la aparición de tumores químicamente inducidos en piel es consistente con su papel como supresor tumoral en el pez cebra. En este organismo, la mutación en heterocigosis de Separasa correlaciona con una mayor progresión de tumores epiteliales inducidos químicamente (Shepard et al., 2007), concretamente adenomas intestinales y colangiocarcinomas. Igualmente, el descenso en los niveles de Separasa coopera con la ausencia de p53 promoviendo el desarrollo de leucemias y linfomas agresivos de células B y T en ratones con un fondo genético nulo de p53 (Mukherjee et al., 2011). Sin embargo, Separasa también se comporta como un oncogén al ser sobreexpresado en células epiteliales de mama deficientes en p53 (Zhang et al., 2008). Por tanto, nuestros

resultados, junto con los obtenidos a partir de otros modelos animales, sugieren que tanto la disminución como la sobreexpresión de Separasa pueden aumentar la susceptibilidad tumoral. Así, Separasa puede desempeñar un papel tanto como oncogén como gen supresor tumoral y la capacidad para actuar en uno u otro sentido probablemente dependa de sus niveles de expresión y del tipo de tejido. No obstante, es necesario destacar que la ausencia de transcripción únicamente de una copia génica de *Separasa* no promueve la aparición espontánea de tumores (esta tesis, Mukherjee et al., 2011) sino que es necesaria la presencia de mutaciones en otros genes clave para la progresión tumoral como p53, en el caso de los ratones que desarrollan linfomas (Mukherjee et al., 2011), o de mutaciones inducidas principalmente en RAS, por agentes químicos (esta tesis, Shepard, et al., 2007). Los resultados en conjunto indican que las alteraciones en Separasa pueden predisponer a cierta malignidad, que junto con la posterior aparición de mutaciones en genes implicados en el control del ciclo celular, fomenta la progresión tumoral.

La activación de las rutas principales de respuesta frente al estrés oncogénico INK4a/Rb o ARF/p53 desencadena apoptosis o entrada en senescencia (OIS, *oncogene induced senescence*) en función del oncogén inductor (Serrano & Blasco, 2001; Bringold & Serrano, 2000). Así por ejemplo, RAS oncogénico induce OIS mediante ARF (Kamijo et al., 1997), por lo que los fibroblastos inmortalizados por la disrupción de la ruta ARF/p53 no senescen por RAS oncogénico, si no que sufren transformación neoplásica (Harvey et al., 1993; Kamijo et al., 1997). Por ello, el hecho de que en los MEFs *Separasa*^{+/-} H-RasV12 induzca senescencia sugiere que la ruta ARF/p53 es funcional, por lo que la función de Separasa como posible supresor tumoral podría estar relacionada con la ruta INK4a/pRb. Puesto que la depleción de pRb sorprendentemente no ocasiona un aumento en la progresión tumoral en la carcinogénesis química con DMBA/TPA (Williams et al., 2006), Separasa actuaría potencialmente aguas arriba de Rb.

Dado que uno de los aspectos cruciales que determinan la progresión tumoral es la desregulación de la proliferación celular (revisado en Hanahan & Weinberg, 2011) analizamos la proliferación en los papilomas de ratones *Separasa*^{+/-} y silvestres. Si bien los papilomas que indujimos en los ratones *Separasa*^{+/-} no exhiben mayor proliferación en comparación con los papilomas silvestres (Figura 47), el estudio de los linfomas desarrollados en los animales *Separasa*^{+/-}*p53*^{-/-} muestra un incremento en la proliferación celular (Mukherjee et al., 2011), lo cual podría ser debido a la acción sinérgica de la disminución de Separasa con la ausencia de p53. Estos linfomas además presentan un incremento del daño en el DNA en comparación con los tumores *Separasa*^{+/+}*p53*^{-/-} lo cual, a pesar de que la función de Separasa en reparación del DNA sólo se ha descrito en *S. pombe*, nos conduce a contemplar la posibilidad de que los papilomas de ratones *Separasa*^{+/-} también presenten mayor daño en el DNA. Asimismo, y teniendo en cuenta que no existen diferencias en proliferación, sería necesario determinar si los

papilomas desarrollados por los ratones heterocigotos muestran menores niveles de apoptosis. A pesar de que *Separasa* ha sido relacionada con la citocinesis y la separación de centriolos no parece que la mayor progresión tumoral en los ratones *Separasa*^{+/-} sea debida a defectos en estos mecanismos puesto que *Separasa* es prescindible para llevar a cabo dichos procesos en MEFs (Kumada et al., 2006; Wirth et al., 2006).

Como hemos comentado, la existencia de bajos niveles de *Separasa* en MEFs es suficiente para que se lleve a cabo la separación entre las cromátidas hermanas, previniendo defectos en la segregación (Kumada et al., 2006, y este trabajo). Sin embargo, la disminución de *Separasa* en esplenocitos con un fondo genético nulo para p53 fomenta la aparición de aneuploidías. Es posible que la aparición de mutaciones en los queratinocitos tratados con DMBA coopere con los menores niveles de *Separasa* en la aparición de aneuploidías que induzcan una ventaja selectiva sobre los queratinocitos silvestres.

Separasa se encuentra sobreexpresado en diferentes tipos de tumores sólidos, incluyendo mama y próstata, donde se correlaciona con una peor prognosis (Zhang et al., 2008; Meyer et al., 2009), y en osteosarcomas humanos, por lo que *Separasa* es considerado como un posible oncogén (Zhang et al., 2008; revisado en Pati, 2008). No obstante, existen también determinados tumores de pulmón y riñón donde los niveles de *Separasa* están disminuidos (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, base de datos COSMIC; revisado en Xu et al., 2011). Por tanto, y teniendo en cuenta los datos recogidos en este trabajo, *Separasa* puede actuar como un supresor tumoral o como un oncogén, lo cual aumenta la complejidad del análisis de su implicación en tumorigénesis. No obstante, es necesario abordar los mecanismos dependientes de *Separasa* implicados en la respuesta frente al estrés oncogénico y/o los procesos celulares desregulados en tumores haploinsuficientes para *Separasa* que conlleven a la progresión tumoral.

La disección genética de la segregación cromosómica ha permitido profundizar en los mecanismos que aseguran la fidelidad en el reparto del material hereditario tanto entre las células somáticas de un organismo como entre las células germinales primordiales y los gametos que éstas producen. El interés en el estudio de estos procesos no se restringe únicamente al ámbito académico, sino que se extiende al de la salud humana dado que la desregulación de la segregación cromosómica puede desencadenar procesos tumorales, infertilidad, abortos, aneuploidías y defectos congénitos (Rajagopalan & Lengauer, 2004; Weaver & Cleveland 2009; Hassold & Hunt, 2001; Jessberger et al., 2012). En este sentido, la función descrita en este trabajo de *Separasa* como una proteína supresora de tumores muestra como además de ser un enzima clave en la mitosis y la meiosis, su haploinsuficiencia da lugar a una mayor susceptibilidad para desarrollar en el ratón tumores de piel inducidos químicamente. A pesar de

los enormes progresos realizados en los últimos cinco años con la identificación de una plétora de mutaciones en los genomas de numerosos tumores humanos, se desconoce la relevancia funcional de una gran mayoría de estas alteraciones. La identificación reciente de mutaciones en subunidades del complejo de cohesinas como promotoras de aneuploidías o “conductoras” de procesos tumorales (Solomon et al., 2011; Ding et al., 2012), sugiere su implicación causal en la carcinogénesis y abre una nueva y atractiva vía de investigación. En este sentido, la identificación de una nueva α -kleisina RAD21L en el genoma de mamíferos con una función específica en meiosis, refleja la anotación aun incompleta de estos genomas y la complejidad aparentemente redundante de los mamíferos para llevar a cabo procesos, que en otros organismos más sencillos se resuelven con menos elementos. De forma inversa, todo ello plantea que las nuevas funciones que se han adquirido *de novo* en la meiosis de mamíferos son sustentadas por los nuevos complejos de cohesinas meióticas surgidos durante su evolución. En este mismo sentido, la demostración de que SGOL2 no protege *in vivo* la cohesión centromérica en células somáticas, pese a su presencia en los centrómeros de los cromosomas metafásicos, sugiere de nuevo que esta complejidad aparentemente redundante no deja de ser un reflejo de la complejidad del análisis funcional de un mamífero y del desconocimiento que aun se tiene sobre la maquinaria molecular responsable de la segregación cromosómica en distintas líneas celulares y condiciones fisiológicas. En este sentido, y pese a que hace más de diez años que se identificaron las cohesinas como las proteínas responsables de mantener la cohesión cromosómica, su creciente participación en funciones no canónicas como son la regulación transcripcional, la reparación de daños en el DNA y la diferenciación celular, están comenzando a definirse y conocerse en detalle. De hecho, mutaciones en las cohesinas o en subunidades reguladoras ocasionan enfermedades humanas sin pérdida de cohesión cromosómica, como es el Síndrome de Cornelia de Lange (Krantz et al., 2004; Tonkin et al., 2004; Musio et al., 2006; Deardorff et al., 2007; Deardorff et al., 2012). Por tanto, determinar cuales son las proteínas que forman parte de todo el entramado que participa en su carga, regulación, protección y disociación del DNA, así como de su interacción con los distintos complejos de cohesinas será esencial para comprender, no sólo los mecanismos implicados en la segregación cromosómica, sino también otros procesos menos conocidos y menos conservados evolutivamente que han surgido en organismos pluricelulares complejos y que son esenciales para el mantenimiento de su homeostasis celular.

Conclusiones

1. La shugoshina SGOL2 no participa en la protección de la cohesión centromérica en células somáticas y es prescindible para la viabilidad y el desarrollo del ratón.
2. SGOL2 no está implicada en la dinámica de los microtúbulos ni en la respuesta a daño en el DNA mediada por el SAC.
3. SGOL2 es prescindible para la segregación cromosómica aún en ausencia de p53.
4. La histona desacetilasa HDAC11 es dispensable para la homeostasis y viabilidad del ratón y para la progresión de la meiosis.
5. HDAC11 interviene en la regulación de la expresión de genes implicados en la transducción de la respuesta olfativa.
6. RAD21L es una nueva α -kleisina que forma parte de un complejo de cohesinas específico de meiosis constituido por SMC1 α o SMC1 β , SMC3 y STAG3 que colocaliza con los elementos laterales del complejo sinaptonémico en oocitos y espermatocitos.
7. RAD21L es susceptible de ser digerida por Separasa *in vitro* y esta susceptibilidad se incrementa por su fosforilación mediante PLK1.
8. La disminución parcial de Separasa no afecta al desarrollo ni a la esperanza de vida del ratón.
9. Separasa es haploinsuficiente en la transformación neoplásica mediada por oncogenes en fibroblastos embrionarios.
10. Separasa se comporta como un supresor tumoral frente al desarrollo de tumores químicamente inducidos en piel.

Bibliografia

- Abel EL, Angel JM, Kiguchi K, DiGiovanni J. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. *Nat. Protoc.* 2009; 4(9):1350-62.
- Adachi Y, Kokubu A, Ebe M, Nagao K, Yanagida M. Cut1/separase-dependent roles of multiple phosphorylation of fission yeast cohesion subunit Rad21 in post-replicative damage repair and mitosis. *Cell Cycle* 2008; 7(6):765-76.
- Akiyama T, Nagata M, Aoki F. Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006; 103(19):7339-44.
- Anderson DE, Losada A, Erickson HP, Hirano T. Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. *J. Cell Biol.* 2002; 156(3):419-24.
- Arumugam P, Gruber S, Tanaka K, Haering CH, Mechtler K, Nasmyth K. ATP hydrolysis is required for cohesin's association with chromosomes. *Curr. Biol.* 2003; 13(22):1941-53.
- Bannister LA, Reinholdt LG, Munroe RJ, Schimenti JC. Positional cloning and characterization of mouse mei8, a disrupted allele of the meiotic cohesin Rec8. *Genesis* 2004; 40(3): 184-194.
- Barber TD, McManus K, Yuen KW, Reis M, Parmigiani G, Shen D, Barrett I, Nouhi Y, Spencer F, Markowitz S, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C, Hieter P. Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008;105(9):3443-8.
- Barford D. Structural insights into anaphase-promoting complex function and mechanism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011; 366(1584):3605-24.
- Bauerschmidt C, Woodcock M, Stevens DL, Hill MA, Rothkamm K, Helleday T. Cohesin phosphorylation and mobility of SMC1 at ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks in human cells. *Exp. Cell. Res.* 2011; 317(3):330-7.
- Beckouët F, Hu B, Roig MB, Sutani T, Komata M, Uluocak P, Katis VL, Shirahige K, Nasmyth K. An Smc3 acetylation cycle is essential for establishment of sister chromatid cohesion. *Mol. Cell* 2010; 39(5):689-99.
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J Roy Stat.Soc.(Ser. B)* 1995; 57:289-300.
- Birkenbihl RP, Subramani S. Cloning and characterization of rad21 an essential gene of *Schizosaccharomyces pombe* involved in DNA double-strand-break repair. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20(24):6605-11.

- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 2003; 19(2):185-93.
- Borges V, Lehane C, Lopez-Serra L, Flynn H, Skehel M, Rolef Ben-Shahar T, Uhlmann F. Hos1 deacetylates Smc3 to close the cohesin acetylation cycle. *Mol. Cell* 2010; 39(5):677-88.
- Boyarchuk Y, Salic A, Dasso M, Arnaoutov A. Bub1 is essential for assembly of the functional inner centromere. *J. Cell Biol.* 2007; 176(7):919-28.
- Brar GA, Hochwagen A, Ee LS, Amon A. The multiple roles of cohesin in meiotic chromosome morphogenesis and pairing. *Mol Biol Cell.* 2009; 20(3):1030-47.
- Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp. Gerontol.* 2000; 35(3):317-29.
- Buonomo SB, Clyne RK, Fuchs J, Loidl J, Uhlmann F, Nasmyth K. Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell* 2000; 103(3):387-98.
- Caron P, Aymard F, Iacovoni JS, Briois S, Canitrot Y, Bugler B, Massip L, Losada A, Legube G. Cohesin protects genes against γ H2AX Induced by DNA double-strand breaks. *PLoS Genet.* 2012; 8(1):e1002460.
- Chestukhin A, Pfeffer C, Milligan S, DeCaprio JA, Pellman D. Processing, localization, and requirement of human separase for normal anaphase progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003; 100(8):4574-9.
- Chiang T, Schultz RM, Lampson MA. Age-dependent susceptibility of chromosome cohesion to premature separase activation in mouse oocytes. *Biol. Reprod.* 2011; 85(6):1279-83.
- Chiang, T, Duncan FE, Schindler K, Schultz RM, Lampson MA. Evidence that weakened centromeres cohesin is a leading cause of age-related aneuploidy in oocytes. *Curr. Biol.* 2010; 20(17):1522–1528.
- Crasta K, Ganem NJ, Dagher R, Lantermann AB, Ivanova EV, Pan Y, Nezi L, Protopopov A, Chowdhury D, Pellman D. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature* 2012; 482(7383):53-8.
- Deardorff MA, Kaur M, Yaeger D, Rampuria A, Korolev S, Pie J, Gil-Rodríguez C, Arnedo M, Loeyes B, Kline AD, Wilson M, Lillquist K, Siu V, Ramos FJ, Musio A, Jackson LS, Dorsett D, Krantz ID. Mutations in cohesin complex members SMC3 and SMC1A cause a mild variant of cornelia de Lange syndrome with predominant mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* 2007; 80(3):485-94.

- Deardorff MA, Wilde JJ, Albrecht M, Dickinson E, Tennstedt S, Braunholz D, Mönnich M, Yan Y, Xu W, Gil-Rodríguez MC, Clark D, Hakonarson H, Halbach S, Michelis LD, Rampuria A, Rossier E, Spranger S, Van Maldergem L, Lynch SA, Gillessen-Kaesbach G, Lüdecke HJ, Ramsay RG, McKay MJ, Krantz ID, Xu H, Horsfield JA, Kaiser FJ. RAD21 Mutations Cause a Human Cohesinopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 2012; 90(6):1014-27.
- DeFilippis RA, Goodwin EC, Wu L, DiMaio D. Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence, and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *J. Virol.* 2003; 77(2):1551-63.
- Ding L, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 2012; 481(7382):506-10.
- Dorsett D, Eissenberg JC, Misulovin Z, Martens A, Redding B, McKim K. Effects of sister chromatid cohesion proteins on cut gene expression during wing development in *Drosophila*. *Development.* 2005; 132(21):4743-53.
- Dorsett D. Cohesin: genomic insights into controlling gene transcription and development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2011; 21(2):199-206.
- Eijpe M, Heyting C, Gross B, Jessberger R. Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes. *J. Cell Sci.* 2000; 113 (Pt 4):673-82.
- Eijpe M, Offenberg H, Jessberger R, Revenkova E, Heyting C. Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3. *J. Cell Biol.* 2003; 160(5):657-70.
- Eot-Houllier G, Fulcrand G, Watanabe Y, Magnaghi-Jaulin L, Jaulin C. Histone deacetylase 3 is required for centromeric H3K4 deacetylation and sister chromatid cohesion. *Genes Dev.* 2008; 22(19):2639-44.
- Fang X, Zhang P. Aneuploidy and tumorigenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2011; 22(6):595-601.
- Faulk CD, Kim J. YY1's DNA-binding motifs in mammalian olfactory receptor genes. *BMC Genomics.* 2009; 10:576.
- Fededa JP, Gerlich DW. Molecular control of animal cell cytokinesis. *Nat. Cell Biol.* 2012; 14(5):440-7.
- Feytout A, Vaur S, Genier S, Vazquez S, Javerzat JP. Psm3 acetylation on conserved lysine residues is dispensable for viability in fission yeast but contributes to Eso1-mediated sister chromatid cohesion by antagonizing Wpl1. *Mol. Cell Biol.* 2011; 31(8):1771-86.

- Fukuda N, Yomogida K, Okabe M, Touhara K. Functional characterization of a mouse testicular olfactory receptor and its role in chemosensing and in regulation of sperm motility. *J. Cell Sci.* 2004; 117(Pt 24):5835-45.
- Fukuda T, Hoog C. The Mouse Cohesin-Associated Protein PDS5B Is Expressed in Testicular Cells and Is Associated with the Meiotic Chromosome Axes Genes. 2010; 1(3):484-94.
- Gandhi R, Gillespie PJ, Hirano T. Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase. *Curr. Biol.* 2006; 16(24):2406-17.
- Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(28):25748-55.
- George SH, Gertsenstein M, Vintersten K, Korets-Smith E, Murphy J, Stevens ME, Haigh JJ, Nagy A. Developmental and adult phenotyping directly from mutant embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104(11):4455-60.
- Glozak MA, Seto E. Acetylation/deacetylation modulates the stability of DNA replication licensing factor Cdt1. *J. Biol. Chem.* 2009; 284(17):11446-53.
- Godard A, Heymann D, Raheer S, Anegon I, Peyrat MA, Le Mauff B, Mouray E, Gregoire M, Virdee K, Soullillou JP, Moreau JF, Jacques Y. High and low affinity receptors for human interleukin for DA cells/leukemia inhibitory factor on human cells. Molecular characterization and cellular distribution. *J. Biol. Chem.* 1992; 267(5):3214-22.
- Gorr IH, Boos D, Stemmann O. Mutual inhibition of separase and Cdk1 by two-step complex formation. *Mol. Cell.* 2005; 19(1):135-41.
- Gregoretti V, Lee YM, Goodson HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J. Mol. Biol.* 2004; 338(1):17-31.
- Gruber S, Haering CH, Nasmyth K. Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell* 2003; 112(6):765-77.
- Gruber S, Arumugam P, Katou Y, Kuglitsch D, Helmhart W, Shirahige K, Nasmyth K. Evidence that loading of cohesin onto chromosomes involves opening of its SMC hinge. *Cell* 2006; 127(3):523-37.
- Gu L, Wang Q, Sun QY. Histone modifications during mammalian oocyte maturation: dynamics, regulation and functions. *Cell Cycle.* 2010; 9(10):1942-50.
- Guacci V, Koshland D, Strunnikov A. A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell* 1997; 91(1):47-57.

- Gutiérrez-Caballero C, Cebollero LR, Pendás AM. Shugoshins: from protectors of cohesion to versatile adaptors at the centromere. *Trends Genet.* 2012 Apr 26. [Epub ahead of print]
- Gutiérrez-Caballero C, Herrán Y, Sánchez-Martín M, Suja JA, Barbero JL, Llano E, Pendás AM. Identification and molecular characterization of the mammalian α -kleisin RAD21L. *Cell Cycle* 2011; 10(9):1477-87
- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.* 2009; 10(1):32-42.
- Haering CH, Farcas AM, Arumugam P, Metson J, Nasmyth K. The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. *Nature* 2008; 454(7202):297-301.
- Haering CH, Löwe J, Hochwagen A, Nasmyth K. Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol. Cell* 2002; 9(4):773-88.
- Haering CH, Nasmyth K. Building and breaking bridges between sister chromatids. *Bioessays* 2003; 25(12):1178-91.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5):646-74.
- Hartman T, Stead K, Koshland D, Guacci V. Pds5p is an essential chromosomal protein required for both sister chromatid cohesion and condensation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 2000; 151(3):613-26.
- Harvey M, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Bradley A, Donehower LA. Genetic background alters the spectrum of tumors that develop in p53-deficient mice. *FASEB J.* 1993; 7(10):938-43.
- Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: The genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet.* 2001; 2(4):280-291.
- Hauf S, Roitinger E, Koch B, Dittrich CM, Mechtler K, Peters JM. Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol.* 2005; 3(3):e69.
- Hauf S, Waizenegger IC, Peters JM. Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science* 2001; 293(5533):1320-3.
- Hauf S, Watanabe Y. Kinetochore orientation in mitosis and meiosis. *Cell* 2004; 119(3): 317-27.
- Hayakawa T, Yusa K, Kouno M, Takeda J, Horie K. Bloom's syndrome gene-deficient phenotype in mouse primary cells induced by a modified tetracycline-controlled trans-silencer. *Gene* 2006; 369:80-9.

- Hayashi S, Lewis P, Pevny L, McMahon AP. Efficient gene modulation in mouse epiblast using a Sox2Cre transgenic mouse strain. *Gene Expr. Patterns*. 2002; 2(1-2):93-7.
- Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure AK, Usson Y, Pelletier R, Sèle B, Khochbin S, Rousseaux S. Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur. J. Cell Biol.* 2000; 79(12):950-60.
- He Y, Sandoval J, Casaccia-Bonofil P. Events at the transition between cell cycle exit and oligodendrocyte progenitor differentiation: the role of HDAC and YY1. *Neuron Glia Biol.* 2007 Aug;3(3):221-31.
- Henderson KA, Keeney S. Synaptonemal complex formation: where does it start? *Bioessays* 2005; 27(10):995-8.
- Henzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 1997; 106(6):348-60.
- Herbert M, Levasseur M, Homer H, Yallop K, Murdoch A, McDougall A. Homologue disjunction in mouse oocytes requires proteolysis of securin and cyclin B1. *Nat. Cell Biol.* 2003; 5(11):1023-5.
- Llano E, Herrán Y, García-Tuñón I, Gutiérrez-Caballero C, de Álava E, Barbero JL, Schimenti J, de Rooij DG, Sánchez-Martín M, Pendás AM. Meiotic cohesin complexes are essential for the formation of the axial element in mice. *J. Cell Biol.* 2012 [Epub ahead of print].
- Herrán Y, Gutiérrez-Caballero C, Sánchez-Martín M, Hernández T, Viera A, Barbero JL, de Álava E, de Rooij DG, Suja JÁ, Llano E, Pendás AM. The cohesin subunit RAD21L functions in meiotic synapsis and exhibits sexual dimorphism in fertility. *EMBO J.* 2011; 30(15):3091-105.
- Hodges CA, Revenkova E, Jessberger R, Hassold TJ, Hunt PA. SMC1beta-deficient female mice provide evidence that cohesins are a missing link in age-related nondisjunction. *Nat. Genet.* 2005; 37(12):1351-5.
- Holland AJ, Cleveland DW. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009; 10(7):478-87.
- Horsfield JA, Anagnostou SH, Hu JK, Cho KH, Geisler R, Lieschke G, Crosier KE, Crosier PS. Cohesin-dependent regulation of Runx genes. *Development* 2007; 134(14):2639-49.

- Huang J, Li T, Ding CH, Brosens J, Zhou CQ, Wang HH, Xu YW. Insufficient histone-3 lysine-9 deacetylation in human oocytes matured in vitro is associated with aberrant meiosis. *Fertil. Steril.* 2012; 97(1):178-84.e3.
- Huang X, Andreu-Vieyra CV, York JP, Hatcher R, Lu T, Matzuk MM, Zhang P. Inhibitory phosphorylation of separase is essential for genome stability and viability of murine embryonic germ cells. *PLoS Biol.* 2008; 6(1):e15.
- Huang X, Hatcher R, York JP, Zhang P. Securin and separase phosphorylation act redundantly to maintain sister chromatid cohesion in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell.* 2005; 16(10):4725-32.
- Huang H, Feng J, Famulski J, Rattner JB, Liu ST, Kao GD, Muschel R, Chan GK, Yen TJ. Tripin/hSgo2 recruits MCAK to the inner centromere to correct defective kinetochore attachments. *J. Cell Biol.* 2007; 177(3):413-24.
- Indjeian VB, Stern BM, Murray AW. The centromeric protein Sgo1 is required to sense lack of tension on mitotic chromosomes. *Science* 2005; 307(5706):130-33.
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003; 4(2):249-64.
- Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(4):e15.
- Ishiguro K, Kim J, Fujiyama-Nakamura S, Kato S, Watanabe Y. A new meiosis-specific cohesin complex implicated in the cohesin code for homologous pairing. *EMBO Rep.* 2011; 12(3):267-75.
- Ishiguro T, Tanaka K, Sakuno T, Watanabe Y. Shugoshin-PP2A counteracts casein-kinase-1-dependent cleavage of Rec8 by separase. *Nat. Cell Biol.* 2010; 12(5):500-6.
- Ishii S, Kurasawa Y, Wong J, Yu-Lee LY. Histone deacetylase 3 localizes to the mitotic spindle and is required for kinetochore-microtubule attachment. *PNAS* 2008; 105(11):4179-84.
- Iwaizumi M, Shinmura K, Mori H, Yamada H, Suzuki M, Kitayama Y, Igarashi H, Nakamura T, Suzuki H, Watanabe Y, Hishida A, Ikuma M, Sugimura H. Human Sgo1 downregulation leads to chromosomal instability in colorectal cancer. *Gut.* 2009; 58(2):249-60.
- Jacks T, Remington L, Williams BO, Schmitt EM, Halachmi S, Bronson RT, Weinberg RA. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr. Biol.* 1994; 4(1):1-7.
- Jäger H, Herzig A, Lehner CF, Heidmann S. *Drosophila* separase is required for sister chromatid separation and binds to PIM and THR. *Genes Dev.* 2001; 15(19):2572-84.

- Janssen A, van der Burg M, Szuhai K, Kops GJ, Medema RH. Chromosome segregation errors as a cause of DNA damage and structural chromosome aberrations. *Science*. 2011; 333(6051):1895-8.
- Jessberger R, Riwar B, Baechtold H, Akhmedov AT. SMC proteins constitute two subunits of the mammalian recombination complex RC-1. *EMBO J*. 1996; 15(15):4061-8.
- Jessberger R. Age-related aneuploidy through cohesion exhaustion. *EMBO Rep*. 2012; 13(6):539-46.
- Jessberger R. Cohesin complexes get more complex: the novel kleisin RAD21L. *Cell Cycle* 2011; 10(13):2053-4.
- Kagawa W, Kurumizaka, H. From meiosis to postmeiotic events: uncovering the molecular roles of the meiosis-specific recombinase Dmc1. *FEBS J*. 2010; 277(3):590-8.
- Kagey MH, Newman JJ, Bilodeau S, Zhan Y, Orlando DA, van Berkum NL, Ebmeier CC, Goossens J, Rahl PB, Levine SS, Taatjes DJ, Dekker J, Young RA. Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* 2010; 467(7314):430-5.
- Kahyo T, Iwaizumi M, Shinmura K, Matsuura S, Nakamura T, Watanabe Y, Yamada H, Sugimura H. A novel tumor-derived SGOL1 variant causes abnormal mitosis and unstable chromatid cohesion. *Oncogene* 2011; 30(44):4453-63.
- Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, Quelle DE, Downing JR, Ashmun RA, Grosveld G, Sherr CJ. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 1997; 91(5):649-59.
- Kammerer S, Roth RB, Reneland R, Marnellos G, Hoyal CR, Markward NJ, Ebner F, Kiechle M, Schwarz-Boeger U, Griffiths LR, Ulbrich C, Chrobok K, Forster G, Praetorius GM, Meyer P, Rehbock J, Cantor CR, Nelson MR, Braun A. Large-scale association study identifies ICAM gene region as breast and prostate cancer susceptibility locus. *Cancer Res*. 2004; 64(24):8906-10.
- Kapoor TM, Mayer TU, Coughlin ML, Mitchison TJ. Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J. Cell Biol*. 2000; 150(5):975-88.
- Katis VL, Galova M, Rabitsch KP, Gregan J, Nasmyth K. Maintenance of cohesin at centromeres after meiosis I in budding yeast requires a kinetochore-associated protein related to MEI-S332. *Curr. Biol*. 2004; 14(7):560-72.

- Lipp JJ, Imre R, Bogdanova A, Okaz E, Habermann B, Mechtler K, Nasmyth K, Zachariae W. Rec8 phosphorylation by casein kinase 1 and Cdc7-Dbf4 kinase regulates cohesin cleavage by separase during meiosis. *Dev. Cell* 2010; 18(3):397–409.
- Kato A, Touhara K. Mammalian olfactory receptors: pharmacology, G protein coupling and desensitization. *Cell Mol Life Sci.* 2009 Dec;66(23):3743-53. Epub 2009 Aug 4.
- Kawashima, S.A. Tsukahara T, Langegger M, Hauf S, Kitajima TS, Watanabe Y. Shugoshin enables tension-generating attachment of kinetochores by loading Aurora to centromeres. *Genes Dev.* 2007; 21(4):420–35.
- Kawashima SA, Yamagishi Y, Honda T, Ishiguro K, Watanabe Y. Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin. *Science* 2010; 327(5962): 172–7.
- Kawauchi S, Calof AL, Santos R, Lopez-Burks ME, Young CM, Hoang MP, Chua A, Lao T, Lechner MS, Daniel JA, Nussenzweig A, Kitzes L, Yokomori K, Hallgrímsson B, Lander AD. Multiple organ system defects and transcriptional dysregulation in the Nipbl(+/-) mouse, a model of Cornelia de Lange Syndrome. *PLoS Genet.* 2009; 5(9):e1000650.
- Kim BJ, Li Y, Zhang J, Xi Y, Li Y, Yang T, Jung SY, Pan X, Chen R, Li W, Wang Y, Qin J. Genome-wide reinforcement of cohesin binding at pre-existing cohesin sites in response to ionizing radiation in human cells. *J. Biol Chem.* 2010; 285(30):22784-92.
- Kim EM, Burke DJ. DNA damage activates the SAC in an ATM/ATR-dependent manner, independently of the kinetochore. *PLoS Genet.* 2008; 4(2):e1000015.
- Kim HS, Vassilopoulos A, Wang RH, Lahusen T, Xiao Z, Xu X, Li C, Veenstra TD, Li B, Yu H, Ji J, Wang XW, Park SH, Cha YI, Gius D, Deng CX. SIRT2 maintains genome integrity and suppresses tumorigenesis through regulating APC/C activity. *Cancer Cell.* 2011; 20(4):487-99.
- Kim JM, Liu H, Tazaki M, Nagata M, Aoki F. Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis. *J. Cell Biol.* 2003; 162(1):37-46.
- Kitajima TS, Miyazaki Y, Yamamoto M, Watanabe Y. Rec8 cleavage by separase is required for meiotic nuclear divisions in fission yeast. *EMBO J.* 2003; 22(20):5643-53.
- Kitajima TS, Hauf S, Ohsugi M, Yamamoto T, Watanabe Y. Human Bub1 defines the persistent cohesion site along the mitotic chromosome by affecting Shugoshin localization. *Curr. Biol.* 2005; 15(4):353–359.
- Kitajima TS, Kawashima SA, Watanabe Y. The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* 2004; 427(6974):510–7.

- Kitajima TS, Sakuno T, Ishiguro K, Iemura S, Natsume T, Kawashima SA, Watanabe Y. Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* 2006; 441(7089):46–52.
- Klein F, Mahr P, Galova M, Buonomo SB, Michaelis C, Nairz K, Nasmyth K. A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* 1999; 98(1):91-103.
- Kline-Smith SL, Khodjakov A, Hergert P, Walczak CE. Depletion of centromeric MCAK leads to chromosome congression and segregation defects due to improper kinetochore attachments. *Mol Biol Cell*. 2004; 15(3):1146-59.
- Kollu S, Bakhom SF, Compton DA. Interplay of microtubule dynamics and sliding during bipolar spindle formation in mammalian cells. *Curr. Biol.* 2009; 19(24):2108-13.
- Komlodi-Pasztor E, Sackett DL, Fojo AT. Inhibitors targeting mitosis: tales of how great drugs against a promising target were brought down by a flawed rationale. *Clin. Cancer Res.* 2012; 18(1):51-63.
- Kouznetsova A, Benavente R, Pastink A, Höög C. Meiosis in mice without a synaptonemal complex. *PLoS One*. 2011; 6(12):e28255.
- Krantz ID, McCallum J, DeScipio C, Kaur M, Gillis LA, Yaeger D, Jukofsky L, Wasserman N, Bottani A, Morris CA, Nowaczyk MJ, Toriello H, Bamshad MJ, Carey JC, Rappaport E, Kawauchi S, Lander AD, Calof AL, Li HH, Devoto M, Jackson LG. Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homolog of *Drosophila melanogaster* Nipped-B. *Nat. Genet.* 2004; 36(6):631-5.
- Kudo NR, Anger M, Peters AH, Stemmann O, Theussl HC, Helmhart W, Kudo H, Heyting C, Nasmyth K. Role of cleavage by separase of the Rec8 kleisin subunit of cohesin during mammalian meiosis I. *J. Cell Sci.* 2009; 122(Pt 15):2686-98.
- Kudo NR, Wassmann K, Anger M, Schuh M, Wirth KG, Xu H, Helmhart W, Kudo H, McKay M, Maro B, Ellenberg J, de Boer P, Nasmyth K. Resolution of chiasmata in oocytes requires separase-mediated proteolysis. *Cell* 2006; 126(1):135–46.
- Kueng S, Hegemann B, Peters BH, Lipp JJ, Schleiffer A, Mechtler K, Peters JM. Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin. *Cell* 2006; 127(5):955-67.
- Kumada K, Yao R, Kawaguchi T, Karasawa M, Hoshikawa Y, Ichikawa K, Sugitani Y, Imoto I, Inazawa J, Sugawara M, Yanagida M, Noda T. The selective continued linkage of centromeres from mitosis to interphase in the absence of mammalian separase. *J. Cell Biol.* 2006; 172(6):835-46.

