

Análisis funcional de las kleisinas meióticas de mamíferos

Tesis doctoral

Yurema Herrán Santamaría

Salamanca, 2012
Instituto Universitario de Investigación de Biología
Molecular y Celular del Cáncer

Instituto Universitario de Investigación de Biología
Molecular y Celular del Cáncer



Yurema Herrán Santamaría
Licenciada en Biología
Director: Alberto Martín Pendás
Co-Directora: Elena Llano Cuadra

Salamanca, 2012

Alberto Martín Pendás, Investigador principal del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC) y Elena Llano Cuadra Investigadora Ramón y Cajal de la Universidad de Salamanca,

certifican que Yurema Herrán Santamaría ha realizado bajo su dirección el trabajo de tesis doctoral titulado:

Análisis funcional de las kleisinias meióticas de 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.

Alberto Martín Pendás

Elena Llano Cuadra

RESUMEN

En mamíferos existen parálogos para la mayoría de subunidades del complejo de cohesinas. En nuestro laboratorio se identificó una nueva kleisina específica de meiosis, denominada RAD21L. La generación de dos modelos de ratón con pérdida de su función ha permitido determinar que esta kleisina forma parte de complejos de cohesinas *in vivo* y que es esencial para la espermatogénesis, ya que su ausencia provoca un bloqueo en zigotena que da lugar a azoospermia. Además, las hembras deficientes para RAD21L presentan una disminución en la cantidad de folículos primordiales y esterilidad precoz sin pérdida aparente de cohesión centromérica. Asimismo, el desarrollo de un modelo murino con pérdida simultánea de las dos kleisinas meióticas RAD21L y REC8 nos ha permitido determinar que los complejos de cohesinas meióticos son esenciales para el ensamblaje del elemento axial (AE), del complejo sinaptonémico (SC) y el inicio de la recombinación en mamíferos. De forma adicional, hemos comprobado que la carga o el mantenimiento de RAD21L en los centrómeros dependen en parte de SGOL2, una shugoshina caracterizada previamente por proteger a REC8 del corte por Separasa en anafase I. Además, el desarrollo de un ratón deficiente para SGOL2 y Securina ha revelado que probablemente estas dos proteínas no llevan a cabo funciones redundantes en la inhibición de Separasa, a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*. No obstante, la función de Securina en la intercinesis es dependiente de complejos de cohesinas meióticos.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN	5
Antecedentes sobre el estudio de la cohesión cromosómica.....	7
El descubrimiento de las cohesinas	8
Otras proteínas implicadas en la regulación de la cohesión	10
La cohesión en mitosis.....	12
La cohesión en meiosis.....	14
Reparación de los DSBs por recombinación homóloga en meiosis.....	19
Cohesinas en meiosis	21
Las shugoshinas y su papel en la protección de la cohesión centromérica.....	22
Funciones no canónicas de las cohesinas.....	24
Patologías humanas relacionadas con la cohesión y la segregación cromosómica.....	26
OBJETIVOS	31
MATERIALES y MÉTODOS.....	35
- Reactivos de electroforesis.....	37
- Enzimas de restricción	37
- Oligonucleótidos.....	37
- Vectores de clonación y de expresión de proteínas.....	37
- Otros productos.....	37
Técnicas en Biología Molecular	38
- Técnicas básicas.....	38
- Transformación con plásmidos y cultivo de bacterias	38
- Purificación de DNA plasmídico y BACs	39
- Purificación de fragmentos de DNA.....	39
- Purificación de RNA de testículos	39
- Marcaje radioactivo de sondas de DNA para southern blot.....	40
- Secuenciación de plásmidos y fragmentos amplificados.....	40
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	40
- Transcripción reversa-PCR (RT-PCR)	41
- Extracción de DNA para análisis southern blot	41
- Análisis Southern-blot.....	41
- Tratamiento informático de secuencias de DNA y proteínas.....	42
Técnicas citológicas	43
- Esparcido de espermatoцитos.....	43
- Aplastado de túbulos seminíferos.....	43
- Desbloqueo de los espermatoцитos con ácido okadaico	44
- Esparcido de oocitos.....	44
- Estimulación <i>in vitro</i> de oocitos para su maduración a metafase I	45
- IFs indirectas	45
- Cariotipado	45
- Frotis de espermatozoides a partir de epidídimos de ratón	47
- Estudio cromosómico mediante hibridación fluorescente <i>in situ</i> o FISH.....	47

- Estudio de la ploidía de testículos de ratón	48
Análisis histológicos	48
- Tinción hematoxilina-eosina	48
- Ensayo TUNEL	49
- Estudio de proliferación celular	49
- Toma y análisis de imágenes.....	49
Generación de ratones mutantes por eliminación dirigida de genes.....	49
- Generación de los ratones <i>Rad21</i> ^{H/-}	49
- Generación del ratón <i>Rad21</i> condicional.....	51
- Generación del ratón <i>Rad21</i> condicional knockout.....	52
- Generación de ratones doble mutantes nulos.....	52
- Origen de los ratones <i>Sgol2</i> ^{-/-} <i>Rec8</i> - <i>myc</i>	53
RESULTADOS	55
Estudios previos en el laboratorio	57
Caracterización de la kleisina RAD21L en el ratón <i>in vivo</i>	58
Análisis de la localización de RAD21L durante la espermatogénesis	58
Generación del ratón <i>Rad21</i> mutante constitutivo	60
Caracterización del alelo mutante	62
Estudio de los ratones <i>Rad21</i> ^{H/-}	62
Caracterización de la espermatogénesis en ausencia de RAD21L	63
Caracterización de la meiosis femenina en hembras <i>Rad21</i> ^{H/-}	73
Generación de un modelo murino <i>Rad21</i> ^{H/-} condicional.....	77
Generación de un ratón doble mutante <i>Rec8</i> ^{-/-} <i>Rad21</i> ^{H/-}	80
Estudio de RAD21L en el ratón <i>Sgol2</i> ^{-/-}	87
Estudio de los ratones doble mutantes <i>Sgol2</i> ^{-/-} <i>Pttg1</i> ^{-/-}	89
Generación de los ratones <i>Sgol2</i> ^{-/-} <i>Pttg1</i> ^{-/-}	89
Caracterización de la espermatogénesis en ratones <i>Pttg1</i> ^{-/-}	91
Caracterización de la espermatogénesis en ratones <i>Sgol2</i> ^{-/-} <i>Pttg1</i> ^{-/-}	96
DISCUSIÓN	101
La nueva kleisina RAD21L es específica de meiosis	103
RAD21L es esencial para la espermatogénesis del ratón.....	105
RAD21L es dispensable para la generación de DSBs	106
RAD21L no es esencial para el inicio de la recombinación.....	106
RAD21L no promueve la cohesión de cromátidas hermanas	108
La pérdida de RAD21L provoca defectos en la carga de SMC1 α y STAG3 en los espermatozoides	109
RAD21L produce esterilidad precoz en las hembras	109
Otras posibles funciones de RAD21L	110
La localización centrómerica de RAD21L en meiosis es dependiente de SGOL2	112
Los ratones <i>Rad21</i> ^{Δ/Δ} fenocopian la esterilidad de los <i>Rad21</i> ^{H/-}	113
RAD21L y fertilidad humana	113
Los complejos de cohesión meiótica son esenciales para la formación del AE	114
Los complejos de cohesión meiótica son prescindibles para la cohesión	115

El inicio de la recombinación homóloga es dependiente de los complejos de cohesinas meióticos	116
El bloqueo en estadio IV es independiente del estadio citológico de los espermatocitos	117
SGOL2 no es esencial en ausencia de Securina	118
Los machos <i>Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}</i> muestran los mismos defectos en la espermatogénesis que los <i>Sgol2^{-/-}</i>	119
La ausencia de Securina provoca aneuploidías en los espermatozoides del ratón	119
CONCLUSIONES	123
BIBLIOGRAFÍA	127
PUBLICACIONES	147

ABREVIATURAS

ACA, antisuero anti-centrómero
AE, elemento axial
APC/C, complejo promotor de anafase ó ciclosoma
ATPasa, enzima de hidrólisis del adenosín- trifostato
BSA, albúmina de suero fetal bovino
C, Carboxilo
CdLS, Cornelia de Lange Syndrome
cDNA, DNA complementario
CIC, Centro de investigación del Cáncer
cm, centímetros
CPC, complejo pasajero del cromosoma
DAPI, 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM, "*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*"
DMSO, dimetil sulfóxido
DNA, ácido desoxirribonucleico
dpc, días post coitum
dpp, días post partum
DSBs, roturas de doble hebra
EDTA, ácido etilendiaminotetraacético
Células ES, Células madre embrionarias
FBS, suero fetal bovino
FITC, fluorescein isotiocianato
g, gramos
Gy, gray
G418, geneticina
HEPES, ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-pireraciril-etanosulfónico
H&E, Hematoxilina y eosina
IgG, inmunoglobulina tipo G
kb, kilobases
kDa, kilodalton
kV, kilovoltios
l, litro
LE, elemento lateral
M, molar
mA, miliamperio
MCAK, quinesina mitótica asociada al centrómero
MEF, fibroblasto embrionario de ratón
Med, Mediator
mg, miligramo
ml, mililitro
µl, microlitro

Abreviaturas

µm, micrómetro
mM, milimolar
mRNA, RNA mensajero
MSCI, inactivación meiótica de los cromosomas sexuales
MSUC, silenciamiento meiótico de la cromatina asinapsada
N, amino
NEO, neomicina
ORF, pauta de lectura abierta
PAR, region pseudo-autosómica
PBS, tampón fosfato salino
PCR, Reacción en cadena de la polimerasa
POF, fallo ovárico prematuro
PSG, penicilina-estreptomicina-glutamina
RBS, syndrome de Roberts
RC, complejo de recombinación
RFLP, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
RNA, ácido ribonucleico
RT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SAC, punto de control de ensamblaje del huso
SC, complejo sinaptonémico
siRNA, RNA de interferencia
SYCP, proteína del complejo sinaptonémico
TE, Tris-EDTA
TNT, sistema de transcripción y traducción
TR, texas red
TRITC, isocianato de tetrametil rodamina
TUNEL. *TdT mediated dUTP Nick End Labelling*
WT, genotipo silvestre

Los acrónimos empleados en este trabajo son los utilizados habitualmente en los textos científicos escritos en inglés para facilitar de esta forma la lectura del texto.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes sobre el estudio de la cohesión cromosómica

En 1882, Walther Flemming estudió por primera vez la división celular y la distribución de los cromosomas en las células hijas, un proceso al que denominó mitosis, de la palabra griega mitos, que significa hebra. Unos años más tarde, entre 1888 y 1904, el embriólogo Theodor Heinrich Boveri observó que la cromatina se duplica durante la interfase y que en metafase los cromosomas experimentan una escisión longitudinal que da lugar a dos cromátidas que son arrastradas a los polos opuestos por microtúbulos. Paralelamente, William Sutton describió la unión de los cromosomas homólogos y la división reduccional mientras estudiaba la individualidad de los cromosomas meióticos, dando así un sentido físico a las Leyes de Mendel. Durante la primera mitad del siglo XX, los mecanismos básicos de la mitosis fueron descritos con imágenes *in vivo* y posteriormente, con la mejora de la microscopía electrónica en la década de los 80, se obtuvieron imágenes más nítidas de los cromosomas humanos en las que se observaba con gran precisión la íntima unión de las cromátidas hermanas por el centrómero hasta la segregación cromosómica en anafase (Harrison et al, 1985). A pesar de que el término cohesión fue acuñado por los citólogos pioneros en el análisis de la división celular y la dinámica de la cromatina por microscopía gracias a la tinción del DNA con anilinas, los mecanismos moleculares que subyacen a la unión de las cromátidas hermanas no empezaron a conocerse hasta años después. Inicialmente, mediante estudios en *Drosophila* se describieron varios mutantes como mei-S332, ord o mei-G87 con defectos en la disyunción cromosómica y en la cohesión cromosómica en meiosis, aunque se desconocía cómo estos genes podían regular la separación de las cromátidas hermanas (Gethmann, 1984). Poco después, se propuso que el DNA podía unirse directamente por el establecimiento de enlaces covalentes o catenación de las cromátidas hermanas, dado que la DNA topoisomerasa II es esencial para la segregación cromosómica en *Saccharomyces cerevisiae* (DiNardo et al, 1984). Además, se comprobó que el DNA satélite es crucial para que las cromátidas hermanas mantengan el contacto en mitosis (Lica et al, 1986). Sin embargo, posteriormente se postuló que la cohesión podría estar regulada por proteínas (Cooke et al, 1987), una idea congruente con el posterior hallazgo de que la proteólisis mediada por ubiquitinación es imprescindible para la segregación cromosómica en *Xenopus laevis*

(Holloway et al, 1993). En concordancia, un estudio en levaduras en el que se utilizaron minicromosomas artificiales sin DNA repetitivo descartó que la catenación pudiera ser el único mecanismo celular utilizado para mantener la cohesión (Guacci et al, 1994).

El descubrimiento de las cohesinas

Las primeras proteínas que fueron identificadas en cohesión pertenecen a la familia de proteínas de "mantenimiento de estructura del cromosoma" o SMC. El primer miembro, Smc1p, fue descubierto en un cribado de mutaciones relacionadas con la pérdida de minicromosomas en levaduras (Larinov et al, 1985). Posteriormente, se comprobó que Smc1p es esencial para la división celular y para la viabilidad de las células, dado que la pérdida de su función impide la división celular, manifestándose por una ausencia de anafases (Strunnikov et al, 1993). Seguidamente, se identificaron otros miembros de la familia SMC fundamentales para mantener la integridad de los cromosomas mitóticos en *S. cerevisiae* y *X. laevis* debido al papel que desempeñan en la condensación del DNA (Hirano & Mitchison, 1994; Strunnikov et al, 1995). No obstante, fueron necesarios varios años para elucidar que tanto las subunidades Smc1p y Smc3p como sus ortólogos XSmc1 y XSmc3 de *Xenopus* son esenciales para mantener la cohesión de los cromosomas replicados hasta su segregación en anafase (Michaelis et al, 1997; Losada et al, 1998). Además, mediante el empleo de *screening* genéticos en levaduras se identificaron proteínas de otras familias diferentes a la SMC implicadas en el mantenimiento de la estructura y la cohesión cromosómicas. Por un lado, se descubrió la familia de las α -kleisin formada por Rec8 y Mcd1p/Scs1/Rad21, las cuales se caracterizan por su papel en el mantenimiento de la cohesión en meiosis en *Schizosaccharomyces pombe* y en mitosis en *S. cerevisiae* respectivamente (Molnar et al, 1995; Michaelis et al, 1997). Más tarde, se identificó Scs3p como otra proteína esencial para mantener la cohesión en levaduras de gemación, la cual pertenece a la familia "antígeno estromal" o SA/STAG (Tóth et al, 1999). Un paso más allá de la identificación de todas estas proteínas implicadas en la cohesión cromosómica (o cohesinas), fue descubrir la relación existente entre ellas, concretamente al determinarse que interaccionan entre sí formando complejos proteicos (Guacci et al, 1997; Michaelis et al, 1997; Losada et al, 1998; Tóth et al,

1999). Smc1 y Smc3, los dos miembros de la familia de estructura de mantenimiento del cromosoma, que forman parte de los complejos de cohesinas mitóticas en eucariotas (Haering & Nasmyth, 2003), se organizan en heterodímeros formando una V (Anderson et al, 2002; Haering et al, 2002). Las proteínas Smc se caracterizan por la presencia de dos dominios alfa-hélice intercalados por una región globular bisagra que se pliega y permite que dichos dominios se enrollen entre sí formando una hélice antiparalela. De esa forma, uno de los extremos de esta hélice corresponde con el dominio globular bisagra y el otro con una cabeza ATPasa, formada por la unión de los extremos N y C-terminal de los dominios alfa-hélice (Hirano & Mitchison, 1994; Hirano & Hirano, 1998; Löwe et al, 2001; Anderson et al, 2002). Asimismo, una propiedad inherente a la familia Smc es la capacidad que muestran sus miembros de formar dímeros mediante su interacción por la región bisagra con otra proteína SMC, pudiendo ser ambas subunidades idénticas, como en bacterias o diferentes, como ocurre con Smc1 y Smc3 en eucariotas (Hirano & Mitchison, 1994; Strunnikov et al, 1995; Hirano & Hirano, 1998; Haering et al, 2002). La carga de los dímeros de SMC en la cromatina parece estar mediada por la actividad de las dos cabezas ATPasas (Kimura & Hirano, 1997; Weitzer et al, 2003). No obstante el hallazgo más significativo, al cual la superfamilia de las kleisinas debe su nombre (Schleiffer et al, 2003), fue comprobar que las cohesinas interactúan entre sí formando anillos de tres subunidades, gracias a que Rad21/Rec8 interactúan por su región C terminal con la cabeza ATPasa de Smc1 y por su región N terminal con la cabeza ATPasa de Smc3 ("kleisimo" = "cierre" en griego; Gruber et al, 2003). En la actualidad, el modelo más aceptado sobre la conformación de las cohesinas propone que un heterodímero de proteínas Smc y una α -kleisina interactúan entre sí constituyendo una estructura en anillo que abraza a las cromátidas hermanas para mantenerlas unidas (Ivanov & Nasmyth, 2005; Haering et al, 2008). Pero además, existe una cuarta subunidad integrante del complejo de cohesinas que pertenece a la familia de los antígenos del estroma SA o STAG (Carramolino et al, 1997), la cual interactúa con la subunidad α -kleisina (Wang et al, 2003) y es esencial para la cohesión (Toth et al, 1999). Por ello, y pese a que Stag no participa directamente en su configuración anular, el complejo de cohesinas generalmente se considera una estructura tetrapartita (Haering & Nasmyth, 2003). En las células somáticas de mamíferos los complejos de cohesinas están formados por SMC3, SMC1 α , RAD21 y STAG1 o STAG2 (McKay et al, 1996;

Carramolino et al, 1997; Schmiesing et al, 1998; Losada et al, 2000; **Figura 1**). A pesar de que prácticamente todas estas subunidades también participan en la meiosis (Eijpe et al, 2000; Prieto et al, 2002) se han identificado otras subunidades específicas de la meiosis que son SMC1 β , REC8 y STAG3 (Parisi et al, 1999; Pezzi et al, 2000; Prieto et al, 2001; Revenkova et al, 2001; **Tabla 1**).

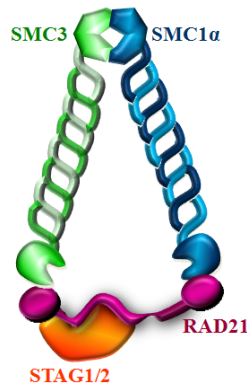


Figura 1. Complejo de cohesinas en células somáticas en mamíferos.

Otras proteínas implicadas en la regulación de la cohesión

A pesar de su capacidad para formar anillos, los complejos de cohesinas no disponen de autonomía para establecer y mantener la cohesión, sino que requieren la colaboración de otras proteínas para coordinar estos procesos (**Tabla 2**). En vertebrados, las cohesinas se unen al DNA durante telofase (Darwiche et al, 1999; Losada et al, 2000; Sumara et al, 2000) y el establecimiento de la cohesión se lleva a cabo en fase S (Guacci et al, 1997; Furuya et al, 1998; Uhlmann & Nasmyth, 1998; Hsu et al, 2011). Para ello, y en primer lugar, se requiere la actividad de SCC2/NIPBL y SCC4/MAU2, dos proteínas que promueven la carga de las cohesinas en el DNA (Ciosk et al, 2000; Rollins et al, 2004; Seitan et al, 2006; Watrin et al, 2006). El complejo formado por SCC2/NIPBL y SCC4/MAU2 se ha denominado recientemente *kollerin*, un término que proviene del verbo griego “Kollao” y que significa “pegar con pegamento” (Nasmyth, 2011). Sin embargo, para que los complejos de cohesinas establezcan la cohesión de las cromátidas hermanas tras la replicación no basta con su carga en el DNA,

sino que es necesario que la subunidad SMC3 sea acetilada por la acetiltransferasa ESCO1 en fase S (Zhang et al, 2008-a). Del mismo modo, la liberación de los complejos de cohesinas del DNA también está regulada por otras proteínas.

	SMC	α -kleisinas	STAG
<i>S. cerevisiae</i>	Smc3, Smc1	Scc1, Rec8	Scc3
<i>S. pombe</i>	Psm3, Psm1	Rad21, Rec8	Psc3, Rec11
<i>D. melanogaster</i>	DmSMC3, DmSMC1	DmRAD21, Mei-S332	DmSA
<i>C. elegans</i>	SMC-3, SMC-1	COH-2, COH-1, COH-3, COH-4, REC-8	SCC-3
<i>X. laevis</i>	XSMC3, XSMC1	XRAD21	XSTAG1, XSTAG2
Mamíferos	SMC3, SMC1 α , SMC1 β	RAD21, REC8	STAG1, STAG2, STAG3

Tabla 1. Subunidades de los complejos de cohesinas de mitosis (azul claro) y meiosis (naranja) en distintos organismos eucariotas.

En las células somáticas de vertebrados, la mayor parte de los complejos de cohesinas de los brazos son liberados durante la profase y los pocos que quedan unidos al DNA, principalmente en los centrómeros, son eliminados justo antes de anafase (Sumara et al, 2000; Waizenegger et al, 2000). El mecanismo principal que garantiza la eliminación de la cohesión de los brazos durante profase es la fosforilación de la subunidad STAG2 dependiente de la kinasa PLK1 (Sumara et al, 2002; Hauf et al, 2005). A pesar de ello, existen otras dos proteínas, PDS5 y WAPL, que forman un complejo proteico denominado *releasin*, el cual interacciona directamente con la subunidades STAG-RAD21, promoviendo la liberación de las cohesinas en profase (Losada et al, 2005; Gandhi et al, 2006; Shintomi & Hirano, 2009, Nasmyth, 2011). Para mantener las cohesinas sin disociarse del DNA hasta profase, WAPL está inhibida por la proteína de vertebrados Sororina (Nishiyama et al, 2010). Esta interacción de Sororina con el complejo de cohesinas requiere la acetilación de SMC3 por la acetil transferasa ESCO2 (Lafont et al, 2010, Vega et al, 2005; Mönnich et al, 2011) y se produce través de su región conservada C-terminal (Wu et al, 2011). En los modelos desarrollados,

Sororina promovería un cambio de posición de WAPL con respecto a PDS5 desde fase S hasta profase, suprimiendo la liberación de las cohesinas de los brazos cromosómicos (Nishiyama et al, 2010). Al llegar a profase, Sororina es fosforilada por CDK1/Ciclina B, lo que promueve su interacción con PLK1 y revierte el desplazamiento sobre WAPL (Zhang et al, 2011). Como consecuencia, STAG2 es fosforilada y se produce la liberación de los complejos de cohesinas de los brazos a través de la ruta profasica (Nishiyama et al, 2010; Zhang et al, 2011). Se cree que la apertura de los complejos de cohesinas para su liberación por *releasin* se produce en la región de interacción Smc3- α -kleisina, mientras que para su carga por *kollerin* probablemente se dé por la región de interacción Smc3-Smc1 (**Figura 2**, Nasmyth, 2011).

	Complejo <i>kollerin</i>	Complejo <i>releasin</i>	Proteínas poco conservadas con motivo FGF invariable	Acetiltransferasas de cohesinas
<i>S. cerevisiae</i>	Scs2, Scs4	Pds5, Rad61/Wapl		Eco1/Ctf7
<i>S. pombe</i>	Mis4, Ssl3	Pds5, Wapl		Eso1
<i>D. melanogaster</i>	NippedB, Scs4	Pds5, Wapl	Dalmatian	Deco, San
<i>C. elegans</i>		PDS-5		
<i>X. laevis</i>		XPDS5		
Mamíferos	SCC2/NIPBL, SCC4/MAU2	PDS5A, PDS5B, WAPL	Sororina	ESCO1, ESCO2

Tabla 2. Factores de regulación de las cohesinas en distintos organismos eucariotas.