- Kuroda M, Oikawa K, Ohbayashi T, Yoshida K, Yamada K, Mimura J, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y, Mukai K. A dioxin sensitive gene, mammalian WAPL, is implicated in spermatogenesis. *FEBS Lett.* 2005; 579(1):167-72.
- Kurze A, Michie KA, Dixon SE, Mishra A, Itoh T, Khalid S, Strmecki L, Shirahige K, Haering CH, Löwe J, Nasmyth K. A positively charged channel within the Smc1/Smc3 hinge required for sister chromatid cohesion. *EMBO J.* 2011; 30(2):364-78.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259):680-5.
- Lammers JH, Offenbergh HH, van Aalderen M, Vink AC, Dietrich AJ, Heyting C. The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol. Cell Biol.* 1994; 14(2):1137-46.
- Lampson MA, Cheeseman IM. Sensing centromere tension: Aurora B and the regulation of kinetochore function. *Trends Cell Biol.* 2010; 21(3):133-40.
- Latres E, Malumbres M, Sotillo R, Martín J, Ortega S, Martín-Caballero J, Flores JM, Cordon-Cardo C, Barbacid M. Limited overlapping roles of P15(INK4b) and P18(INK4c) cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis. *EMBO J.* 2000; 19(13):3496-506.
- Lee J, Hirano T. RAD21L, a novel cohesin subunit implicated in linking homologous chromosomes in mammalian meiosis. *J. Cell Biol.* 2011; 192(2):263-76.
- Lee J, Kitajima TS, Tanno Y, Yoshida K, Morita T, Miyano T, Miyake M, Watanabe Y. Unified mode of centromeric protection by shugoshin in mammalian oocytes and somatic cells. *Nat. Cell Biol.* 2008; 10(1):42-52.
- Lian ZR, Xu YF, Wang XB, Gong JP, Liu ZJ. Suppression of histone deacetylase 11 promotes expression of IL-10 in kupffer cells and induces tolerance following orthotopic liver transplantation in rats. *J. Surg. Res.* 2012; 174(2):359-68.
- Lister LM, Kouznetsova A, Hyslop LA, Kalleas D, Pace SL, Barel JC, Nathan A, Floros V, Adelfalk C, Watanabe Y, Jessberger R, Kirkwood TB, Höög C, Herbert M. Age-related meiotic segregation errors in mammalian oocytes are preceded by depletion of cohesin and Sgo2. *Curr. Biol.* 2010; 20(17):1511-21.
- Liu H, Hu Q, Kaufman A, D'Ercole AJ, Ye P. Developmental expression of histone deacetylase 11 in the murine brain. *J. Neurosci. Res.* 2008; 86(3):537-43.
- Liu J, Krantz ID. Cornelia de Lange syndrome, cohesin, and beyond. *Clin. Genet.* 2009; 76(4):303-14.

- Liu JG, Yuan L, Brundell E, Björkroth B, Daneholt B, Höög C. Localization of the N-terminus of SCP1 to the central element of the synaptonemal complex and evidence for direct interactions between the N-termini of SCP1 molecules organized head-to-head. *Exp. Cell Res.* 1996; 226(1):11-9.
- Llano E, Gómez R, Gutiérrez-Caballero C, Herrán Y, Sánchez-Martín M, Vázquez-Quñones L, Hernández T, de Alava E, Cuadrado A, Barbero JL, Suja JA, Pendás AM. Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Genes Dev.* 2008; 22(17):2400-13.
- Losada A, Hirano M, Hirano T. Identification of Xenopus SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev.* 1998; 12(13):1986-97.
- Losada A, Yokochi T, Hirano T. Functional contribution of Pds5 to cohesin-mediated cohesion in human cells and Xenopus egg extracts. *J. Cell Sci.* 2005; 118(Pt 10):2133-41.
- Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, Housman DE, Jacks T. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 1994; 266(5186):807-10.
- Luke MP, Sui G, Liu H, Shi Y. Yin Yang 1 physically interacts with Hoxa11 and represses Hoxa11-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(44):33226-32.
- Lushnikova T, Bouska A, Odvody J, Dupont WD, Eischen CM. Aging mice have increased chromosome instability that is exacerbated by elevated Mdm2 expression. *Oncogene* 2011; 30(46):4622-31.
- Magklara A, Yen A, Colquitt BM, Clowney EJ, Allen W, Markenscoff-Papadimitriou E, Evans ZA, Kheradpour P, Mountoufaris G, Carey C, Barnea G, Kellis M, Lomvardas S. An epigenetic signature for monoallelic olfactory receptor expression. *Cell* 2011; 145(4):555-70.
- Magnaghi-Jaulin L, Eot-Houllier G, Fulcrand G, Jaulin C. Histone deacetylase inhibitors induce premature sister chromatid separation and override the mitotic spindle assembly checkpoint. *Cancer Res.* 2007; 67(13):6360-7.
- Maguire MP. Letter: The need for a chiasma binder. *J. Theor. Biol.* 1974; 48(2):485-487.
- Mahadevaiah SK, Turner JM, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, Blanco-Rodríguez J, Jasin M, Keeney S, Bonner WM, Burgoyne PS. Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet.* 2001; 27(3):271-6.
- Margolis RL, Lohez OD, Andreassen PR. G1 tetraploidy checkpoint and the suppression of tumorigenesis. *J. Cell Biochem.* 2003; 88(4):673-83.

- Mayer TU, Kapoor TM, Haggarty SJ, King RW, Schreiber SL, Mitchison TJ. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* 1999; 286(5441):971-4.
- McGuinness, B.E. Hirota T, Kudo NR, Peters JM, Nasmyth K. Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. *PLoS Biol.* 2005; 3(3):e86.
- Metazoan Scc4 homologs link sister chromatid cohesion to cell and axon migration guidance. *PLoS Biol.* 4:e242.
- Meuwissen RL, Offenberg HH, Dietrich AJ, Riesewijk A, van Iersel M, Heyting C. A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J.* 1992; 11(13):5091-100.
- Meyer R, Fofanov V, Panigrahi A, Merchant F, Zhang N, Pati D. Overexpression and mislocalization of the chromosomal segregation protein separase in multiple human cancers. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15(8):2703-10.
- Michaelis C, Ciosk R, Nasmyth K. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* 1997; 91(1):35-45.
- Mitchison TJ, Salmon ED. Mitosis: a history of division. *Nat. Cell Biol.* 2001; 3(1):E17-21.
- Mukherjee M, Ge G, Zhang N, Huang E, Nakamura LV, Minor M, Fofanov V, Rao PH, Herron A, Pati D. Separase loss of function cooperates with the loss of p53 in the initiation and progression of T- and B-cell lymphoma, leukemia and aneuploidy in mice. *PLoS One* 2011; 6(7):e22167.
- Musio A, Selicorni A, Focarelli ML, Gervasini C, Milani D, Russo S, Vezzoni P, Larizza L. X-linked Cornelia de Lange syndrome owing to SMC1L1 mutations. *Nat. Genet* 2006; 38(5):528-30.
- Nagao K, Adachi Y, Yanagida M. Separase-mediated cleavage of cohesin at interphase is required for DNA repair. *Nature* 2004; 430(7003):1044-8.
- Nakamura A, Arai H, Fujita N. Centrosomal Aki1 and cohesin function in separase-regulated centriole disengagement. *J. Cell Biol.* 2009; 187(5):607-14.
- Nasmyth K. Cohesin: a catenase with separate entry and exit gates? *Nat. Cell Biol.* 2011; 13(10):1170-7.
- Nasmyth K. Segregating sister genomes: The molecular biology of chromosome separation. *Science* 2002; 297(5581):559-65.

- Nelson MA, Futscher BW, Kinsella T, Wymer J, Bowden GT. Detection of mutant Ha-ras genes in chemically initiated mouse skin epidermis before the development of benign tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992; 89(14):6398-402.
- Nguyen CL, Münger K Human papillomavirus E7 protein deregulates mitosis via an association with nuclear mitotic apparatus protein 1. *J. Virol.* 2009; 83(4):1700-7.
- Nicklas RB. The forces that move chromosomes in mitosis. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1988; 17:431-49.
- Nicklas RB. The motor for poleward chromosome movement in anaphase is in or near the kinetochore. *J. Cell Biol.* 1989; 109(5):2245-55.
- Nishiyama T, Ladurner R, Schmitz J, Kreidl E, Schleiffer A, Bhaskara V, Bando M, Shirahige K, Hyman AA, Mechtler K, Peters JM. Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl. *Cell.* 2010; 143(5):737-49.
- Nitzsche A, Paszkowski-Rogacz M, Matarese F, Janssen-Megens EM, Hubner NC, Schulz H, de Vries I, Ding L, Huebner N, Mann M, Stunnenberg HG, Buchholz F. RAD21 cooperates with pluripotency transcription factors in the maintenance of embryonic stem cell identity. *PLoS One.* 2011; 6(5):e19470.
- Ohbayashi T, Oikawa K, Yamada K, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Satoh H, Mukai H, Mukai K, Kuroda M. Unscheduled overexpression of human WAPL promotes chromosomal instability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 356(3):699-704.
- Oikawa K, Ohbayashi T, Kiyono T, Nishi H, Isaka K, Umezawa A, Kuroda M, Mukai K. Expression of a novel human gene, human wings apart-like (hWAPL), is associated with cervical carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res.* 2004; 64(10):3545-9.
- Oikawa T, Okuda M, Ma Z, Goorha R, Tsujimoto H, Inokuma H, Fukasawa K. Transcriptional control of BubR1 by p53 and suppression of centrosome amplification by BubR1. *Mol. Cell Biol.* 2005; 25(10):4046-61.
- Page SL, Hawley RS. Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* 2003; 301(5634):785-789.
- Panizza S, Tanaka T, Hochwagen A, Eisenhaber F, Nasmyth K. Pds5 cooperates with cohesin in maintaining sister chromatid cohesion. *Curr. Biol.* 2000; 10(24):1557-64.
- Parelho V, Hadjur S, Spivakov M, Leleu M, Sauer S, Gregson HC, Jarmuz A, Canzonetta C, Webster Z, Nesterova T, Cobb BS, Yokomori K, Dillon N, Aragon L, Fisher AG, Merkenschlager M. Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell* 2008; 132(3):422-33.

- Parisi S, McKay MJ, Molnar M, Thompson MA, van der Spek PJ, van Drunen-Schoenmaker E, Kanaar R, Lehmann E, Hoeijmakers JH, Kohli J. Rec8p, a meiotic recombination and sister chromatid cohesion phosphoprotein of the Rad21p family conserved from fission yeast to humans. *Mol. Cell Biol.* 1999; 19(5):3515-28.
- Parra MT, Page J, Yen TJ, He D, Valdeolmillos A, Rufas JS, Suja JA. Expression and behaviour of CENP-E at kinetochores during mouse spermatogenesis. *Chromosoma* 2002; 111(1):53-61.
- Parra MT, Viera A, Gómez R, Page J, Benavente R, Santos JL, Rufas JS, Suja JA. Involvement of the cohesin Rad21 and SCP3 in monopolar attachment of sister kinetochores during mouse meiosis I. *J. Cell Sci.* 2004; 117(Pt 7):1221-34.
- Pati D. Oncogenic activity of separase. *Cell Cycle* 2008; 7(22):3481-2.
- Peacocke M, Campisi J. Cellular senescence: a reflection of normal growth control, differentiation or aging? *J. Cell Biochem.* 1991; 45(2):147-55.
- Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol. Endocrinol.* 1997; 11(4):433-41.
- Pelttari J, Hoja MR, Yuan L, Liu JG, Brundell E, Moens P, Santucci-Darmanin S, Jessberger R, Barbero JL, Heyting C, Höög C. 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.* 2001; 21(16):5667-77.
- Perera D, Taylor SS. Sgo1 establishes the centromeric cohesion protection mechanism in G2 before subsequent Bub1-dependent recruitment in mitosis. *J. Cell Sci.* 2010; 123(Pt 5):653-9.
- Perrimon N, Engstrom L, Mahowald AP. Developmental genetics of the 2C-D region of the *Drosophila* X chromosome. *Genetics* 1985; 111(1):23-41.
- Peserico A, Simone C. Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011; 2011:371832.
- Peters AH, Plug AW, van Vugt MJ, de Boer P. Drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome Res.* 1997; 5(1):66-71.
- Peters JM, Tedeschi A, Schmitz J. The cohesin complex and its roles in chromosome biology. *Genes Dev.* 2008; 22(22):3089-114.
- Petronczki M, Siomos MF, Nasmyth K. Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 2003; 112(4):423-40.

- Porkka KP, Tammela TL, Vessella RL, Visakorpi T. RAD21 and KIAA0196 at 8q24 are amplified and overexpressed in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004; 39(1):1-10.
- Pothof J, van Haaften G, Thijssen K, Kamath RS, Fraser AG, Ahringer J, Plasterk RH, Tijsterman M. Identification of genes that protect the *C. elegans* genome against mutations by genome-wide RNAi. *Genes Dev*. 2003; 17(4):443-8.
- Pouwels, J. Kukkonen AM, Lan W, Daum JR, Gorbisky GJ, Stukenberg T, Kallio MJ. Shugoshin 1 plays a central role in kinetochore assembly and is required for kinetochore targeting of Plk1. *Cell Cycle* 2007; 6(13):1579-85.
- Prieto I, Suja JA, Pezzi N, Kremer L, Martínez-A C, Rufas JS, Barbero JL. Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat. Cell Biol*. 2001; 3(8):761-766.
- Quintanilla M, Brown K, Ramsden M, Balmain A. Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* 1986; 322(6074):78-80.
- Rabitsch KP, Gregan J, Schleiffer A, Javerzat JP, Eisenhaber F, Nasmyth K. Two fission yeast homologs of *Drosophila* Mei-S332 are required for chromosome segregation during meiosis I and II. *Curr. Biol*. 2004; 14(4), 287–301.
- Rajagopalan H, Lengauer C. Aneuploidy and cancer. *Nature* 2004; 432(7015):338–41.
- Rankin S, Ayad NG, Kirschner MW. Sororin, a substrate of the anaphase-promoting complex, is required for sister chromatid cohesion in vertebrates. *Mol. Cell*. 2005; 18(2):185-200.
- Remeseiro S, Cuadrado A, Carretero M, Martínez P, Drosopoulos WC, Cañamero M, Schildkraut CL, Blasco MA, Losada A. Cohesin-SA1 deficiency drives aneuploidy and tumorigenesis in mice due to impaired replication of telomeres. *EMBO J*. 2012b; 31(9):2076-89.
- Remeseiro S, Cuadrado A, Gómez-López G, Pisano DG, Losada A. A unique role of cohesin-SA1 in gene regulation and development. *EMBO J*. 2012; 31(9):2090-102.
- Resnick TD, Satinover DL, Maclsaac F, Stukenberg PT, Earnshaw WC, Orr-Weaver TL, Carmena M. INCENP and Aurora B promote meiotic sister chromatid cohesion through localization of the Shugoshin MEI-S332 in *Drosophila*. *Dev. Cell*. 2006; 11(1):57-68.
- Revenkova E, Eijpe M, Heyting C, Gross B, Jessberger R. Novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1. *Mol. Cell Biol*. 2001; 21(20):6984-98.
- Revenkova E, Eijpe M, Heyting C, Hodges CA, Hunt PA, Liebe B, Scherthan H, Jessberger R. Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat. Cell Biol*. 2004; 6(6):555-62.

- Rhodes JM, McEwan M, Horsfield JA. Gene regulation by cohesin in cancer: is the ring an unexpected party to proliferation? *Mol. Cancer Res.* 2011; 9(12):1587-607.
- Rivera T, Losada A. Shugoshin regulates cohesion by driving relocalization of PP2A in *Xenopus* extracts. *Chromosoma* 2008; 118(2):223-233.
- Rivera T, Ghenoiu C, Rodríguez-Corsino M, Mochida S, Funabiki H, Losada A. *Xenopus* Shugoshin 2 regulates the spindle assembly pathway mediated by the chromosomal passenger complex. *EMBO J.* 2012; 31(6):1467-79.
- Rodríguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymecki SM. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat. Genet.* 2000; 25(2):139-40.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* 1999; 146(5):905-16.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(10):5858-68.
- Rolef Ben-Shahar T, Heeger S, Lehane C, East P, Flynn H, Skehel M, Uhlmann F: Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion. *Science* 2008, 321(5888):563-6.
- Rollins RA, Korom M, Aulner N, Martens A, Dorsett D. *Drosophila* nipped-B protein supports sister chromatid cohesion and opposes the stromalin/Scc3 cohesion factor to facilitate long-range activation of the cut gene. *Mol. Cell Biol.* 2004; 24(8):3100-11.
- Rollins RA, Morcillo P, Dorsett D. Nipped-B, a *Drosophila* homologue of chromosomal adherins, participates in activation by remote enhancers in the cut and Ultrabithorax genes. *Genetics.* 1999; 152(2):577-93.
- Rowland BD, Roig MB, Nishino T, Kurze A, Uluocak P, Mishra A, Beckouët F, Underwood P, Metson J, Imre R, Mechtler K, Katis VL, Nasmyth K. Building sister chromatid cohesion: smc3 acetylation counteracts an antiestablishment activity. *Mol. Cell* 2009; 33(6):763-74.
- Rumpf C, Cipak L, Dudas A, Benko Z, Pozgajova M, Riedel CG, Ammerer G, Mechtler K, Gregan J. Casein kinase 1 is required for efficient removal of Rec8 during meiosis I. *Cell Cycle.* 2010; 9(13):2657-62.
- Rundhaug JE, Fischer SM. Molecular Mechanisms of Mouse Skin Tumor Promotion. *Cancers (Basel).* 2010; 2(2):436-482.
- Ryu B, Kim DS, Deluca AM, Alani RM. Comprehensive expression profiling of tumor cell lines identifies molecular signatures of melanoma progression. *PLoS One.* 2007; 2(7):e594.

- Salic, A. Waters JC, Mitchison TJ. Vertebrate Shugoshin Links Sister Centromere Cohesion and Kinetochore Microtubule Stability in Mitosis. *Cell* 2004; 118(5):567–578.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 1989, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez Y, Bachant J, Wang H, Hu F, Liu D, Tetzlaff M, Elledge SJ. Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science* 1999; 286(5442):1166-71.
- Sanhaji M, Friel CT, Wordeman L, Louwen F, Yuan J. Mitotic centromere-associated kinesin (MCAK): a potential cancer drug target. *Oncotarget* 2011; 2(12):935-47.
- Scanlan MJ, Gout I, Gordon CM, Williamson B, Stockert E, Gure AO, Jäger D, Chen YT, Mackay A, O'Hare MJ, Old LJ. Humoral immunity to human breast cancer: antigen definition and quantitative analysis of mRNA expression. *Cancer Immun.* 2001; 1:4.
- Schalk JA, Dietrich AJ, Vink AC, Offenbergh HH, van Aalderen M, Heyting C. Localization of SCP2 and SCP3 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Chromosoma* 1998; 107(8):540-8.
- Scheffner M, Münger K, Byrne JC, Howley PM. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991; 88(13):5523-7.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63(6):1129-36.
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1993; 75(3):495-505.
- Schleiffer A, Kaitna S, Maurer-Stroh S, Glotzer M, Nasmyth K, Eisenhaber F. Kleisins: a superfamily of bacterial and eukaryotic SMC protein partners. *Mol. Cell* 2003; 11(3):571-5.
- Schmidt D, Schwalie PC, Ross-Innes CS, Hurtado A, Brown GD, Carroll JS, Flicek P, Odom DT. A CTCF-independent role for cohesin in tissue-specific transcription. *Genome Res.* 2010; 20(5):578-88.
- Schmitz J, Watrin E, Lénárt P, Mechtler K, Peters JM. Sororin is required for stable binding of cohesin to chromatin and for sister chromatid cohesion in interphase. *Curr. Biol.* 2007; 17(7):630-6.
- Schnütgen F, De-Zolt S, Van Sloun P, Hollatz M, Floss T, Hansen J, Altschmied J, Seisenberger C, Ghyselinck NB, Ruiz P, Chambon P, Wurst W, von Melchner H.

- Genomewide production of multipurpose alleles for the functional analysis of the mouse genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005; 102(20):7221-6.
- Schöckel L, Möckel M, Mayer B, Boos D, Stemmann O. Cleavage of cohesin rings coordinates the separation of centrioles and chromatids. *Nat. Cell Biol.* 2011; 13(8):966-72.
- Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985; 314(6006):111-4.
- Seitan VC, Banks P, Laval S, Majid NA, Dorsett D, Rana A, Smith J, Bateman A, Krpic S, Hostert A, Rollins RA, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Benard CY, Hekimi S, Newbury SF, Strachan T. Metazoan Scc4 homologs link sister chromatid cohesion to cell and axon migration guidance. *PLoS Biol.* 2006; 4(8):e242.
- Serrano M, Blasco MA. Putting the stress on senescence. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001; 13(6):748-53.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997; 88(5):593-602.
- Severson AF, Ling L, van Zuylen V, Meyer BJ. The axial element protein HTP-3 promotes cohesin loading and meiotic axis assembly in *C. elegans* to implement the meiotic program of chromosome segregation. *Genes Dev.* 2009; 23(15):1763-78.
- Sheltzer JM, Blank HM, Pfau SJ, Tange Y, George BM, Humpton TJ, Brito IL, Hiraoka Y, Niwa O, Amon A. Aneuploidy drives genomic instability in yeast. *Science* 2011; 333(6045):1026-30.
- Shepard JL, Amatruda JF, Finkelstein D, Ziai J, Finley KR, Stern HM, Chiang K, Hersey C, Barut B, Freeman JL, Lee C, Glickman JN, Kutok JL, Aster JC, Zon LI. A mutation in separase causes genome instability and increased susceptibility to epithelial cancer. *Genes Dev.* 2007; 21(1):55-9.
- Sherr J, DePinho RA. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 2000; 102(4):407-10.
- Shin YH, Choi Y, Erdin SU, Yatsenko SA, Kloc M, Yang F, Wang PJ, Meistrich ML, Rajkovic A. Hormad1 mutation disrupts synaptonemal complex formation, recombination, and chromosome segregation in mammalian meiosis. *PLoS Genet.* 2010; 6(11):e1001190.
- Shintomi K, Hirano T. Releasing cohesin from chromosome arms in early mitosis: opposing actions of Wapl-Pds5 and Sgo1. *Genes Dev.* 2009; 23(18):2224-36.

- Shykind BM. Regulation of odorant receptors: one allele at a time. *Hum. Mol. Genet.* 2005; 14 Spec No 1:R33-9.
- Silva P, Barbosa J, Nascimento AV, Faria J, Reis R, Bousbaa H. Monitoring the fidelity of mitotic chromosome segregation by the spindle assembly checkpoint. *Cell Prolif.* 2011; 44(5):391-400.
- Siomos MF, Badrinath A, Pasierbek P, Livingstone D, White J, Glotzer M, Nasmyth K. Separase is required for chromosome segregation during meiosis I in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 2001; 11(23):1825-35.
- Sjögren C, Nasmyth K. Sister chromatid cohesion is required for postreplicative double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Biol.* 2001; 11(12):991-5.
- Solomon DA, Kim T, Diaz-Martinez LA, Fair J, Elkahloun AG, Harris BT, Toretsky JA, Rosenberg SA, Shukla N, Ladanyi M, Samuels Y, James CD, Yu H, Kim JS, Waldman T. Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer. *Science* 2011; 333(6045):1039-43.
- Spange S, Wagner T, Heinzl T, Krämer OH. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 41(1):185-98.
- Spehr M, Schwane K, Riffell JA, Barbour J, Zimmer RK, Neuhaus EM, Hatt H. Particulate adenylate cyclase plays a key role in human sperm olfactory receptor-mediated chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(38):40194-203.
- Spehr M, Schwane K, Riffell JA, Zimmer RK, Hatt H. Odorant receptors and olfactory-like signaling mechanisms in mammalian sperm. *Mol. Cell Endocrinol.* 2006; 250(1-2):128-36.
- Stead K, Aguilar C, Hartman T, Drexel M, Meluh P, Guacci V. Pds5p regulates the maintenance of sister chromatid cohesion and is sumoylated to promote the dissolution of cohesion. *J. Cell Biol.* 2003; 163(4):729-41.
- Stemmann O, Zou H, Gerber SA, Gygi SP, Kirschner MW. Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell* 2001; 107(6):715-26.
- Ström L, Karlsson C, Lindroos HB, Wedahl S, Katou Y, Shirahige K, Sjögren C. Postreplicative formation of cohesion is required for repair and induced by a single DNA break. *Science* 2007; 317(5835):242-5.
- Strunnikov AV, Larionov VL, Koshland D. SMC1: an essential yeast gene encoding a putative head-rod-tail protein is required for nuclear division and defines a new ubiquitous protein family. *J. Cell Biol.* 1993; 123(6 Pt 2):1635-48.

- Sumara I, Vorlaufer E, Gieffers C, Peters BH, Peters JM. Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J. Cell Biol.* 2000; 151(4):749-62.
- Symington LS, Gautier J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu. Rev. Genet.* 2011; 45:247-71.
- Tachibana-Konwalski K, Godwin J, van der Weyden L, Champion L, Kudo NR, Adams DJ, Nasmyth K. Rec8-containing cohesin maintains bivalents without turnover during the growing phase of mouse oocytes. *Genes Dev.* 2010; 24(22):2505-16.
- Takata H, Matsunaga S, Morimoto A, Ma N, Kurihara D, Ono-Maniwa R, Nakagawa M, Azuma T, Uchiyama S, Fukui K. PHB2 protects sister-chromatid cohesion in mitosis. *Curr. Biol.* 2007; 17(15):1356-61.
- Tanaka K, Hao Z, Kai M, Okayama H. Establishment and maintenance of sister chromatid cohesion in fission yeast by a unique mechanism. *EMBO J.* 2001; 20(20):5779-90.
- Tanaka K, Hirota T. Chromosome segregation machinery and cancer. *Cancer Sci.* 2009; 100(7):1158-65.
- Tang Z, Shu H, Qi W, Mahmood NA, Mumby MC, Yu H. PP2A is required for centromeric localization of Sgo1 and proper chromosome segregation. *Dev. Cell* 2006; 10(5):575-85.
- Tang Z, Sun Y, Harley SE, Zou H, Yu H. Human Bub1 protects centromeric sister-chromatid cohesion through Shugoshin during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004; 101(52):18012-7.
- Tanno, Y. Kitajima TS, Honda T, Ando Y, Ishiguro K, Watanabe Y. Phosphorylation of mammalian Sgo2 by Aurora B recruits PP2A and MCAK to centromeres. *Genes Dev.* 2010 24(19):2169-2179.
- Todaro GJ, Green H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established cell lines. *J. Cell Biol.* 1963; 17, 299–313.
- Tonkin ET, Wang TJ, Lisgo S, Bamshad MJ, Strachan T. NIPBL, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome. *Nat. Genet.* 2004; 36(6):636-41.
- Tóth A, Ciosk R, Uhlmann F, Galova M, Schleiffer A, Nasmyth K. Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. *Genes Dev.* 1999; 13(3):320-33.
- Tsukahara T, Tanno Y, Watanabe Y. Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation. *Nature* 2010; 467(7316):719-23.

- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98(9):5116-21.
- Uhlmann F, Lottspeich F, Nasmyth K. Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* 1999; 400(6739):37-42.
- Uhlmann F, Wernic D, Poupart MA, Koonin EV, Nasmyth K. Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* 2000; 103(3):375-86.
- Unal E, Arbel-Eden A, Sattler U, Shroff R, Lichten M, Haber JE, Koshland D. DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain. *Mol. Cell.* 2004; 16(6):991-1002.
- Unal E, Heidinger-Pauli JM, Koshland D. DNA double-strand breaks trigger genome-wide sister-chromatid cohesion through Eco1 (Ctf7). *Science* 2007; 317(5835):245-8.
- Valls E, Sánchez-Molina S, Martínez-Balbás MA. Role of histone modifications in marking and activating genes through mitosis. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(52):42592-600.
- van den Berg IM, Eleveld C, van der Hoeven M, Birnie E, Steegers EA, Galjaard RJ, Laven JS, van Doorninck JH. Defective deacetylation of histone 4 K12 in human oocytes is associated with advanced maternal age and chromosome misalignment. *Hum. Reprod.* 2011; 26(5):1181-90.
- Vanoosthuysen, V. Prykhozij S, Hardwick KG. Shugoshin 2 regulates localization of the chromosomal passenger proteins in fission yeast mitosis. *Mol. Biol. Cell* 2007; 18(5):1657-69.
- Vega H, Waisfisz Q, Gordillo M, Sakai N, Yanagihara I, Yamada M, van Gosliga D, Kayserili H, Xu C, Ozono K, Jabs EW, Inui K, Joenje H. Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion. *Nat. Genet.* 2005; 37(5):468-70.
- Verni F, Gandhi R, Goldberg ML, Gatti M. Genetic and molecular analysis of wings apart-like (*wapl*), a gene controlling heterochromatin organization in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 2000; 154(4):1693-710.
- Villagra A, Cheng F, Wang HW, Suarez I, Glozak M, Maurin M, Nguyen D, Wright KL, Atadja PW, Bhalla K, Pinilla-Ibarz J, Seto E, Sotomayor EM. The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance. *Nat. Immunol.* 2009; 10(1):92-100.
- Vogel C, Kienitz A, Hofmann I, Müller R, Bastians H. Crosstalk of the mitotic spindle assembly checkpoint with p53 to prevent polyploidy. *Oncogene* 2004; 23(41):6845-53.

- Vogt E, Kirsch-Volders M, Parry J, Eichenlaub-Ritter U. Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error. *Mutat. Res.* 2008; 651(1-2):14–29.
- Waizenegger I, Giménez-Abián JF, Wernic D, Peters JM. Regulation of human separase by securin binding and autocleavage. *Curr. Biol.* 2002; 12(16):1368-78.
- Waizenegger IC, Hauf S, Meinke A, Peters JM. Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* 2000; 103(3):399-410.
- Wang F, Yoder J, Antoshechkin I, Han M. *Caenorhabditis elegans* EVL-14/PDS-5 and SCC-3 are essential for sister chromatid cohesion in meiosis and mitosis. *Mol. Cell Biol.* 2003; 23(21):7698-707.
- Wang Z, Zang C, Cui K, Schones DE, Barski A, Peng W, Zhao K. Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell* 2009; 138(5):1019-31.
- Watanabe Y, Nurse P. Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* 1999; 400(6743):461-4.
- Watrin E, Peters JM. The cohesin complex is required for the DNA damage-induced G2/M checkpoint in mammalian cells. *EMBO J.* 2009; 28(17):2625-35.
- Watrin E, Schleiffer A, Tanaka K, Eisenhaber F, Nasmyth K, Peters JM. Human Scc4 is required for cohesin binding to chromatin, sister-chromatid cohesion, and mitotic progression. *Curr. Biol.* 2006; 16(9):863-74.
- Weaver BA, Cleveland DW. The role of aneuploidy in promoting and suppressing tumors. *J. Cell Biol.* 2009; 185(6):935-7.
- Weitzer S, Lehane C, Uhlmann F. A model for ATP hydrolysis-dependent binding of cohesin to DNA. *Curr. Biol.* 2003; 13(22):1930-40.
- Wendt KS, Yoshida K, Itoh T, Bando M, Koch B, Schirghuber E, Tsutsumi S, Nagae G, Ishihara K, Mishiro T, Yahata K, Imamoto F, Aburatani H, Nakao M, Imamoto N, Maeshima K, Shirahige K, Peters JM. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* 2008; 451(7180):796-801.
- Williams JP, Stewart T, Li B, Mulloy R, Dimova D, Classon M. The retinoblastoma protein is required for Ras-induced oncogenic transformation. *Mol. Cell Biol.* 2006; 26(4):1170-82.

- Wirth KG, Wutz G, Kudo NR, Desdouets C, Zetterberg A, Taghybeeglu S, Seznec J, Ducos GM, Ricci R, Firnberg N, Peters JM, Nasmyth K. Separase: a universal trigger for sister chromatid disjunction but not chromosome cycle progression. *J. Cell Biol.* 2006;172(6):847-60.
- Woo JS, Lim JH, Shin HC, Suh MK, Ku B, Lee KH, Joo K, Robinson H, Lee J, Park SY, Ha NC, Oh BH. Structural studies of a bacterial condensin complex reveal ATP-dependent disruption of intersubunit interactions. *Cell* 2009; 136(1):85-96.
- Wu CS, Chen YF, Gartenberg MR. Targeted sister chromatid cohesion by Sir2. *PLoS Genet.* 2011; 7(2):e1002000.
- Xu B, Kim ST, Lim DS, Kastan MB. Two molecularly distinct G(2)/M checkpoints are induced by ionizing irradiation. *Mol. Cell Biol.* 2002; 22(4):1049-59.
- Xu D, Bai J, Duan Q, Costa M, Dai W. Covalent modifications of histones during mitosis and meiosis. *Cell Cycle* 2009; 8(22):3688-94.
- Xu H, Balakrishnan K, Malaterre J, Beasley M, Yan Y, Essers J, Appeldoorn E, Tomaszewski JM, Vazquez M, Verschoor S, Lavin MF, Bertoncetto I, Ramsay RG, McKay MJ. Rad21-cohesin haploinsufficiency impedes DNA repair and enhances gastrointestinal radiosensitivity in mice. *PLoS One.* 2010; 5(8):e12112.
- Xu H, Beasley MD, Warren WD, van der Horst GT, McKay MJ. Absence of mouse REC8 cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis. *Dev. Cell.* 2005; 8(6):949-61.
- Xu H, Tomaszewski JM, McKay MJ. Can corruption of chromosome cohesion create a conduit to cancer? *Nat. Rev. Cancer.* 2011; 11(3):199-210.
- Xu H, Yan M, Patra J, Natrajan R, Yan Y, Swagemakers S, Tomaszewski JM, Verschoor S, Millar EK, van der Spek P, Reis-Filho JS, Ramsay RG, O'Toole SA, McNeil CM, Sutherland RL, McKay MJ, Fox SB. Enhanced RAD21 cohesin expression confers poor prognosis and resistance to chemotherapy in high grade luminal, basal and HER2 breast cancers. *Breast Cancer Res.* 2011;13(1):R9.
- Xu J, Wang M, Gao X, Hu B, Du Y, Zhou J, Tian X, Huang X. Separase phosphosite mutation leads to genome instability and primordial germ cell depletion during oogenesis. *PLoS One* 2011; 6(4):e18763.
- Xu Z, Cetin B, Anger M, Cho US, Helmhart W, Nasmyth K, Xu W. Structure and function of the PP2A-shugoshin interaction. *Mol. Cell.* 2009; 35(4):426-41.
- Yamagishi Y, Sakuno T, Shimura M, Watanabe Y. Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin. *Nature* 2008; 455(7210):251-5.