La cohesión en mitosis

Como ya se ha mencionado previamente, en vertebrados los complejos de cohesinas de los centrómeros y los pocos que permanecen en los brazos después de profase son eliminados justo antes de la segregación cromosómica (Sumara et al, 2000; Waizenegger et al, 2000). Para eliminar los complejos de cohesinas que mantienen unidas las cromátidas hermanas es necesaria la activación justo antes de anafase de Separasa, una cisteín proteasa que corta específicamente la subunidad RAD21 de los complejos de cohesinas (Uhlman et al, 2000; Hauf et al, 2001; Nakajima et al, 2007; Kucej & Zou, 2010). La actividad de Separasa se encuentra regulada desde levaduras hasta mamíferos por Securina, una chaperona inhibidora (Funabiki et al, 1996; Zou et al, 1999; Waizenegger et al, 2002) que es esencial para *S. pombe* y

Drosophila (Funabiki et al, 1996; 1997; Stratmann and Lehner, 1996), aunque no para otros organismos como *S. cerevisiae* y mamíferos (Yamamoto et al, 1996-a;b; Wang et al, 2001). Una vez que todos los cromosomas se alinean correctamente en la placa ecuatorial, Securina es degradada por ubiquitinación dependiente del complejo promotor de anafase o ciclosoma (APC/C), Separasa se activa y se inicia la segregación cromosómica (Waizenegger et al, 2002). En mamíferos, la activación de Separasa se produce mediante su auto-procesamiento proteolítico (Chestukhin et al, 2003; Papi et al, 2005; Rubinek et al, 2007) y probablemente también ocurra así en el resto de vertebrados, ya que los sitios de corte están conservados (Zou et al, 2002). Además, existe otro mecanismo capaz de inhibir a Separasa por fosforilación dependiente de CDK1/Ciclina B (Stemmann et al, 2001; Gorr et al, 2005). La co-existencia de estos dos mecanismos de inhibición en las células somáticas provoca la activación precisa de Separasa en la transición entre metafase y anafase, ya que es en ese instante cuando ambos mecanismos se inactivan de forma sincronizada gracias a la degradación de Securina y de Ciclina B (Cohen-Fix et al, 1996; Vorlauffer & Peters, 1998). Dicha transición metafase-anafase es un proceso irreversible del ciclo celular (Tyson & Novak, 2001), el cual es promovido y regulado por APC/C (King et al, 1995; Sudakin et al, 1995).

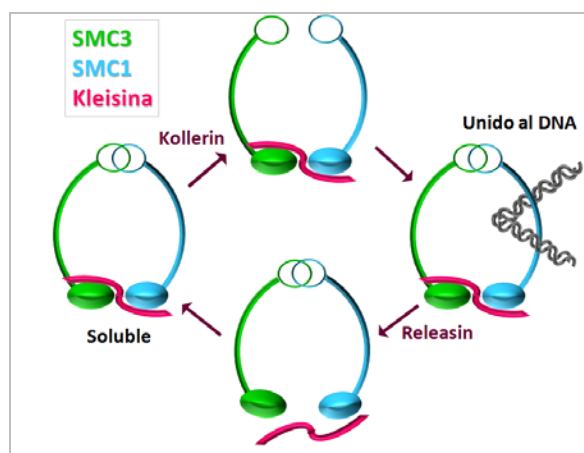


Figura 2. Modelo de carga y liberación de los complejos de cohesinas; modificada de Nasmyth, 2011.

Para garantizar el reparto equitativo del material genético, APC/C se encuentra finamente regulado por el checkpoint de ensamblaje del huso (SAC, Sudakin et al, 2001).

Como su nombre indica, el SAC es un dispositivo de control que impide la progresión del ciclo celular en caso de errores en el ensamblaje de los microtúbulos en los cinetocoros, evitando defectos de segregación y aneuploidías (Rieder et al, 1995; Malmanche et al, 2006). En prometafase, los microtúbulos del huso mitótico emanan de los dos centrosomas localizados en los polos de la célula y se ensamblan a los cinetocoros hermanos de cada cromosoma formando anclajes bipolares (Huitorel & Kirschner, 1988). Mediante movimientos antagónicos hacia cada polo los microtúbulos alinean los cromosomas en la placa ecuatorial (Skibbens et al, 1993) y una vez que se alcanza la tensión adecuada entre los microtúbulos y los cinetocoros, el SAC se inactiva (Li & Nicklas, 1995; 1997). Además, el SAC no sólo reconoce y corrige los defectos de ensamblaje de los microtúbulos en los cinetocoros, sino que al mismo tiempo debe evitar la pérdida de cohesión en los centrómeros. Para ello, la salida de metafase está directamente inhibida por el complejo del *checkpoint* mitótico o MCC, formado por las tres proteínas del SAC MAD2, BUBR1/Mad3 y CDC20 (Sudakin et al, 2001). Finalmente, cuando los cromosomas alinean en la placa ecuatorial, Cdc20, que es el activador mitótico de APC/C (Visitin et al, 1997) se libera de Mad2 y Mad3 y esto permite su unión a los sustratos de esta ubiquitin ligasa para que puedan ser degradados (Barford, 2011).

La cohesión en meiosis

A diferencia de la mitosis, en la que se generan dos células hijas idénticas a la progenitora, la meiosis es un tipo de división celular adquirida por los organismos eucariotas con reproducción sexual para producir, a partir de una célula diploide, células haploides que son además diferentes entre sí: los gametos y las esporas. Para ello se producen dos rondas de segregación cromosómica sucesivas a partir de una única duplicación del DNA, de forma que durante la primera segregación se separan los cromosomas homólogos y durante la segunda las cromátidas hermanas. Aunque la segunda división meiótica es similar a la mitosis en lo que a la segregación de las cromátidas hermanas se refiere, la segregación de los cromosomas homólogos en la primera división a polos opuestos es una adquisición clave de la división reduccional que se produce gracias a la existencia de procesos específicos de la meiosis, como son la generación de roturas en el DNA de forma programada (Mahadevaiah et

al, 2001), el apareamiento de los cromosomas homólogos formando bivalentes o la unión entre ellos mediante quiasmas (empalmes que se generan por recombinación homóloga entre dos cromátidas de cromosomas homólogos). La mayor parte de las diferencias existentes entre la meiosis I y la mitosis ocurren en la profase I (Cohen et al, 2006), la cual se ha dividido, en función de los procesos que tienen lugar, en 5 etapas: leptotena, zigotena, paquitena, diplotena y diacineis (**Figura 3**).

Mediante un mecanismo dependiente de la endonucleasa SPO11, al inicio de leptotena se generan en el DNA de los meiocitos roturas programadas de doble hebra (DSBs) (Romanienko & Camerini-Otero, 2000). Como consecuencia, se activan rutas de reparación similares a las empleadas en la recombinación homóloga en células somáticas, pero en este caso el DNA molde que se emplea corresponde al cromosoma homólogo en vez de la cromátida hermana (Tarsounas et al, 1999). Para que la recombinación homóloga tenga lugar entre cromosomas homólogos, estos deben “reconocer” a su homólogo y aparearse con él. Sin embargo, en la mayoría de las especies éste apareamiento no es suficiente para que tenga lugar la reparación por recombinación homóloga de las DSBs. Para ello, los homólogos deben establecer una unión íntima entre sí denominada sinapsis.

En leptotena, los cromosomas se empiezan a condensar en filamentos largos sobre los que se ensambla paulatinamente el elemento axial (AE), un armazón proteico que recorre toda su longitud. Además, en esta etapa los cromosomas adquieren una disposición en ramillete o *bouquet*, ya que todos los telómeros se anclan en una misma región de la membrana nuclear interna (Scherthan, et al 1996). Posteriormente, durante la etapa de zigotena, los cromosomas homólogos se reconocen y comienza a establecerse la sinapsis. Esto se hace visible cuando unos filamentos transversales que forman parte del elemento central se localizan entre los AEs de los cromosomas homólogos (**Figura 4**), formando una estructura proteica denominada complejo sinaptonémico (SC; Heyting, 1996). Los AEs sinapsados pasan a denominarse elementos laterales (LEs). Seguidamente, en paquitena, los bivalentes alcanzan el mayor grado de sinapsis. En los cromosomas autosómicos y en el bivalente sexual de las hembras (XX) la sinapsis tiene lugar por toda su longitud, mientras que

los cromosomas XY sólo sinapsan en una pequeña región de homología denominada región pseudo-autosómica (PAR, Simmler et al, 1985). Por tanto, en una paquinema de ratón se observan 20 SCs en las hembras, los cuales se corresponden con los 20 bivalentes, y 19 SCs en los machos, que se corresponden con los 19 bivalentes autosómicos, más el bivalente XY parcialmente sinapsado.

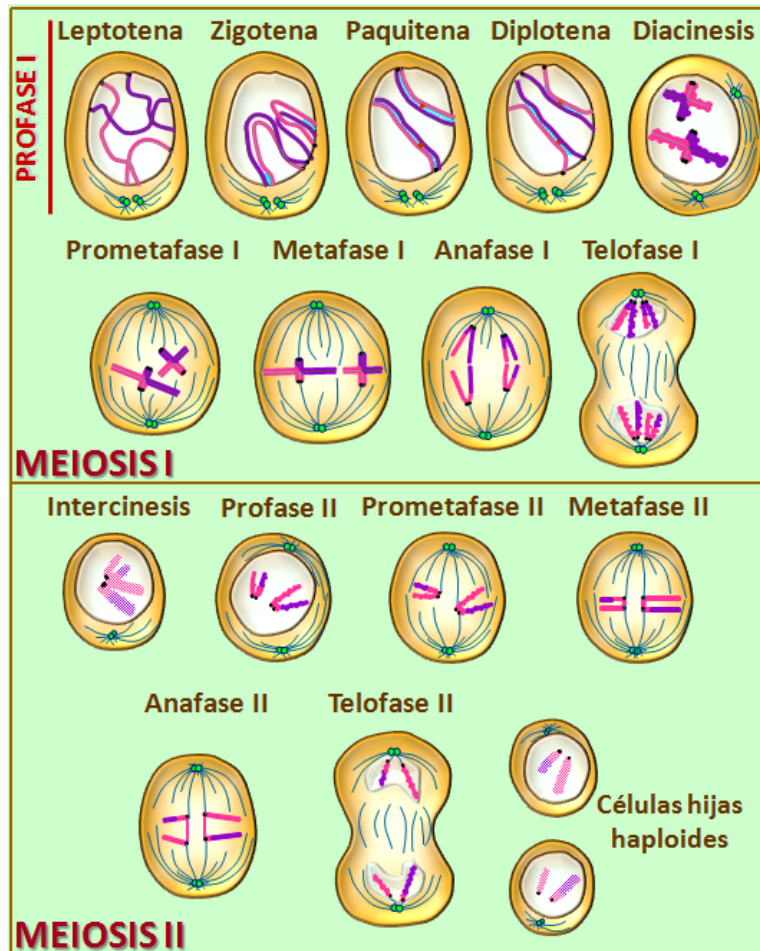


Figura 3. Esquema que representa las distintas fases celulares de la división meiótica, en el que los cromosomas paternos se representan en rosa y los maternos en morado

Entre el final de leptotena y el final de paquitena las DSBs se reparan por recombinación homóloga y se producen los sobrecruzamientos que darán lugar a los quiasmas

(Inagaki et al, 2010). La importancia de este intercambio recíproco de fragmentos homólogos entre cromátidas no hermanas radica en dos aspectos diferentes. Por un lado, garantiza la unión de los homólogos hasta anafase I, lo cual es esencial para generar la tensión necesaria para formar la placa ecuatorial en metafase I y en consecuencia, para segregar los cromosomas equitativamente (Zalevsky et al, 1999). Por el otro, incrementa la variabilidad genética de los descendientes gracias al intercambio de información que se produce entre los cromosomas materno y paterno, lo que conlleva una supuesta ventaja evolutiva (Burt, 2000). Posteriormente, el SC se desensambla en diplotena, quedando finalmente los cromosomas homólogos unidos únicamente por los quiasmas en diacinesis, etapa en la cual se alcanza una mayor condensación, previa a la entrada en metafase I.