- Yamamoto A, Guacci V, Koshland D. Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). *J. Cell Biol.* 1996; 133(1):99-110.
- Yang XJ, Seto E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* 2007; 26(37):5310-8.
- Yang XJ, Seto E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 2008; 9(3):206-18.
- Yuan L, Pelttari J, Brundell E, Björkroth B, Zhao J, Liu JG, Brismar H, Daneholt B, Höög C. The synaptonemal complex protein SCP3 can form multistranded, cross-striated fibers in vivo. *J. Cell Biol.* 1998;142(2):331-9.
- Yuen KW, Montpetit B, Hieter P. The kinetochore and cancer: what's the connection? *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005; 17(6):576-82.
- Zachariae W. Progression into and out of mitosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999; 11(6):708–716.
- Zhang B, Chang J, Fu M, Huang J, Kashyap R, Salavaggione E, Jain S, Kulkarni S, Deardorff MA, Uzielli ML, Dorsett D, Beebe DC, Jay PY, Heuckeroth RO, Krantz I, Milbrandt J. Dosage effects of cohesin regulatory factor PDS5 on mammalian development: implications for cohesinopathies. *PLoS One* 2009; 4(5):e5232.
- Zhang B, Jain S, Song H, Fu M, Heuckeroth RO, Erlich JM, Jay PY, Milbrandt J. Mice lacking sister chromatid cohesion protein PDS5B exhibit developmental abnormalities reminiscent of Cornelia de Lange syndrome. *Development* 2007;134(17):3191-201.
- Zhang J, Håkansson H, Kuroda M, Yuan L. Wapl localization on the synaptonemal complex, a meiosis-specific proteinaceous structure that binds homologous chromosomes, in the female mouse. *Reprod. Domest. Anim.* 2008;43(1):124-6.
- Zhang J, Shi X, Li Y, Kim BJ, Jia J, Huang Z, Yang T, Fu X, Jung SY, Wang Y, Zhang P, Kim ST, Pan X, Qin J. Acetylation of Smc3 by Eco1 is required for S phase sister chromatid cohesion in both human and yeast. *Mol. Cell.* 2008; 31(1):143-51.
- Zhang N, Ge G, Meyer R, Sethi S, Basu D, Pradhan S, Zhao YJ, Li XN, Cai WW, El-Naggar AK, Baladandayuthapani V, Kittrell FS, Rao PH, Medina D, Pati D. Overexpression of Separase induces aneuploidy and mammary tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; 105(35):13033-8.
- Zhang N, Panigrahi AK, Mao Q, Pati D. Interaction of Sororin protein with polo-like kinase 1 mediates resolution of chromosomal arm cohesion. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(48):41826-37.

Zou H, McGarry TJ, Bernal T, Kirschner MW. Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science* 1999; 285(5426):418–422.

Anexo
Anexo



Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice

Elena Llano, Rocío Gómez, Cristina Gutiérrez-Caballero, et al.

Genes Dev. 2008 22: 2400-2413

Access the most recent version at doi:[10.1101/gad.475308](https://doi.org/10.1101/gad.475308)

Supplemental Material <http://genesdev.cshlp.org/content/suppl/2008/08/14/22.17.2400.DC1.html>

References This article cites 56 articles, 17 of which can be accessed free at:
<http://genesdev.cshlp.org/content/22/17/2400.full.html#ref-list-1>

Article cited in:
<http://genesdev.cshlp.org/content/22/17/2400.full.html#related-urls>

Email alerting service Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article or [click here](#)

To subscribe to *Genes & Development* go to:
<http://genesdev.cshlp.org/subscriptions>

Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice

Elena Llano,^{1,2,6} Rocío Gómez,^{3,6} Cristina Gutiérrez-Caballero,¹ Yurema Herrán,¹ Manuel Sánchez-Martín,⁴ Luis Vázquez-Quiñones,¹ Teresa Hernández,¹ Enrique de Álava,¹ Ana Cuadrado,⁵ José Luis Barbero,⁵ José A. Suja,³ and Alberto M. Pendás^{1,7}

¹Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (CSIC-USAL), Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain; ²Departamento de Fisiología, Campus Miguel de Unamuno S/N, 37007 Salamanca, Spain; ³Unidad de Biología Celular, Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain; ⁴Departamento de Medicina, Campus Miguel de Unamuno S/N, 37007 Salamanca, Spain; ⁵Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

Shugoshin-2 (SGOL2) is one of the two mammalian orthologs of the Shugoshin/Mei-S322 family of proteins that regulate sister chromatid cohesion by protecting the integrity of the multiprotein cohesin complexes. This protective system is essential for faithful chromosome segregation during mitosis and meiosis, which is the physical basis of Mendelian inheritance. Regardless of its evolutionary conservation from yeast to mammals, little is known about the *in vivo* relevance and specific role that SGOL2 plays in mammals. Here we show that disruption of the gene encoding mouse SGOL2 does not cause any alteration in sister chromatid cohesion in embryonic cultured fibroblasts and adult somatic tissues. Moreover, mutant mice develop normally and survive to adulthood without any apparent alteration. However, both male and female *Sgol2*-deficient mice are infertile. We demonstrate that SGOL2 is necessary for protecting centromeric cohesion during mammalian meiosis I. *In vivo*, the loss of SGOL2 promotes a premature release of the meiosis-specific REC8 cohesin complexes from anaphase I centromeres. This molecular alteration is manifested cytologically by the complete loss of centromere cohesion at metaphase II leading to single chromatids and physiologically with the formation of aneuploid gametes that give rise to infertility.

[*Keywords:* Cohesion; chromosome segregation; Shugoshin-2; mouse; mitosis; meiosis]

Supplemental material is available at <http://www.genesdev.org>.

Received February 7, 2008; revised version accepted July 4, 2008.

Loss of sister chromatid cohesion is probably one of the most dramatic events during eukaryotic cell division and is the pivotal process that enables the equal delivery of the replicated genetic material to daughter cells. Sister chromatid cohesion is mediated during both mammalian mitosis and meiosis by a cohesin complex constituted by two members of the family of structural maintenance of chromosome proteins (SMC1 and SMC3), one kleisin subunit (RAD21 at mitosis and/or REC8 at meiosis) that is the substrate of the cysteine protease separase, and a HEAT repeat domain protein (SA1/SA2 at mitosis or STAG3 at meiosis) (Watanabe 2005; Hirano 2006). These proteins create a gigantic ring structure that is presumed to entrap the sister chromatids (Gruber et al. 2003).

During mitosis, most of the cohesin complexes at the arms are released by the phosphorylation of its SA2 subunit by the PLK1 kinase (Waizenegger et al. 2000; Hauf et al. 2005; Losada and Hirano 2005). The remaining co-

hesin complexes at centromeres and arms are lost from chromosomes during the metaphase/anaphase transition, once all chromosomes have bioriented and the spindle assembly checkpoint (SAC) is satisfied, since separase is activated by the APC (Anaphase-Promoting Complex) (Huang and Moazed 2006) and then cleaves the cohesin subunit RAD21.

The meiotic cycle is governed by similar principles as the mitotic one, but the existence of two consecutive rounds of segregation after a single round of DNA replication explains why the dissociation of cohesin must be tightly regulated in a spatial and time-dependent manner. During the first meiotic division, recombined homologs segregate to opposite poles since cohesin complexes at the arms are cleaved by separase. The cohesin complexes remaining at centromeres are then proteolyzed by separase during the metaphase II/anaphase II transition to allow the segregation of single chromatids (Buonomo et al. 2000; Petronczki et al. 2003). In this sense, the second meiotic division mimics mitosis in that sister chromatids segregate to opposite poles. It has been proposed that the protection of centromeric cohe-

⁶These authors contributed equally to this work.

⁷Corresponding author.

E-MAIL amp@usal.es; FAX 34-923 294743.

Article is online at <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.475308>.

sion during meiosis I is essential for chromosome mono-orientation at metaphase I and biorientation at metaphase II (Page and Hawley 2003; Hauf and Watanabe 2004; Kudo et al. 2006).

In yeast, flies, and vertebrates, a family of centromeric proteins identified as key regulators of chromosome segregation named Shugoshins (Sgo1 and Sgo2/Mei-S322), are responsible for the effective protection of the centromeric RAD21/REC8 cohesin complexes from removal by PLK1 during mitosis and cleavage by separase during meiosis I by recruiting the phosphatase PP2A. This enzyme in turn neutralizes the phosphorylation ability of PLK1 onto SA2 during mitosis (Kitajima et al. 2004, 2006; McGuinness et al. 2005). The shugoshin family of proteins is composed of a single gene in *Saccharomyces cerevisiae* and *Drosophila melanogaster*, and two paralogs in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* and mammals (Shugoshin-1, or SGOL1, and Shugoshin-2, or SGOL2) (Kitajima et al. 2004). In *S. pombe*, Sgo1 is only required for meiosis completion, and its lack generates random segregation at meiosis II, whereas Sgo2-depleted cells show both mitotic and meiotic alterations, like chromosome biorientation defects and alterations in the mono-orientation of sister chromatids, respectively (Rabitsch et al. 2004; Vaur et al. 2005; Vanoosthuysen et al. 2007).

The role of SGOL1 and SGOL2 in mammals is still poorly understood, and their function in chromatid cohesion has been only functionally analyzed by means of RNAi-mediated repression in HeLa cells, giving rise to controversial reports (Kitajima et al. 2006; Huang et al. 2007). In addition, the presence of two members has added a new level of difficulty in the course of their functional characterization. Despite the implication of human SGOL1 in maintaining centromeric cohesion in mitosis, a similar function has also been proposed for SGOL2 in HeLa cells. Moreover, both SGOL1 and SGOL2 cooperate with PP2A at the centromere, where they antagonize the kinase activity of PLK1 onto the cohesin complex (McGuinness et al. 2005; Kitajima et al. 2006; Rivera and Losada 2006). Yet, little is known about the functional contribution of SGOL2 in chromatid cohesion in a somatic cell lineage, even less about its role in embryogenesis, organogenesis, and tissue homeostasis. In this study, we demonstrate that SGOL2 is not essential for mouse embryogenesis and adult somatic development. Accordingly, SGOL2 deficiency does not promote any mitotic defect in primary cultured somatic cells. However, both adult male and female mice, despite not showing any overt phenotype, are infertile. We provide evidence that such infertility is caused by the premature loss of centromeric cohesion at meiosis that leads to the formation of gametes with an aberrant number of chromatids.

Results

Generation of *Sgol2* mutants

To address the *in vivo* role of SGOL2, we searched the gene trap database (<http://www.knockoutmouse.org>) for

insertional mutations that could disrupt the transcription of the mouse *Sgol2* gene. We selected the line D025B05 (GGTC) in which the cassette rFlpROSA- β geo (Schnütgen et al. 2005) was inserted into the first intron of the *Sgol2* gene. This mutation was further characterized and confirmed by cloning the insertion of the retrovirus into intron 1 (Fig. 1a). We generated founder mice from this embryonic stem (ES) cell line, and following heterozygote intercrossing, *Sgol2*-deficient (knockout [KO], -/-), heterozygous (+/-), and wild-type (+/+) mice were obtained in the expected Mendelian ratio. Homozygosity for the mutation was demonstrated by Southern blot, and the lack of both transcript and protein was verified by Northern blot, RT-PCR, and immunofluorescence (Fig. 1b-d; Supplemental Fig. S1a,b), indicating that the insertional mutation is a null allele. In addition, since it has been recently reported that SGOL2 is needed for the loading of the mitotic centromere-associated kinesin (MCAK) at centromeres (Huang et al. 2007), we analyzed the localization of MCAK in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) of both genotypes. Our results showed that MCAK was present at the inner centromere domain in wild-type dividing MEFs. In contrast, and as expected from a loss-of-function *Sgol2* allele, MCAK was not detected at the centromeres of *Sgol2*^{-/-} mitotic chromosomes (Supplemental Fig. S2a).

Unexpectedly, and despite of the *Sgol2* widespread expression (<http://symatlas.gnf.org>; Supplemental Fig. S1a,b), the mutant mice developed normally and displayed no overt phenotype. Moreover, observation of cohorts of mice ($n = 25$) for 12 mo revealed similar adult survival rate for these mice (100%) and their wild-type controls (96%).

Mouse SGOL2 is not essential for mitosis

During the prophase pathway, most of the cohesin complexes at chromosome arms are released by PLK1-dependent phosphorylation of their SA2 subunit, whereas centromeric cohesin complexes remain intact until they are proteolyzed at their RAD21 subunit by separase at anaphase (Waizenegger et al. 2000; Hauf et al. 2005). Because it has been reported that human SGOL2 is essential for protecting centromeric cohesin complexes and/or for correcting defective kinetochore-microtubule attachments in mitotic mammalian cells (Kitajima et al. 2006; Huang et al. 2007), we sought to study several mitotic parameters of MEFs lacking SGOL2. Firstly, we studied cell proliferation and transformation, and we found no essential difference in either cellular proliferation rates, mitotic index, or proliferative arrest induced by culture stress in *Sgol2*^{-/-} MEFs compared with wild-type MEFs (Fig. 2a-c). Partial loss of cohesion in mitosis causes loss of tension across centromeres that leads to anaphase lagging, chromosome mis-segregation, and finally aneuploidy (Nasmyth 2002; Weaver et al. 2003). We extensively analyzed the karyotypes of MEFs and adult somatic cells (cultured thymocytes) lacking SGOL2, and we did not observe significant differences between wild-type and *Sgol2*^{-/-} in chromatid cohesion defects or any

Llano et al.

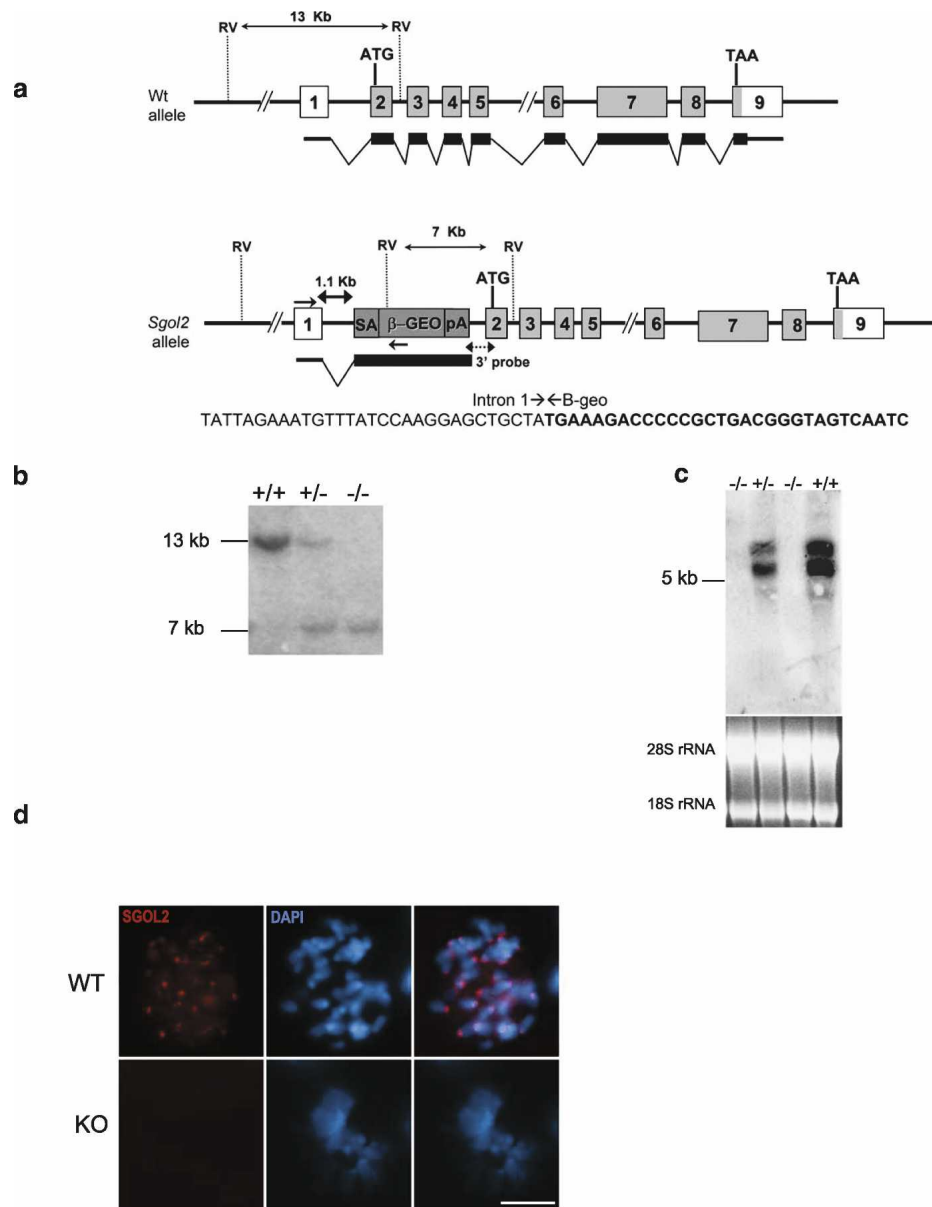


Figure 1. Generation and genetic characterization of *Sgol2*-deficient mice. (a) Schematic representation of the wild-type locus (wt) and insertional mutant at the *Sgol2* locus showing the insertion site, the corresponding coding exons (light gray) and noncoding exons (open boxes), and the β -geo cassette (dark gray). Thin (noncoding) and thick (coding sequences) lines under exons represent the expected transcript derived from wild-type and *Sgol2* trapped allele. (ATG) Initiation codon; (TAA) stop codon; (SA) splicing acceptor; (β -geo) bacterial β -galactosidase fused to the neomycin resistance gene; (pA) polyadenylation signal. The nucleotide sequence of the insertion site derived from PCR amplification of DNA from the ES cells [D56678] is indicated. Primers are represented by arrows. The junction of the intronic sequence (regular) and from the β -geo cassette (bold) is depicted. (b) Southern blot analysis of genomic DNA from three littermate progeny of *Sgol2* heterozygote crosses. Probing of EcoRV-digested DNA revealed 13-kb and 7-kb fragments for wild-type and disrupted alleles, respectively. (+/+), (+/-), and (-/-) designate wild-type, heterozygous, and homozygous knockout animals, respectively. (c) Northern blot analysis of RNA extracts from testis of (+/+), (+/-), and (-/-) animals with a full-length *Sgol2* cDNA probe. The corresponding ethidium bromide stained 18S and 28S ribosomal RNA used as a loading control is also shown below. (d) Immunofluorescence of mitotic plates obtained from MEFs from wild-type (WT) and knockout (KO) genotypes using a polyclonal antibody against the C-terminal region of the SGOL2 protein. (d) Bar, 10 μ m.

other of those aberrations (Fig. 2e; Supplemental Fig. S1c,d). In addition, and supporting this notion, the karyotype distribution is similar between *Sgol2*^{-/-} and wild-type MEFs and thymocytes (Fig. 2e; Supplemental Fig. S1c).

To further analyze the role of SGOL2 in mitosis under stressed conditions, we treated the cell cultures with two antagonistic microtubule poisons such as nocodazole (a microtubule depolymerizing agent) and taxol (a microtubule-stabilizing drug) in order to trigger the ac-

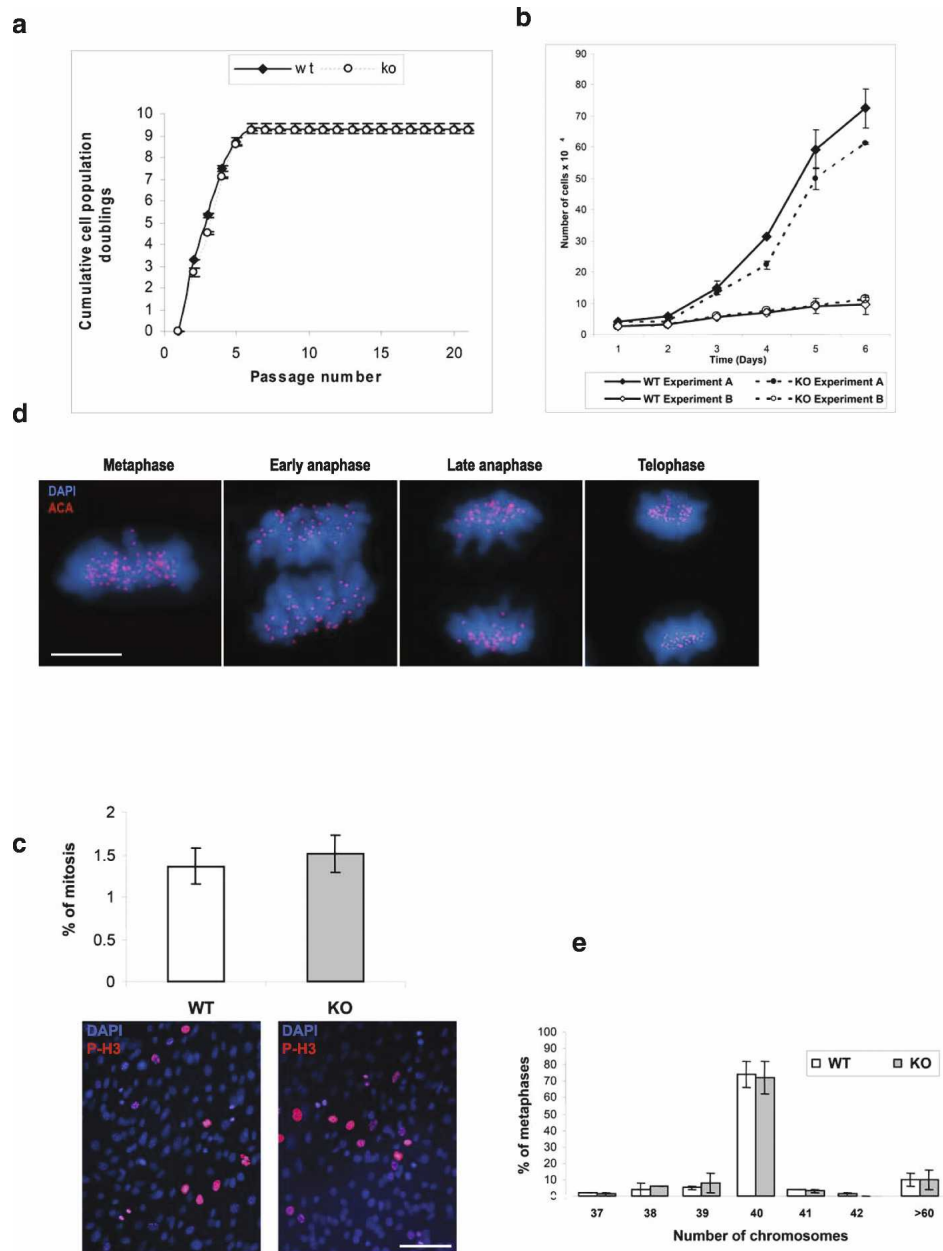


Figure 2. Normal mitosis in somatic cells lacking *Sgol2*. (a) Serial 3T3 cultivation of primary MEFs of different genotypes. Four independent embryos are shown for each genotype. Cumulative population doublings were measured until immortalization. (b) Proliferation of wild-type (WT) and *Sgol2*^{-/-} (KO) primary MEFs at two different cell densities (experiments A and B) and counted every following day (see the Materials and Methods). (c) Measurement of the mitotic index (%) by immunostaining with anti-histone H3 phosphorylated at Ser-10 (P-H3-Ser¹⁰) in wild-type (WT) and knockout MEFs (KO). Nuclei were counterstained with DAPI. The left panel shows the similar proportion of cells positive for P-H3-Ser¹⁰ between *Sgol2*^{+/+} and *Sgol2*^{-/-} MEFs scored in three independent experiments. (d) Immunolabeling of kinetochores (ACA, red) and counterstaining of chromatin (DAPI, blue) of a somatic cell from a *Sgol2*-deficient mouse. (e) Karyotype distribution of wild-type and knockout MEFs. Each data point in a-c, and e represents the mean \pm SM. Bars: c, 100 μ m; d, 10 μ m.

tivation of the SAC. Similar to their wild-type counterparts, *Sgol2*-null MEFs have their ability to arrest at metaphase intact (Supplemental Fig. S3d). This result suggests that the fidelity of the SAC is not affected by the absence of SGOL2 under these experimental conditions.

Given the overlapping functions between the SAC and the DNA damage checkpoint and the recent report describing the activation of the SAC in response to DNA damage in an ATM/ATR-dependent manner (Kim and Burke 2008), we determined whether the lack of *Sgol2* could be affecting this pathway. For this purpose, we

Llano et al.

γ -irradiated wild-type and *Sgol2*^{-/-} MEFs and measured their ability to enter mitosis and to repair their radiation-induced DNA double-strand breaks by looking at the resolution of the γ -H2AX foci after irradiation. We did not observe significant differences at these parameters between cells of both genotypes (Supplemental Fig. S3a–c). Altogether, these findings provide the first *in vivo* evidence that SGOL2 is dispensable for mitotic chromatid cohesion, cell cycle progression, and proliferation in somatic cells.

Male and female Sgol2-deficient mice are infertile

Although adult mice were apparently normal and showed no overt phenotype, they were infertile since they failed to produce offspring when a male or female *Sgol2*-deficient mouse was mated with a wild type. As controls, these same wild-type males and females were always able to produce offspring when crossed with *Sgol2* heterozygotes (data not shown). In order to discard sexual behavior dysfunction as the cause of the observed infertility, we monitored daily for the presence of the vaginal plug in reciprocal crosses between wild-type and knockout mice. In both instances, we observed a similar ratio of vaginal plugs independently of the genotypes. The histopathological analysis of multiple tissues from mutant mice revealed no observable differences with wild-type tissues with the exception of testes, which were ~35% smaller than their wild-type littermates (Fig. 3a). Although the organization and number of germ cells within the seminiferous tubules appeared normal in the infertile KO mice and no abnormalities were observed in the number and distribution of Sertoli and Leydig cells (Fig. 3b), the number of mature spermatids was reduced, a possible indication of a deficient meiosis. To dissect more precisely the expression pattern of *Sgol2* in spermatogenesis, we took advantage of the β -galactosidase-neomycin fusion gene expressed under the control of the *Sgol2* promoter. Extensive X-gal staining was observed with the strongest activity corresponding to the spermatocytes (Fig. 3c), supporting the specific role of SGOL2 in spermatogenesis.

To understand the molecular mechanisms underlying the observed infertility in the absence of SGOL2, we examined the accuracy of meiotic divisions in testes using immunofluorescence of whole squashed seminiferous tubules, a technique that enables the analysis of meiosis at any stage in a 3D manner (Prieto et al. 2001). As shown in Figure 3d, the low-magnification view of DAPI and kinetochoric immunofluorescence of squashed spermatocytes from *Sgol2*^{-/-} testis exhibited a very high proportion of cells arrested at the metaphase II stage (Supplemental Fig. S4), although the remaining cells of the testis looked apparently normal including the mitotic figures of dividing spermatogonial cells. As expected from a null allele, SGOL2, which is localized at the inner centromere domain in wild-type dividing spermatocytes (Gómez et al. 2007), was not detected in *Sgol2*^{-/-} metaphases I and metaphases II (Fig. 3e). According with this loss of function, the SGOL2-dependent

MCAK was also delocalized from the centromeres of metaphase I chromosomes in the knockout meiotic cells (Supplemental Fig. S2b). Strikingly, during *Sgol2*^{-/-} meiosis II, and in contrast to wild type, sister chromatids were not held together through their centromeres and never congressed to a typical metaphase II plate. These secondary spermatocytes are hereafter referred as metaphase II-like spermatocytes (Fig. 3e). Therefore, no canonical anaphases II were observed, due most likely to the lack of biorientation of individualized chromatids (Fig. 4). This observation suggests a premature release of sister chromatid centromere cohesion during meiosis II as the most plausible explanation for the infertile phenotype.

The inner domain of metaphase I centromeres is altered in spermatocytes lacking SGOL2

Since the formation of the axial/lateral elements (AEs/LEs) and the synaptonemal complex (SC) are abrogated in several mutant mice with meiotic defects including cohesive ones (Hodges et al. 2005; Xu et al. 2005), we took advantage of the SYCP3 protein marker to follow the development of AEs/LEs and SC during prophase I (Lammers et al. 1994) in the absence of SGOL2. Examination of *Sgol2*^{-/-} spermatocytes from adult testes by immunofluorescence revealed that the localization of SYCP3 at AEs/LEs was normal during pairing and synapsis of the homologs during zygotene and pachytene (data not shown), and during desynapsis at diplotene and diakinesis (Supplemental Fig. S5). These results indicate that SGOL2 is not necessary for chromosome pairing and recombination during mammalian prophase I. This is the expected situation since in mouse spermatocytes, SGOL2 becomes associated to centromeres during late diplotene (Gómez et al. 2007). However, the distribution of SYCP3 at metaphase I is partially altered in the absence of SGOL2, although bivalents are accurately aligned at the equatorial plate. As shown in Figure 5a, in wild-type metaphase I bivalents, SYCP3 appears preferentially accumulated at the inner centromere domain showing a T-like distribution below the closely associated sister kinetochores, and as faint patches along the surface of contact between sister chromatids (interchromatid domain). SYCP3 maintains a T-like distribution at anaphase I centromeres but redistributes at telophase I to appear as a small bar below or separated from the individualized sister kinetochores (Parra et al. 2004). In contrast, and although the distribution of SYCP3 at the interchromatid domain is unaffected in *Sgol2*^{-/-} metaphase I bivalents, SYCP3 appears just like a small spot below the closely associated sister kinetochores and not as a T-shape like in wild-type bivalents (inset from KO metaphase I in Fig. 5a). Thus, SGOL2 is not required to maintain the close association between sister kinetochores that allows their monopolar orientation during prometaphase I. Interestingly, in mutant early anaphase I chromosomes, SYCP3 redistributes at the inner centromere domain to appear as small bars connecting clearly separated sister kinetochores (insets from KO early ana-

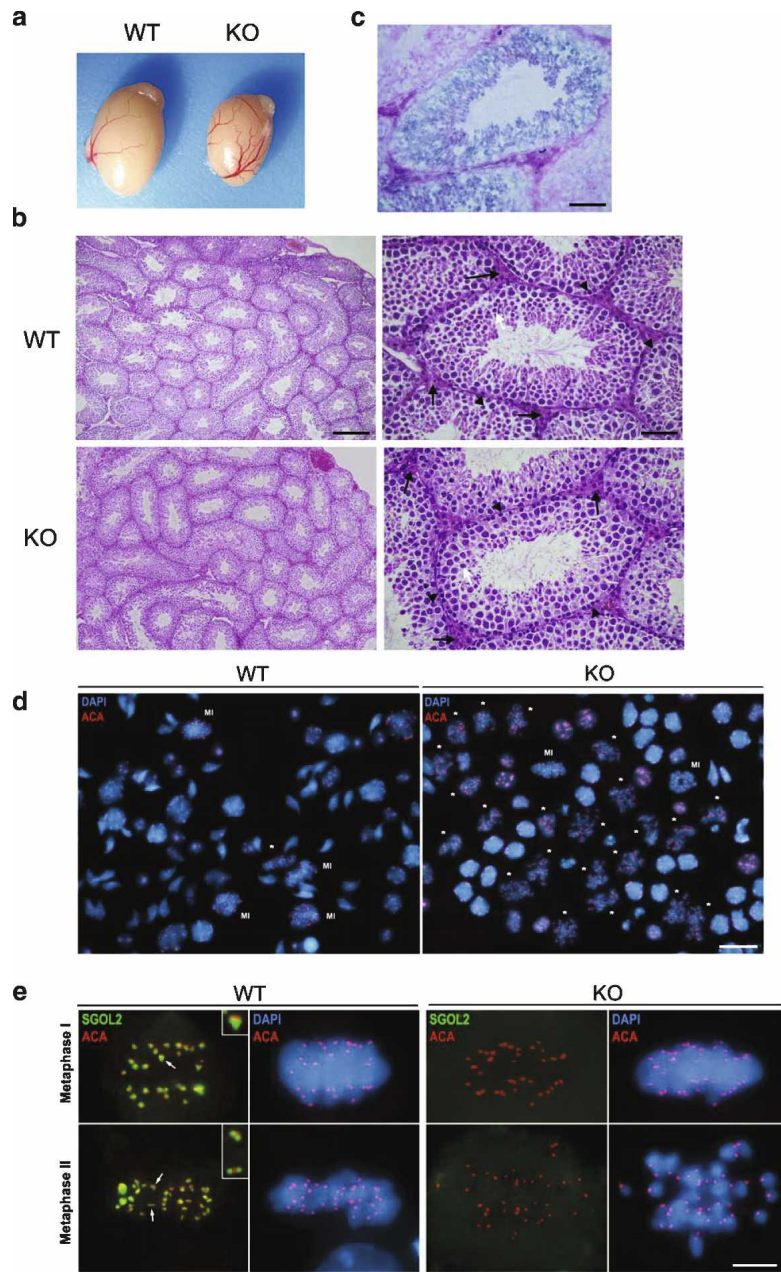


Figure 3. Testicular characterization showing minor size, normal histology, and metaphase II-like arrest in *Sgol2*-deficient mice. (a) Testes from a wild-type and a null *Sgol2* mouse. (b) Hematoxylin-eosin staining of a section of the testis at 200 \times (left) showing seminiferous tubules. Higher magnification of seminiferous tubules showing Leydig cells (black arrows), spermatogonia (arrowhead) in a more peripheral position within the tubule, and spermatids (white arrow) in *Sgol2*^{-/-} and wild-type testes. (c) β -galactosidase staining (blue) counterstained with eosin (red) of a section of a testis from a heterozygote mouse showing blue positive staining in the meicytes. (d) Low-magnification view of a representative squash preparation of seminiferous tubules showing the accumulation of metaphases II-like in knockout *Sgol2* (KO) in comparison with a representative wild-type view (WT, left). The identity of metaphases II (asterisks)/metaphases I (MI) was confirmed by the immunolabeling of kinetochores (ACA, red) and counterstaining with DAPI (blue). (e) Double immunodetection of SGOL2 and kinetochores (ACA) in metaphase I and metaphase II from a wild-type and a *Sgol2* KO cell showing an accurate congression during metaphase I but a lack of congression of separated chromatids at the metaphase II-like plate when SGOL2 is lacking. Bars: b (right panels), c, 50 μ m; b (left panels), 200 μ m; d, 15 μ m; e, 5 μ m.

phases I in Fig. 5a) resembling the wild-type telophase I distribution, to finally mostly disappear during telophase I.

All these results demonstrate that in the absence of SGOL2, the organization of the inner centromere domain, as detected by the SYCP3 labeling, is compromised, but bivalents are able to align correctly at the metaphase I plate. Moreover, the homologs segregate accurately at anaphase I, since we never detected separated chromatids or lagging chromosomes during this stage. In this sense, sister kinetochores lose their close association (hereafter referred as sister kinetochore cohesion) during the metaphase/anaphase I transition, although centromere cohesion is apparently maintained during anaphase I.

SGOL2 protects REC8 centromeric cohesin complexes from degradation during anaphase I

Since we had observed that the lack of SGOL2 promoted an alteration at the inner centromere domain leading to a premature release of sister kinetochore cohesion during the metaphase/anaphase I transition, we next analyzed the distribution of the cohesin subunit REC8. This cohesin subunit of the canonical meiotic complex is cleaved along the chromosome arms by separate through the metaphase/anaphase I transition, but is protected at centromeres, where REC8 is cleaved during the metaphase/anaphase II transition (Watanabe and Nurse 1999; Lee et al. 2003; Kudo et al. 2006). The fact that this protection is carried out by shugoshin-1 orthologs in

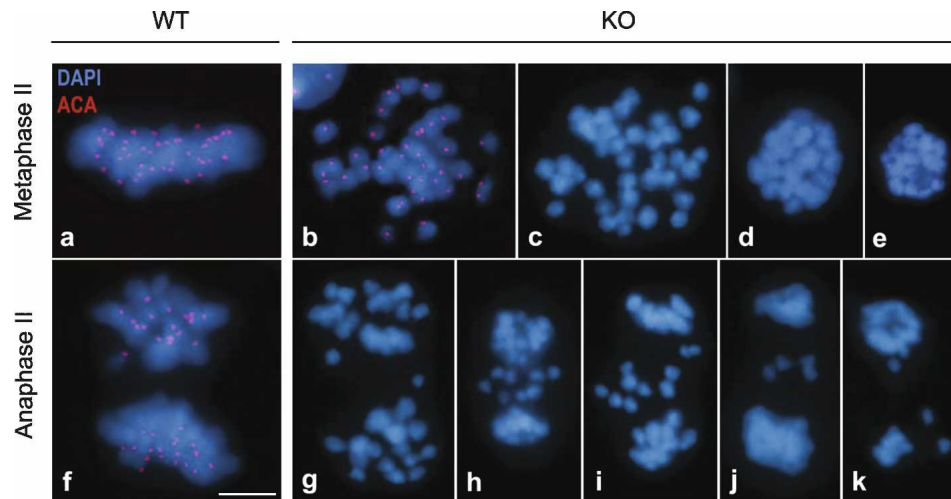


Figure 4. Defective metaphase II congression and progression to anaphase II. Immunolabeling of kinetochores (ACA, red), and counterstaining with DAPI (blue) in wild-type (WT) and *Sgo12*^{-/-} (KO) spermatocytes from metaphase II up to anaphase II. (a) Example of a canonical metaphase II in wild-type cells. (b) Metaphase II-like from a *Sgo12*^{-/-} showing 40 individualized chromatids with a single kinetochore that do not congress at a metaphase II plate like in wild type. (c–e) Examples of degenerating metaphases II without kinetochore labeling. (f) Example of a canonical anaphase II from a wild-type cell. (g–k) Degenerating anaphases II with lagging chromatids from *Sgo12*^{-/-} spermatocytes. The absence of kinetochoric signals present in c–e, g–j, and k is due to the entrance into a degenerative process with the loss of most centromeric proteins or their anti-genicity. Bar, 5 μ m.

budding and fission yeast (Katis et al. 2004; Kitajima et al. 2004), *Drosophila* (Kerrebrock et al. 1995), and maize (Hamant et al. 2005) prompted us to examine the location of REC8 in spermatocytes lacking SGOL2. In both wild-type and *Sgo12*^{-/-} metaphase I bivalents, REC8 is located at the interchromatid domain and at the inner centromere domain at the vertical region of the T-shaped SGOL2 and SYCP3 signals (cf. Figs. 5b and 3e; Gómez et al. 2007). As metaphase I proceeds and transits to anaphase I, REC8 staining is restricted to a small bar perpendicular to the closely associated sister kinetochores in wild-type chromosomes (Fig. 5b). However, when SGOL2 is not present, REC8 is not detected at centromeres in early anaphase I chromosomes, and sister kinetochores appear clearly individualized (inset from KO anaphase I in Fig. 5b). A similar distribution and behavior were found for the cohesin subunit SMC3 in *Sgo12*^{-/-} metaphase I and anaphase I spermatocytes (Supplemental Fig. S6). In order to quantify this alteration, we measured the distance between sister kinetochores (wild type vs. KO) and found that it is approximately two times larger in *Sgo12*^{-/-} anaphase I centromeres than in control ones (Fig. 5c). We therefore conclude from these results that SGOL2 is necessary for protecting REC8 and SMC3-containing cohesin complexes at centromeres of mammalian anaphase I chromosomes. Thus, in the absence of SGOL2, the precocious release of centromeric cohesin complexes during early anaphase I leads to a loss of sister kinetochore cohesion.

Sgo12 deficiency provokes SAC activation during the second meiotic division.

Due to the lack of sister centromere cohesion in metaphase II-like chromosomes when SGOL2 is absent, one

would predict that the meiotic SAC should be sensing the inaccurate kinetochore–microtubule attachments, thus avoiding meiotic progression (Fang et al. 1998; Hassold and Hunt 2002; Kouznetsova et al. 2007). To test this, we compared the intensity of the immunofluorescent signals of two proteins involved in this checkpoint (CENP-E and BubR1) from prometaphase I up to metaphase II. As shown in Figure 6a, BubR1 signals are bright at the kinetochores of unaligned bivalents at prometaphase I, but very faint when bivalents have accurately aligned at the metaphase I plate. Likewise, a faint BubR1 labeling is detected at kinetochores of wild-type metaphase II-aligned chromosomes (Fig. 6a). However, in *Sgo12*-deficient metaphase II-like spermatocytes, we observed a strong labeling of BubR1 and CENP-E in almost all the kinetochores of the separated and unaligned chromatids (Fig. 6a; Supplemental Fig. S7). These results support the hypothesis that the SAC is activated in metaphase II-like arrested spermatocytes, because of the centromere cohesion defect and the incapacity of single chromatids to biorient correctly.

Spermiogenesis is partially altered in the absence of SGOL2

We next examined whether this activation of the SAC at metaphase II-like could lead to aberrant spermatids through an adaptation process (either by slippage through an activated checkpoint or by an eventual inactivation) similar to that observed in mitosis after a prolonged SAC activation (Weaver and Cleveland 2005). Our results show that in the absence of SGOL2, there is an accumulation of metaphase II-like spermatocytes (16% of the meiotic divisions in the wild-type vs. 53.8% in the knockout) that never progress through a standard

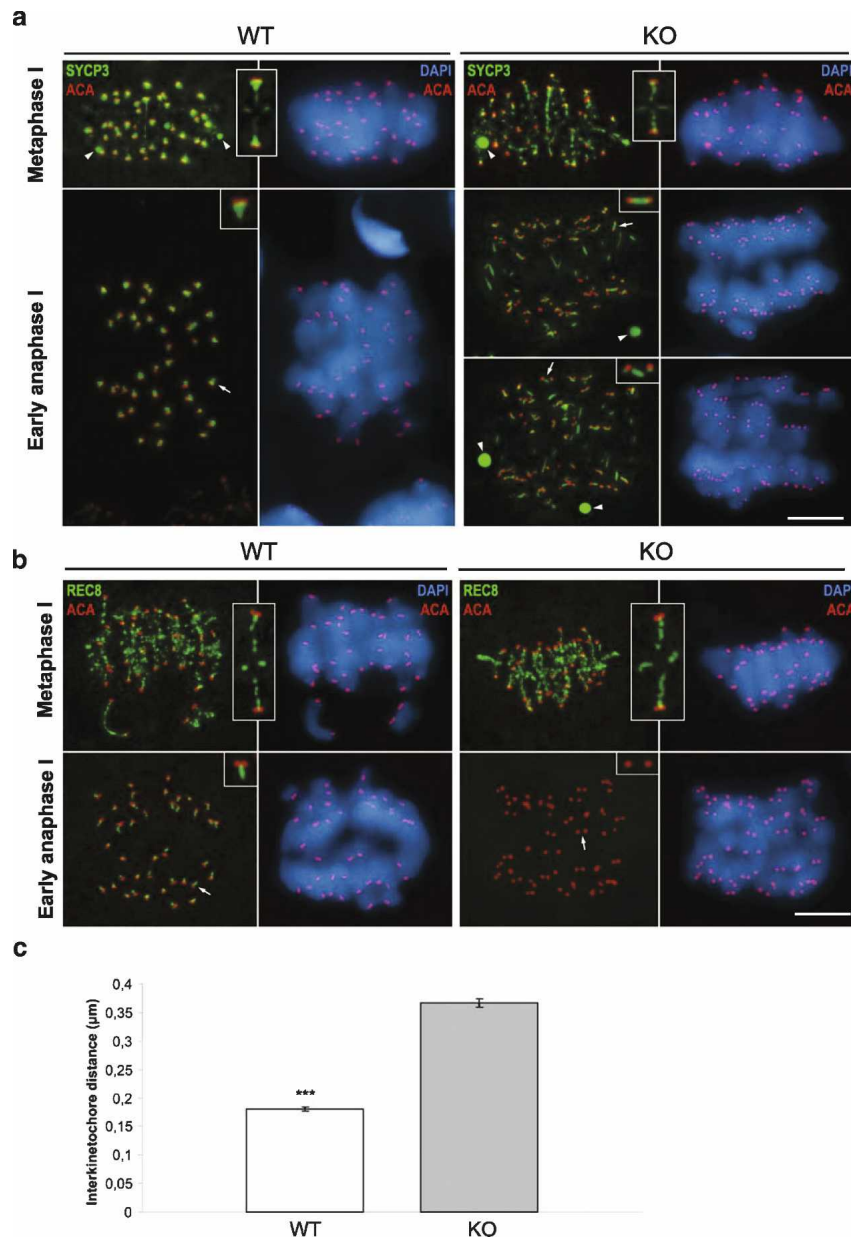


Figure 5. Altered localization of SYCP3 and REC8 in the absence of SGOL2 in meiosis I. (a) Double immunolabelings of SYCP3 (green) and kinetochores (ACA, red), and counterstaining with DAPI (blue) in wild-type (WT) and *Sgol2*^{-/-} spermatocytes (KO) at metaphase I and early anaphase I. Arrowheads indicate the presence of SYCP3 cytoplasmic agglomerates in both wild-type and KO spermatocytes. *Insets* at the metaphase I panel show magnification of the T-shaped structure delineated by SYCP3 at wild-type bivalents and the small spot in the KO ones. *Insets* at the early anaphase I panel show SYCP3 at the inner centromere region in wild-type and the bar structure in the KO meiotic cells. (b) Double immunolabeling of REC8 (green) with kinetochores (ACA, red) and DAPI (blue) in wild-type and KO spermatocytes at metaphase I and early anaphase I. (*Insets*) REC8 distribution at the interchromatid domain and at centromeres is similar in wild-type and *Sgol2*^{-/-} metaphase I bivalents. At early anaphase I, REC8 distribution in wild type persists as a bar (arrow, *inset*) and is absent in *Sgol2*^{-/-} spermatocytes, where sister kinetochores are clearly separated (arrow, *inset*). All images are projections of different focal planes throughout the cell volume. (ACA) Anti-centromeric autoantibody. (c) Centromeres of *Sgol2*^{-/-} and wild-type anaphase I were immunodetected with ACA, and interkinetochore distances were measured. Error bars represent the mean \pm SM (statistical significance is indicated by asterisks, $P < 0.001$, Student's *t*-test). Bar, 5 μ m.

anaphase II/telophase II stage (Fig. 4; Supplemental Fig. S4). The increased rate of TUNEL-positive spermatocytes detected in the seminiferous tubules from SGOL2-deficient mice in comparison with those in wild-type individuals is also remarkable. This result suggests that a fraction of the *Sgol2*^{-/-} meiotic cells enter into apoptosis (Supplemental Fig. S8). Moreover, our scoring of the percentage of the meiotic divisions in wild-type and mutant individuals on squashed seminiferous tubules shows that 19.3% of metaphase II-like spermatocytes (Fig. 4c–e) and 97.5% of anaphase II-like spermatocytes (Fig. 4g–k) do not present any kind of kinetochore labeling by immunofluorescence and show hypercondensed and lagging chromatids (Supplemental Fig. S4). In order to follow the spermatid maturation, we undertook the quantification of the number of kinetochores per spermatid.

We found the presence of round spermatids with a number of kinetochores ranging from one up to 40 (Fig. 6b; Supplemental Fig. S9). In addition, when we looked at elongated spermatids, the percentage of cells with >20 kinetochores drastically increased (45% in round spermatids vs. 79% in elongated spermatids). These observations raise the question of whether mature sperm can still be produced from the differentiation of the abnormal aneuploid spermatids. The results from the histological and sperm counts performed in *Sgol2*^{-/-} epididymis show that although the knockout display close to a 40% reduction in the number of sperm, they still were able to produce sperm morphologically similar to their wild-type counterparts (Supplemental Fig. S10). Altogether, these results indicate that the absence of SGOL2 results in an aberrant meiotic exit and partially altered

Llano et al.

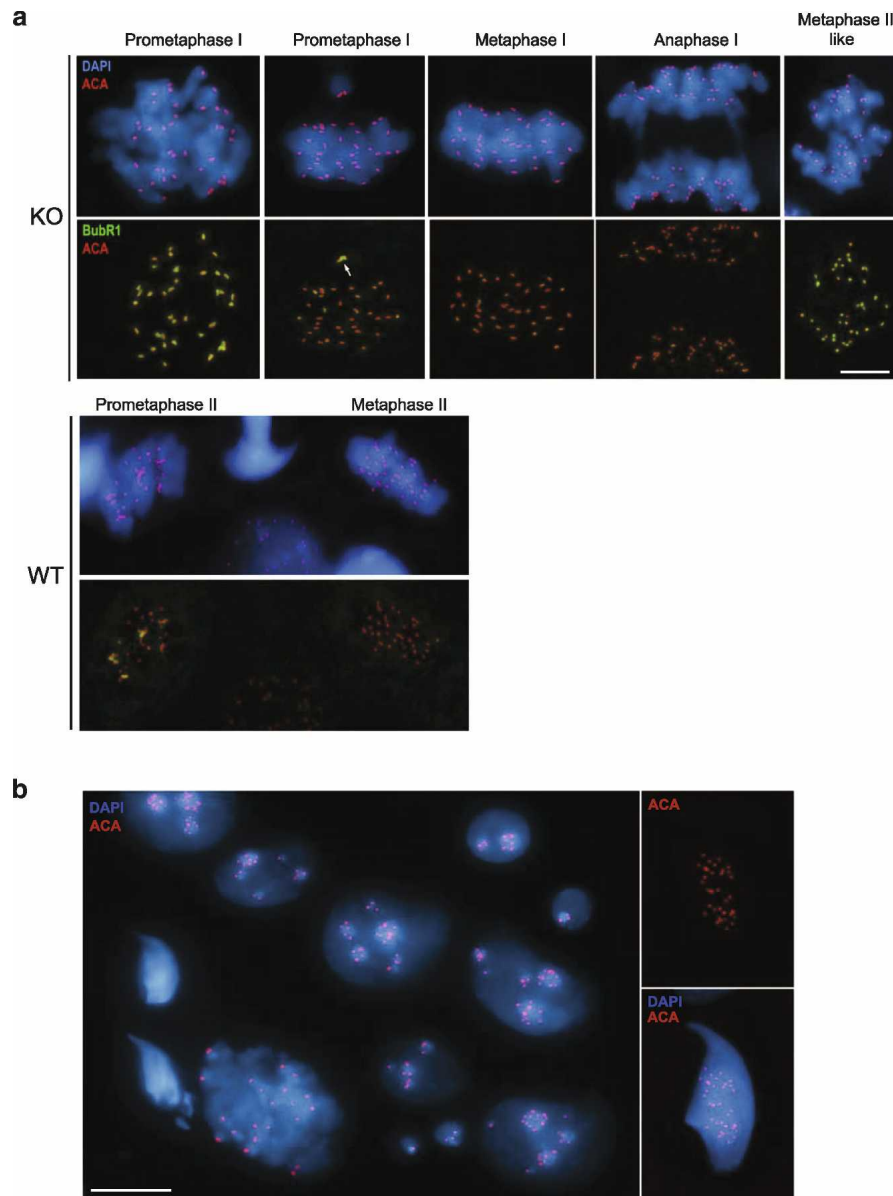


Figure 6. Abnormal meiosis II and formation of aneuploid spermatids in the presence of an activated SAC in *Sgol2*^{-/-} spermatocytes. Double immunolabeling of BUBR1 (green), and kinetochores (ACA, red) and counterstaining with DAPI (blue) in wild-type (WT) and *Sgol2*^{-/-} (KO) spermatocytes. (a) Proper BUBR1 labeling in meiosis I in the absence of SGOL2 showing an unaligned bivalent with intense BUBR1 labeling at their kinetochores during prometaphase I, and a very faint labeling in metaphase I and anaphase I. In metaphase II-like, most of the kinetochores of the separated chromatids show an intense BUBR1 labeling in contrast to the wild type. In wild-type meiosis II spermatocytes, unaligned chromosomes show an intense BUBR1 labeling at their kinetochores in prometaphase II, but the labeling almost disappears in metaphase II. (b) Representative field of round and elongated abnormal spermatids with one up to 36 kinetochore (ACA, red) signals and counterstained with DAPI (blue). Bars: a, b (left panel), 5 μ m; b (right panel), 10 μ m.

spermiogenesis that leads to a reduction in the sperm production.

Female mutant mice for Sgol2 are infertile and also show a cohesion defect in metaphase II

It is well accepted from genetic analysis of human fetuses with chromosomal abnormalities and mouse ge-

netic engineered models that mammalian female meiosis is more prone to error than male meiosis (Hassold and Hunt 2002). To better understand this gender difference, we undertook a meiotic chromosome analysis in female *Sgol2*^{-/-} mice. By taking advantage of the meiotic maturation process in mammalian oogenesis, we directly analyzed metaphase II-arrested oocytes obtained from superovulated *Sgol2*^{-/-} and wild-type females. Despite the fact that female *Sgol2*^{-/-} mice are infertile, the histological

analysis of adult ovaries showed that the number and structure of follicles and corpus lutei were similar to those found in wild-type ovaries (Supplemental Fig. S11a). This result indicates that mutant females ovulate physiologically. In addition, we collected a similar number of oocytes from mutant and wild-type females when they were superovulated (data not shown). C-banded metaphase II chromosomes obtained from mutant oocytes showed 40 individualized chromatids, whereas wild-type presented 20 chromosomes, arguing to a similar defect in centromeric cohesion in both male and female meiosis as the cause of infertility (Supplemental Fig. S11b). This conclusion is consistent with a very recent report (which appeared while this manuscript was being edited) using a knockdown strategy of *Sgol2* in cultured mouse oocytes (Lee et al. 2008). Taken together, these findings provide *in vivo* evidence that mammalian SGOL2 is also protecting the removal of REC8 from the meiotic centromeres at oogenesis, since its deficiency also provokes premature chromatid disjunction at metaphase II.

Discussion

We generated knockout mice for *Sgol2* in order to analyze the *in vivo* role that this protein plays during both mitosis and meiosis. We found that these mice develop normally and reach adulthood but are infertile. Our data on the proliferation and transformation rates, mitotic index, and conservation of normal karyotypes on MEFs and thymocytes suggest that SGOL2 is dispensable for mitosis. On the other hand, in these mutant individuals, pairing, synapsis, and recombination during prophase I are normal, as well as bivalent biorientation and alignment at the metaphase I plate. However, in the absence of SGOL2, there is a loss of centromeric cohesin complexes at the onset of anaphase I that promotes the separation between sister kinetochores, although the segregation of chromosomes to opposite poles is normal. During meiosis II, chromatids lose their centromeric cohesion, appear separated, and do not biorient at the equatorial plate. Some of the metaphase II-like and anaphase II-like spermatocytes degenerate by apoptosis, but other spermatocytes escape the SAC and give rise to aneuploid spermatids with one up to 40 chromatids. Altogether, our data suggest that SGOL2 protects centromeric cohesin complexes until the metaphase II/anaphase II transition and is thus essential for an accurate gametogenesis.

Mitosis is not altered in SGOL2-deficient mice

The analysis of the mutant mice demonstrated surprisingly that despite the wide expression of SGOL2 in somatic tissues, homozygous mutant mice were viable and did not show any overt phenotype. Accordingly, all the mitotic parameters analyzed in cultured MEFs including centromeric cohesion and chromosome stability were unaltered. In addition, we found that the absence of SGOL2 was dispensable for the development of the tis-

sular architecture of both the ovary and the testis including the highly proliferative spermatogonial compartment that sustains the spermatogenesis (de Rooij and de Boer 2003) as well as the proliferation capacity of cultured thymocytes. These results are in marked contrast with the assumption that human SGOL2 participates together with SGOL1 in protecting the centromeric cohesion in human HeLa cells, since when *Sgol2* was knocked down, a high incidence of prematurely chromatid separation was observed (Kitajima et al. 2006). Apart from the few putative species-specific differences between humans (HeLa) and mouse (MEFs), the fact that HeLa cells are not primary cell cultures but transformed cells with mutations in several important oncogenic and tumor-suppressor pathways such as p53, a tumor suppressor that interacts with the SAC pathway (Oikawa et al. 2005), might underlie some of the observed discrepancies. In this same regard, *Mei-S322*, the only shugoshin ortholog in *Drosophila*, is not essential for somatic cell division, embryonic development, and adult homeostasis (Kerrebrock et al. 1995).

Moving backward in terms of complexity, the fission yeast with two paralogs (*Sgo1* involved solely in meiosis and *Sgo2* involved in mitosis and meiosis) and the budding yeast with a single member (*Sgo1*) constitute very well-known systems to study this hypothesis. Despite controversial interpretations regarding the function of shugoshins in protecting centromeric cohesion (Goulding and Earnshaw 2005; Wang and Dai 2005) fueled by the strong meiotic phenotype observed in their mutants, the deficiency of either *Sgo1* or *Sgo2* did not elicit an obvious cohesion defect in mitosis (Katis et al. 2004; Kitajima et al. 2004; Marston et al. 2004). Moreover, these mutants shared properties at the mitotic level with other SAC mutants such as *MAD2*, like the presence of chromosome instability and aneuploidy as well as of an increased sensitivity to depolymerizing drugs (Indjeian et al. 2005). It thus seems from the more recent findings in yeast that shugoshins act by sensing tension across centromeres by interacting with members of the chromosomal passenger complex, enabling chromosome biorientation (Kawashima et al. 2007; Vanoosthuyse et al. 2007). We cannot rule out that in the absence of *Sgol2*, its paralog *Sgol1* could be playing a major role in protecting centromeric cohesion in mammalian mitosis constitutively or because of a compensatory mechanism. This possibility cannot be empirically tested in the absence of mice deficient for SGOL1. However, it has been reported recently that the Cre-dependent loss of the SAC protein BUB1 in MEFs resulted in the functional delocalization of SGOL1 from mitotic centromeres, while their chromatid cohesion was only modestly altered (Perera et al. 2007). In addition, the SGOL2 centromere loading is also dependent on BUB1 (Huang et al. 2007), a fact that would indicate that the simultaneous loss of function of both mouse shugoshins (in addition to BUB1) in this primary cell culture model does not abruptly compromise mitotic cohesion. Further development of a loss-of-function mouse models of SGOL1 will be required to assess this hypothesis.

Llano et al.

SGOL2 is necessary for protecting centromeric cohesion during the metaphase I/anaphase I transition

Our analysis of *Sgo12* mutant mice has allowed us to demonstrate unambiguously that mammalian SGOL2 is responsible for protecting the dissociation of centromeric cohesin complexes during meiosis I. This mechanism of protection is most likely due to the colocalization of SGOL2 and cohesin complexes at the inner domain of metaphase I centromeres (Gómez et al. 2007). In the absence of SGOL2, we found that REC8 and SMC3 are lost from centromeres at the metaphase I/anaphase I transition concomitant to the separation between sister kinetochores. However, and strikingly, sister chromatids remain associated at their centromeres, and anaphase I segregation proceeds normally. A similar chromosome behavior was previously found in mutants for *Mei-S322* in *Drosophila* meiosis I (Kerrebrock et al. 1995). These observations are apparently contradictory since we could expect that the loss of centromeric cohesin complexes would lead to the complete separation of chromatids during anaphase I and then to an aberrant segregation. In our opinion, in *Sgo12* mutants, chromosomes can segregate normally during anaphase I with separated kinetochores given that they were previously attached to microtubules emanating from the same pole at metaphase I, when they were closely associated. There are several possibilities that may explain why the loss of centromere cohesion is only detected at metaphase II-like spermatocytes and oocytes when cohesin complexes with REC8 and SMC3 are released from centromeres during the metaphase I/anaphase I transition. One possibility is that other RAD21-based cohesin complexes also located at the inner domain of metaphase I centromeres (Parra et al. 2004; Gómez et al. 2007) are not affected in the absence of SGOL2, and could maintain centromere cohesion during anaphase I while allowing the loss of association between sister kinetochores. Since it has been reported that RAD21 redistributes and is lost from centromeres during telophase I (Parra et al. 2004), only in this moment could sister centromeres separate. Another not exclusive possibility consists in the persistence of a topoisomerase II-dependent cohesion mechanism during anaphase I when REC8-containing cohesin complexes have been lost. Future studies are required to test these hypotheses.

It is tempting to speculate that the additional processes required for the stepwise loss of cohesion in yeast should also be necessary in mammals, such as homologous recombination, the REC8 phosphorylation status by the interplay between phosphatases (PP2A) and kinases (Polo kinases) at meiosis I, but not meiosis II, and the separase-dependent cleavage of the phosphorylated form of REC8. Supporting this notion, it has been elegantly demonstrated in a conditional mouse model of separase, that cohesin dissociation from chromosome arms at anaphase I is dependent on the proteolytic activity of separase onto REC8 (Kudo et al. 2006).

REC8 is considered as a specific cohesin subunit involved in the formation of the SC in yeast, flies, and

mammals (Watanabe and Nurse 1999; Lee et al. 2003). However, it remains controversial that the mammalian function of REC8 is constrained to the germline since mice lacking REC8 show perinatal mortality and adult infertility, whereas another reported loss-of-function mutation only displays infertility (Bannister et al. 2004; Xu et al. 2005). Likely, previous unpublished results reported in Lee et al. (2008) comments about the lethality of deficient *Sgo12*. In relation with the additional functions of cohesins, very recent evidence supports a non-canonical function in the integration of DNA sequence with the epigenetic state of the cell through the DNA-binding protein CTCF (Parelho et al. 2008).

Phylogenetic relationships of the shugoshin family of proteins

Genetic analysis in flies and later on in fission and budding yeast has shed essential knowledge on the chromosome cohesion field with the functional identification of the members of the shugoshin family of proteins (Kerrebrock et al. 1995; Kitajima et al. 2004). However, the confusing nomenclature used leads to the establishment of some putative erroneous phylogenetic relationships between their members attending to their numeration. This is specially significant in the case of the mammalian shugoshins (*Sgo11* and *Sgo12*) with respect to their yeast counterparts, which has hampered a true functional relationship among them. In addition, the very low sequence identity between the yeast and the mammalian counterparts has not allowed elucidation of their orthology relationship. Thus, and from the functional data accumulated in this study, essentially the major involvement of mouse SGOL2 in meiosis and its role in protecting centromeric cohesion in spermatocytes, we suggest that mammalian SGOL2 is the functional ortholog of *S. pombe* Sgo1. We can speculate that the remaining mammalian member, mouse SGOL1, will share functional abilities with its fission yeast counterpart Sgo2.

Alterations in the SGOL2 pathway can lead to meiosis II segregation defects and altered gametogenesis

Most of the human chromosome abnormalities found in fetuses result from nondisjunction during female meiosis I. In addition, there is a group of less frequent, but also important, trisomies (chromosome 18, and to a lesser extent chromosomes 13, 14, and 15, and 20% of the trisomies at chromosome 21) that arise because of meiosis II errors (Hassold et al. 2007). It has been previously postulated that partial alterations in the SGO/REC8/Separase cohesion pathway could lead to metaphase II nondisjunction in human gametogenesis and thus to aneuploidy (Orr-Weaver 1996; Warren and Goringe 2006). However, the *in vivo* analysis of mutations affecting this meiotic pathway has impacted our understanding of aneuploidy in a limited way due to the lack of viability of

the model or because most mutations lead to prophase I arrest and subsequent apoptosis (de Rooij and de Boer 2003). The SGOL2-deficient mouse model analyzed in this work constitutes an exception in which the meiotic alterations (loss of centromeric cohesion) do not apparently compromise prophase I, and the gametogenesis is completed in both sexes. Thus, this mutant provides new experimental evidence into the association between loss of chromosome cohesion, which would ultimately result in an increased susceptibility of premature chromosome segregation, and aneuploidy.

In this context, it has been reported in human and mouse that a gradual loss of chromosome cohesion in females is associated with chronological age coupled with a reduced expression of the SAC genes MAD2 and BUB1 (Cukurcam et al. 2004; Steuerwald 2005). This age-dependent missegregation has also been observed in a more rapid time scale in the SMC1 β mutant mouse (Hodges et al. 2005). We postulate that subtle alterations in the cohesin pathway due to either single nucleotide polymorphisms (SNPs) and/or age-dependent accumulated errors could account for a fraction of cases of mechanistically orphan aneuploidies. In this model, the *Sgol2*-deficient mice would display a full penetrance phenotype with complete infertility.

In summary, our results establish for the first time in a mammalian organism that SGOL2 deficiency does not alter mitotic progression. However, SGOL2 is essential for meiosis, and its deficiency provokes premature removal of REC8-containing cohesin complexes during anaphase I that leads to a loss of sister chromatid centromere cohesion during meiosis II, resulting in mice infertility.

Materials and methods

Mapping the integration site and genotyping

Insertion of the β -*geo* cassette was verified by XL-PCR (with primers exon 1 sense, 5'-ACCCTTCTCGGTAGCCACTCCTG-3'; and a universal LacZ antisense, 5'-GTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG-3') using as template genomic DNA obtained from the embryonic cell line D025B05 and an Expand long template PCR polymerase kit (Roche). The PCR product was cloned in the EcoRV site of pBS (Stratagene), and the integration site was sequenced using universal primers.

Genotyping of the colony was performed by Southern blot analysis using as probe a PCR fragment amplified from genomic DNA using primers exon 2 sense, 5'-CTGTTACCTCTGG AATTCAGAG-3'; and intron 2 antisense, 5'-CACTTGGC TCTCCTTGGCATAACC-3'. The 870-bp fragment enclosed exon 2 and part of the adjacent intron 2. The probe was labeled with α -dCTP³² (Perkin Elmer) by random priming. The probe recognized a 13-kb EcoRV restriction band in wild-type DNA and a 7-kb restriction band in the *Sgol2* mutant allele due to an EcoRV site located in the β -*geo* cassette.

The ES cell clone was used to generate chimeric mice by standard microinjection procedures at the University of Salamanca Transgenic facility. Two highly chimeric males were bred to C57BL/6 females transmitting the *Sgol2* allele by germline. The genetic background under which the mutation was analyzed is a mixed BL6/129. The handling, maintenance and

care of the animals, as well as all procedures performed in this study, were in accordance with institutional guidelines (CSIC and USAL).

Fertility assessment

We investigated the reproductive capacities of *Sgol2*^{-/-} and wild-type mice by mating one male with two females for 2 wk. Female mice were examined for vaginal plugs each morning, and litter size was recorded on delivery after three successive matings.

Cell culture and proliferation assays

MEFs were derived from embryonic day 13.5 (E13.5) embryos following standard procedures. Cells were cultured at atmospheric oxygen pressure in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma), 1% nonessential amino acids, and 2 mM Gln. Serial 3T3 cultivation was carried out following standard procedures. Briefly, 10⁶ cells were plated on 10-cm diameter dishes, and 3 d later, the total number of cells in the dish was counted and 10⁶ cells were replated again. This procedure was repeated for 25 passages. The increase in population doubling level (PDL) was calculated according to the formula $PDL = \log(n_i/n_0)/\log 2$, where n_0 is the initial number of cells and n_i is the final number of cells.

For cell proliferation assays, 2.5 \times 10⁴ or 4 \times 10⁴ cells/well were seeded in 12-well plates with 10% fetal bovine serum. The number of cells was counted daily.

Immunofluorescence microscopy

For immunofluorescence, mitotic cells were fixed in cold 4% paraformaldehyde in PBS, rinsed in PBS, permeabilized with 0.2% Triton X-100, and incubated with the corresponding primary antibodies diluted in 7% FCS in PBS. The Rhodamine and FITC-conjugated secondary antibodies were from Jackson. Nuclei were counterstained with DAPI diluted in Vectashield (Vector Laboratories).

Testes from adult male *Sgol2*^{+/+}, *Sgol2*^{+/-}, and *Sgol2*^{-/-} mice were used. Testes were removed and detunicated, and seminiferous tubules were fixed for squashing and subsequent immunofluorescence as previously described (Page et al. 1998). The slides were rinsed three times for 5 min in PBS and incubated for 45 min at room temperature or 12 h at 4°C with primary antibodies diluted in PBS. The slides were then incubated for 30 min at room temperature with either a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Jackson) secondary antibody (1:150) in PBS, a FITC-conjugated donkey anti-sheep IgG (Jackson) secondary antibody (1:40) in PBS, a FITC-conjugated donkey anti-mouse IgG (Jackson) secondary antibody (1:150) in PBS, or a Texas Red-conjugated donkey anti-human IgG (Jackson) secondary antibody (1:150) in PBS. The slides were counterstained with DAPI and mounted with Vectashield (Vector Laboratories). Kinetochores were revealed with a purified human anti-centromere autoantibody (ACA) serum (Antibodies Incorporated, 15-235) at a 1:50 dilution. SGOL2 was detected with the rabbit polyclonal serum K1059 against the C terminus of mouse SGOL2 (Gómez et al. 2007) at a 1:20 dilution. The cohesin subunit REC8 was detected with a rabbit polyclonal serum against the C terminus of mouse REC8 kindly provided by J. Lee at a 1:10 dilution. To detect SYCP3, we used a mouse monoclonal antibody (Abcam, ab-12452) at a 1:100 dilution. An affinity-purified sheep polyclonal antibody against human BubR1 (SBR1.1) kindly provided by Stephen S. Taylor was used at a 1:50 dilution. To detect CENP-E, we used a polyclonal

Llano et al.

rabbit serum (pAb1.6) that recognizes the neck region (amino acids 256–817) of human CENP-E kindly provided by T. Yen at a 1:100 dilution. The antibody against anti-histone H3 phosphorylated at Ser-10 (P-H3-Ser¹⁰) was from Upstate Biotechnologies and was used at 1:400.