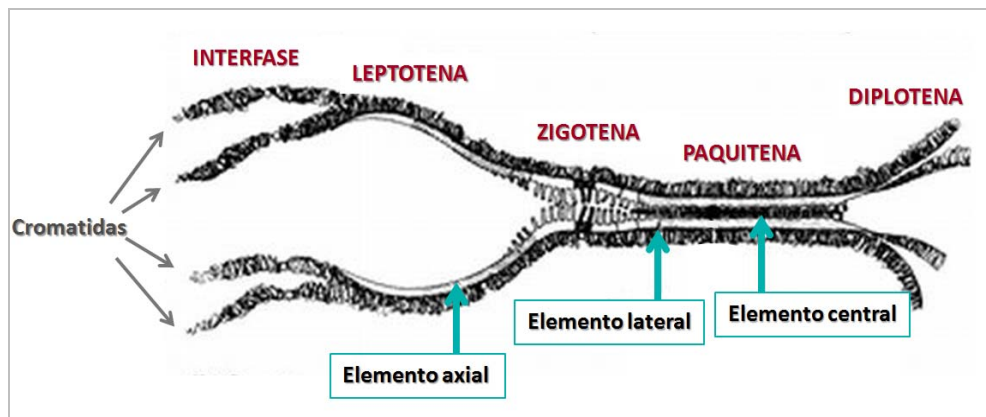


Figura 4. Diagrama de la profase I de mamíferos en el que se representan los procesos de sinapsis y desinapsis entre los los cromosomas homólogos.

En mamíferos, el SC está formado por proteínas SYCP, SYCE y HORMAD (Yuan et al, 2000; de Vries et al, 2006; Costa et al, 2005; Bolcun-Filas et al, 2007; 2009; Wojtasz et al, 2009; Schramm et al, 2011). Sin embargo, las proteínas clásicas para el estudio de las meiosis han sido las SYCPs, debido a que fueron las primeras en identificarse. SYPC3 y SYCP2 son proteínas estructurales que forman parte de los AE/LEs (Schalk et al, 1998) y SYCP1 es un filamento transversal integrante del elemento central (Schmekel et al, 1996). SYCP3 y SYCP2 se ensamblan en leptotena (Yuan et al, 2000; Eijpe et al, 2003; Yang et al, 2006) y SYCP1 se localiza transversalmente en las regiones de sinapsis sobre los LEs (de Vries et al, 2005;

Figura 5). En *S. cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Mus musculus* y en saltamontes la generación de DSBs y el inicio de la recombinación no sólo preceden a la sinapsis, sino que ésta depende de ambos procesos (Roeder, 1995; Grelon et al, 2001; Mahadevaiah et al, 2001; Viera et al, 2004). En *Caenorhabditis elegans*, sin embargo, la sinapsis se produce antes de la recombinación (Dernburg et al, 1998) y en *Drosophila* antes de la generación de las DSBs (Jang et al, 2003). A diferencia de lo que ocurre en levaduras de gemación, las levaduras de fisión carecen de SC y de AEs. A pesar de ello, en *S. pombe* existe una estructura proteica denominada elemento lineal (LinES), cuyas funciones muestran cierta similitud con las de los AEs en lo que se refiere a la organización de los loops del DNA, el reconocimiento de regiones homólogas y la colaboración en recombinación. Sin embargo, el montaje del LinES es independiente a la formación de DSBs (Lorenz et al, 2004). En conjunto, estos datos indican que aunque la meiosis consta de unos procesos comunes en todos los eucariotas, los mecanismos moleculares que ha adquirido cada especie para llevarlos a cabo no se encuentran conservados evolutivamente.

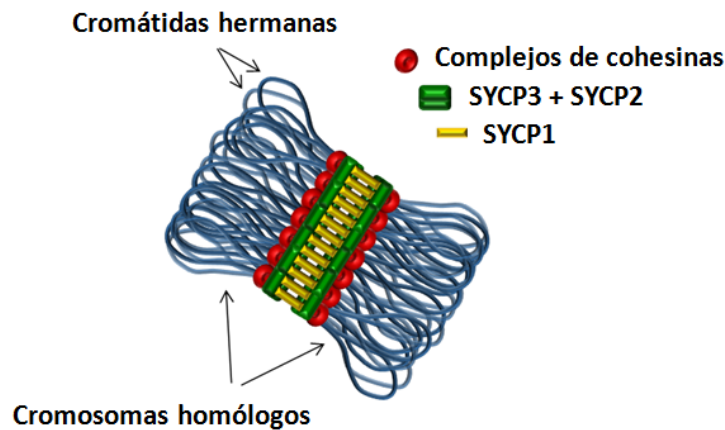


Figura 5. Representación de una región de sinapsis en mamíferos.

Reparación de los DSBs por recombinación homóloga en meiosis

En mamíferos, el inicio de la recombinación homóloga es dependiente de la generación de DSBs por la endonucleasa SPO11 al inicio de leptotena (Baudat et al, 2000). Como consecuencia de estas roturas programadas, los sensores de daño ATR y ATM activan cascadas de señalización encargadas de la reparación del DNA (Keegan et al, 1996). Inicialmente ATM promueve la fosforilación de H2AX, la cual se localiza en los sitios de rotura al inicio de leptotena (Bellani et al, 2005), y como consecuencia, se produce una amplificación de la señal mediante un proceso integrado por numerosas proteínas de las rutas de reparación como son CHK2, BRCA1, BRCA2, RPA, RAD52, RAD51 y DMC1 (Barlow et al, 1998; Xu et al, 2003; Sharan et al, 2004; Miles et al, 2010). Para que la reparación de las DSBs se lleve a cabo por recombinación homóloga, ATM/CHK2 fosforilan BRCA1, lo que promueve su localización en las DSBs señalizadas por la histona γ H2AX. Una vez allí, BRCA1 regula las exonucleasas encargadas de la resección o el acortamiento de los extremos 5' para que los extremos 3' queden como hebras simples (Symington & Gautier, 2011). Seguidamente la proteína RPA, a pesar de ser una proteína característica de los nódulos de recombinación intermedios (Moens et al, 2002), reconoce las hebras simples de DNA y se une transitoriamente a los extremos 3' para protegerlos del cromosoma homólogo (Tarsounas et al, 1999) y la formación de nódulos tempranos que marcan el inicio de la recombinación (Anderson et al, 1997). A medida que avanza la profase algunos de estos nódulos tempranos maduran a nódulos de transición, caracterizados por la presencia de otras proteínas de recombinación como la previamente mencionada RPA y posteriormente, MSH4 y MSH5 (de Vries et al, 1999; Moens et al, 2002; Ashley et al, 2004; Neyton et al, 2004). Finalmente, sólo entre el 6 y el 20 % de los nódulos generados en leptotena se transforman en nódulos de recombinación que dan lugar a los quiasmas en paquitena (Plug et al, 1998; Moens et al, 2002; 2007) y que se distinguen por la presencia de las proteínas MLH1 y MLH3 (Baker et al, 1996; Santucci-Darmanin et al, 2002). Pero además, la kinasa ATR, el otro sensor de daño genético, también participa durante el proceso de intercambio de información entre los cromosomas homólogos. Para ello, ATR co-localiza con la proteína de reparación TOPBP1 en las DSBs y

conjuntamente forman parte de la maquinaria que monitoriza la recombinación (Perera et al, 2004).

Aparte de la función que desempeñan durante la recombinación y reparación del DNA, algunas de estas proteínas desempeñan un papel importante en el silenciamiento de los cromosomas sexuales en la espermatogénesis de mamíferos (Fernandez-Capetillo et al, 2003, Turner et al, 2004). En paquitena, la falta de homología y sinapsis a lo largo de la mayor parte de los cromosomas sexuales XY conduce a la asinapsis forzosa. En un intento de señalar diferencialmente esta asinapsis obligada de la que ocurre en los bivalentes autosómicos por defectos en el apareamiento o la recombinación, se cree que los espermátocitos de mamíferos forman en torno a su bivalente sexual un dominio cromatínico especializado que se conoce como cuerpo sexual. Durante esta misma etapa, la cromatina de aquellos cromosomas autosómicos con defectos de sinapsis, sufren modificaciones que silencian su transcripción por un proceso denominado MSUC (meiotic silencing of unsynapsed chromatin). A pesar de que el MSUC es un proceso conservado funcionalmente en la mayoría de los eucariotas, los mecanismos ejecutores que se emplean en los distintos phyla son muy diferentes (Turner et al, 2005; Schoenmakers et al, 2010). Este mecanismo contribuye a la eliminación de los meiocitos con defectos en sinapsis (Kouznetsova et al, 2009). Asimismo, la mayor parte de la cromatina del cuerpo sexual se mantiene silenciada entre paquitena y diplotena mediante el MSCI (meiotic sex chromosome inactivation), un proceso especializado que se cree que ha derivado evolutivamente del MSUC y que es imprescindible para completar la espermatogénesis en mamíferos (Fernandez-Capetillo et al, 2003; Turner et al, 2005; Schoenmakers et al, 2009; 2010).

En relación con todos estos procesos, en la profase I de la meiosis existe un punto de control importante para prevenir la producción de gametos aberrantes por defectos en la sinapsis, en la generación/reparación de DSBs y en la recombinación, el cual se denomina *checkpoint* de paquitena. A pesar de que se desconoce en mamíferos el mecanismo del bloqueo de los meiocitos con estas alteraciones, éste se desencadena por la pérdida de función de gran parte de las proteínas implicadas en dichos procesos. Así, mediante el

desarrollo de modelos murinos con pérdida de función se ha comprobado que la deficiencia de SPO11 (Baudat et al, 2000), ATM (Barlow et al, 1998), BRCA1 (Xu et al, 2003), BRCA2 (Sharan et al, 2004), DMC1 (Pittman et al, 1998), MSH5 (de Vries et al, 1999), MLH1 (Edelmann et al, 1996) o las proteínas del SC (Yuan et al, 2000; de Vries et al, 2005; Yang et al, 2006), provoca la activación de este *checkpoint*. Dos de las proteínas que podrían estar implicadas en la activación de este punto de control de paquitena son ATR y TOPBP1, las cuales interactúan en regiones de los cromosomas autosómicos en las que no se ha completado la sinapsis en zigotena. Esta hipótesis se basa en que la proteína ortóloga de TOPBP1 en levaduras se ha relacionado con dicha función (Perera et al, 2004) y en que ATR está implicada en el MSUC (van der Heijden et al, 2007).

Cohesinas en meiosis

Además de estas proteínas implicadas en la reparación de los DSBs (sensoras, recombinasas, kinasas, etc...) y otras específicas de meiosis (DMC1, SYCP1, SYCP3, etc...), las cohesinas también desempeñan un papel clave en diferentes procesos meióticos. Durante la profase I, los complejos de cohesinas se distribuyen a lo largo de los cromosomas homólogos co-localizando con los AE/LEs y no sólo participan en la cohesión, sino también en la sinapsis, la reparación, la recombinación, la formación de quiasmas y la organización de la cromatina en loops (Bannister et al, 2004; Revenkova et al, 2004; Xu et al, 2005; Novak et al, 2008). Por tanto, la naturaleza reduccional de la primera división meiótica es posible gracias a la adaptación de las funciones de las cohesinas a los procesos específicos de la meiosis. Una de las diferencias entre la mitosis y la meiosis que probablemente ha sido clave para esta adaptación es la sustitución de RAD21 por REC8 en los complejos de cohesinas implicados en el mantenimiento de la cohesión centromérica durante las divisiones meióticas (Molnar et al, 1995; Parisi et al, 1999; Pasierbek et al, 2001; Bannister et al, 2004; Tachibana-Konwalski et al, 2010). REC8 se localiza en el dominio intercromatídico y en los centrómeros desde leptotena hasta metafase I. Llegado este momento, los cromosomas homólogos se alinean en la placa ecuatorial con los centrómeros hermanos orientados hacia el mismo polo (Yokobayashi & Watanabe, 2005; Hauf et al, 2007) y una vez que la tensión es adecuada, Separara se activa y

corta la subunidad REC8 de los complejos de cohesinas de los brazos, lo que permite la resolución de los quiasmas y la segregación de los homólogos (Buonomo et al, 2000; Kudo et al, 2006). En levaduras, además, se ha propuesto que Rec8 y un complejo de proteínas denominadas monopolinas participan en la mono-orientación de los centromeros hermanos (Watanabe and Nurse, 1999; Watanabe et al, 2001; Yokobayashi et al, 2003), sin embargo, en mamíferos todavía se desconocen las proteínas que promueven la mono-orientación, aunque existen algunas candidatas como SYCP3 y RAD21 (Parra et al, 2004). Después de la primera división meiótica las cromátidas hermanas permanecen unidas sólo por los centrómeros, gracias a unos pocos complejos de cohesinas con REC8 que se mantienen en dicha región, de forma que en metafase II éstas son bi-orientadas al igual que ocurre en mitosis. Finalmente, justo antes de anafase II Separasa corta el REC8 de los complejos de cohesinas centroméricos y cada cromátida migra a una célula hija (Kitajima et al, 2003).

Las shugoshinas y su papel en la protección de la cohesión centromérica

Una de las características que la mitosis de vertebrados y la primera división meiótica tienen en común es que, a pesar de que los complejos de cohesinas de los brazos son eliminados por fosforilación en profase o por proteólisis en metafase I, la cohesión centromérica se mantiene hasta la segregación de las cromátidas hermanas en anafase I y anafase II respectivamente (Waizenegger et al, 2000; **Figura 6**). Este hecho sugiere la existencia de algún mecanismo capaz de proteger los complejos de cohesinas centroméricos hasta anafase. La primera proteína a la que se le atribuyó esta función fue MEI-S332, la cual protege la cohesión centromérica de *Drosophila* hasta anafase II (Kerrebrock et al, 1995). Posteriormente se identificó una proteína con una función similar en la meiosis de levaduras, la cual pertenece a la familia de MEI-S332, y que se denominó shugoshina (Sgo), término que en japonés significa “espíritu guardián” (Kitajima et al, 2004).

La familia de las shugoshinas se extiende desde levaduras hasta humanos (Kitajima et al, 2004; Rabitsch et al, 2004). Algunos organismos como *S. cerevisiae* y *Drosophila* únicamente tienen una shugoshina (Kerrebrock et al, 1995; Katis et al, 2004; Kitajima et al, 2004; Rabitsch

et al, 2004), mientras que las levaduras de fisión y los animales vertebrados tienen dos (Kitajima et al, 2004; 2006; Rabitsch et al, 2004; Rivera et al, 2012). Sin embargo, y a pesar de que en *S. pombe* sus dos miembros (Sgo1 y Sgo2) se denominan igual que en mamíferos (SGOL1 y SGOL2), la poca identidad que existe entre sus secuencias aminoacídicas sugiere que no existen relaciones de ortología entre sgo1 y SGOL1 y sgo2 y SGOL2 (Gutiérrez-Caballero et al, 2012). Funcionalmente, en *S. pombe*, *S. cerevisiae*, *Drosophila* y *Zea mays*, Sgo1/Mei-S332 protege los complejos de cohesinas centroméricos de ser cortados durante la primera ola de activación de Separasa en la primera división meiótica (Kerrebrock et al, 1995; Katis et al, 2004; Kitajima et al, 2004; Rabitsch et al, 2004; Hamant et al, 2005). Sin embargo, en vertebrados SGOL1 protege la cohesión de los centrómeros de la ruta profásica en células somáticas (Salic et al, 2004; Kitajima et al, 2006; Huang et al, 2007; Rivera et al, 2012), mientras que SGOL2 es esencial para el mantenimiento de la cohesión hasta anafase II en ratón (Llano et al, 2008; Lee et al, 2008). Hasta la fecha se desconoce la posible función *in vivo* de SGOL2 en células somáticas de ratón (Llano et al, 2008). Sin embargo, su depleción mediante siRNA en HeLa provoca defectos de cohesión o segregación (Kitajima et al, 2006;

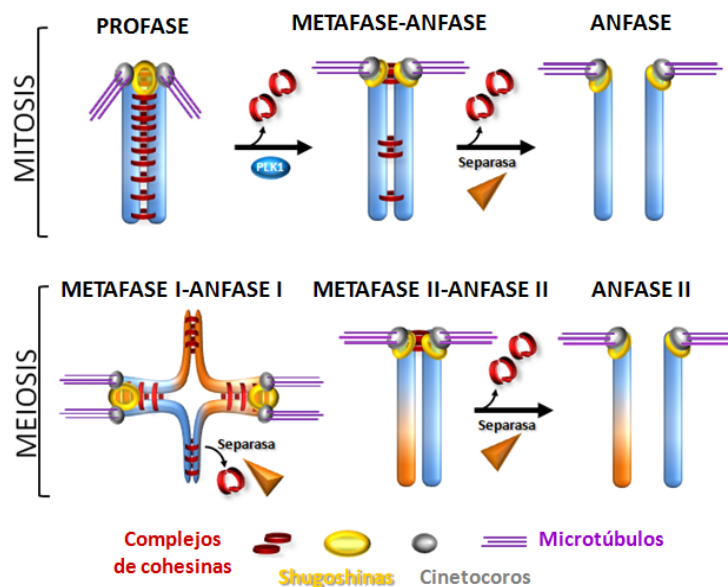


Figura 6. Esquema sobre la mitosis de vertebrados y la meiosis de levaduras con el que se representa la liberación de complejos de cohesinas en dos pasos; adaptada de Gutiérrez-Caballero et al, 2012.

Huang et al, 2007). De forma similar al ratón, la deficiencia en *Xenopus* de XSgo2 no provoca defectos de cohesión en mitosis (Rivera et al, 2012). Por tanto, es probable que las shugoshinas de vertebrados hayan divergido de una shugoshina ancestral cuya función primera fuera la protección de la cohesión en meiosis. En cualquier caso, sería más adecuado considerar que SGOL2 de vertebrados es la órtóloga de Sgo1 de levaduras (Gutiérrez-Caballero et al, 2012). A pesar de ello, y como ocurre con Sgo1 en *S. cerevisiae* (Indjeian et al, 2005; Kiburz et al, 2008; Storchová et al, 2011) y Sgo2 en *S. pombe* (Kitajima et al, 2004; Rabitsch et al, 2004; Kawashima et al, 2007; Vanoosthuysen et al, 2007), las funciones de las shugoshinas de vertebrados no están restringidas a preservar la cohesión cromosómica, sino que éstas también participan en la formación de husos bipolares (Rivera et al, 2012), en mantener la integridad de los centriolos hasta anafase (Wang et al, 2008) e incluso podrían estar implicadas en el SAC, dada la interacción descrita entre hSGOL2 y hMAD2 (Orth et al, 2011).

Funciones no canónicas de las cohesinas

Además de su función en el establecimiento de la cohesión entre cromátidas hermanas, las proteínas del complejo de cohesinas y las proteínas que participan en su carga en el DNA o en el establecimiento de la cohesión, también están implicadas en otros procesos celulares importantes. En los años 70 se realizaron cribados genéticos para identificar en *S. pombe* genes protectores frente a radiaciones UV y radiaciones γ , los cuales fueron bautizados como genes rad (sensibilidad a la radiación), y entre ellos se identificó rad21 (Nasim & Smith, 1975). Posteriormente, se describió a rad21 como una proteína esencial para la reparación de DSBs en levaduras (Birkenbihl & Subramani, 1992) y recientemente se ha comprobado que los ratones *Rad21^{+/-}* tienen reducida la capacidad de reparar el DNA dañado y sufren hipersensibilidad del epitelio intestinal frente a radiaciones γ (Xu et al, 2010). Asimismo, las proteínas SMC1 y SMC3 están implicadas en reparación y forman parte del complejo de recombinación humano RC-1 (Jessberger et al, 1996; Stursberg et al, 1999; Schär et al, 2004). Además, la fosforilación de SMC1 y SMC3 dependiente de ATM/ATR regula la señalización y reparación de daño en el DNA en mamíferos (Kim et al, 2010). De forma adicional, las

cohesinas están implicadas en la activación de los *checkpoints* de fase S y G2/M en mamíferos y, dado que para ello no se requiere Sororina, esta función parece ser independiente del su papel en cohesión (Watrin & Peters, 2009). De manera similar, las subunidades reguladoras de *S. cerevisiae* Eco1/Ctf7 (Sjögren & Nasmyth, 2001; Unal et al, 2007) y de mamíferos ESCO1 (Kim et al, 2010) también participan en reparación y para ello colaboran en el establecimiento de cohesión no sólo en fase S, sino también en respuesta a DSBs en G2/M. De forma adicional, durante la meiosis las cohesinas no sólo participan en la cohesión centromérica, sino en varios procesos necesarios para la condición reduccional de la primera segregación meiótica, como es el empleo del cromosoma homólogo en vez de la cromátida hermana como molde durante la recombinación homóloga (Brar et al, 2009).

Por otro lado, las cohesinas y sus proteínas reguladoras también participan en la regulación transcripcional de otros genes. En *Drosophila*, Nipped-B regula la activación de los genes implicados en la regulación del desarrollo o genes homeobox y la activación de la ruta de señalización Notch (Rollins et al, 1999). De forma similar, en *Zebrafish* las cohesinas Rad21 y Smc3 son fundamentales para la activación de los genes *Runx* que se expresan al inicio del desarrollo embrionario (Horsfield et al, 2007). Asimismo, en células humanas las cohesinas colaboran directamente con el factor de transcripción CTCF para regular la expresión de algunos genes en interfase (Parelho et al, 2008; Stedman et al, 2008; Wendt et al, 2008). Dado que CTCF colabora en procesos epigenéticos y se asocia con regiones que regulan la impronta y con elementos que aíslan ciertos genes de otras regiones vecinas del genoma, las cuales generan efectos represivos o de activación sobre ellos (Ohlsson et al, 2001; West et al, 2002), es posible que las cohesinas también participen en dichos procesos (**Figura 7A**). Pero además, se ha demostrado que la interacción del complejo de cohesinas con NIPBL y un co-activador transcripcional denominado complejo Mediador activa genes que mantienen la pluripotencia de las células ES de ratón, como son Oct4 y Nanog. Este modelo transcripcional se basa en que estas proteínas promueven la formación de loops en el DNA para acercar entre sí a promotores y enhancers (Kagey et al, 2010; Nitzsche et al, 2011; **Figura 7B**). Así mismo, recientemente se ha demostrado que RAD21 está implicada en la diferenciación de timocitos *in vivo* al promover modificaciones en la arquitectura de la cromatina (Seitan et al, 2011).

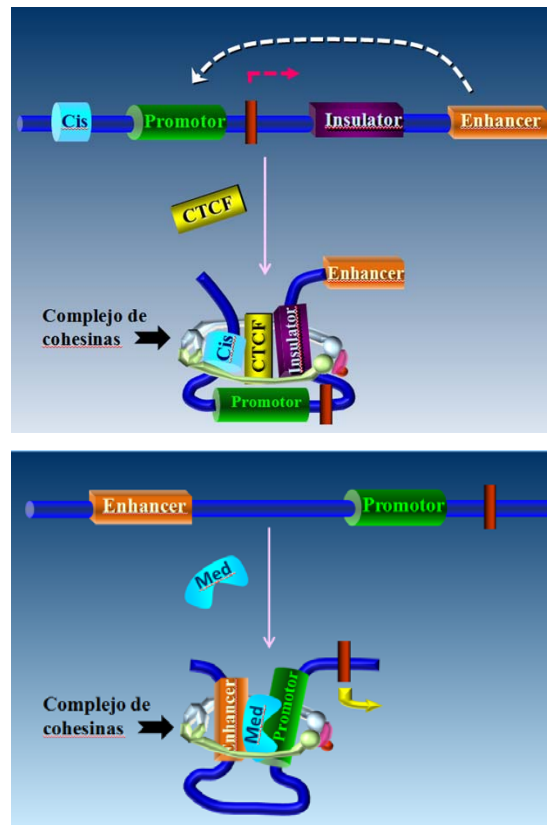


Figura 7. Modelos de regulación transcripcional en los que participan los complejos de cohesinas limitando (A; Stedman et al, 2008; Wendt et al, 2008) o promoviendo (B; Kagey et al, 2010) la actividad de los *enhancers* sobre los promotores.