Immunofluorescence image stacks were collected on an Olympus BX61 microscope equipped with epifluorescence optics, a motorized z-drive, and an Olympus DP70 digital camera controlled by analySIS software (Soft Imaging System). Stacks were analyzed and processed using the public domain ImageJ software (National Institutes of Health; <http://rsb.info.nih.gov/ij>) and VirtualDub (VirtualDub.org; <http://www.virtualdub.com>). Final images were processed with Adobe Photoshop 7.0 software.

Histology and β -gal histochemistry

For histological analysis, samples were fixed with cold 4% paraformaldehyde in PBS, processed into serial paraffin sections, and stained with H&E. Histochemical analysis of β -galactosidase reporter activity in frozen sections was performed following standard procedures.

Superovulation of female mice

At least three individuals of each genotype were induced successfully to superovulate using a standard procedure. Pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG; Folligon; Intervet) and human chorionic gonadotropin (HCG; Chorulon; Intervet) were used to induce efficient superovulation. Briefly, 4-wk-old C57BL/6J females were injected intraperitoneally with 7 U.I. PMSG resuspended in 0.1 mL of saline solution at 2 p.m. into each animal, and the same dosage of HCG was administered 46 h later. Unfertilized oocytes enclosed in cumulus were collected 21 h post-HCG administration, digested with hyaluronidase under microscope, and immediately used for chromosome preparation. Meiotic chromosome figures were obtained following the classical air-dried technique and C-banded.

Karyotyping of MEFs

Metaphases were obtained from MEFs at passage 4–5 by standard procedures. Active growing cultures were arrested using colcemide (1 μ g/mL) for 4 h, trypsinized, treated with hypotonic solution (0.75 mM KCl), and fixed with Methanol/Acetic. At least 50 metaphases were counted from four independent embryos of each genotype.

Acknowledgments

We acknowledge Dr. C. López-Otín and Dr. A. Folgueras for their advice and Dr. A.K.Tarkowski for helpful comments. We express our sincere thanks to Drs. J. Lee, S.S. Taylor, T. Yen, L. Wordeman, M. Serrano, and M. Balbin for providing antibodies and reagents. This work was supported by SAF-2005-01993, J CyLe (SA), CSIC 2006 2 01 051, and Fundación Mutua Madrileña. C.G.C. and Y.S. are supported by FIS and FPI fellowships, respectively. E.L. and M.S.M. are recipients of a Ramón y Cajal Research contract. M.S.M. is supported by FIS and Junta de Castilla y León. J.A.S. and R.G. are supported by grants BFU2005-05668-C03-01/BCM from MEC and CCG06-UAM/SAL-0260 from UAM/Comunidad de Madrid, and an FPI predoctoral fellowship, respectively. A.C. and J.L.B. are supported by BFU2006-04406/BMC from MEC and P-BIO-0189-2006 from CAM.

References

- Bannister, L.A., Reinholdt, L.G., Munroe, R.J., and Schimenti, J.C. 2004. Positional cloning and characterization of mouse mei8, a disrupted allele of the meiotic cohesin Rec8. *Genesis* **40**: 184–194.
- Buonomo, S.B., Clyne, R.K., Fuchs, J., Loidl, J., Uhlmann, F., and Nasmyth, K. 2000. Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell* **103**: 387–398.
- Cukurcam, S., Sun, F., Betzendahl, I., Adler, I.D., and Eichenlaub-Ritter, U. 2004. Trichlorfon predisposes to aneuploidy and interferes with spindle formation in vitro maturing mouse oocytes. *Mutat. Res.* **564**: 165–178.
- de Rooij, D.G. and de Boer, P. 2003. Specific arrests of spermatogenesis in genetically modified and mutant mice. *Cytogenet. Genome Res.* **103**: 267–277.
- Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M.W. 1998. The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes & Dev.* **12**: 1871–1883.
- Gómez, R., Valdeolmillos, A., Parra, M.T., Viera, A., Carreiro, C., Roncal, F., Rufas, J.S., Barbero, J.L., and Suja, J.A. 2007. Mammalian SGO2 appears at the inner centromere domain and redistributes depending on tension across centromeres during meiosis II and mitosis. *EMBO Rep.* **8**: 173–180.
- Goulding, S.E. and Earnshaw, W.C. 2005. Shugoshin: A centromeric guardian senses tension. *Bioessays* **27**: 588–591.
- Gruber, S., Haering, C.H., and Nasmyth, K. 2003. Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell* **112**: 765–767.
- Hamant, O., Golubovskaya, I., Meeley, R., Fiume, E., Timofejeva, L., Schleiffer, A., Nasmyth, K., and Cande, W.Z. 2005. A REC8-dependent plant Shugoshin is required for maintenance of centromeric cohesion during meiosis and has no mitotic functions. *Curr. Biol.* **15**: 948–954.
- Hassold, T. and Hunt, P. 2002. Rescuing distal crossovers. Sex matters in meiosis. *Science* **296**: 2181–2183.
- Hassold, T., Hall, H., and Hunt, P. 2007. The origin of human aneuploidy: Where we have been, where we are going. *Hum. Mol. Genet.* **16**: 203–208.
- Hauf, S. and Watanabe, Y. 2004. Kinetochores orientation in mitosis and meiosis. *Cell* **119**: 317–327.
- Hauf, S., Roitinger, E., Koch, B., Ditttrich, C.M., Mechtler, K., and Peters, J.M. 2005. Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol.* **3**: 419–432.
- Hirano, T. 2006. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**: 311–322.
- Hodges, C.A., Revenkova, E., Jessberger, R., Hassold, T.J., and Hunt, P.A. 2005. SMC1 β -deficient female mice provide evidence that cohesins are a missing link in age-related nondisjunction. *Nat. Genet.* **37**: 1351–1355.
- Huang, J. and Moazed, D. 2006. Sister chromatid cohesion in silent chromatin: Each sister to her own ring. *Genes & Dev.* **20**: 132–137.
- Huang, H., Feng, J., Famulski, J., Rattner, J.B., Liu, S.T., Kao, G.D., Muschel, R., Chan, G.K., and Yen, T.J. 2007. Tripin/hSgo2 recruits MCAK to the inner centromere to correct defective kinetochore attachments. *J. Cell Biol.* **177**: 413–424.
- Indjeian, V.B., Stern, B.M., and Murray, A.W. 2005. The centromeric protein Sgo1 is required to sense lack of tension on mitotic chromosomes. *Science* **307**: 130–133.
- Katis, V.L., Galova, M., Rabitsch, K.P., Gregan, J., and Nasmyth, K. 2004. Maintenance of cohesin at centromeres after meiosis I in budding yeast requires a kinetochore-associated protein related to MEI-S332. *Curr. Biol.* **14**: 560–572.

- Kawashima, S.A., Tsukahara, T., Langegger, M., Hauf, S., Kitajima, T.S., and Watanabe, Y. 2007. Shugoshin enables tension-generating attachment of kinetochores by loading Aurora to centromeres. *Genes & Dev.* **21**: 420–435.
- Kerrebrock, A.W., Moore, D.P., Wu, J.S., and Orr-Weaver, T.L. 1995. Mei-S332, a *Drosophila* protein required for sister-chromatid cohesion, can localize to meiotic centromere regions. *Cell* **83**: 247–256.
- Kim, E.M. and Burke, D.J. 2008. DNA damage activates the SAC in an ATM/ATR-dependent manner, independently of the kinetochore. *PLoS Genet.* **4**: e1000015. doi: 10.1371/journal.pgen.1000015.
- Kitajima, T.S., Kawashima, S.A., and Watanabe, Y. 2004. The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* **427**: 510–517.
- Kitajima, T.S., Sakuno, T., Ishiguro, K., Iemura, S., Natsume, T., Kawashima, S.A., and Watanabe, Y. 2006. Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* **441**: 46–52.
- Kouznetsova, A., Lister, L., Nordenskjöld, M., Herbert, M., and Höög, C. 2007. Bi-orientation of achiasmatic chromosomes in meiosis I oocytes contributes to aneuploidy in mice. *Nat. Genet.* **39**: 966–968.
- Kudo, N.R., Wassmann, K., Anger, M., Schuh, M., Wirth, K.G., Xu, H., Helmhart, W., Kudo, H., McKay, M., Maro, B., et al. 2006. Resolution of chiasmata in oocytes requires separase-mediated proteolysis. *Cell* **126**: 135–146.
- Lammers, J.H., Offenberger, H.H., van Aalderen, M., Vink, A.C., Dietrich, A.J., and Heyting, C. 1994. The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 1137–1146.
- Lee, J., Iwai, T., Yokota, T., and Yamashita, M. 2003. Temporally and spatially selective loss of Rec8 protein from meiotic chromosomes during mammalian meiosis. *J. Cell Sci.* **116**: 2781–2790.
- Lee, J., Kitajima, T.S., Tanno, Y., Yoshida, K., Morita, T., Miyano, T., Miyake, M., and Watanabe, Y. 2008. Unified mode of centromeric protection by shugoshin in mammalian oocytes and somatic cells. *Nat. Cell Biol.* **10**: 42–52.
- Losada, A. and Hirano, T. 2005. Dynamic molecular linkers of the genome: The first decade of SMC proteins. *Genes & Dev.* **19**: 1269–1287.
- Marston, A.L., Tham, W.H., Shah, H., and Amon, A. 2004. A genome-wide screen identifies genes required for centromeric cohesion. *Science* **303**: 1367–1370.
- McGuinness, B.E., Hirota, T., Kudo, N.R., Peters, J.M., and Nasmyth, K. 2005. Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. *PLoS Biol.* **3**: 433–449.
- Nasmyth, K. 2002. Segregating sister genomes: The molecular biology of chromosome separation. *Science* **297**: 559–565.
- Oikawa, T., Okuda, M., Ma, Z., Goorha, R., Tsujimoto, H., Inokuma, H., and Fukasawa, K. 2005. Transcriptional control of BubR1 by p53 and suppression of centrosome amplification by BubR1. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 4046–4061.
- Orr-Weaver, T. 1996. Meiotic non-disjunction does the two-step. *Nat. Genet.* **14**: 374–376.
- Page, S.L. and Hawley, R.S. 2003. Chromosome choreography: The meiotic ballet. *Science* **301**: 785–789.
- Page, J., Suja, J.A., Santos, J.L., and Rufas, J.S. 1998. Squash procedure for protein immunolocalization in meiotic cells. *Chromosome Res.* **6**: 639–642.
- Parelho, V., Hadjur, S., Spivakov, M., Leleu, M., Sauer, S., Gregson, H.C., Jarmuz, A., Canzonetta, C., Webster, Z., Nesterova, T., et al. 2008. Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell* **132**: 422–433.
- Parra, M.T., Viera, A., Gómez, R., Page, J., Benavente, R., Santos, J.L., Rufas, J.S., and Suja, J.A. 2004. Involvement of the cohesin Rad21 and SCP3 in monopolar attachment of sister kinetochores during mouse meiosis I. *J. Cell Sci.* **117**: 1221–1234.
- Perera, D., Tilston, V., Hopwood, J.A., Barchi, M., Boot-Handford, R.P., and Taylor, S.S. 2007. Bub1 maintains centromeric cohesion by activation of the spindle checkpoint. *Dev. Cell* **13**: 566–579.
- Petronczki, M., Siomos, M.F., and Nasmyth, K. 2003. Un ménage à quatre: The molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* **112**: 423–440.
- Prieto, I., Suja, J.A., Pezzi, N., Kremer, L., Martínez-A, C., Rufas, J.S., and Barbero, J.L. 2001. Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms during meiosis I. *Nat. Cell Biol.* **3**: 761–766.
- Rabitsch, K.P., Gregan, J., Schleiffer, A., Javerzat, J.P., Eisenhaber, F., and Nasmyth, K. 2004. Two fission yeast homologs of *Drosophila* Mei-S332 are required for chromosome segregation during meiosis I and II. *Curr. Biol.* **14**: 287–301.
- Rivera, T. and Losada, A. 2006. Shugoshin and PP2A, shared duties at the centromere. *Bioessays* **8**: 775–779.
- Schnütgen, F., Schnütgen, F., De-Zolt, S., Van Sloun, P., Hollatz, M., Floss, T., Hansen, J., Altschmied, J., Seisenberger, C., Ghyselinck, N.B., et al. 2005. Genome wide production of multipurpose alleles for the functional analysis of the mouse genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 7221–7226.
- Steuerwald, N. 2005. Meiotic spindle checkpoints for assessment of aneuploid oocytes. *Cytogenet. Genome Res.* **111**: 256–259.
- Vanoosthuysse, V., Prykhozhiy, S., and Hardwick, K.G. 2007. Shugoshin 2 regulates localization of the chromosomal passenger proteins in fission yeast mitosis. *Mol. Biol. Cell* **18**: 1657–1669.
- Vaur, S., Cubizolles, F., Plane, G., Genier, S., Rabitsch, P.K., Gregan, J., Nasmyth, K., Vanoosthuysse, V., Hardwick, K.G., and Javerzat, J.P. 2005. Control of Shugoshin function during fission-yeast meiosis. *Curr. Biol.* **15**: 2263–2270.
- Waizenegger, I.C., Hauf, S., Meinke, A., and Peters, J.M. 2000. Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* **103**: 399–410.
- Wang, X. and Dai, W. 2005. Shugoshin, a guardian for sister chromatid segregation. *Exp. Cell Res.* **310**: 1–9.
- Warren, W.D. and Gorringe, K.L. 2006. Molecular model for sporadic human aneuploidy. *Trends Genet.* **22**: 218–224.
- Watanabe, Y. 2005. Sister chromatid cohesion along arms and at centromeres. *Trends Genet.* **21**: 405–412.
- Watanabe, Y. and Nurse, P. 1999. Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* **400**: 461–464.
- Weaver, B.A. and Cleveland, D.W. 2005. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation and cell death. *Cancer Cell* **8**: 7–12.
- Weaver, B.A., Bonday, Z.Q., Putkey, F.R., Kops, G.J., Silk, A.D., and Cleveland, D.W. 2003. Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *J. Cell Biol.* **162**: 551–563.
- Xu, H., Beasley, M.D., Warren, W.D., van der Horst, G.T., and McKay, M.J. 2005. Absence of mouse REC8 cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis. *Dev. Cell* **8**: 949–961.

Identification and molecular characterization of the mammalian α -kleisin RAD21L

Cristina Gutiérrez-Caballero,^{1,†} Yurema Herrán,^{1,†} Manuel Sánchez-Martín,² José Ángel Suja,³ José Luis Barbero,⁴ Elena Llano^{1,5,*} and Alberto M. Pendás^{1,*}

¹Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (CSIC-USAL); ²Departamento de Medicina; ³Departamento de Fisiología; Campus Miguel de Unamuno; Salamanca, Spain; ⁴Unidad de Biología Celular; Departamento de Biología; Universidad Autónoma de Madrid; Madrid, Spain ⁵Departamento de Proliferación Celular y Desarrollo; Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC); Madrid, Spain

[†]These authors contributed equally to this work.

Key words: cohesins, kleisin, meiosis, mitosis, chromosome segregation, synaptonemal complex

Abbreviations: CC, cohesin complex; AE, axial element; LE, lateral element; IP, immunoprecipitation; SC, synaptonemal complex; ORF, open reading frame; WB, western blot

Meiosis is a fundamental process that generates new combinations between maternal and paternal genomes and haploid gametes from diploid progenitors. Many of the meiosis-specific events stem from the behavior of the cohesin complex (CC), a proteinaceous ring structure that entraps sister chromatids until the onset of anaphase. CCs ensure chromosome segregation, participate in DNA repair, regulate gene expression, and also contribute to synaptonemal complex (SC) formation at meiosis by keeping long-range distant DNA interactions through its conserved structure. Studies from yeast to humans have led to the assumption that Scc1/RAD21 is the α -kleisin that closes the tripartite CC that entraps two DNA molecules in mitosis, while its paralog REC8 is essential for meiosis. Here we describe the identification of RAD21L, a novel mammalian CC subunit with homology to the RAD21/REC8 α -kleisin subfamily, which is expressed in mouse testis. RAD21L interacts with other cohesin subunits such as SMC1 α , SMC1 β , SMC3 and with the meiosis-specific STAG3 protein. Thus, our results demonstrate the existence of a new meiotic-specific CC constituted by this α -kleisin and expand the view of REC8 as the only specific meiotic α -kleisin.

During meiosis, two successive rounds of chromosome segregation occur with a single round of replication, which leads to the production of haploid gametes from diploid progenitors.¹ This ploidy reduction is achieved by meiosis-specific events such as pairing, synapsis, crossing over between homologs, suppression of sister centromere separation during the meiosis I (reductional division) and separation of sister chromatids in meiosis II (equational division). Sister chromatid cohesion is mediated by a ring-shaped proteinaceous complex named the cohesin complex (CC), which entraps the sister chromatids from its establishment at the S-phase of the cell cycle until its opening at the onset of anaphase.²⁻⁵ The distinct patterns of chromosome dynamics between mitosis and meiosis II (biorientation) and meiosis I (monorientational) stem in part from a meiosis-specific mechanism of protection of the centromeric cohesion^{6,7} and from differences in the composition of the CC between the somatic and the germline lineages.

The mammalian CC is composed of four proteins: two members of the family of structural maintenance of chromosome proteins (SMC1 α and SMC3 at mitosis, and SMC1 α or SMC1 β and SMC3 at meiosis), one α -kleisin subunit (SCC1/RAD21 at

mitosis and/or REC8 at meiosis) and a HEAT repeat domain protein (STAG1 or STAG2 at mitosis and STAG1, STAG2 or STAG3 at meiosis).^{8,9} This proteinaceous complex is supposed to form a tripartite ring that can be cleaved at the α -kleisin subunit (either RAD21 or REC8) by the action of separase.⁸ The activity of this protease plays a crucial function in the metaphase to anaphase transition.⁹ In addition to the structural components of the CC, there are several cohesin-interacting proteins that regulate the dynamics of CC such as PDS5 (two paralogs exist in mammals PDS5A and PDS5B), WAPAL, Sororin, the loading factor NIPBL/SCC2, the lysine acetylases ESCO1/ESCO2 and the yeast lysine deacetylase Hos1.¹⁰⁻¹²

An important aspect of the cohesins in meiosis, apart from its function in chromosome dynamics, is related to their contribution to the assembly of the SC and eventually, in the generation of the axis-loop structure of meiotic chromosomes, which supports synapsis, recombination and segregation.¹³⁻¹⁵ The assembly of the axial element (AE) of the SC after DNA replication is one of the earliest events of meiosis. In mammals, the cohesin subunits RAD21, REC8, SMC3, SMC1 α , SMC1 β and STAG3 and WAPAL decorate the AEs of the SC from its assembly at leptotene

*Correspondence to: Elena Llano and Alberto M. Pendás; Email: amp@usal.es and ellano@usal.es
Submitted: 03/16/11; Accepted: 03/17/11
DOI: 10.4161/cc.10.9.15515

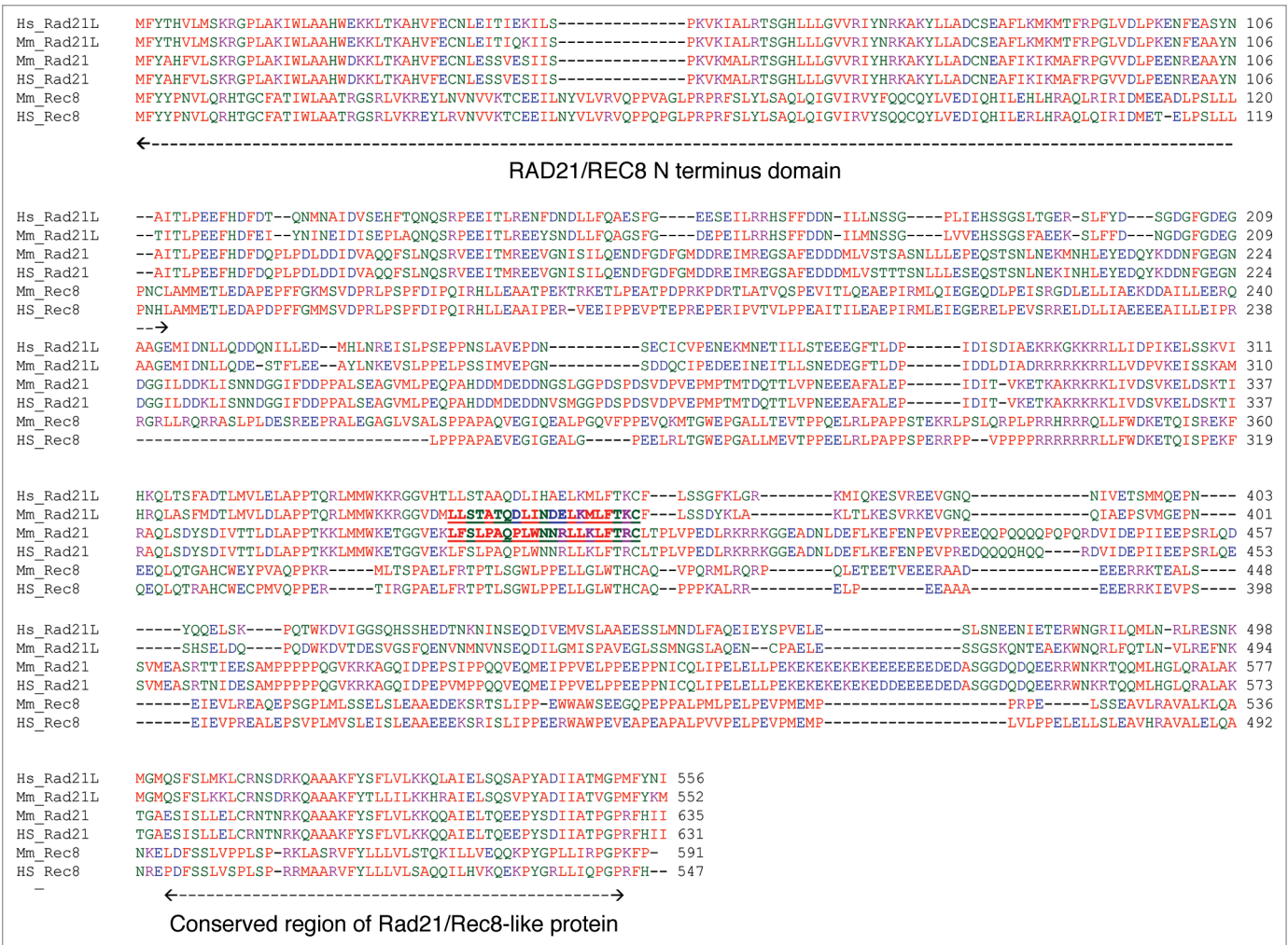


Figure 1. Alignment of the three members of the α -kleisin family (RAD21L, RAD21 and REC8) from mouse (Mm) and human (Hs). The mouse and human ORFs of RAD21L, RAD21 and REC8 were translated and the proteins aligned using CLUSTAL. The mouse RAD21L protein has 56% similarity (41% identity) with mouse RAD21 and 35.7% similarity (21% identity) with mouse REC8 and contains the two Pfam domains present in RAD21/REC8 α -kleisins; the so-called "RAD21/REC8 N-terminus domain" (expanding from residues 1 to 111) and a C-terminal domain named "Conserved region of RAD21/REC8 like proteins" (expanding from residues 496–548 in the mouse). These domains are underlined. The regions deleted in the mutant mouse proteins $\Delta_{345,365}$ RAD21L and $\Delta_{372,392}$ RAD21 are bolded and underlined in the corresponding sequence.

to the full synapsed lateral elements (LEs) at pachytene.¹⁶⁻²¹ It is not until diakinesis when most of the structural components of the AEs/LEs are partially removed including cohesins.²² Based on the inability of yeast Rec8 mutants and meiotic-kleisin-deficient *C. elegans* (Rec8, COH-3 and COH-4) to form AEs, it is becoming widely accepted that cohesins play a pivotal role in the AE assembly.^{23,24} However, this requirement is not so evident in mammals since it has been observed that REC8-deficient mice are able to assemble AEs in male and female meocytes.²⁵ This fact has been attributed to the coexpression of several α -kleisins in mammalian meocytes, as is the case for *C. elegans*, which would be masking the essential and conserved function of cohesins in AE assembly.²⁴ In this work we describe the molecular cloning and biochemical characterization of RAD21L, a novel mammalian protein of the CC with homology to the RAD21/REC8 α -kleisin subfamily. This novel α -kleisin interacts with other cohesin subunits such as SMC1 α , SMC1 β , SMC3 and with the

meiosis-specific STAG3 but not with STAG1/2. The *Rad21l* transcript is detected by northern blot analysis only in testis. Accordingly, RAD21L protein is expressed in mouse meocytes localizing to the AEs/LEs of the SC.

Results and Discussion

Based on the existence of paralogs for most of the cohesin subunits in mammals, and given the fact that other species such as *C. elegans* have five different kleisins, we searched for paralogs of the RAD21/REC8 in silico using their conserved N-terminal and C-terminal domains (see Methods). A new ORF encoding for a new protein was obtained from mouse and human by RT-PCR (552 and 556 residues respectively, accession numbers HQ603827 and HQ603828) of RNAs from testis and from the MCF7 cell line respectively. Recently, it has been annotated by the Ensembl as *Rad21l* (BC171911 Gene Bank). Herein, we will

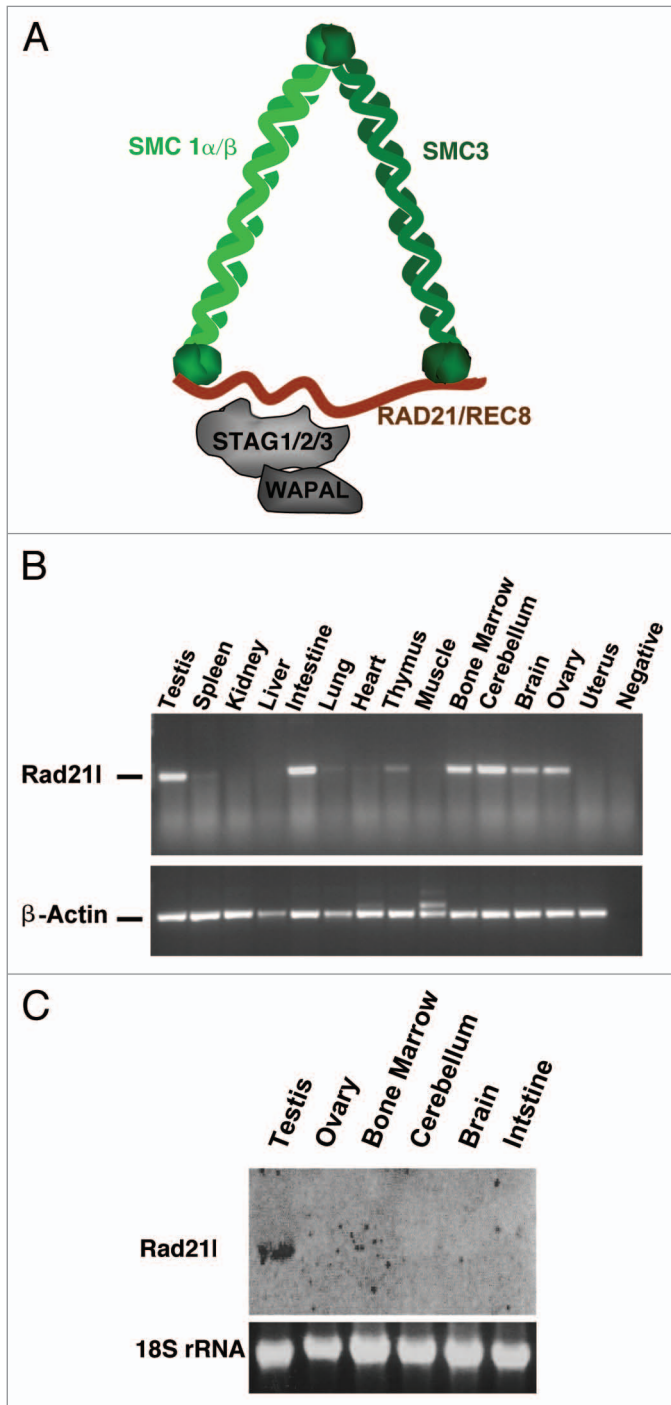


Figure 2. Model of the cohesin complex and mouse tissue expression pattern of *Rad21l*. (A) Schematic representation of the ring-like model of the mammalian CC and the cohesin-regulator WAPAL. In the ring model of the CC two members of the SMC family (SMC1 α/β and SMC3) associate with one α -kleisin subunit that closes the ring (RAD21 or REC8) and with a HEAT repeat domain protein (STAG1, STAG2 or STAG3). (B) RT-PCR of RNAs from the indicated mouse tissues was analyzed by agarose gel electrophoresis using primers S2 and AS2 to amplify a 352 bp fragment of *Rad21l*. RT-PCR of a fragment of the β -Actin RNA was used as control. (C) Tissue expression of murine *Rad21l* by northern blot.

use the name RAD21L. The mouse RAD21L protein shows 56% similarity with mouse RAD21 and 35.7% similarity with mouse REC8, and contains the two Pfam domains present in RAD21/REC8 α -kleisins (Fig. 1). In its paralog RAD21, these domains interact with the head of SMC1 α/β and SMC3, locking the CC (Fig. 2A).

In order to determine the *Rad21l* transcription pattern in mouse, we carried out RT-PCR of RNAs from different mouse tissues. The amplified product, indicative of positive transcription, was obtained in testis, intestine, brain, bone marrow, cerebellum and ovary (Fig. 2B). Given the non-quantitative measurement of this RT-PCR procedure (35 cycles), we undertook a quantitative analysis by a classical northern blot technique of these positive tissues. The results obtained showed only a transcript of RAD21L in testis (3.5 Kbs approximately), being undetectable in the remaining tissues (Fig. 2C). Since oocytes are not the predominant cell type in whole ovary extracts, we can not rule out that oocyte could also express RAD21L at moderate levels (see below). From these results, we conclude that RAD21L is expressed very weakly in a variety of somatic tissues, being the testis the only organ with a moderate level of transcription. Interestingly, this situation is also mirrored in the pattern of transcription of REC8 (which is widely accepted to be meiosis-specific) in somatic tissues with an unknown function such as in thymus (www.symatlas.org). Taking together our results of the transcription analysis of RAD21L, we anticipate that this novel α -kleisin could be playing a major reproductive function in the mouse.

Given the absence of cellular models in the male germline that enable studies of gain and loss of function, we first made use of a heterologous system. Human Embryonic Kidney (HEK) 293T cells were transiently transfected with an expression plasmid encoding RAD21L tagged at the N terminus and subjected to immunoprecipitation (IP). The two prominent bands obtained were identified by mass spectrometry as SMC1 α and SMC3 (Fig. 3A). The efficiency and specificity of the immunoprecipitated proteins were comparable using an expression vector of *Rad21l*. The reciprocal interaction was validated by western blot (Fig. 3B). Similarly, RAD21L was also able to interact with SMC1 β as well as with SMC1 α (Fig. 3C and D). In order to validate the observed interactions using this overexpression model, we confirmed that transfected RAD21L was targeted to the nucleus and bound to chromatin in a way similar to that expected for a cohesin subunit (Fig. 3E and F).

Aside from the structural subunits of the CC, several additional above mentioned regulatory factors such as PDS5 and WAPAL have been demonstrated to play important roles in the dissociation of most cohesins from sister chromatids at the mitotic prophase in the so-called sister chromatid resolution.^{26,27} Recently, the region of interaction of STAG1 with RAD21 has been mapped and proposed to be needed for the assembly and function of WAPAL to the CC.²⁸ Thus, we next sought to examine whether RAD21L is also able to interact with these subunits. For this purpose, we transiently expressed *Rad21l* in HEK 293T cells as well as two novel engineered expressing vectors with deletions at the region of interaction of RAD21

with STAG1²⁸ and at the corresponding homologous region of RAD21L ($\Delta_{345,365}$ Rad21L and $\Delta_{372,392}$ Rad21L). We did not observe interaction of RAD21L/ $\Delta_{345,365}$ RAD21L with STAG1 and/or STAG2 nor with WAPAL, whereas RAD21 was able to interact with these proteins and its negative control ($\Delta_{372,392}$ RAD21) was not, further supporting the specificity of our assay (Fig. 4A–C). Owing to the tetrapartite structure of the cohesin core complex and to the expression of RAD21L at testis, we asked whether STAG3 could be the HEAT repeat domain protein that interacts with this new α -kleisin. Interestingly, RAD21L was able to interact with STAG3 (Fig. 5A). This interaction is also observed with RAD21 and is not mediated via the same domain that interacts with STAG1/STAG2. In order to validate these interactions in vivo, we carried out IP using antibodies directed against RAD21L in testis extracts. SMC3, SMC1 β and STAG3 but not STAG1 were co-precipitated with RAD21L. Similarly, RAD21L were co-precipitated with SMC1 α and SMC3 (Fig. 5B and C). Taken together, we thus conclude that the new α -kleisin RAD21L is able to interact with SMC1 α/β , SMC3 and STAG3 as a new bona fide element of the CC (Fig. 5D) but with distinctive properties such as its inability to interact with STAG1, STAG2 and WAPAL.

We next determined the subcellular localization of RAD21L in meiocytes using two antibodies raised against the C-terminus end of the protein (see Methods for details). To do that, we carried out an analysis of mouse spermatocytes/oocytes spreads using immunofluorescence (IF) colocalization of RAD21L and SYCP3, a structural component of the AEs/LEs that enables meiosis staging. The results showed that RAD21L is located at the AEs and LEs of spermatocytes and oocytes (Fig. 6), similarly to other cohesin subunits such as REC8 and RAD21.^{17,19} Thus endogenous RAD21L protein is detected and locates to the SC of both spermatocytes and oocytes.

These conclusions are consistent with two very recent reports (appeared while this manuscript was being edited) using other reagents and strategies.^{29,30} In these studies, the same ORF was also identified. The protein, named RAD21L by these two independent groups, is likewise shown to be located at the AEs/LEs of the SC of spermatocytes and oocytes.^{29,30} In these works, the pattern of transcription is restricted to reproductive tissues and no transcription was detected in somatic tissues. These discrepancies with our study could be due in part to different sensitivities between the RT-PCR assays. Nevertheless, in both reports, the protein RAD21L is also showed to interact with SMC1 α/β ,

SMC3 and STAG3 in testis extracts^{29,30} which is also the tissue found to express the new protein.