Patologías humanas relacionadas con la cohesión y la segregación cromosómica

Desde el siglo pasado, una de las enfermedades que más interés ha suscitado en la comunidad científica ha sido el cáncer y concretamente, llegar a entender las causas subyacentes al desarrollo de tumores y su transformación maligna, con el fin de generar tratamientos efectivos. En 1891, el patólogo David Paul Hansemann describió por primera vez la presencia de mitosis poli-astres con puentes anafásicos en carcinomas humanos, aunque tuvieron que pasar dos décadas para que Boveri postulara que las aneuploidías generadas por errores en la segregación cromosómica podían ser el origen de las neoplasias. Sin embargo, y a pesar de que se conocen y se comprenden cada vez mejor muchos de los procesos

moleculares alterados en las células cancerosas y las mutaciones que causan o potencian dichas alteraciones, hasta la fecha no se ha podido esclarecer si las aneuploidías y las reorganizaciones cromosómicas inherentes a muchos carcinomas son una causa o una consecuencia de la tumorigénesis (Williams et al, 2008; Weaver & Cleveland, 2009). Dado que la mayor parte de las proteínas mencionadas anteriormente están implicadas en el establecimiento, mantenimiento y/o la regulación de la cohesión y la segregación cromosómica, así como en la regulación de la transcripción del genoma, no es de extrañar que en diversos tipos de tumores se hayan identificado mutaciones o alteraciones en la expresión de algunos de los genes que las codifican. En tumores de colon, mama, ovario, pulmón, o tiroides y en células de pacientes con leucemia y linfoma se han detectado alteraciones de la expresión y mutaciones en algunos genes que codifican proteínas del SAC, como por ejemplo hBUB1, hBUBR1 hMAD2 o hCDC20 (Cahill et al, 1998; Garber et al, 2001; Chen et al, 2002; Ru et al, 2002; Rhodes et al, 2004; Wada et al, 2008), aunque en general se considera que los genes del SAC no son dianas frecuentes de mutaciones en los tumores (Haruki et al, 2001). Por otra parte, el desarrollo de tumores de pituitaria, tiroides, colon y de algunos gliomas pueden estar vinculado a niveles altos en la expresión de hSecurina (Tfelt-Hansen et al, 2006). La sobre-expresión de Securina en células tumorales y su actividad oncogénica se describió por primera vez durante el estudio de una línea celular de rata procedente de un tumor de pituitaria, por lo que se denominó pituitary tumor-transforming gene o PTTG1 (Pei & Melmed, 1997). De forma similar, alteraciones en hSeparasa, hWAPL y en proteínas del CPC (Complejo pasajero del cromosoma) pueden provocar inestabilidad cromosómica, aneuploidías y/o tumorigénesis, y además su sobre-expresión se ha asociado con varios tipos de tumores (Zhang et al, 2008-b; Mukherjee et al, 2011; Oikawa et al, 2004; Kollareddy et al, 2008; Barbanis et al, 2009; Meyer et al, 2009; Small et al, 2010). Finalmente, en el gen *hSgo1* se han hallado también alteraciones asociadas al desarrollo de cáncer de colon, algunas referentes a una reducción de su expresión (Iwaizumi et al, 2009) y más recientemente, a una nueva variante de SGOL1 generada por *splicing* alternativo (SGOL1-P1) que inhibe la localización de SGOL1 y de RAD21 en los centrómeros (Kahyo et al, 2011). Además, recientemente se ha encontrado una relación directa entre las cohesinas y la progresión tumoral a través de la presencia de mutaciones inactivantes de STAG2 en glioblastomas, sarcoma de Ewing,

melanoma y leucemias y de mutaciones conductoras en el gen de la subunidad SMC3 en leucemias agudas crónicas (AML) (Solomon et al, 2011; Rocquain et al, 2010, Ding et al, 2012). Dado que SMC3 es la única subunidad estructural común a todos los complejos de cohesinas, la presencia de mutaciones en este gen en AMLs conllevaría una alteración de las funciones de todos los complejos de cohesinas existentes.

Por otro lado, y dado que muchas de las proteínas a las que se ha hecho referencia en los apartados anteriores también participan en la meiosis, es posible que éstas puedan estar implicadas en algunos casos de esterilidad humana. La esterilidad humana puede estar provocada por factores ambientales que afectan, por ejemplo, a la producción de hormonas o de anticuerpos, o bien por alteraciones genéticas (Benoff et al, 2000; Poongothai et al, 2009). Con respecto a los defectos genéticos que provocan esterilidad masculina, los más estudiados son las microdeleciones en el brazo largo del cromosoma Y, que afectan a las tres regiones denominadas factores de azoospermia o AZF (Navarro-Costa et al, 2010). En mujeres, las alteraciones genéticas no sólo pueden causar esterilidad sino que además pueden ser responsables del fallo prematuro del ovario (POF) que provoca menopausia precoz (Fauser & Hsueh, 1995; Persani et al, 2010). No obstante, en más de la mitad de los casos de infertilidad las causas de su origen se desconocen (Poongothai et al, 2009).

Mediante modelos murinos se ha comprobado que mutaciones en las proteínas implicadas en los procesos de DSBs, reparación y recombinación provocan esterilidad (Baker et al, 1996; Edelman et al, 1996; 1999; Xu et al, 1996; Pittman et al, 1998; Yoshida et al, 1998; de Vries et al, 1999; Baudat et al, 2000; Romanienko & Camerini-Otero, 2000; Kneitz et al, 2000; Sharan et al, 2004). De forma similar, la pérdida de función de alguna de las tres proteínas SYCP del SC, así como de las cohesinas REC8 o SMC1 β provoca azoospermia en machos y distrofia del ovario o subfertilidad en hembras (Yuan et al, 2000; Pelttari et al, 2001; de Vries et al, 2005; Yang et al, 2006; Bannister et al, 2004; Xu et al, 2005; Revenkova et al, 2004). Asimismo, en humanos se han identificado mutaciones en SYCP3 asociadas a esterilidad masculina y a abortos recurrentes (Miyamoto et al, 2003; Bolor et al, 2009). Además, los defectos en la segregación cromosómica que se han detectado en los óvulos de

mujeres de avanzada edad podrían estar originados por una disminución de la cohesión y/o por defectos en el funcionamiento de las proteínas del SAC (Cukurcam et al, 2004; Hodges et al, 2005; Steuerwald, 2005; Tachibana-Konwalski et al, 2010; Orth et al, 2011).

Por último, existe un conjunto de enfermedades menos conocidas denominadas cohesinopatías que se atribuyen directamente a defectos en proteínas del complejo de cohesinas o en proteínas reguladoras de la cohesión. El síndrome de Cornelia de Lange (CdLS), es una cohesinopatía que afecta a 1 de cada 10.000 nacidos que se caracteriza por presentar desórdenes en el desarrollo, retraso mental, defectos cardiacos, malformaciones faciales y de las extremidades, retraso en el crecimiento y anomalías intestinales (Gillis et al, 2004) y se produce por mutaciones en los genes *Nipbl* (Krantz et al 2004; Tonkin et al, 2004), *Smc3*, *Smc1a* (Musio et al, 2006; Deardorff et al, 2007) , *Pds5b* (Zhang et al, 2009) o *Rad21* (Deardorff et al, 2012). El síndrome de Roberts (RBS), la otra cohesinopatía más frecuente, está provocado por mutaciones en el gen *Esco2* (Vega et al, 2005) y se caracteriza por alteraciones en el desarrollo similares a las del CdLS, como malformaciones cráneo-faciales, defectos en las extremidades o retraso mental (Gerkes et al, 2010). Paradójicamente, los pacientes con estas patologías no sufren defectos de cohesión, salvo los que padecen RBS, en los que se suele observar una leve pérdida de cohesión en la heterocromatina centromérica de algunos cromosomas y en el brazo largo del cromosoma Y (Whelan et al, 2011). En consecuencia, todo ello sugiere que las anomalías asociadas a las cohesinopatías surgen por alteraciones en las funciones no canónicas de las cohesinas, especialmente aquellas relacionadas con la morfogénesis (Rollins et al, 1999; Horsfield et al, 2007; Stedman et al, 2008; Wendt et al, 2008). En concordancia se ha observado que la pérdida de función de CTCF en el desarrollo embrionario del ratón provoca malformaciones de las extremidades (Soshnikova et al, 2010).

OBJETIVOS

En mamíferos, los complejos de cohesinas son esenciales para la cohesión de las cromátidas hermanas desde su replicación hasta la segregación cromosómica, la reparación del DNA, la regulación de la expresión génica y la diferenciación celular. En meiosis, además, las cohesinas se requieren para la sinapsis y la recombinación homóloga. Para que los complejos de cohesinas puedan llevar a cabo estas funciones, existen, además, otras proteínas que participan directa o indirectamente en su carga (SCC2/NIPBL, SCC4/MAU) y liberación del DNA (WAPL, PDS5, PLK1, Separasa), en el establecimiento (ESCO1) y mantenimiento (ESCO2, Sororina) de la cohesión y en su protección frente a fosforilación o corte (SGOL1, SGOL2, PP2A, Securina, CDK1/ciclina B). Por tanto, muchas de estas proteínas, junto con las subunidades canónicas del complejo de cohesinas, podrían ser necesarias para preservar la estabilidad cromosómica.

El presente trabajo de investigación se centra en el estudio de la ruta de la cohesión y su implicación en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica en mamíferos. Para ello, se aborda el desarrollo de nuevos modelos de ratón por pérdida de función, con el fin de diseccionar *in vivo* los procesos celulares afectados. En base a ello, los objetivos concretos que nos planteamos son los siguientes:

- Estudio de la localización y dinámica cromosómica de una nueva kleisina del complejo de cohesinas identificada en el laboratorio.
- Análisis funcional de la nueva kleisina mediante el desarrollo y caracterización de un ratón mutante por pérdida de función.
- Caracterización funcional de los complejos de cohesinas meióticos en la espermatogénesis de mamíferos mediante la generación y análisis de un ratón deficiente para las kleisinas meióticas.

Objetivos

- Determinación de un posible mecanismo adicional en el mantenimiento de la cohesión cromosómica en mamíferos, potencialmente implicado en la inhibición de Separasa.
- Análisis de la espermatogénesis de un modelo murino con hipoplasia del testículo por pérdida de función de Securina.

MATERIALES y MÉTODOS

- Reactivos de electroforesis

La separación de DNA y RNA se realizó en geles de agarosa (Grado de Biología Molecular, Pronadisa) en TAE o TBE. El bromuro de etidio utilizado para detectar los ácidos nucleicos fue adquirido en Sigma-Aldrich.

- Enzimas de restricción

Los diversos enzimas de restricción, así como enzimas para PCR, clonación o marcaje de sondas fueron suministrados por Takara, Fermentas, New England Biolabs, Amersham Pharmacia Biotech y Roche Molecular Biochemicals.

- Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados a lo largo del trabajo fueron sintetizados por Thermo Scientific, Isogen Life Science, Sigma-Aldrich e Invitrogen a una escala de síntesis de 50nmol.

- Vectores de clonación y de expresión de proteínas

El cDNA de RAD21L se clonó en el vector de expresión pET, lo que sirvió para expresar la proteína en *E. coli*. En el vector pBluescript se clonaron las sondas necesarias para las distintas estrategias de genotipado de los ratones mutantes.