Given that all the cohesin subunits are expressed simultaneously in testis, is very plausible that different CCs could coexist within the same cell at the same time following the tetrapartite ring model: SMC1(α or β)-SMC3- α -Kleisin(RAD21, REC8 or RAD21L)-STAG(1, 2 or 3) suggesting specific CC program during mammalian meiosis. From our results, we provide experimental evidences showing that RAD21L is able to constitute a meiotic-specific CC with SMC3-SMC1 α/β -STAG3.

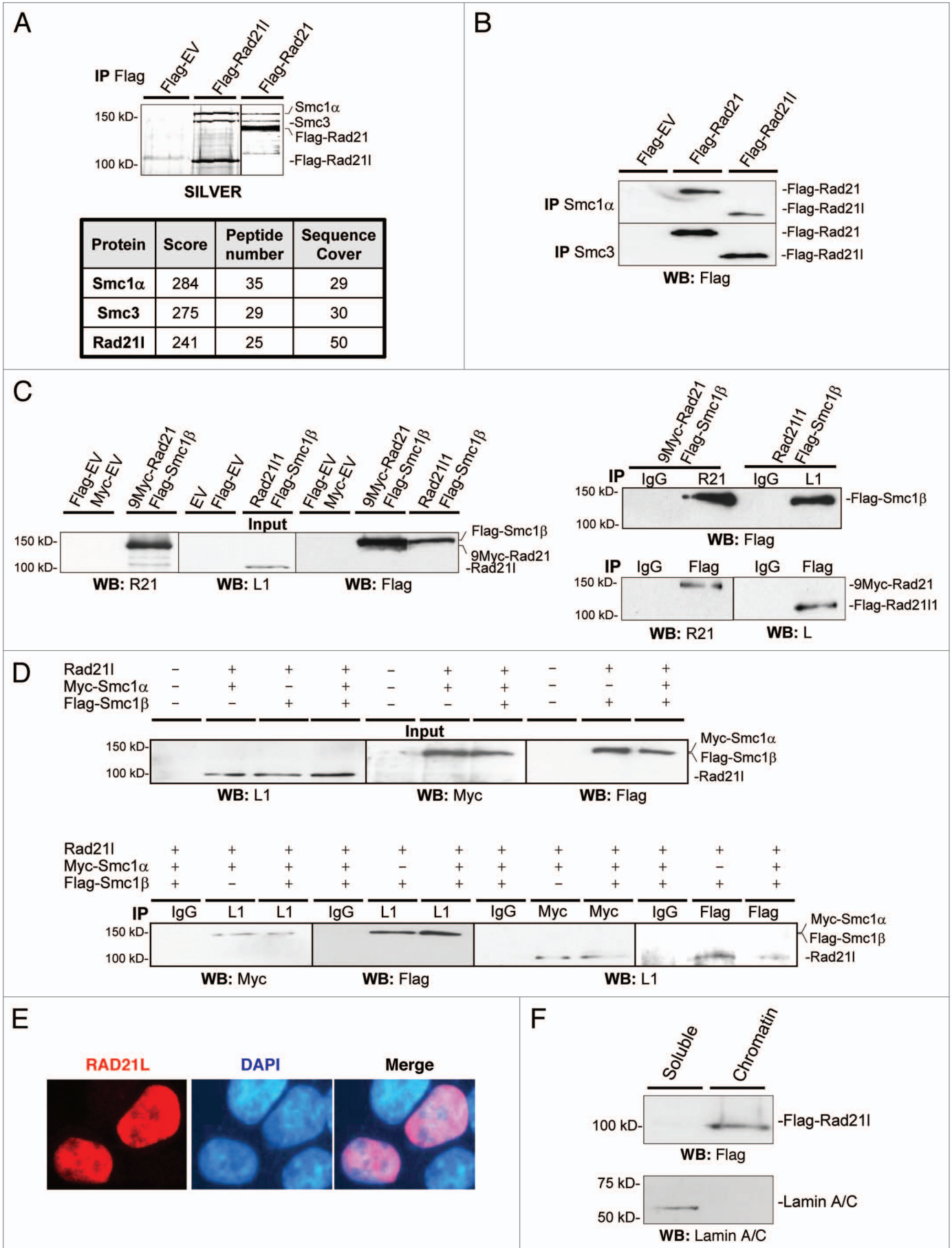
Finally, we analyzed the genetic relationship of RAD21L with their paralogs RAD21 and REC8 by using an in silico analysis of sequenced genomes from sea urchin to humans. This evolutionary analysis shows that RAD21L is most likely a paralog of RAD21 and is present from bony fish to mammals including reptiles and birds but was lost by the amphibian lineage (Fig. 7). From this analysis, it is interesting to also note the surprising absence of REC8 in the avian lineage, which suggests that RAD21L could have functionally replaced the meiotic function of REC8.

In summary, we provide evidences that RAD21L is a new α -kleisin related with RAD21 which is only expressed at moderate levels in spermatocytes/oocytes. Given the localization of RAD21L at the AEs/LEs of the SC during prophase I and its ability to interact specifically with the meiotic-specific STAG3, we suggest that this α -kleisin participates in the composite molecular processes that are sustained by the SC such as DNA-looping and compaction, pairing, synapsis and recombination. The functional analysis of a gene-targeted mutation of RAD21L in mouse will undoubtedly shed light on the role that this α -kleisin plays in mammalian gametogenesis.

Methods

Identification and molecular cloning of a novel paralog of the RAD21/REC8 family of proteins. In silico search (tBlastn) with the conserved ~30 residues N-terminal and ~40 residues C-terminal domains of the REC8 and RAD21 proteins against the genome databases of mouse and human, identified two putative exons (corresponding to the ATG and STOP codons) present in most mammals, separated apart in the mouse by 23 Kbs of genomic sequence. *Rad21l* ORF was PCR amplified from cDNA obtained from mouse testis using the following primers S1 5'-ATG TTC TAC ACT CAT GTG CTT ATG-3' and AS1 5'-TCA CAT CTT ATA GAA CAT TGG TCC C-3'. The

Figure 3 (See opposite page). Biochemical characterization of RAD21L and nuclear localization of the overexpressed protein. HEK 293T cells were transfected or cotransfected with the indicated expression vectors or empty vector. IP was performed with the indicated antibody. Input (20 μ g) and IP samples were resolved by SDS-PAGE and silver stained (SILVER) or western-blotted (WB) with the indicated antibody. Immunoprecipitation of Flag-RAD21/Myc-RAD21 was used in all the experiments as positive control. (A) The two endogenous proteins that immunoprecipitate with Flag-RAD21L and Flag-RAD21 (positive control) were analyzed by mass spectrometry showing to be SMC1 α and SMC3. (B) Endogenous SMC1 α and SMC3 immunoprecipitate transfected Flag-Rad21 and Flag-Rad21L. (C) RAD21L immunoprecipitates with Flag-SMC1 β . (D) RAD21L interacts with either SMC1 α or SMC1 β . Cells were cotransfected with *Rad21l* together with Myc-Smc1 α and/or Flag-Smc1 β . IP was performed with anti-RAD21L, anti-Myc or anti-Flag and was analyzed by immunoblotting with the indicated antibody. (E) Nuclear localization of RAD21L. IF detection of transfected RAD21L in HEK 293T cells with an antibody against RAD21L. Nuclei were counterstained with DAPI. (F) Transfected RAD21L is found in the chromatin-bound fraction. HEK 293T cells were transfected with Flag-*Rad21l* and chromatin was isolated and digested with micrococcal nuclease to release chromatin-bound proteins. Both nuclear-soluble fraction (*soluble*) and chromatin-bound fraction (*chromatin*) were resolved by SDS-PAGE and blotted with anti-Flag. Antibody against Lamin A/C was used as positive control of the soluble fraction. EV, Empty vector; IP, Immunoprecipitation; WB, western blot; R21, α -RAD21; L, α -RAD21L; IgG, negative control with whole rabbit or mouse IgG.



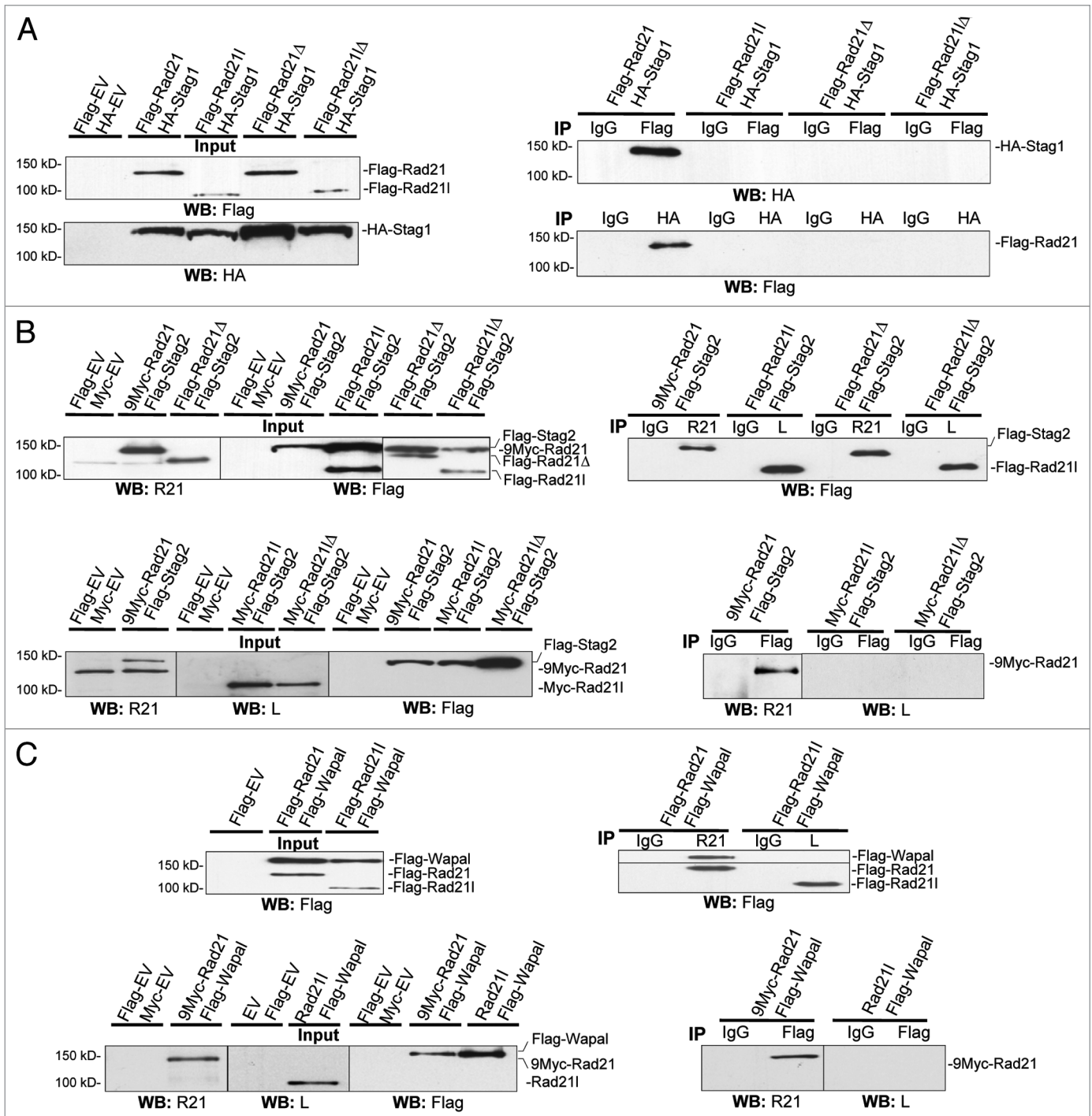


Figure 4. STAG1, STAG2 and WAPAL do not interact with RAD21L. HEK 293T cells were transfected or cotransfected with the indicated expression vectors or empty vector. IP was performed with the indicated antibody. IP samples were resolved by SDS-PAGE and western-blotted with the indicated antibody. Immunoprecipitation of Flag- $\Delta_{372,392}$ RAD21 was used as negative control in the co-immunoprecipitation with STAG1 and STAG2. Flag-RAD21L does not immunoprecipitate HA-STAG1 (A), Flag-STAG2 (B) and Flag-WAPAL (C). EV, Empty vector; IP, Immunoprecipitation; WB, western blot; R21, α -RAD21; L, α -RAD21L; IgG, negative control with whole rabbit or mouse IgG; Rad21 Δ , $\Delta_{372,392}$ RAD21; Rad21 $\Delta\Delta$, $\Delta_{345,365}$ RAD21L.

human *Rad21l* ORF was reverse amplified from RNA extracted from the MCF7 cell line using the S2 5'-CAG GCA ACA TGT TCT ACA CAC ATG T-3' and AS2 5'-CAG AAA TTC CAG TGA TGC CAT AAA T-3' primers. The human and murine ORFs encode for proteins of 552 and 556, respectively (residues

Accession numbers HQ603827 and HQ603828) which have been recently annotated by the Ensembl and named *Rad21l* (BC171911). The gene is composed of 13 exons and spans over 26 and 23 kbs in human and mouse genomes respectively and is located in a syntenic chromosomal segment at 20p13 and 2G3.

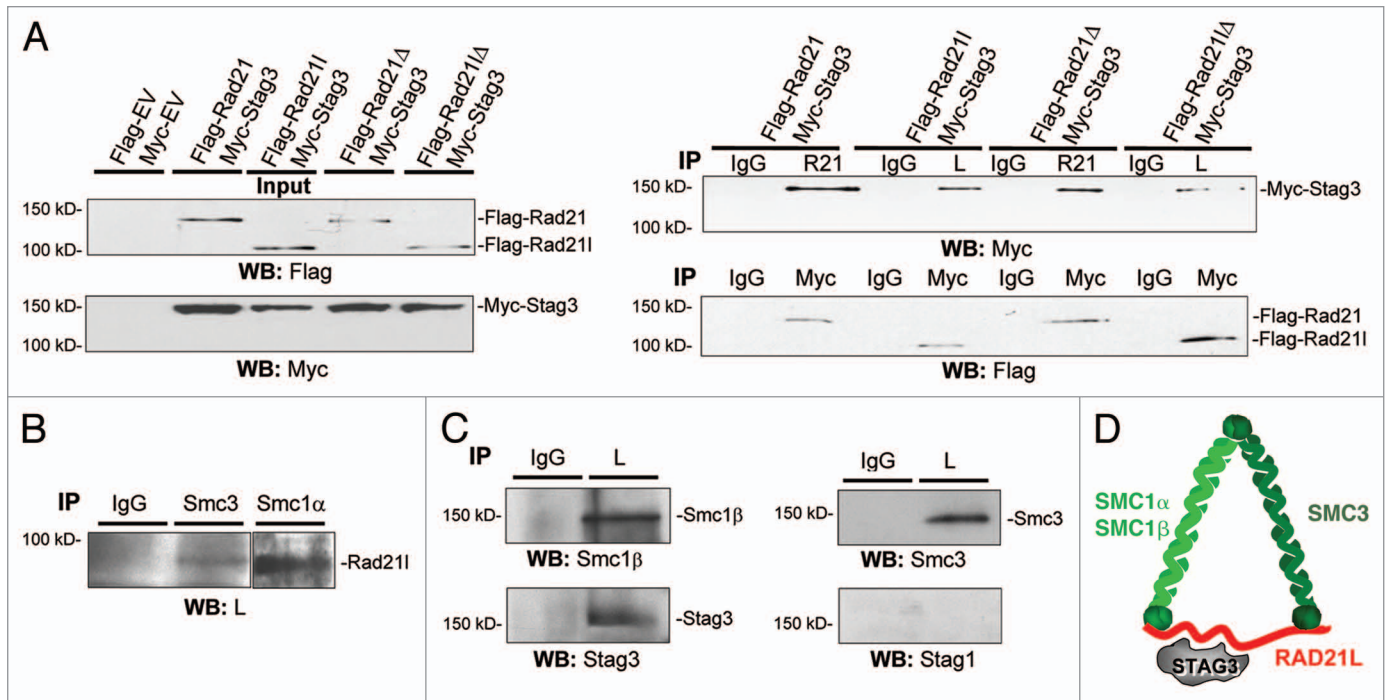


Figure 5. Analysis of the interactions of the subunits of the cohesin complex with RAD21L and proposed model of the new cohesin complex. (A) Flag-RAD21L and Flag-RAD21 immunoprecipitate Myc-STAG3 and the IP is not disturbed by the deletion of the interacting region in RAD21 (RAD21 Δ) or in its counterpart region in RAD21L (RAD21 Δ). (B and C) Whole testis extracts were immunoprecipitated with the corresponding antibody. (B) Endogenous RAD21L interacts with SMC proteins and STAG3 but not STAG1. (C) RAD21L immunoprecipitates SMC proteins and STAG3 but not STAG1. (D) Proposed model of the CC following the most accepted ring configuration in which RAD21L would interact with SMC1 and SMC3 and with the STAG3 subunit but not with WAPAL. EV, Empty vector; IP, Immunoprecipitation; WB, western blot; R21, α -RAD21; L, α -RAD21L; IgG, negative control with whole rabbit or mouse IgG; Rad21 Δ , $\Delta_{372,392}$ RAD21; Rad21 Δ , $\Delta_{345,365}$ RAD21L.

Generation of plasmids. Full-length cDNAs encoding *Rad21l*, *Rad21* and *Wapal* were RT-PCR amplified from murine testis RNA. *Smc1 β* and *Stag1* cDNAs were obtained from an IMAGE cDNA clone. Full-length cDNAs were cloned into the pcDNA3, pcDNA3 x2Flag, pCEFL HA or pcDNA3.1 Myc-His (-) mammalian expression vectors. The *Rad21l* and *Rad21* mutants ($\Delta_{345,365}$ *Rad21l* and $\Delta_{372,392}$ *Rad21*) with a deletion at the region that interacts with STAG1, were generated by directed mutagenesis. The pRevTRE 9Myc-*Rad21*, Myc-*Smc1 α* and Flag-*Stag2* expression plasmids were kindly provided by Dr. J. Gregan (Max F. Perutz Laboratories, University of Vienna), Dr. M.B. Kastan (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis) and Dr. D. Pati (Texas Children's Hospital), respectively.

Antibody production. We have generated two different Abs in the same species (rabbit) using two different antigens. Rabbit α RAD21L-AP was raised against a peptide of RAD21L-CNS HSE LDQ PQD WKD. Rabbit α RAD21L-ARP was raised against a recombinant protein expressed in *E. coli* corresponding to residues 344 to 552 (located at the C-terminus end). IgGs were purified using the Amersham IgG purification Kit. The specificity of both Abs was tested against mouse RAD21 and REC8. For this purpose, we carried out immunofluorescence and western blotting using Human Embryonic Kidney (HEK) 293T cells transfected with a plasmid expressing REC8, RAD21 and RAD21L. Cells were fixed similarly to the spermatocytes to mimic the conditions of spermatocyte spreads. Both antibodies

showed to specifically recognize RAD21L and did not cross-react neither with RAD21 or REC8. Both RAD21 and REC8 were detected simultaneously with an epitope tagged at either N or C terminus to validate that they were successfully transfected and expressed. Both antibodies were used to validate the results of the IF and IP data presented throughout this work.

Immunoprecipitation and antibodies. HEK 293T cells were transiently transfected and whole cell and nuclear extracts were prepared and cleared with protein G Sepharose beads (GE Healthcare) for 1 h. Antibody was added for 2 h and immunocomplexes were isolated by adsorption to protein G Sepharose beads for 1 h. After washing, beads were loaded on reducing 8% polyacrylamide SDS gels and proteins were detected by western blotting with the indicated antibodies or silver staining followed by mass spectrometry of the excised and digested bands of interest. Coimmunoprecipitation of WAPAL with cohesins was analyzed using dithiobis succinyl propionate (DSP, 1 mg/ml 10' at 37°C) to stabilize their labile protein complexes.³¹ Immunoprecipitation of the endogenous protein was performed using whole extracts of testis as previously described in reference 32, but with the addition of 5 mM β -mercaptoethanol. Immunoprecipitations were performed using rabbit α RAD21L AP IgG (1:500), rabbit α RAD21L ARP IgG (1:500), mouse α Flag IgG (5 μ g; F1804, Sigma-Aldrich), rabbit α Myc Tag IgG (4 μ g; #06-549, Millipore), rabbit α RAD21 IgG K854,³³ (1:500), rabbit α SMC1 α serum K988,³⁴ (1:250), rabbit α SMC3 serum K987,³⁵ (1:250),

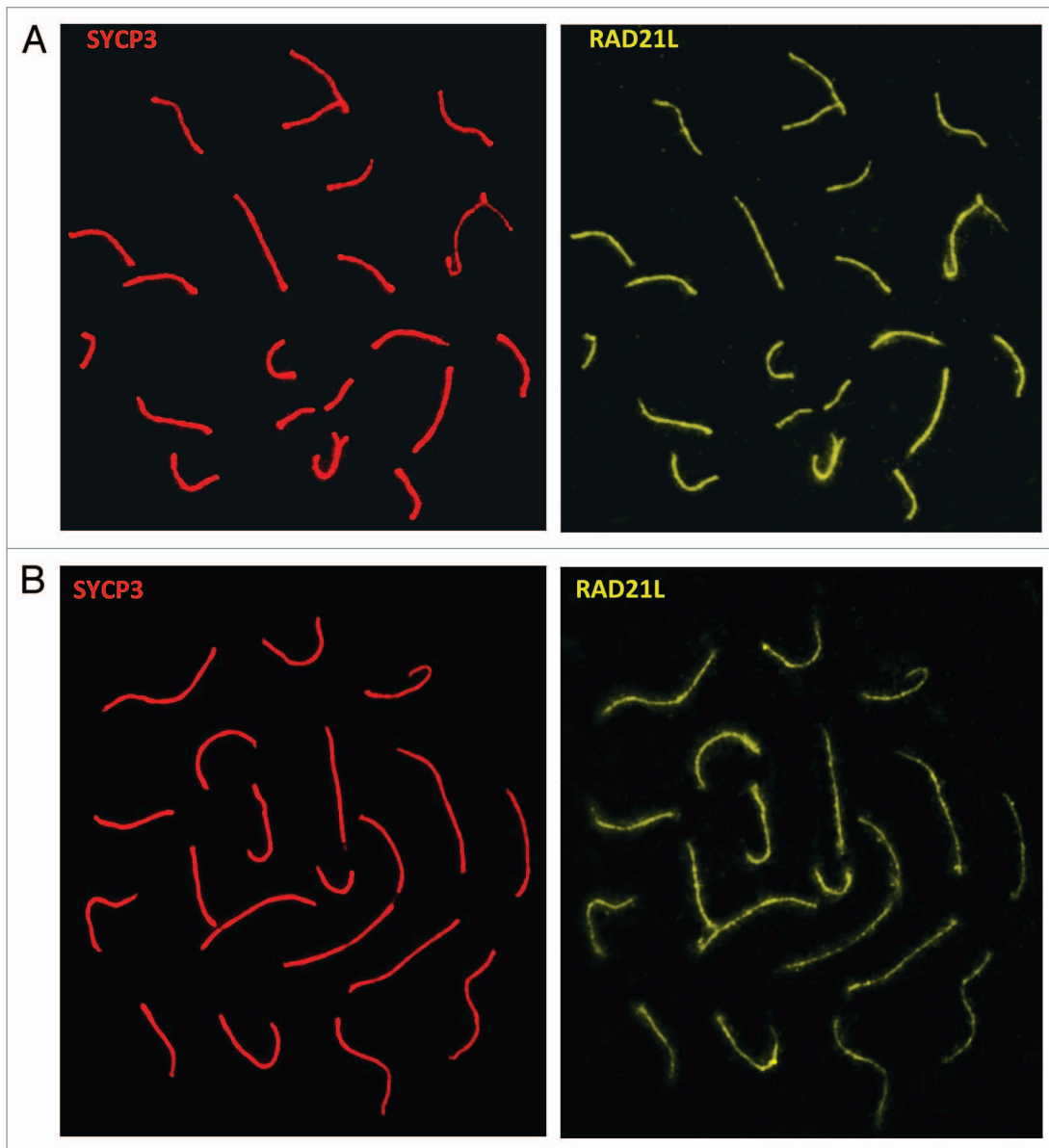


Figure 6. RAD21L is located at the LEs of the SC of mouse meiocytes. (A) Double immunolabeling of RAD21L (green) and SYCP3 (red) in a wild-type spermatocyte at early pachytene. (B) Double immunolabeling of RAD21L and SYCP3 in a pachytene oocyte.

mouse α HA.11 IgG MMS-(5 μ L, approx. 10 μ g/1 mg prot.; 101R, Covance), ChomPure mouse IgG 015-000-003 (5 μ g), ChomPure rabbit IgG (5 μ g/1 mg prot.; 011-000-003, Jackson ImmunoResearch), rabbit α SMC3 agarose immobilized S300-060 (4 μ g/1 mg prot.) and rabbit α SMC1 α agarose immobilized (5 μ g/1 mg prot., S300-055, Bethyl). Primary antibodies used for western blotting were mouse α Flag IgG (F1804, Sigma-Aldrich) (1:10,000), rabbit α HA IgG (H6908, Sigma-Aldrich) (1:1,000), rabbit α Flag IgG (1:800; F7425 Sigma-Aldrich), mouse α Myc obtained from hybridoma cell myc-1-9E10.2 ATCC (1:5), rabbit α RAD21 serum K854,³³ (1:10,000), rabbit α RAD21L serum (1:8,000), rabbit α SMC1 α serum K988,³⁴ (1:8,000), rabbit α SMC3 serum K987,³⁵ (1:8,000). Secondary horseradish peroxidase-conjugated α -mouse NA931V (GE Healthcare) or α -rabbit

#7074 (Cell Signaling) antibodies were used at 1:10,000 and 1:2,000 dilution, respectively. Antibodies were detected by using ImmobilonTM western Chemiluminescent HRP Substrate from Millipore.

Chromatin fractionation. HEK 293T cells were transfected with Flag-*Rad21l*. Chromatin fractionation was performed as previously described in reference 36. Thereafter, proteins of nuclear-soluble fraction and chromatin-bound fraction were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with mouse α Flag IgG (1:10,000; F1804 Sigma-Aldrich) or mouse α Lamin A/C (Manlac-1) (1:100, provided by Dr. G. Morris, Oswestry, UK).

Transcription analysis of *Rad21l* in several tissues. In the absence of ESTs from mouse and very few from humans, we analyzed the transcription by RT-PCR using 5 μ g of RNA from

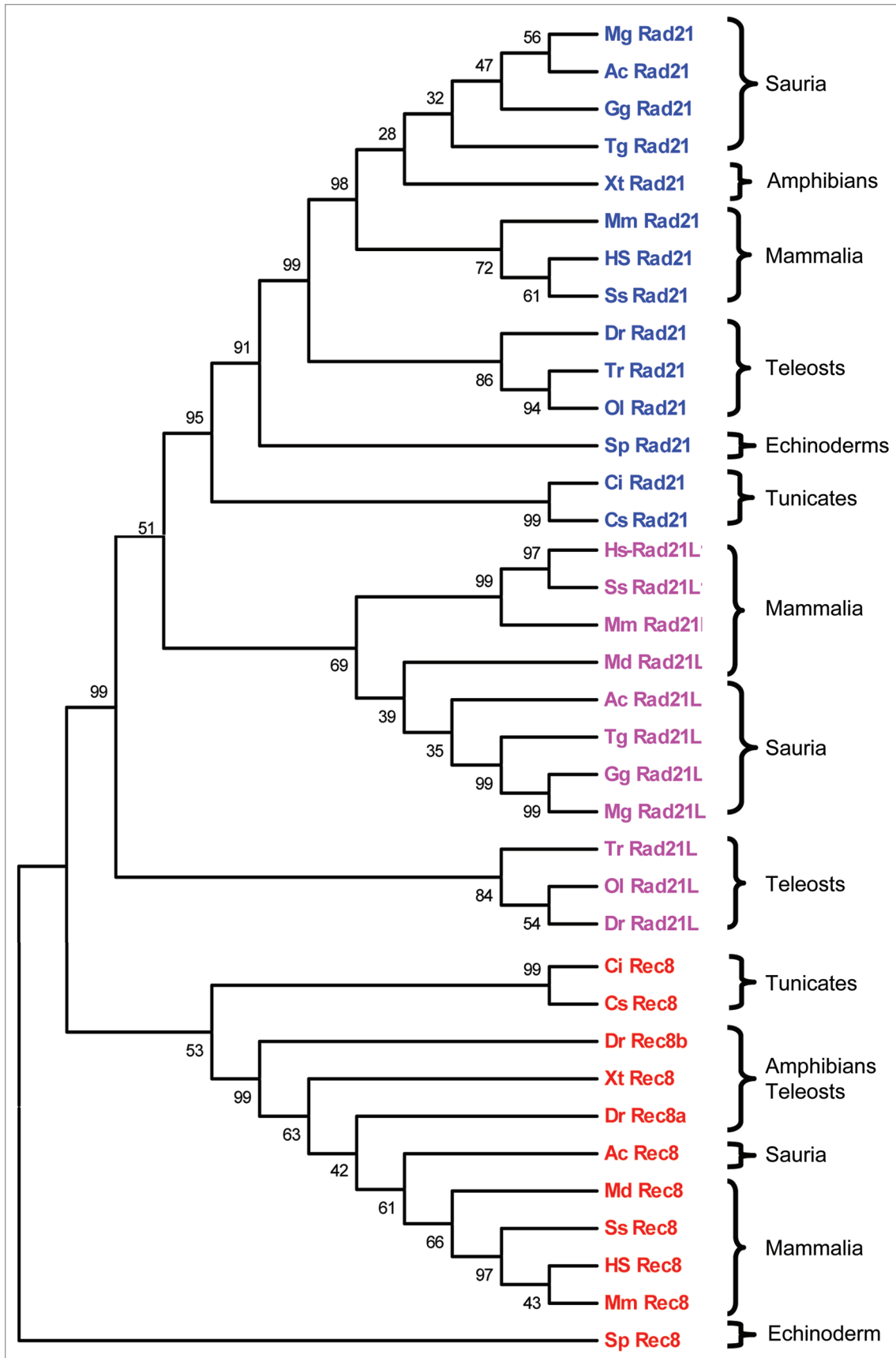


Figure 7. Phylogenetic tree of presumed RAD21L, RAD21 and REC8 orthologs. The database sequence accession number of each protein is presented in Table 1. The indicated numbers represent the bootstrap values. Major phylogenetic groups are indicated.

Table 1. Protein-gene identification

Species	Group	Abrev.	Rad21L1	Rad21	Rec8
<i>Homo sapiens</i>	Hominid	Hs	+/this work HQ603827	+/O60216	+/Q8C5S7
<i>Mus musculus</i>	Rodent	Mm	+/this work HQ603828	+/Q61550	+/O95072
<i>Sus scrofa</i>	Laurasiatheria	Ss	+/ENSSSCP00000007658	+/ENSSSCP00000006424	+/ENSSSCP00000002187
<i>Monodelphis domestica</i>	Marsupial	Md	+/ENSMODP00000024381	pp/chr3:389108458-389129090	+/ENSMODP000000034072
<i>Gallus gallus</i>	Birds	Gg	+/ENSGALG00000006186	+/Q5ZLK3	-
<i>Taeniopygia guttata</i>	Birds	Tg	+/ENSTGUP00000007091	+/ENSTGUP00000012686	-
<i>Meleagris gallopavo</i>	Birds	Mg	+/ENSMGAP00000008199	+/ENSMGAP00000013148	-
<i>Anolis carolinensis</i>	Reptile	Ac	P/ENSACAP00000008231	+/ENSACAP00000010827	P/ENSACAP00000003857
<i>Xenopus tropicalis</i>	Amphibia	Xt	-	+/ENSXETP00000044903	+/ENSXETG00000014620
<i>Danio rerio</i>	Fish	Dr	+/ENSARP00000074083	+/Q7ZW30	+/ENSARP00000091417 +/ENSARP00000091005
<i>Oryzias latipes</i>	Fish	OI	+/ENSORLP00000018323	+/ENSORLG00000005535	pp
<i>Takifugu rubripes</i>	Fish	Tr	+/ENSTRUP00000007429	+/ENSTRUP00000017209	pp
<i>Ciona intestinalis</i>	Tunicate	Ci	-	+/ENSCINP00000022121	p/ENSCINP00000021677
<i>Ciona savignyi</i>	Tunicate	Cs	-	p/ENSCSAVP00000001613	p/ENSCSAVG00000004732
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Echinoderm	Sp	-	+/xp_001176016	+/XP_001200458

The presence of genomic sequences coding for full protein is indicated with a "+." When most of the full protein is present in the translated genomic sequence is indicated with a "p," whereas the existence of only genomic sequences coding for part of the protein is denoted with "pp" and were not used in the alignment but only as a first hint of its likely existence in that species. -, indicates the absence of the protein in the genome.

kidney, liver, lung, muscle, bone marrow, cerebellum, brain, thymus, uterus, intestine, ovary, spleen, heart and testis, and reverse-transcribed into cDNA using oligo dT. PCR was performed using primers S2 5'-TGG CTT GCA GCT CAC TGG GA-3' and AS2 5'-GGT TCT GAG CAA GGG GCT CCG-3' (amplicon size 352 bp) (located at exons 1 and 4 respectively). As control, β -actin was also amplified (5'-GCT CCG GCA TGT GCA A-3', 5'-AGG ATC TTC ATG AGG TAG T-3'). 40 μ g of total RNA was electrophoresed under denaturing conditions, blotted to Genescreen Plus membrane (Perkin Elmer) and hybridized with the ORF of RAD21L labelled by random priming with dCTP.³²

MALDI-TOF mass spectrometry analysis. Bands of interest were manually excised and in-gel digested with trypsin. Tryptic peptides were analyzed on a Bruker Ultraflex MALDI-TOF mass spectrometer and searched against NCBI database. Mowse scores with a value greater than 66 were considered as significant ($p < 0.05$). The Proteomics Laboratory at IBMCC is a member of ProteoRed funded by Genoma España.

Immunocytology. Testes were detunicated and processed for spreading using a "dry-down" technique.³⁷ Oocytes from foetal ovaries (E17.5 embryos) were digested with collagenase, incubated in hypotonic buffer, disaggregated, fixed in paraformaldehyde and incubated with the indicated antibodies for immunofluorescence.