- Otros productos

Las disoluciones tampón utilizadas (TE, SSC, TBE, TAE, solución Denhardt) se prepararon según describen Sambrook & Rusell (2001). Los distintos productos empleados fueron de calidad analítica y se adquirieron a distintas firmas suministradoras, principalmente Merck, Sigma-Aldrich, Applied Biosystems y Prolabo. Se utilizó agua de grado reactivo MilliQ-plus (Millipore). El resto de productos se detallan en los apartados siguientes.

Técnicas en Biología Molecular

- Técnicas básicas

Las técnicas básicas de biología molecular empleadas en este trabajo, como electroforesis en geles de agarosa, digestiones con enzimas de restricción, ligamiento de fragmentos de DNA etc., se realizaron siguiendo los procedimientos aconsejados por las casas comerciales o según los protocolos descritos por Sambrook & Rusell (2001) y Brown (2006).

- Transformación con plásmidos y cultivo de bacterias

La propagación de los plásmidos se realizó en cepas de *E. coli* mediante transformación química o mediante electroporación. En el primer caso, se descongeló el vial de células competentes *E. coli* DH α 5 en hielo y se añadió el DNA plasmídico (0,1-50 ng en 20 μ l). Se incubó el vial 10 min en hielo, se introdujo en un baño a 42° C durante 33 segundos y se enfrió en hielo 1 min. Para transformación eléctrica se descongeló un vial de células electrocompetentes de *E. coli* DH α 5 en hielo y se incubaron 100 μ l de las mismas con 1 μ l de ligación en la una cubeta *E.coli* pulse de BioRad (0,2 cm gap) durante 10 min en hielo. Después, se aplicó una descarga eléctrica de 25 μ F de capacitancia, 186 Ω de resistencia y 2,5 kV de voltaje en un electroporador ECM600 BTX Electroporation system y se introdujo la cubeta en hielo. Para la transformación de ligaciones, tanto por choque térmico como eléctrico, las bacterias se dejaron recuperando 40-60 min en 1 ml de LB y posteriormente se sembraron en una placa de LB agar con el antibiótico de selección correspondiente y se incubaron al menos 15 h a 37° C. En el caso de que la transformación de la ligación se realizara con plásmidos pBluescript (LacZ), junto con las bacterias se añadió IPTG 200 mM (5 μ l en placa petri de 100 mm y 12,5 μ l en placa petri de 150 mm) y X-gal al 2% en dimetilformamida (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido; 50 μ l y 125 μ l en 10 y 15 cm respectivamente; Takara), lo que permitió identificar las colonias que contenían el vector recombinante por su incapacidad para transformar el X-gal en un pigmento azul. Para obtener la cantidad necesaria del vector recombinante las colonias de interés crecidas en las placas de LB agar se picaron en 2 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente y se cultivaron al menos 12 h a 37° C.

Posteriormente se realizó la extracción del plásmido o en caso de requerirse una mayor cantidad del mismo se dejó crecer un volumen mayor a partir de un inóculo del cultivo inicial.

- Purificación de DNA plasmídico y BACs

Para la extracción del DNA plasmídico a pequeña escala y de los BACs utilizados principalmente como moldes de PCRs, se aplicó un protocolo de purificación rápida a partir de 1,5 ml de cultivo de las *E. coli*. Tras centrifugación en microcentrífuga (Beckman Coulter microfuge 18), el pellet de bacterias obtenido se resuspendió en 200 μ l de Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM y RNAsa 100 μ g/ml (Roche). Posteriormente se añadieron 200 μ l de una solución NaOH 0,2 N y SDS 1% (Merck) para lisar las bacterias. Después de 5 min, se añadieron 200 μ l de acetato potásico 3 M de pH 5,5 (Merck) para precipitar el DNA cromosómico bacteriano y las proteínas. Tras su centrifugación, se recogió el sobrenadante y se mezcló con 0,7 volúmenes de isopropanol (Merck) para precipitar el DNA plasmídico, el cual se lavó con etanol al 70 % (Merck) y se resuspendió en TE. Para cultivos a gran escala la purificación del DNA plasmídico se realizó utilizando un kit de la casa comercial QIAGEN.

- Purificación de fragmentos de DNA

Las sondas y otros fragmentos de DNA utilizados para clonación obtenidos por PCR o por digestión de plásmidos recombinantes se separaron en geles de agarosa en tampón 1X TAE. La banda del gel correspondiente al fragmento de interés se recortó en el transiluminador BioRad Gel Doc 2000 y se purificó utilizando el kit comercial GenClean III kit MP Biomedicals.

- Purificación de RNA de testículos

Cada testículo se introdujo en un eppendorf de 2 ml con 750 μ l de solución con GIT (4 M Isotiocianato de guanidina, TEMED), 0,025 M citrato sódico pH 7.0 (Merk), lauril sarcosinato de sodio 0,5 % (w/v; Sigma-Aldrich), 0,1 M β -mercaptoetanol (Gibco) y se homogenizó con un polytron (IKA T10 basic, Ultra Turrax) para romper las membranas y desnaturalizar las proteínas. Después se añadió 0,1 vol acetato de sodio 3 M, 1 vol fenol-H₂O (Sigma-Aldrich) y 0,4 vol cloroformo isoamílico (Merck), se mezcló con vortex y se incubó 15

min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm 20 min a 4° C en microcentrífuga. La fase acuosa resultante, conteniendo el RNA, se transfirió a un nuevo tubo y se mezcló con isopropanol 1:1. Para precipitar el RNA, se centrifugó la muestra a 13.000 rpm 15 min a 4° C y después se lavó con etanol 70 %. Después el pellet se resuspendió con MQ-H₂O y se cuantificó a 260 nm.

- Marcaje radioactivo de sondas de DNA para southern blot

Las secuencias de DNA que se emplearán como sonda en los análisis southern genómicos fueron de al menos 400 nucleótidos de longitud y no incluyeron secuencias repetidas. El fragmento se obtuvo mediante amplificación por PCR. Una vez purificado se marcó mediante *random priming*. Para ello, se mezclaron 30 ng de molde con 2,5 µg de oligonucleótidos aleatorios (random primers, Takara) se desnaturalizó 5 min a 100 °C y se enfrió en hielo 5 min para impedir la re-naturalización del DNA. Posteriormente se añadieron 2,5 µl de un mezcla con 0,5 mM de 3 dNTPs (dATP+dGTP+dTTP; BioLine), 3,5 U de la polimerasa Klenow de Takara, el buffer 10X de la polimerasa y 12 mCi/ml de [α 32]-dCTP. Tras 90 min a 37° C la reacción se desnaturalizó antes de ser usada.

- Secuenciación de plásmidos y fragmentos amplificados

La secuenciación de las sondas clonadas en pBS fue realizada por el Servicio de Genómica del CIC (Campus Miguel de Unamuno, Salamanca) empleando un secuenciador capilar ABI.

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar fragmentos de DNA por PCR se diseñaron oligonucleótidos complementarios para la secuencia a amplificar considerando una longitud de 22-24 nt, contenido un GC superior al 50% y temperatura de fusión mayor de 55° C. Para las reacciones se utilizaron 10 µmol de dNTPs, 150 pmol de cada oligonucleótido y 2,5 U de la Taq DNA polimerasa (Takara) en un volumen final de 50 µl. Las reacciones se realizaron en termocicladores Applied Biosystems y los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa en TAE.

- Transcripción reversa-PCR (RT-PCR)

En primer lugar, se transcribieron de forma reversa 5 µg de RNA de testículos para obtener el cDNA empleando un oligo(dT) y un kit comercial para transcripción reversa (Invitrogen). Seguidamente, se amplificó el cDNA de *Rad21l* comprendido entre los exones 1 y 13 con los oligonucleótidos Rad21IS 5'-ATGTTCTACACTCATGTGCTTATG-3' y Rad21IAS 5'-TCACATCTTATAGAA CATTGGTCCC-3'. Como control de amplificación se amplificó el locus de la β-actina, empleando los oligonucleótidos ActS 5'-GCTCCGGCATGTGCAA-3' y ActAS 5'-AGGATCTTCATGAGGTAGT-3'. Como control de calidad del RNA, se amplificó la ORF de *Rad21*, que es de una longitud similar a la de *Rad21l*, con los oligonucleótidos Rad21S 5'-ATGTTCTACGCACATTTTGTCTC -3' y Rad21AS 5'- ACACATCTAGCTCCTCAGATA -3'

- Extracción de DNA para análisis southern blot

El DNA se extrajo a partir de fragmentos de cola de ratón y de células madre embrionarias (ES) mediante extracción con fenol en un tampón (100 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM EDTA, 0,5 % SDS y 580 ng/µl de proteinasa K (Roche)). El tejido o las células se incubaron al menos 15 horas a 55° C. El DNA solubilizado se extrajo en 1 vol de fenol:cloroformo isoamílico y se separó por centrifugación. La fase superior con los ácidos nucleicos se recogió, se precipitó con acetato potásico 7,5 M (Merck) e isopropanol y después se lavó con etanol al 70 %. Una vez evaporado el etanol se resuspendió el DNA en TE (concentración final entre 200-300 µg/µl).

- Análisis Southern-blot

Los DNAs (5-10 µg) digeridos durante una noche con el enzima de restricción correspondiente se cargaron en geles 1X TBE con agarosa al 0,5 % y se sometieron a electroforesis durante 8-24 h (dependiendo de la longitud de los fragmentos esperados y de la diferencia en el tamaño de los mismos) a bajo voltaje. Posteriormente, los geles se fotografiaron en un transiluminador, y se trataron con dos soluciones que adecúan el DNA para su transferencia a una membrana de nylon (greenscreen plus TM hybridation transfer membrane, NEF988001PK). Primero, se trataron con HCl 0,25 M durante 15-30 min para romper los anillos de las purinas y así facilitar la transferencia del DNA desde el gel a la

membrana. Seguidamente, los geles se lavaron 3 veces con agua destilada para neutralizar el pH del HCl y después se incubaron 30 min en NaOH 0,4 N para desnaturalizar el DNA. Posteriormente, los geles se colocaron en cubetas de transferencia elaboradas manualmente (Brown, 2006) con NaOH 0,4 N. El DNA se transfirió por capilaridad durante al menos 15 h y posteriormente, fue fijado a las membranas covalentemente con luz ultravioleta en un UV Stratalinker(R) 2400 (marca Stratagene; 1200 μ julios x 100). Las membranas se lavaron 3 veces en una solución 2X SSC para eliminar restos de NaOH y se prehibridaron en un horno Techne Hybridiser HB-1D Hybridisation Incubators durante 90 min a 65° C en solución de hibridación (15 g de Dextran Sulfato de sodio de Leuconostoc spp, Mw > 500,000; Sigma-Aldrich, 0,2 x SSPE S-2015 Sigma-Aldrich, 15 ml de 100 x Denhart's [2 g de Ficoll 400; Sigma-Aldrich, 2 g de Polyvinilpyrrolidone; Sigma-Aldrich y 2 g de BSA; Roche, en 100 ml], 15 ml 10 x PBS pH 7,4 y 3 ml 10 % SDS en 300 ml finales) con 1,5 μ g/ml de DNA de esperma de salmón (Sigma-Aldrich) desnaturalizado a 65° C. Justo antes de añadir la sonda marcada con p³², se cambió la solución del cilindro por solución de hibridación a 65° C y DNA de salmón desnaturalizado (1,5 μ g/ml). Las membranas se hibridaron a 65° C durante 12 h y posteriormente se lavaron con 0,2X SSC y 0,1 % SDS a 65° C, tres veces de al menos 20 minutos para cada lavado. Para detectar la señal radioactiva las membranas se expusieron durante tres días en casetes Fujifilm BAS cassette r2 2040 con pantallas digitales que se revelaron mediante escáner.

- Tratamiento informático de secuencias de DNA y proteínas.