Primary antibodies used for immunofluorescence were rabbit α RAD21L AP IgG (1:5), rabbit α -RAD21L ARP IgG (1:5) and mouse α SYCP3 IgG (Santa Cruz, sc-74569) (1:100). Secondary antibodies used were TRITC α -mouse (115-095-146)/ α -rabbit (111-025-144), FITC- α -mouse (115-095-146)/ α -rabbit (111-095-045) (Jackson ImmunoResearch).

Phylogenetic analysis. *Rad21l* orthologs were identified by BLASTP searches of Genbank and other genome webs such as Ensembl. The selected orthologs can be found in Table 1. Amino acid alignments were done with ClustalW, using the default settings. The phylogram tree was constructed by using the neighbor-joining method with Poisson correction. The reliability of internal branches was assessed by using 1,000 bootstrap with the computer program MEGA4.

Acknowledgments

We acknowledge Dr. C. López-Otín for his advice and helpful comments and Dr. V. Quesada for sharing genomic sequence data. We wish to express our sincere thanks to Drs. G.M. Morris, D. Pati, J. Gregan, J.M. Peters and M.B. Kastan for providing antibodies and reagents and I. Ramos-Fernández for technical assistance. This work was supported by SAF, J CyLe (SA) and BFU, and BFU/BCM. C.G.C. and Y.H. are supported by FIS and FPI fellowships respectively. E.L. is recipient of a Ramón y Cajal Research contract.

References

- Nasmyth K. Segregating sister genomes: The molecular biology of chromosome separation. *Science* 2002; 297:559-65.
- Unal E, Heidinger-Pauli JM, Koshland D. DNA double-strand breaks trigger genome-wide sister chromatid cohesion through Eco1 (Ctf7). *Science* 2007; 317:245-8.
- Zhang N, Kuznetsov SG, Sharan SK, Li K, Rao PH, Pati D. A handcuff model for the cohesin complex. *J Cell Biol* 2008; 183:1019-31.
- Gruber S, Haering CH, Nasmyth K. Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell* 2003; 112:765-77.
- Haering CH, Farcas AM, Arumugam P, Metson J, Nasmyth K. The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. *Nature* 2008; 454:297-301.
- Kitajima TS, Sakuno T, Ishiguro K, Iemura S, Natsume T, Kawashima SA, et al. Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* 2006; 441:46-52.
- Llano E, Gómez R, Gutiérrez-Caballero C, Herrán Y, Sánchez-Martín M, Vázquez-Quifiones L, et al. Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Genes Dev* 2008; 22:2400-13.
- Watanabe Y. Sister chromatid cohesion along arms and at centromeres. *Trends Genet* 2005; 21:405-12.
- Hirano T. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7:311-22.
- Nishiyama T, Ladurner R, Schmitz J, Kreidl E, Schleiffer A, Bhaskara V, et al. Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl. *Cell* 2010; 143:737-49.
- Borges V, Lehane C, Lopez-Serra L, Flynn H, Skehel M, Rolef Ben-Shahar T, et al. Hos1 deacetylates Smc3 to close the cohesin acetylation cycle. *Mol Cell* 2010; 39:677-88.
- Nasmyth K, Haering CH. Cohesin: Its roles and mechanisms. *Annu Rev Genet* 2009; 43:525-58.
- Page SL, Hawley RS. The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20:525-58.
- Revenkova E, Jessberger R. Shaping meiotic prophase chromosomes: cohesins and synaptonemal complex proteins. *Chromosoma* 2006; 115:235-40.
- Yang F, Wang PJ. The Mammalian synaptonemal complex: A scaffold and beyond. *Genome Dyn* 2009; 5:69-80.
- Parra MT, Viera A, Gómez R, Page J, Benavente R, Santos JL, et al. Involvement of the cohesin Rad21 and SCP3 in monopolar attachment of sister kinetochores during mouse meiosis I. *J Cell Sci* 2004; 117:1221-34.
- Eijpe M, Heyting C, Gross B, Jessberger R. Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes. *J Cell Sci* 2000; 113:673-82.
- Revenkova E, Eijpe M, Heyting C, Gross B, Jessberger R. Novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1. *Mol Cell Biol* 2001; 21:6984-98.
- Prieto I, Suja JA, Pezzi N, Kremer L, Martínez AC, Rufas JS, et al. Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat Cell Biol* 2001; 3:761-6.
- Zhang J, Håkansson H, Kuroda M, Yuan L. Wapl localization on the synaptonemal complex, a meiosis-specific proteinaceous structure that binds homologous chromosomes, in the female mouse. *Reprod Domest Anim* 2008; 43:124-6.
- Pelttari J, Hoja MR, Yuan L, Liu JG, Brundell E, Moens P, et al. 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* 2001; 21:5667-77.
- Suja JA, Barbero JL. Cohesin complexes and sister chromatid cohesion in mammalian meiosis. *Genome Dyn* 2009; 5:94-116.
- Klein F, Mahr P, Galova M, Buonomo SB, Michaelis C, Nairz K, et al. A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements and recombination during yeast meiosis. *Cell* 1999; 98:91-103.
- Severson AE, Ling L, van Zuylen V, Meyer BJ. The axial element protein HTP-3 promotes cohesin loading and meiotic axis assembly in *C. elegans* to implement the meiotic program of chromosome segregation. *Genes Dev* 2009; 23:1763-78.
- Xu H, Beasley MD, Warren WD, van der Horst GT, McKay MJ. Absence of mouse REC8 cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis. *Dev Cell* 2005; 8:949-61.
- Kueng S, Hegemann B, Peters BH, Lipp JJ, Schleiffer A, Mechtler K, et al. Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin. *Cell* 2006; 127:955-67.
- Losada A, Yokochi T, Hirano T. Functional contribution of Pds5 to cohesin-mediated cohesion in human cells and *Xenopus* egg extracts. *J Cell Sci* 2005; 118:422-33.
- Shintomi K, Hirano T. Releasing cohesin from chromosome arms in early mitosis: opposing actions of Wapl-Pds5 and Sgo1. *Genes Dev* 2009; 23:2224-36.
- Lee J, Hirano T. RAD21L, a novel cohesin subunit implicated in linking homologous chromosomes in mammalian meiosis. *J Cell Biol* 2011; 192:263-76.
- Ishiguro K, Kim J, Fujiyama-Nakamura S, Kato S, Watanabe Y. A new meiosis-specific cohesin complex implicated in the cohesin code for homologous pairing. *EMBO Rep* 2011; 12:267-75.
- Terret ME, Sherwood R, Rahman S, Qin J, Jallepalli PV. Cohesin acetylation speeds the replication fork. *Nature* 2009; 462:231-4.
- Kolli S, Zito CI, Mossink MH, Wiemer EA, Bennett AM. The major vault protein is a novel substrate for the tyrosine phosphatase SHP-2 and scaffold protein in epidermal growth factor signaling. *J Biol Chem* 2004; 279:29374-85.
- Prieto I, Pezzi N, Buesa JM, Kremer L, Barthelemy I, Carreiro C, et al. STAG2 and Rad21 mammalian mitotic cohesins are implicated in meiosis. *EMBO Rep* 2002; 3:543-50.
- Krasikova A, Barbero JL, Gaginskaya E. Cohesion proteins are present in centromere protein bodies associated with avian lampbrush chromosomes. *Chromosome Res* 2005; 13:675-68.
- Prieto I, Tease C, Pezzi N, Buesa JM, Ortega S, Kremer L, et al. Cohesin component dynamics during meiotic prophase I in mammalian oocytes. *Chromosome Res* 2004; 12:197-213.
- Santos MA, Huen MS, Jankovic M, Chen HT, López-Contreras AJ, Klein IA, et al. Class switching and meiotic defects in mice lacking the E3 ubiquitin ligase RNF8. *J Exp Med* 2010; 207:973-81.
- Peters AH, Plug AW, van Vugt MJ, de Boer P. Drying-down technique for the spreading of mammalian meiotic cells from the male and female germline. *Chromosome Res* 1997; 5:66-71.

Shugoshins: from protectors of cohesion to versatile adaptors at the centromere

Cristina Gutiérrez-Caballero, Luis R. Cebollero and Alberto M. Pendás

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (CSIC-USAL), Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain

Sister chromatids are held together by a protein complex named cohesin. Shugoshin proteins protect cohesin from cleavage by separase during meiosis I in eukaryotes and from phosphorylation-mediated removal during mitosis in vertebrates. This protection is crucial for chromosome segregation during mitosis and meiosis. Mechanistically, shugoshins shield cohesin by forming a complex with the phosphatase PP2A, which dephosphorylates cohesin, leading to its retention at centromeres during the onset of meiotic anaphase and vertebrate mitotic prophase I. In addition to this canonical function, shugoshins have evolved novel, species-specific cellular functions, the mechanisms of which remain a subject of intense debate, but are likely to involve spatio-temporally coordinated interactions with the chromosome passenger complex, the spindle checkpoint and the anaphase promoting complex. Here, we compare and contrast these remarkable features of shugoshins in model organisms and humans.

Pushing and pulling

The movements of sister chromatids during cell division must be carefully orchestrated – first maintained together as a pair from S phase to metaphase – and then separated at anaphase. Failure to regulate these intricate spatio-temporal movements properly leads to chromosome instability and aneuploidy, with significant deleterious consequences such as tumorigenesis, birth defects, and infertility [1–3]. Central to this regulatory process is the balance between push and pull. Sister chromatids (Glossary) are pulled apart through their attachment to microtubules, which serve to draw them apart from each other and towards the spindle pole. To counteract this pull there must be a push, the existence of which was first supported by cytological observations of chiasmata [4] and from dynamic chromosome studies [5]. This force emanates from the bipolar spindle and aligns each pair of sister chromatids on the metaphase plate through their attachment to the kinetochores [6]. The subsequent separation of sister chromatids to opposite poles at anaphase is due to the pulling force of the spindle machinery and to the sudden loss of cohesion between sister chromatids [7]. The sister chromatids are held together after replication

by the cohesin complex, which forms a ring-like structure around them and pushes them together [8–10]. This complex comprises four subunits: two members of the structural maintenance of chromosome proteins family (SMC1 and SMC3), one kleisin subunit (RAD21/Scc1 during mitosis and/or REC8 and/or RAD21L during meiosis), and a HEAT repeat-domain protein (SA1/STAG1 or SA2/STAG2 at mitosis and/or SA3/STAG3 at meiosis) [11–16]. Although cohesin is important for both mitosis and meiosis, there are subtle differences in the role it plays in these two processes.

Sister-chromatid cohesion in mitosis

In budding and fission yeast, cohesin persists along the chromosome arms and at centromeres until the onset of anaphase, when it is removed by the proteolytic cleavage of Scc1/Rad21, the mitotic closing subunit of the cohesin complex, by the cysteine-protease separase to allow sister-chromatid separation, a process referred to as the separase pathway. By contrast, in vertebrate mitotic cells cohesin removal differs from yeast because it takes place in two steps for as yet unknown reasons. The cohesin present on chromosome arms is first released by phosphorylation of SA2 by polo-kinase 1 (PLK1); this process is referred to as the prophase pathway [17–20]. However, cohesin stays at

Glossary

Bi-orientation: orientation of the two sister kinetochores of each chromosome to opposite poles.

Centromeric chromatin: chromatin where centromeric protein A is incorporated, underlying the kinetochore.

Centromeric cohesion: a resisting force that counteracts the spindle-pulling forces by holding sister chromatids together at the centromeres.

Chromatid: an identical copy of a chromosome that is created through DNA replication. The two sister chromatids of a chromosome each become a chromosome when their centromeres are separated in mitosis or in the second meiotic division.

Cohesin: a ring-shaped multiprotein complex that tethers sister chromatids and promotes cohesion.

Kinetochore: a multiprotein complex assembled on centromeric DNA that enables attachments between the chromosomes and the spindle microtubules.

Meiosis: a specific division consisting of a single DNA replication, followed by two rounds of chromosome segregation, resulting in the production of haploid gametes (spores in yeast) from a diploid precursor cell.

Mitosis: the process of equal segregation of the replicated DNA (packaged in chromosomes) from a dividing cell to its emerging two daughter cells.

Mono-orientation: orientation of the two sister kinetochores of each chromosome to the same pole.

Spindle: the microtubule-based structures that separate chromosomes in mitosis and meiosis towards opposite poles of the dividing cell.

Corresponding author: Pendás, A.M. (amp@usal.es).

Keywords: shugoshin; cohesins; separase; centromeric cohesion; chromosomal passenger complex; spindle-assembly checkpoint.

centromeric regions until the onset of anaphase to ensure that sister kinetochores can be captured by spindle microtubules from opposite poles, enabling chromosome alignment at metaphase and preventing precocious separation of the sister chromatids [21–23]. Cohesin is maintained at centromeric regions by the inhibition of separase by the protein securin. When all the sister chromatids are bi-oriented at the metaphase plate, the spindle assembly checkpoint (SAC) requirement is satisfied, and the anaphase-promoting complex (APC/C) ubiquitinates securin, marking it for degradation [24,25]. This releases separase from inhibition, and it then cleaves RAD21-containing cohesin complexes, driving the dissociation of the remaining cohesin at the centromere and the subsequent segregation of sister chromatids [18,26]. This two-phase removal process requires a mechanism that distinguishes and protects centromeric cohesin during prophase in mitosis.

Sister-chromatid cohesion in meiosis

Meiotic division consists of a single round of DNA replication followed by two rounds of chromosome segregation, resulting in the production of haploid gametes from a diploid precursor cell. In eukaryotes, meiosis I (or reductional division), unlike mitosis, is characterized by chromosome pairing, crossing-over between homologs, and suppression of sister-centromere separation. Consequently, homologous chromosomes are linked by the chromatid regions where cross-over occurs between two homologous non-sister chromatids, named chiasmata, until the onset of anaphase I, and sister kinetochores attach to microtubules emanating from the same spindle pole (mono-orientation). By contrast, in meiosis II, sister kinetochores are attached to microtubules emanating from opposite poles of the spindle (bi-orientation). Therefore, although homologous chromosomes are segregated away from each other in meiosis I, sister-chromatid segregation does not occur until meiosis II [27].

During yeast and vertebrate meiotic prophase, chiasmata are maintained by cohesin complexes along the chromosome arms of sister chromatids keeping homologous chromosomes connected. In yeasts, the *Sccl/Rad21* kleisin of the cohesin complex is substituted during meiosis by the paralog *Rec8*. During meiosis I, *Rec8*-containing

cohesin complexes at the arms must be cleaved by separase to allow homologous chromosomes to segregate to opposite poles [28–30]. However, centromeric cohesin complexes, which are essential for the bi-orientation of sister chromatids in meiosis II, are maintained. At the metaphase II/anaphase II transition, *Rec8*-containing cohesin complexes are also thought to be proteolytically cleaved by separase, and this allows segregation of chromatids [29,30]. Vertebrate cells employ a mechanism similar to that in yeast to distinguish and maintain centromeric cohesion until the metaphase II/anaphase II transition [31,32].

The shugoshin family in yeast, flies and vertebrates

Experiments in *Drosophila melanogaster* and yeast demonstrated that cohesin is protected at centromeres during meiosis I by a protein (originally named *Mei-S322* in *Drosophila*) [33–36] that was dubbed shugoshin, which is Japanese for guardian spirit. These aptly named proteins have been discovered in nearly all eukaryotes, but there are species-specific differences in their functions. For example, they also protect centromeric cohesion in vertebrate mitosis [37]. Furthermore, different species encode a different number of paralogs. Although flies and budding yeast have only one known shugoshin (*Mei-S322* and *Sgo1*, respectively), fission yeast, *Xenopus laevis* and mammals have two shugoshin-like proteins (*Sgo1* and *Sgo2* in yeast and *SGOL1* and *SGOL2* in vertebrates) [35–39]. Historically, these proteins have been considered orthologs, however they share little sequence homology and exhibit functional differences. Thus, the functions of shugoshins in yeast, flies, and vertebrates should be considered individually, which despite having the same name (*Schizosaccharomyces pombe Sgo1*, *Saccharomyces cerevisiae Sgo1* and the mammalian *SGOL1*) do not reflect direct orthology relationships and are widely divergent in their sequence and function (Table 1).

Here we review the remarkable roles of shugoshins during the cell cycle from yeast to mammals, focusing on how shugoshins protect cohesins during meiosis and vertebrate mitosis and how they are localized to centromeres, where they carry out their multiple functions. We also address some unresolved aspects of the cohesin protection mechanism and the still poorly understood interactions

Table 1. Function of shugoshins in different species

	Protection of mitotic centromere cohesion	Protection of meiotic centromere cohesion	CPC localization	Sensor of tension/microtubule dynamics	MAD2 interaction	Refs.
<i>S. cerevisiae Sgo1</i>	no	yes	no	yes	–	[35,43,44,90,91]
<i>S. pombe Sgo1</i>	no	yes	no	–	–	[35,36,82,84]
<i>S. pombe Sgo2</i>	no	no	yes	yes	–	[35,36,82,83]
<i>D. melanogaster Mei-S322</i>	no [33], yes [92]	yes	no	predicted	–	[33,81,92]
<i>X. laevis SGOL1</i>	yes	–	no [85], yes [39,52]	yes	yes	[37,39,52,57,85]
<i>M. musculus SGOL1</i>	–	yes [60], no [51]	–	–	no	[51,57,60]
<i>H. sapiens SGOL1</i>	yes	–	no [82], yes* [84]	yes	no	[37,49,50,57,82,84,87,95]
<i>X. laevis SGOL2</i>	no	–	no	yes	–	[39]
<i>M. musculus SGOL2</i>	no	yes	–	–	yes	[51,57,58]
<i>H. sapiens SGOL2</i>	no [56,57], yes [88]	–	yes*	yes	yes	[56,57,82,84,88]

Abbreviation: CPC, chromosome passenger complex.

*Depletion of both *SGOL1* and *SGOL2* is necessary to impair localization of CPC [84].

–: Unknown function.

between shugoshins and the SAC and the chromosome passenger complex (CPC). Understanding both the basic and more varied roles of shugoshins will shed light on the intricate push–pull of chromosome segregation and advance our knowledge of how misregulation of this delicate process can lead to cancer and infertility [40–42].

Shugoshins as guardians of cohesion

The somatic role of shugoshins in budding and fission yeast differs from that in other organisms because mitotic division in yeast does not have a pronounced prophase pathway. It is thus unsurprising that there is no evidence to support a role for shugoshins in the protection of mitotic centromere cohesion [35,43,44]. Nevertheless, yeast shugoshins are required for proper chromosome segregation during mitosis because they are involved in monitoring the tension between sister chromatids and correcting any erroneous microtubule–kinetochore attachments, as mentioned below.

In *S. cerevisiae*, depletion of Sgo1 (Sc-Sgo1 hereafter) leads to a premature loss of cohesion at meiosis I. This is correlated with premature loss of Rec8 from sister centromeres, resulting in the frequent nondisjunction of homologous chromosomes during meiosis I and random segregation of sister chromatids in meiosis II [35,44,45]. However, mitotic Δ sgo1 cells do not show precocious splitting of sister chromatids, suggesting that Sc-Sgo1, similarly to Mei-S332 in flies, is not involved in protecting centromeric cohesion at mitosis in *S. cerevisiae* [44].

Likewise, the depletion of Sgo1 in *S. pombe* (Sp-Sgo1 hereafter) decreases centromeric Rec8 levels and provokes precocious centromeric dissociation, leading to random mis-segregation in meiosis II [35,36]. In addition, the protective action of Sp-Sgo1 allows accurate chromosome segregation in situations where sister chromatids attach aberrantly to opposite poles during meiosis I [46–48]. This is because centromeric cohesin is preserved in the presence of Sp-Sgo1, and the sister chromatids are held tightly together.

Although neither Sp-Sgo1 nor Sp-Sgo2 are involved in protecting cohesin during mitosis, Δ Sgo2 mutants show very slight defects in chromosome segregation during mitosis (a low rate of anaphase lagging). Similarly, Sp-Sgo2 does not play a direct role in cohesin protection during meiosis [35,36]. Δ Sgo2 mutants, however, show severe defects in bi-orientation of homologous chromosomes owing to erroneous bi-orientation of sister kinetochores, but these are not due to a premature loss of Rec8 [36]. Sp-Sgo1 is thus the only protector of centromeric cohesin in meiosis and Sp-Sgo2 has evolved different kinetochore functions [36].

In contrast to the situation in yeast, cohesins are removed in a two-step process during mitosis in higher eukaryotes. The majority of arm cohesin complexes are removed by PLK1-dependent phosphorylation of their SA2 subunit (prophase pathway) [17–20], and the small fraction of centromeric cohesin is subsequently removed by the separase-dependent cleavage of RAD21 [18,26]. To ensure this stepwise removal, centromeric cohesin complexes must be protected from their release during mitotic prophase. In mammals, the two shugoshin proteins SGOL1

and SGOL2 have been studied extensively in transformed cell lines. The depletion of SGOL1 in humans (Hs-SGOL1) during mitosis causes premature loss of centromeric cohesion, mis-segregation of sister chromatids, and mitotic arrest, suggesting that Hs-SGOL1 plays a crucial role in protecting centromeric cohesin during prophase [37,49,50]. In support, SGOL1 is indispensable for mammalian development, as *Sgol 1* knockout mice are not viable [51]. A similar conclusion was obtained using *X. laevis* extracts, where XI-SGOL1 function is also important for centromeric cohesion [52]. Taking into account both the yeast and animal observations, it seems likely that the original function of shugoshins was to protect centromeric cohesion during meiosis and that the ability of SGOL1 to protect centromeric cohesion during mitosis has been gained in vertebrates.

A small subset of cohesin complexes at the arms of mitotic chromosomes are not removed by the prophase pathway [53] during vertebrate mitosis. Similarly to centromeric cohesin, this fraction of cohesin also seems to be protected by small amounts of SGOL1 [54]. This is consistent with the observation that, in human cells, a small amount of Hs-SGOL1 localizes to the chromosome arms from prophase to metaphase in addition to being enriched at centromeres [54]. It has recently been suggested that XI-SGOL1 contributes to stabilizing arm cohesion, at least in egg extracts [55].

The other mammalian shugoshin, SGOL2, is not directly involved in the protection of centromeric cohesion during mitosis. Hs-SGOL2 is dispensable for keeping sister chromatids together until the onset of anaphase in HeLa cells, as SGOL2-depleted mitotic cells do not manifest defects in chromatid cohesion [56,57]. Instead, Hs-SGOL2 is needed for loading mitotic centromere-associated kinesin (MCAK) at centromeres [56]. MCAK is a microtubule depolymerase that participates in the error-correction mechanism at kinetochores. In HeLa cells depleted of Hs-SGOL2 there is an increase in chromosome lagging at anaphase, and this might be indicative of misregulation of kinetochore attachment [56]. The defect can be overcome *in vivo*, however, because SGOL2-deficient mice develop normally and do not exhibit an overt phenotype [58]. Furthermore, the same study concluded that Mm-SGOL2 is not necessary *in vivo* for cell cycle progression, mitotic chromatid cohesion or proliferation of somatic cells, even though MCAK is delocalized from the kinetochores [58]. This MCAK dysfunction might enhance the stability of kinetochore–microtubule attachments and consequently elicit chromosome-segregation defects in cells [59]. Nevertheless, this delocalization does not seem to be essential for the proliferative arrest induced by culture stress, such as treatment with microtubule poisons or radiation-induced DNA double-strand breaks, in SGOL2-deficient mouse embryonic fibroblasts (MEFs) [58]. Similarly, it was shown recently that depletion of the novel *X. laevis* SGOL2 (XI-SGOL2) does not lead to premature loss of cohesion in mitotic chromosomes [39].

In contrast to mitosis, the role of shugoshins during meiosis in vertebrates seems to depart from the known functions of these proteins in yeast. However, the involvement of SGOL1 in the protection of meiotic centromeric

cohesion is still not clear. Two independent groups looked at the role of mouse SGOL1 (Mm-SGOL2) in oocytes using siRNA knockdown but obtained conflicting results. One study focused only on Mm-SGOL1 and concluded that it is required for maintenance of centromeric cohesion during meiosis I [60]. The other study analyzed the depletion of Mm-SGOL1 or Mm-SGOL2 and showed that Mm-SGOL1 depletion does not result in any loss of cohesion. However, it was found that Mm-SGOL2 is essential for the maintenance of sister-chromatid cohesion in metaphase II [51]. In addition, Mm-SGOL1 overexpression in oocytes disturbs chiasma resolution and the removal of REC8-containing cohesin complexes from chromosome arms, and this blocks chromosome segregation during meiosis I [61]. Taken together, these experiments suggest that Mm-SGOL1 could protect cohesin complexes at chromosome arms in meiosis I, but it may not be involved in protecting centromeric cohesion.

SGOL2, by contrast, is required for protecting centromeric cohesin during meiosis. *Sgol2* knockout mice are infertile due to precocious dissociation of centromeric cohesin during early anaphase I [58]. Mm-SGOL2 is necessary for protecting REC8-containing cohesin complexes at the centromeres of the meiotic chromosomes at the onset of anaphase I, and loss of Mm-SGOL2 leads to complete loss of centromere cohesion at metaphase II that in turn causes the formation of aneuploid gametes with an aberrant number of chromatids. This extreme aneuploidy gives rise to infertility in both males and females. Similar results were obtained in cultured mouse oocytes using *Sgol2*-RNAi [51]. Thus, vertebrate SGOL2 is dispensable for mitosis but is essential for maintaining cohesion between sister kinetochores during meiosis I, playing an analogous role to Sp-Sgo1 [58] (Table 1).

A novel role for vertebrate shugoshins in centriole engagement has recently been described. Similar to the protection of cohesin complexes on chromosome arms, Hs-SGOL1 prevents centriole disengagement at the prophase pathway [62,63]. This function is carried out by a splice variant of Hs-SGOL1, designated sSGOL1, that protects paired centrioles from disengagement in early mitosis, and this function seems to be regulated by PLK1 [63]. Indeed, *Sgol1*^{+/-} MEFs display centriole disengagement, and depletion of Hs-SGOL1 in HeLa cells leads to centriole separation [63]. The specific function of cohesins and shugoshins at centrioles is, however, difficult to dissect, in part due to the impossibility of analyzing chromosome cohesion and centriole cohesion independently.

Molecular mechanism of cohesion protection

Mechanism of protection of cohesion at meiosis I

In yeast and vertebrates, the Rec8 subunit of the meiotic cohesin complex must be phosphorylated before cleavage by separase during meiosis I [29,64,65]. Thus, it has been suggested that centromeric cohesin might be resistant to phosphorylation, and this would prevent the premature release of these complexes during the first wave of separase activation at the metaphase I to anaphase I transition. This idea is supported by the finding that phosphomimetic mutations of Rec8 cause precocious loss of sister-centromere cohesion during meiosis, and

phosphor-resistant mutations of Rec8 are resistant to separase cleavage, thus blocking chiasmata resolution [65,66]. In yeast meiosis, one specific variant of the PP2A phosphatase associates with Sgo1 in both budding and fission yeast and protects centromeric cohesin by counteracting Rec8 phosphorylation [38,67,68]. Furthermore, a budding yeast shugoshin mutant that cannot bind to PP2A fails to protect centromeric Rec8 during meiosis I [61].

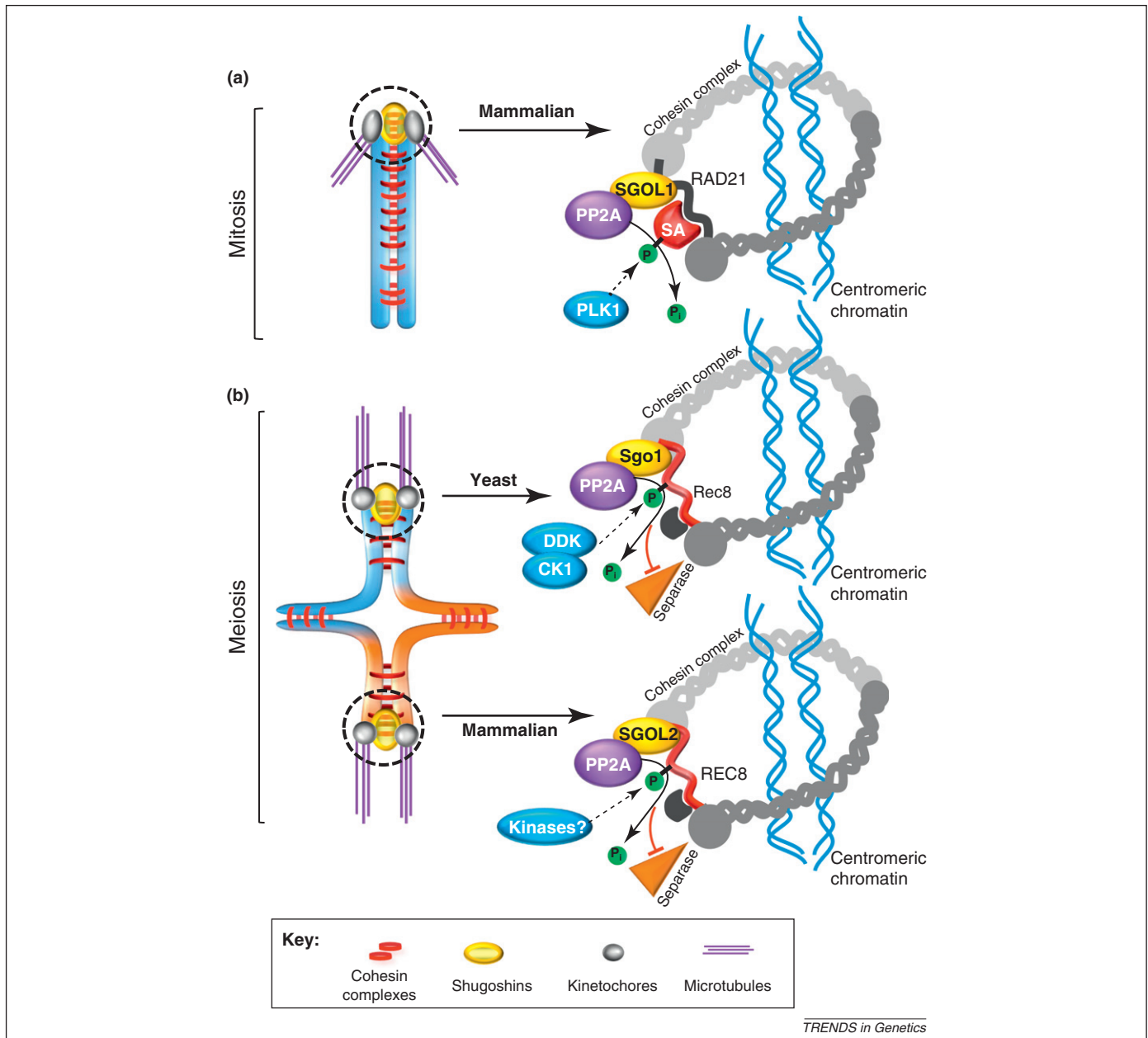
These findings provide a clear molecular description of the protection of centromeric cohesion in yeast meiosis: Sgo1-PP2A targets Rec8 to counteract its phosphorylation, preventing it from being cleaved by separase. Recently, the kinases involved in Rec8 phosphorylation and cleavage have been identified in budding and fission yeast: casein-kinase-1 (CK1) and Dbf4-dependent Cdc7 kinase (DDK) [65,69,70]. Depletion of these kinases impairs Rec8 cleavage even in the absence of Sc-Sgo1 [65]. It should be emphasized that, although a similar mechanism exists during both mitosis and meiosis, different kinases are involved in cohesin phosphorylation during these processes which are essential for cohesin release and cleavage in mitosis and meiosis respectively. Whereas DDK and CK1 are important for Rec8 phosphorylation during yeast meiosis, PLK1 and Aurora B are needed for SA phosphorylation during mitosis in mammals (Figure 1b).

In mouse meiosis, Mm-SGOL2 is responsible for the centromeric localization of PP2A to meiotic chromosomes of oocytes [51]. This is supported by findings that inhibition of PP2A with okadaic acid leads to precocious separation of sister centromeres, and recruitment of PP2A to the arms of chromosomes through overexpression of Mm-SGOL1 blocks cohesin cleavage in oocytes [61,71]. Consistent with the idea that a PP2A-SGOL2 interaction is needed to prevent cohesin removal, recruitment of PP2A by Mm-SGOL2 is essential to prevent the precocious separation of sisters during the first meiotic division in mouse oocytes (Figure 1b) (A. Rattami and K. Nasmyth, personal communication). In sum, the experimental data suggest that the mechanism of cohesin protection during meiosis by shugoshins is evolutionarily conserved from yeast to mammals. To further test this, it will be important to investigate whether mouse REC8 and the new α -kleisin identified, RAD21L, are phosphorylated by CK1 and DDK and/or PLK1 [13,14] and whether shugoshins also protect RAD21L from separase cleavage.

Mechanism of protection during the mitotic prophase pathway

In vertebrates, the SA subunit of mitotic cohesin complexes must be phosphorylated by PLK1 for release by the prophase pathway in mitosis [18,20]. In support, expression of non-phosphorylatable SA2 mutants or depletion of PLK1 in vertebrate cells impairs cohesin release during the mitotic prophase pathway, indicating that centromeric cohesin might also use resistance to phosphorylation as a mechanism to avoid premature release [18,20,53].

Both Hs-SGOL1 and Hs-SGOL2 interact with PP2A phosphatases, suggesting that PP2A could be responsible for counteracting phosphorylation of the SA subunit of cohesin *in vivo*, as has been shown *in vitro* [38]. Thus, a similar mechanism to that seen in meiosis could also



TRENDS in Genetics

Figure 1. The molecular mechanism of shugoshin-dependent protection of centromeric cohesin complexes. **(a)** Mammalian SGOL1 recruits PP2A to centromeres to counteract PLK1-mediated SA1/2 phosphorylation which protects centromeric cohesion in mitotic cells during the prophase pathway. **(b)** Fission and budding yeast Sgo1 (upper figure) protects centromeric cohesin complexes during meiosis I through the recruitment of PP2A to centromeres. This phosphatase reverses CK1- and/or DDK-dependent phosphorylation of the Rec8 subunit of the cohesin complex, preventing Rec8 cleavage by separase at the onset of anaphase I. During mammalian meiosis I (lower figure), SGOL2 recruits PP2A to centromeres, and this counteracts the phosphorylation of REC8 by an as yet unknown kinase, protecting centromeric cohesin from separase-cleavage. Black broken arrows indicate phosphorylation events. Black unbroken arrows indicate PP2A-specific dephosphorylation. Red arrows represent inhibitory relationships. Chromatin is represented by a blue helix.

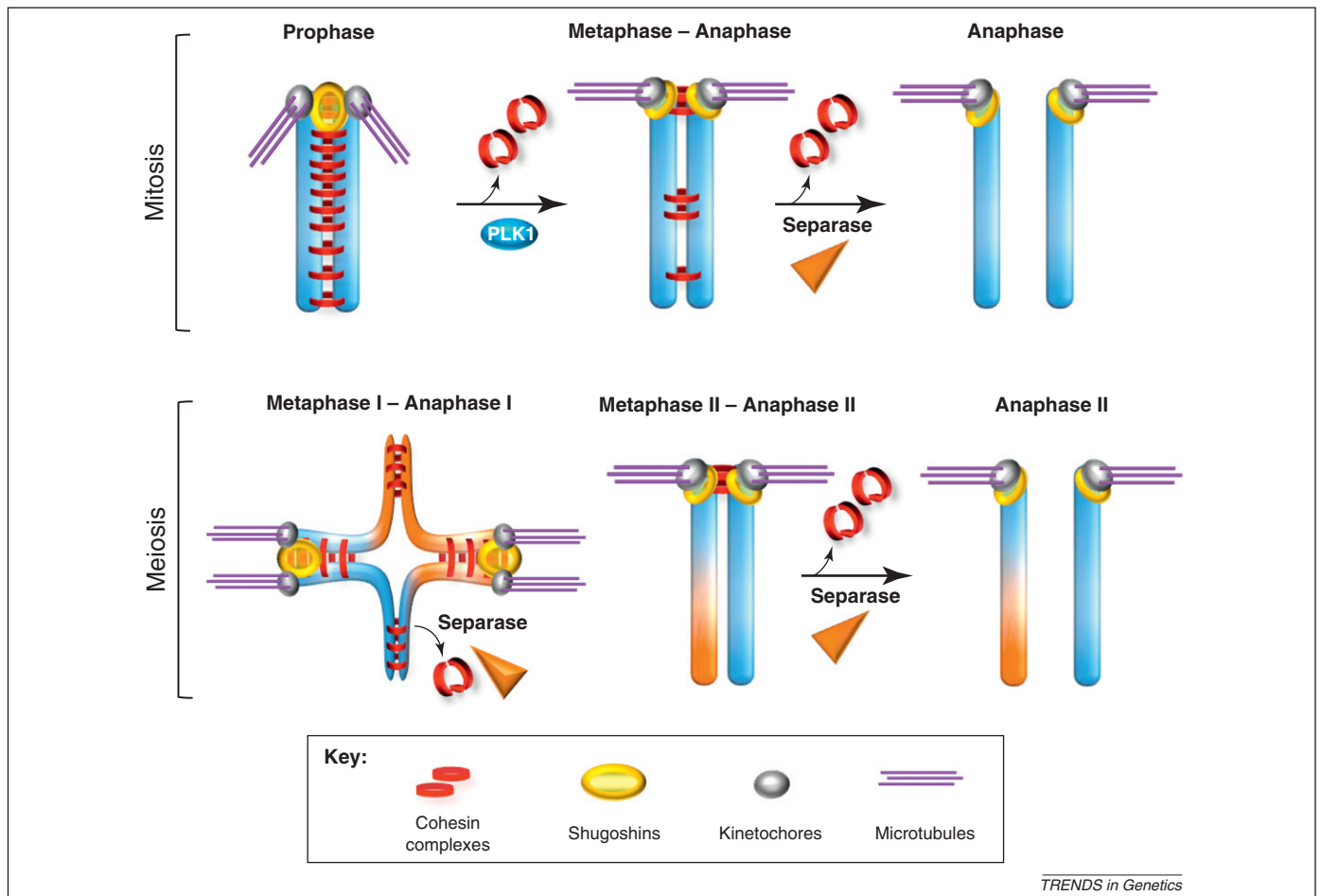
prevent the dissociation of cohesin from centromeres during the mitotic prophase pathway [38] (Figure 1a). However, this assertion requires further experimental validation.

Modeling cohesin removal during meiosis II

A major outstanding question in the field is the process that makes centromeric cohesin sensitive to separase cleavage during metaphase II [27,72]. In fission yeast, Sp-Sgo1 and PP2A are associated with centromeres during meiosis I but not during meiosis II. Interestingly, artificially targeting Sgo1/PP2A to meiosis II centromeres does not inhibit cleavage of cohesin, suggesting that a different

mechanism (other than Rec8 phosphorylation) might operate during meiosis II [73,74].

In mammals, however, Mm-SGOL2 appears at the centromeres of metaphase II chromosomes and is redistributed from the inner centromere towards the kinetochores as a consequence of the tension across the centromeres at metaphase. If the tension does not act on the centromeres, shugoshins remain colocalized with cohesins, and this would prevent separase cleavage of cohesins at the centromeres of meiotic chromosomes [51,75] (Figure 2; Tension model). However, this model may be vertebrate-specific. In budding yeast, monopolin mutants, which are defective in mono-orientation during meiosis I (and hence



TRENDS in Genetics

Figure 2. Model of tension-dependent relocation of shugoshin proteins. The absence of tension across the centromeres of sister chromatids in mitotic prophase/prometaphase or meiotic metaphase I (mouse) preserves shugoshin colocalization with cohesins, protecting them from separase cleavage. During metaphase II and mitotic metaphase, SGOL2 and SGOL1 relocate from the inner centromere towards the kinetochores owing to the tension generated between the sister chromatids by the pulling forces of the spindle. As a result, cohesins are not protected at the centromeres and are cleaved by separase, leading to faithful equal segregation. Adapted from references [51,58,75].

the sister centromeres are under tension), are able to protect cohesin [76]. It also contrasts with evidence suggesting that Sp-Sgo1 is able to protect centromeric cohesion when sister chromatids attach aberrantly to opposite poles during meiosis I ([46–48]; see above). Hence, the mechanism making cohesins susceptible to release during anaphase II does not appear to be conserved between yeast and mouse, indicating that shugoshins have diverged in their functions in higher eukaryotes.

More than cohesion protectors: the interplay between shugoshin localization and the regulation of the SAC and CPC

For proper chromosome segregation in mitosis, the sister kinetochores must attach spindle microtubules emanating from opposite spindle poles, and this generates tension across centromeres. To coordinate these processes, interplay between the CPC, SAC and APC/C is essential. The CPC includes one kinase, Aurora B, and several regulatory components (INCENP, Bir1/Survivin and Borealin) and remains at the inner centromere until anaphase onset when it redistributes to the midzone of the anaphase spindle and the equatorial cell cortex [77]. When kinetochores are unattached, or do not undergo tension due to

improper interaction with microtubules, Aurora B phosphorylates kinetochore substrates (i.e. MCAK), which destabilizes mis-attachments, thereby providing time for the errors to be corrected [77]. At present, it is not clear whether the CPC functions solely by generating unattached kinetochores which in turn recruit the APC or whether the CPC also functions directly to activate the canonical SAC components (i.e. BubR1, Bub3, Mad2 and Cdc20) to inhibit the APC [78].

Shugoshins and the SAC

The functional localization of shugoshins at centromeres depends on the conserved SAC protein kinase Bub1 [35,50,79]. Both yeast and mammalian shugoshins require phosphorylation of histone H2A, at S121 and T120, respectively, by Bub1 for proper localization to centromeric regions [80] (Figure 3a–c). The mechanism underlying the interaction between shugoshins and nucleosomes containing phospho-H2A remains unclear. However, it is important, because conditional depletion of BUB1 prevents Hs-SGOL1 from loading at mitotic centromeres.

More recently, MAD2, another protein of the SAC, was identified as an interactor of Hs-SGOL2, and this interaction is conserved in *X. laevis* [57]. The significance of this

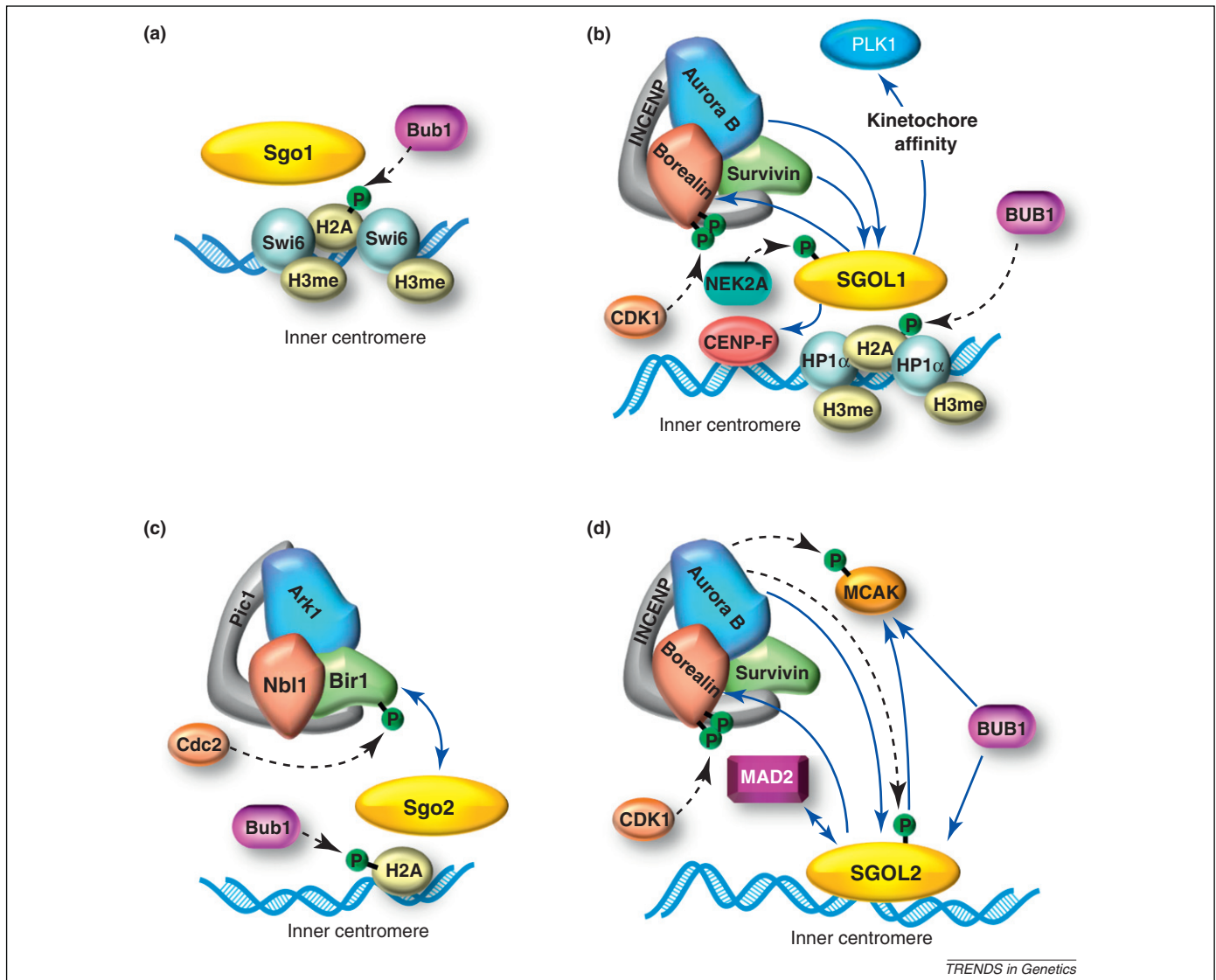


Figure 3. Targeting shugoshins to centromeres and recruitment of other proteins (a) Swi6 (ortholog of metazoan HP1) [93] and H2A phosphorylation (S121) by the kinase BUB1 are involved in the recruitment of *S. pombe* Sgo1 to centromeres in meiosis I. (b) Centromeric localization of SGOL1 is determined by the presence of H3K9me3-HP1 α [94] and by phosphorylation of H2A-T120 in a BUB1-dependent manner. The kinase subunit of the chromosomal passenger complex (CPC), Aurora B, is also required for the localization of SGOL1. Reciprocally, phosphorylation of the CPC subunit Borealin by CDK1 promotes the centromere targeting of the CPC through its interaction with SGOL1. The CPC subunit Survivin recognizes the N terminus of SGOL1. SGOL1 also promotes the kinetochore binding of PLK1, a kinase involved in tension-responsive signal transduction, kinetochore-microtubule attachment, and chromosome congression [37,95]. In addition, SGOL1 regulates the kinetochore binding of CENP-F, a centromere protein required for kinetochore-microtubule interactions and spindle-checkpoint function [87]. SGOL1 is phosphorylated by NEK2A (NIMA-related kinase 2A), a kinetochore-associated kinase necessary for accurate chromosome dynamics that is essential for the proper attachment of spindle microtubules to the kinetochore [96]. (c) Fission yeast Sgo2 and Bir1 mutually require each other to localize at centromeres. Cdc2-dependent phosphorylation of Bir1 is needed for the interaction with Sgo2 and consequently promotes CPC recruitment onto centromeres. Sgo2 also requires phosphorylation of H2A-S121 by Bub1 to localize to centromeres. (d) Aurora B and BUB1 are required by mammalian SGOL2 for centromeric localization. BUB1 is also required for the localization of MCAK [96]. CDK1-dependent phosphorylation of Borealin contributes to centromere recruitment of the CPC through interaction with SGOL2. Phosphorylation of SGOL2 by Aurora B promotes recruitment of MCAK to the centromeres. SGOL2 could be an upstream regulator of MAD2, and thus could participate in the spindle-checkpoint signaling during meiosis. Blue arrows indicate interaction and/or dependence for centromeric localization. Black broken arrows indicate phosphorylation. Chromatin is represented by a blue helix.

interaction, however, awaits further *in vivo* validation in terms of SAC and chromatid cohesion. It is interesting to note that *Sgol2* knockout spermatocytes undergo partial arrest at metaphase II followed by apoptosis [58]. However, nearly half escaped this blockade and underwent normal spermiogenesis, leading to aneuploid spermatozoa [58]. Whether this escape from apoptosis is dependent on relaxation of the SAC due to the lack of SGOL2-MAD2 interaction is an interesting open question and would support a function of Mm-SGOL2 in the SAC during mouse meiosis independent of its canonical role in sister-chromatid cohesion in meiosis.

Shugoshins and the CPC

The function of shugoshins is also regulated by its CPC-dependent localization at centromeres. *Drosophila* Mei-S332 functional localization is under the control of INCENP and requires phosphorylation by Aurora B to ensure centromeric localization in both meiosis I and mitosis. Conversely, the centromeric function of Aurora B, but not its localization, is regulated by Mei-S332 [81]. In fission yeast, Sp-Sgo2 promotes CPC recruitment to the centromeres by the Cdc2-dependent phosphorylation of the Bir1 subunit [82-84]. Reciprocally, Bir1 is needed for the Sp-Sgo2 enrichment at centromeres during mitosis [82]

(Figure 3c). In vertebrates, the recruitment and maintenance of SGOL1 and SGOL2 at the centromeres is also dependent on the Aurora B subunit of the CPC [56,85,86]. Conversely, XI-SGOL1 is the only shugoshin required for proper localization of the CPC (INCENP) whereas XI-SGOL2 promotes Aurora B activation [39]. In humans, however, both shugoshins are simultaneously required for the centromeric localization of Aurora B [56,84,87]. This recruitment of human Aurora B is carried out by CDK1-dependent phosphorylation of Borealin, and this has been postulated to be functionally equivalent to the Cdc2-dependent phosphorylation of the fission yeast Bir1/Survivin [85] (Figure 3b,d). In addition, mammalian SGOL2 activity, through the recruitment of PP2A and MCAK, relies on Aurora B-dependent phosphorylation [88] (Figure 3d).

It has recently been determined that the N terminus of the Hs-SGOL1 mimics the phosphorylated N-terminus of histone H3, which is recognized by the BIR domain of Survivin. Thus, Hs-SGOL1 and phospho-H3 might compete for binding to Survivin, regulating the recruitment of the CPC complex to the centromere [89] (Figure 3b). This hypothesis awaits experimental validation and verification of its functional relevance.

It is interesting to note that, whereas Sp-Sgo1 recruits PP2A, and Sp-Sgo2 facilitates CPC targeting to centromeres, Hs-SGOL1 and Hs-SGOL2 share both of these functions [38,82,84]. Again, these differences highlight the divergence between the roles of these paralogs. In summary, shugoshins are targeted to centromeres through a combination of epigenetic marks at the centromeric chromatin and through their interactions with components of the CPC (Table 1).

Shugoshins and tension

Given the canonical function of shugoshins in protecting cohesin complexes, and the interplay between shugoshins and the CPC and SAC, it is not surprising that they also participate in other functionally relevant aspects of chromosome dynamics, such as kinetochore-orientation and tension-sensing. For instance, Sc-Sgo1 is required for attachment of microtubules to the kinetochore by acting as a sensor of tension during mitosis [43,90]. Moreover, Sc-Sgo1 delays activation of the APC/C when there is a lack of tension at the interconnection between microtubules and kinetochores during mitosis [43]. However, Sc-Sgo1 is not essential for sensing the lack of tension at kinetochores between homologous chromosomes during meiosis I [90]. In addition, Sp-Sgo2 is required to correct erroneous attachment during prolonged mitotic spindle-checkpoint arrest. This function could be carried out by the centromeric recruitment of Aurora B [82,83]. This Aurora-dependent function of Sp-Sgo2 seems to be conserved in meiosis because the meiotic defects of $\Delta Sgo2$ mutants are, at least partly, reproduced in the Aurora B mutants and overexpression of Bir1 partially rescues the *Sgo2* mutant phenotype [82]. Thus, although the exact molecular mechanism remains unclear, shugoshins might promote kinetochore bi-orientation through Aurora B recruitment, at least in yeast.

In vertebrates, SGOL2 participates in spindle assembly by promoting the recruitment of MCAK to centromeres and

its microtubule-depolymerizing activity [39,56]. Thus, shugoshins are involved in monitoring the tension between sister chromatids in yeast and in regulating microtubule dynamics in yeast and vertebrates. This is probably due to their interplay as adaptor proteins with the CPC and SAC members in both a temporal and spatial manner.

Concluding remarks

The expanding study of shugoshins has been confounded by the assignment of inaccurate orthologies between yeast and their vertebrate counterparts. However, it seems likely that their original function was to protect centromeric cohesion during the first meiotic division. Following this, novel functions have been gained and lost by new paralogs, such as the ability of SGOL1 to maintain centromeric cohesion during vertebrate mitosis, recruit CPC and maintain centriolar cohesion. In addition, the appearance in vertebrates of paralogs of the cohesin complex [13–16] could have favored the acquisition of novel unprecedented functions by shugoshins. It will be challenging to determine whether these novel cohesin complexes are functionally and specifically protected by shugoshins during mitosis and meiosis.

Shugoshins also have functions beyond the protection of the cohesin complex. Aside from this role, novel functions of shugoshins have emerged more recently, including sensing kinetochore tension [43,90], involvement in accurate kinetochore–microtubule attachment [82,83], and protecting centriole cohesion [62,63]. Thus, shugoshins interact with proteins of the CPC, APC/C, and interestingly with the SAC complex. An important point to be clarified involves the role of mammalian SGOL2 in the SAC during meiosis I and II and what might be the functional *in vivo* consequences of the interaction between SGOL2 and the master checkpoint protein MAD2.

Despite recent advances, there are still many open questions about shugoshins. For example, it remains to be demonstrated formally if the yeast mechanism of protection of meiotic cohesins through PP2A-dependent dephosphorylation is conserved in higher eukaryotes. It is also unclear if the ability of SGOL1 to protect the specialized centriolar cohesin complex is the underlying molecular mechanism of the centriolar engagement. Why is cohesin susceptible to release at anaphase II even in the presence of shugoshin? – and what is the role of vertebrate SGOL1 in protecting a residual amount of cohesin at the chromosome arms? In addition to these questions, an exciting and unexplored field is how misregulation of shugoshins promotes chromosome instability and aneuploidy, which can ultimately lead to birth defects and infertility. Thus, it will be of great interest to delineate how shugoshins participate in disease development and progression, and how genetic variants (somatic and/or germline) impact upon their activity.

Acknowledgments

We thank Elena Llano, Yurema Herrán and Ignacio García Tuñón for valuable comments and for their critical reading of the manuscript and to Carlos López-Otín for his support. This work was supported, in part, by Sociedad Administradora de Fondos grants SAF 2011 25252, SAF 2008.03172 and the Junta de Castilla y León. C.G.C. is supported by a Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) fellowship. We also thank the

anonymous reviewers for their helpful comments and criticism. We apologize to the many authors whose work has not been cited due to space limitations.

References

- Holland, A.J. and Cleveland, D.W. (2009) Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 478–487
- Rajagopalan, H. and Lengauer, C. (2004) Aneuploidy and cancer. *Nature* 432, 338–341
- Hassold, T. *et al.* (2007) The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum. Mol. Genet. Spec.* 2, R203–R208
- Maguire, M.P. (1974) Letter: the need for a chiasma binder. *J. Theor. Biol.* 48, 485–487
- Nicklas, R.B. (1989) The motor for poleward chromosome movement in anaphase is in or near the kinetochore. *J. Cell Biol.* 109, 2245–2255
- Nicklas, R.B. (1988) The forces that move chromosomes in mitosis. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17, 431–449
- Miyazaki, W.Y. and Orr-Weaver, T.L. (1994) Sister chromatid cohesion in mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Genet.* 28, 167–187
- Anderson, D.E. *et al.* (2002) Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. *J. Cell Biol.* 156, 419–424
- Haering, C.H. *et al.* (2002) Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol. Cell* 9, 773–788
- Onn, I. *et al.* (2008) Sister chromatid cohesion: a simple concept with a complex reality. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 24, 105–129
- Watanabe, Y. (2005) Sister chromatid cohesion along arms and at centromeres. *Trends Genet.* 21, 405–412
- Hirano, T. (2006) At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 311–322
- Herrán, Y. *et al.* (2011) The cohesin subunit RAD21L functions in meiotic synapsis and exhibits sexual dimorphism in fertility. *EMBO J.* 30, 3091–3105
- Gutiérrez-Caballero, C. *et al.* (2011) Identification and molecular characterization of the mammalian α -kleisin RAD21L. *Cell Cycle* 10, 1477–1487
- Lee, J. and Hirano, T. (2011) RAD21L, a novel cohesin subunit implicated in linking homologous chromosomes in mammalian meiosis. *J. Cell Biol.* 192, 263–276
- Ishiguro, K.I. *et al.* (2011) A new meiosis-specific cohesin complex implicated in the cohesin code for homologous pairing. *EMBO Rep.* 12, 267–275
- Hauf, S. *et al.* (2005) Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol.* 3, e69
- Waizenegger, I.C. *et al.* (2000) Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* 103, 399–410
- Warren, W.D. *et al.* (2000) The *Drosophila* RAD21 cohesin persists at the centromere region in mitosis. *Curr. Biol.* 10, 1463–1466
- Sumara, I. *et al.* (2002) The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol. Cell* 9, 515–525
- Sonoda, E. *et al.* (2001) Scc1/Rad21/Mcd1 is required for sister chromatid cohesion and kinetochore function in vertebrate cells. *Dev. Cell* 1, 759–770
- Vass, S. *et al.* (2003) Depletion of Drad21/Scc1 in *Drosophila* cells leads to instability of the cohesin complex and disruption of mitotic progression. *Curr. Biol.* 13, 208–218
- Vagnarelli, P. (2004) Analysis of Scc1-deficient cells defines a key metaphase role of vertebrate cohesin in linking sister kinetochores. *EMBO Rep.* 5, 167–171
- Zachariae, W. (1999) Progression into and out of mitosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 708–716
- Uhlmann, F. *et al.* (2000) Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* 103, 375–386
- Hauf, S. *et al.* (2001) Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science* 293, 1320–1323
- Clift, D. and Marston, A.L. (2011) The role of shugoshin in meiotic chromosome segregation. *Cytogenet. Genome Res.* 133, 234–242
- Kudo, N.R. *et al.* (2006) Resolution of chiasmata in oocytes requires separase-mediated proteolysis. *Cell* 126, 135–146
- Kudo, N.R. *et al.* (2009) Role of cleavage by separase of the Rec8 kleisin subunit of cohesin during mammalian meiosis I. *J. Cell Sci.* 122, 2686–2698
- Buonomo, S.B. *et al.* (2000) Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell* 103, 387–398
- Page, S.L. and Hawley, R.S. (2003) Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* 301, 785–789
- Hauf, S. and Watanabe, Y. (2004) Kinetochore orientation in mitosis and meiosis. *Cell* 119, 317–327
- Kerrebrock, A.W. *et al.* (1995) Mei-S332, a *Drosophila* protein required for sister-chromatid cohesion, can localize to meiotic centromere regions. *Cell* 83, 247–256
- Moore, D.P. *et al.* (1998) The cohesin protein MEI-S332 localizes to condensed meiotic and mitotic centromeres until sister chromatids separate. *J. Cell Biol.* 140, 1003–1012
- Kitajima, T.S. *et al.* (2004) The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* 427, 510–517
- Rabitsch, K.P. *et al.* (2004) Two fission yeast homologs of *Drosophila* Mei-S332 are required for chromosome segregation during meiosis I and II. *Curr. Biol.* 14, 287–301
- Salic, A. *et al.* (2004) Vertebrate shugoshin links sister centromere cohesion and kinetochore microtubule stability in mitosis. *Cell* 118, 567–578
- Kitajima, T.S. *et al.* (2006) Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* 441, 46–52
- Rivera, T. *et al.* (2012) *Xenopus* Shugoshin 2 regulates the spindle assembly pathway mediated by the chromosomal passenger complex. *EMBO J.* 31, 1467–1479
- Iwazumi, M. *et al.* (2009) Human Sgo1 downregulation leads to chromosomal instability in colorectal cancer. *Gut* 58, 249–260
- Kahyo, T. *et al.* (2011) A novel tumor-derived SGOL1 variant causes abnormal mitosis and unstable chromatid cohesion. *Oncogene* 30, 4453–4463
- Lister, L.M. *et al.* (2010) Age-related meiotic segregation errors in mammalian oocytes are preceded by depletion of cohesin and Sgo2. *Curr. Biol.* 20, 1511–1521
- Indjeian, V.B. *et al.* (2005) The centromeric protein Sgo1 is required to sense lack of tension on mitotic chromosomes. *Science* 307, 130–133
- Katis, V.L. *et al.* (2004) Maintenance of cohesin at centromeres after meiosis I in budding yeast requires a kinetochore-associated protein related to MEI-S332. *Curr. Biol.* 14, 560–572
- Marston, A.L. (2004) A genome-wide screen identifies genes required for centromeric cohesion. *Science* 303, 1367–1370
- Dudas, A. *et al.* (2011) Sgo1 is required for co-segregation of sister chromatids during achiasmate meiosis I. *Cell Cycle* 10, 951–955
- Hirose, Y. *et al.* (2011) Chiasmata promote monopolar attachment of sister chromatids and their co-segregation toward the proper pole during meiosis I. *PLoS Genet.* 7, e1001329
- Sakuno, T. *et al.* (2011) Repositioning of aurora B promoted by chiasmata ensures sister chromatid mono-orientation in meiosis I. *Dev. Cell* 21, 534–545
- McGuinness, B.E. *et al.* (2005) Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. *PLoS Biol.* 3, e86
- Kitajima, T.S. *et al.* (2005) Human Bub1 defines the persistent cohesion site along the mitotic chromosome by affecting Shugoshin localization. *Curr. Biol.* 15, 353–359
- Lee, J. *et al.* (2008) Unified mode of centromeric protection by shugoshin in mammalian oocytes and somatic cells. *Nat. Cell Biol.* 10, 42–52
- Rivera, T. and Losada, A. (2008) Shugoshin regulates cohesion by driving relocalization of PP2A in *Xenopus* extracts. *Chromosoma* 118, 223–233
- Giménez-Abian, J.F. *et al.* (2004) Regulation of sister chromatid cohesion between chromosome arms. *Curr. Biol.* 14, 1187–1193
- Nakajima, M. *et al.* (2007) The complete removal of cohesin from chromosome arms depends on separase. *J. Cell Sci.* 120, 4188–4196
- Shintomi, K. and Hirano, T. (2009) Releasing cohesin from chromosome arms in early mitosis: opposing actions of Wapl-Pds5 and Sgo1. *Genes Dev.* 23, 2224–2236

- 56 Huang, H. *et al.* (2007) Tripin/hSgo2 recruits MCAK to the inner centromere to correct defective kinetochore attachments. *J. Cell Biol.* 177, 413–424
- 57 Orth, M. *et al.* (2011) Shugoshin is a Mad1/Cdc20-like interactor of Mad2. *EMBO J.* 30, 2868–2880
- 58 Llano, E. *et al.* (2008) Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Genes Dev.* 22, 2400–2413
- 59 Bakhom, S.F. *et al.* (2009) Deviant kinetochore microtubule dynamics underlie chromosomal instability. *Curr. Biol.* 19, 1937–1942
- 60 Yin, S. *et al.* (2008) Shugoshin1 may play important roles in separation of homologous chromosomes and sister chromatids during mouse oocyte meiosis. *PLoS ONE* 3, e3516
- 61 Xu, Z. *et al.* (2009) Structure and function of the PP2A–shugoshin interaction. *Mol. Cell* 35, 426–441
- 62 Schöckel, L. *et al.* (2011) Cleavage of cohesin rings coordinates the separation of centrioles and chromatids. *Nat. Cell Biol.* 13, 966–972
- 63 Wang, X. *et al.* (2008) sSgo1, a major splice variant of Sgo1, functions in centriole cohesion where it is regulated by Plk1. *Dev. Cell* 14, 331–341
- 64 Lee, B.H. and Amon, A. (2003) Role of Polo-like kinase Cdc5 in programming meiosis I chromosome segregation. *Science* 300, 482–486
- 65 Katis, V.L. *et al.* (2010) Rec8 phosphorylation by casein kinase 1 and Cdc7-Dbf4 kinase regulates cohesin cleavage by separate during meiosis. *Dev. Cell* 18, 397–409
- 66 Brar, G.A. *et al.* (2009) The multiple roles of cohesin in meiotic chromosome morphogenesis and pairing. *Mol. Biol. Cell* 20, 1030–1047
- 67 Janssens, V. and Goris, J. (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J.* 353, 417–439
- 68 Riedel, C.G. *et al.* (2006) Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature* 441, 53–61
- 69 Ishiguro, T. *et al.* (2010) Shugoshin-PP2A counteracts casein-kinase-1-dependent cleavage of Rec8 by separase. *Nat. Cell Biol.* 12, 500–521
- 70 Rumpf, C. *et al.* (2010) Casein kinase 1 is required for efficient removal of Rec8 during meiosis I. *Cell Cycle* 9, 2657–2662
- 71 Mailhes, J.B. *et al.* (2003) Okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A, induces premature separation of sister chromatids during meiosis I and aneuploidy in mouse oocytes *in vitro*. *Chromosome Res.* 11, 619–631
- 72 Gregan, J. *et al.* (2008) Solving the shugoshin puzzle. *Trends Genet.* 24, 205–207
- 73 Gregan, J. *et al.* (2007) What makes centromeric cohesion resistant to separase cleavage during meiosis I but not during meiosis II? *Cell Cycle* 7, 151–153
- 74 Brar, G.A. (2006) Rec8 phosphorylation and recombination promote the step-wise loss of cohesins in meiosis. *Nature* 441, 532–536
- 75 Gómez, R. *et al.* (2007) Mammalian SGO2 appears at the inner centromere domain and redistributes depending on tension across centromeres during meiosis II and mitosis. *EMBO Rep.* 8, 173–180
- 76 Tóth, A. *et al.* (2000) Functional genomics identifies monopolin: a kinetochore protein required for segregation of homologs during meiosis I. *Cell* 103, 1155–1168
- 77 Lampson, M.A. and Cheeseman, I.M. (2010) Sensing centromere tension: Aurora B and the regulation of kinetochore function. *Trends Cell Biol.* 21, 133–140
- 78 Musacchio, A. and Salmon, E.D. (2007) The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 379–393
- 79 Tang, Z. *et al.* (2004) Human Bub1 protects centromeric sister-chromatid cohesion through Shugoshin during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 18012–18017
- 80 Kawashima, S.A. *et al.* (2010) Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin. *Science* 327, 172–177
- 81 Resnick, T.D. *et al.* (2006) INCENP and Aurora B promote meiotic sister chromatid cohesion through localization of the Shugoshin MEI-S332 in *Drosophila*. *Dev. Cell* 11, 57–68
- 82 Kawashima, S.A. *et al.* (2007) Shugoshin enables tension-generating attachment of kinetochores by loading Aurora to centromeres. *Genes Dev.* 21, 420–435
- 83 Vanoosthuysse, V. *et al.* (2007) Shugoshin 2 regulates localization of the chromosomal passenger proteins in fission yeast mitosis. *Mol. Biol. Cell* 18, 1657–1669
- 84 Tsukahara, T. *et al.* (2010) Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation. *Nature* 467, 719–723
- 85 Boyarchuk, Y. *et al.* (2007) Bub1 is essential for assembly of the functional inner centromere. *J. Cell Biol.* 176, 919–928
- 86 Takata, H. *et al.* (2007) PHB2 protects sister-chromatid cohesion in mitosis. *Curr. Biol.* 17, 1356–1361
- 87 Pouwels, J. *et al.* (2007) Shugoshin 1 plays a central role in kinetochore assembly and is required for kinetochore targeting of Plk1. *Cell Cycle* 6, 1579–1585
- 88 Tanno, Y. *et al.* (2010) Phosphorylation of mammalian Sgo2 by Aurora B recruits PP2A and MCAK to centromeres. *Genes Dev.* 24, 2169–2179
- 89 Jeyaprakash, A.A. *et al.* (2011) Structural basis for the recognition of phosphorylated histone H3 by the survivin subunit of the chromosomal passenger complex. *Structure* 19, 1625–1634
- 90 Kiburz, B.M. *et al.* (2008) Shugoshin promotes sister kinetochore biorientation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 19, 1199–1209
- 91 Storchová, Z. *et al.* (2011) Bub1, Sgo1, and Mps1 mediate a distinct pathway for chromosome biorientation in budding yeast. *Mol. Biol. Cell* 22, 1473–1485
- 92 LeBlanc, H.N. *et al.* (1999) The mitotic centromeric protein MEI-S332 and its role in sister-chromatid cohesion. *Chromosoma* 108, 401–411
- 93 Yamagishi, Y. *et al.* (2008) Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin. *Nature* 455, 251–255
- 94 Perera, D. and Taylor, S.S. (2010) Sgo1 establishes the centromeric cohesion protection mechanism in G2 before subsequent Bub1-dependent recruitment in mitosis. *J. Cell Sci.* 123, 653–659
- 95 Suzuki, H. *et al.* (2006) Human Shugoshin mediates kinetochore-driven formation of kinetochore microtubules. *Cell Cycle* 5, 1094–1101
- 96 Fu, G. *et al.* (2007) Phosphorylation of human Sgo1 by NEK2A is essential for chromosome congression in mitosis. *Cell Res.* 17, 608–618