Las secuencias nucleotídicas y aminoácidas de los genes de interés se obtuvieron de las bases de datos de Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) y UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>). La búsqueda de secuencias genómicas por homología se realizó mediante el programa informático online BLAST del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los patrones de digestión *in silico* de las secuencias nucleotídicas se realizaron con el programa informático online NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) y el diseño de oligonucleótidos se realizó mediante el programa informático online Primer3 Input (versión 0.4.0) (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).

Para alineamientos de secuencias, traducción de nucleótidos a proteínas, etc, se utilizó el paquete BioEdit.

Técnicas citológicas

- Esparcido de espermatozoides

Mediante una modificación del protocolo de Peters et al (1997) se fijaron células procedentes de testículos de ratón sobre portaobjetos para analizar la meiosis mediante IFs. Para ello, se eliminó la túnica albugínea de los testículos y se colocaron en una placa petri con una gota de PBS. Tras triturarse con un bisturí, la muestra se pasó a un tubo de ensayo de 10 ml, con 6 ml de PBS y se centrifugó a 600 rpm durante 10 segundos en una centrífuga eppendorf 5810-R. El sobrenadante formado por una suspensión de células unicelularizadas se recogió y se centrifugó a 1200 rpm durante 8 min. Tras dos lavados en PBS, el pellet obtenido se resuspendió en 75-350 µl de sacarosa 100 mM durante 7 min a temperatura ambiente, antes de añadirse 10-20 µl sobre un portaobjetos con 300 µl del fijador. El fijador se preparó con 1% de paraformaldehído Sigma-Aldrich, 3,5 mM de NaOH, 0,05 % de PBS, 0,15 % de Tritón X-100 Sigma-Aldrich, 2,5 mM de tetraborato sódico Merck, ajustado a pH 9,5 o 7,15. Los portaobjetos se balancearon para provocar la mezcla de la suspensión celular con el fijador por toda su superficie y se dejaron secar parcialmente en una cámara húmeda durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, los portaobjetos se lavaron con 0,08 % photo-flo de Kodak (detergente) y se dejaron secar completamente a temperatura ambiente. En un microscopio invertido de contraste de fase Nikon eclipse TS100 se valoró la calidad de los esparcidos. Los portaobjetos se almacenaron en PBS con 0,05 % de azida a 4° C hasta el momento de usarse.

- Aplastado de túbulos seminíferos

La metodología que se empleó fue desarrollada por Parra et al (2002). Los túbulos seminíferos recién extraídos se fijaron 10 min (2 % Formaldehído Merck, 0,1 % Tritón X-100 en PBS). En un portaobjetos con poli-L-lisina Sigma-Aldrich (1 mg/ml) se colocaron 2-4 túbulos sobre los que se añadió una gota del fijador, se cubrieron con un cubreobjetos de 22 x 22 mm y sobre él se pasó un lápiz dos veces para disgregarlos. Posteriormente, se presionó el

cubeobjetos con la yema del pulgar, se introdujo la preparación en nitrógeno líquido durante unos 10 s, se eliminó el cubeobjetos con la ayuda de un bisturí y se introdujo la preparación en PBS. Tras 3 lavados sucesivos de 5 min en PBS se realizó la IF. En el caso de no usarse en el momento, las preparaciones se guardaron a -80° C sin eliminar el cubeobjetos después de sacarse del nitrógeno líquido. Llegado el momento de usarse, estas preparaciones se introdujeron de nuevo en nitrógeno líquido y se procedió de igual forma que con las preparaciones frescas.

- Desbloqueo de los espermatozoides con ácido okadaico

En primer lugar se detunicaron los testículos, se unicelularizaron los túbulos seminíferos y se cultivaron 5×10^6 células/ml en una placa de cultivo de 35 mm durante 5-6 h a 32° C en medio de cultivo completo con 25 mM HEPES y 5 mM de ácido okadaico (Sigma-Aldrich). Posteriormente se realizaron esparcidos siguiendo los procedimientos descritos previamente.

- Esparcido de oocitos

Los ovarios de embriones de 17,5 días post-coitum (paquitena), se introdujeron en placas de 24 pocillos con PBS. Después se recogieron y se incubaron con 50 μ l de colagenasa a 50 mg/ml (Sigma-Aldrich) a 37° C 20-30 min. Posteriormente, se transfirieron a una solución hipotónica (30 mM de Tris-HCl pH 8.2, 50 mM de sacarosa, 17 mM de citrato sódico Merck, 5 mM de EDTA Merck, 0,5 mM de DTT [ditiotreitól; Sigma-Aldrich] y 1 mM de PMSF) durante 45 min a temperatura ambiente. Seguidamente, fueron transferidos a 60 μ l de 100 mM de sacarosa a pH 8.2 y se pipetearon con una p100 bajo la lupa hasta ser unicelularizados. Para finalizar, se añadió una gota de 40 μ l de fijador a pH 9.2 (1 % de paraformaldehído, 5 mM de tetraborato sódico, 0,15 % de Triton X-100, 3 mM de DTT) en portaobjetos y sobre esa gota se añadieron 10 μ l de la suspensión unicelularizada. Con movimientos de zig-zag se esparcieron las células por el portaobjetos y se incubaron durante 3 h. Los portaobjetos se almacenaron como en el apartado anterior.

- Estimulación *in vitro* de oocitos para su maduración a metafase I

Los sobrecruzamientos de las diacinesis/metafase I se analizaron mediante el protocolo desarrollado por Kan et al (2008). Para ello, se extrajeron los ovarios de hembras de 18 semanas, se añadió una gota de medio Waymouth Gibco suplementado con 100 U/ml de penicilina, 10 µg/ml de estreptomina, 10 % FCS (suero fetal bovino, Gibco) y 0,23 mmol de piruvato de sodio (Gibco) y se perforaron con una aguja de gauge 30. Los oocitos obtenidos se cultivaron 2 h 30 min a 37° C y 5 % de CO₂ en gotas de 20 µl de KSOM (medio de cultivo de embriones, Millipore) para inducir la rotura de la membrana nuclear de la vesícula germinal. Posteriormente se incubaron en KSOM fresco durante 8 h para que progresaran de dictiata a metafase I, se transfirieron a citrato sódico 1 % y se incubaron 15 min a temperatura ambiente. Seguidamente los oocitos se fijaron en portaobjetos con metanol:acético (3:1, Merck).

- IFs indirectas

Los anticuerpos primarios frente a las proteínas de interés se diluyeron en PBS, se colocaron sobre las preparaciones con un cubreobjetos y se incubaron 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C. Tras tres lavados sucesivos de 5 min con PBS, se incubaron 1 h con los anticuerpos secundarios correspondientes. Finalmente, tras repetir los tres lavados, las preparaciones se montaron en Vectashield con DAPI, que se une al DNA en regiones ricas en A-T, (Sigma-Aldrich). Todos los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se indican en las Tablas 1 y 2.

- Cariotipado

Las células ES en placas de cultivo de 35 mm fueron bloqueadas con colchicina (1 µg/ml; Sigma-Aldrich) durante 90 min a 37° C. Posteriormente, se tripsinizaron, se lavaron con PBS y se incubaron 20 min a 37° C en 0,56 % KCl (choque hipotónico). Tras la centrifugación, las células fueron fijadas en 3 lavados sucesivos con 10 ml de metanol-acético (3:1) a -20°C. Finalmente, el pellet de células fijadas se resuspendió en 200 µl de metanol-acético y se añadieron dos gotas de la suspensión sobre un portaobjetos. Por último, las células se tiñeron en 5% Giemsa (Sigma-Aldrich).

Proteína	Origen	Tipo	Proveedor	Denominación	Dil.
ATR	Cabra	IgG	Santa Cruz	sc-1887	1:30
DMC1	Conejo	IgG	Santa Cruz	sc-22768	1:20
γ H2AX (Ser139)	Ratón	IgG	Millipore	#05-636	1:200
γ H2AX (Ser139)	Conejo	IgG	Millipore	#07-164	1:200
MLH1	Conejo	IgG	Lab. Dra. Esther de Boer; Revenkova et al, 2004		1:400
MSH4	Conejo	IgG	Abcam	ab58666	1:10
Proteínas del centrómero	Derivado de suero humano α-centrómero positivo	IgG	Antibodies Incorporated, EEUU	ACA 15-235	1:5
RAD21	Conejo	IgG	Lab. Dr. J.L. Barbero; Prieto et al, 2002	k-854	1:5
RAD21L	Conejo	IgG	Diseñado en nuestro lab. frente al péptido CNSHSELDQPQDWKD de RAD21L. Desarrollado y purificado por Immunostep, España	α-RAD21L AP	1:5
RAD21L	Conejo	IgG	Proteína recombinante expresada en <i>E. coli</i> correspondiente a los aa 344-552 de RAD21L diseñada en nuestro laboratorio. Desarrollado y purificado por el lab. del Dr. J.L. Barbero	α-RAD21L ARP	1:5
RAD51	Conejo	IgG	Santa Cruz	sc-8349	1:30
REC8	Conejo	Suero	Lab. Dr. J.L. Barbero. Diseñado frente a la secuencia completa de la proteína REC8 y expresado en <i>E. coli</i>	k-1019	1:20
RPA	Conejo	Suero	Lab. Dra. Edyta Marcon; He et al, 1995	Molly-RPA	1:30
SMC1α	Conejo	Suero	Lab. Dr. J.L. Barbero; Krasikova et al, 2005	k-988	1:20
SMC1β	Conejo	Suero	Lab. Dr. J.L. Barbero; Prieto et al, 2004	k-974	1:20
SMC3	Conejo	Suero	Lab. Dr. J.L. Barbero; Prieto et al, 2004	k-987	1:20
STAG3	Conejo	Suero	Lab. Dr. J.L. Barbero; Prieto et al, 2001	k-403	1:20
SYCP1	Conejo	IgG	Abcam	ab15090	1:200
SYCP2	Conejo	Suero	Lab. Dr. J.L. Barbero. Diseñado frente a 24 aa de la región C-terminal de la proteína murina y expresado en <i>E. coli</i>		1:20
SYCP3	Ratón	IgG	Santa Cruz Biotechnology	sc-74569	1:100
TOPBP1	Conejo	IgG	Lab. Dr. Dr. R. Freire; Mäkinen et al, 2001	α-TopBP1.2	1:20

Tabla 1. Anticuerpos primarios. Dil: dilución

Especificidad	Fluorocromo	Origen	Proveedor	Denominación	Dilución
Anti-cabra	FITC	Conejo	JIR	305-095-045	1:100
Anti-cobaya	FITC	Cabra	Sigma-Aldrich	F6261	1:100
Anti-conejo	FITC	Cabra	JIR	111-095-045	1:100
Anti-conejo	TRITC	Cabra	JIR	111-025-144	1:100
Anti-humano	Texas Rojo	Asno	JIR	709-075-149	1:100
Anti-ratón	FITC	Cabra	JIR	115-095-146	1:100
Anti-ratón	TRITC	Oveja	JIR	515-025-003	1:100

Tabla2. Anticuerpos secundarios. FITC: Fluoresceína / TRITC: Rodamina / JIR: Jackson ImmunoResearch.

- Frotis de espermatozoides a partir de epidídimos de ratón

Se extrajeron los epidídimos del ratón y se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 ml con 300 µl de citrato sódico al 2,2 %. Tras trocearse con tijeras para favorecer la salida de los espermatozoides, las muestras se incubaron 10 min a 32° C y se añadieron 20 µl en un portaobjetos. Los portaobjetos se envejecieron 1 día a temperatura ambiente, se lavaron con agua tres veces durante 1 min y tras secarse completamente se fijaron con metanol-acético (3:1, -20°C) durante 3 min. Para el estudio morfológico se realizó tinción con hematoxilina-eosina. Para el análisis de posibles alteraciones del contenido cromosómico en los espermatozoides se realizó un FISH sobre los frotis. Para aumentar la permeabilidad frente a la sonda se trataron con DTT 10 mM en Tris-HCl 0,1 mM durante 30 min en hielo. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se dejaron secar al menos 30 min antes de realizar la FISH.

- Estudio cromosómico mediante hibridación fluorescente *in situ* o FISH

El FISH se llevo a cabo sobre aplastados de espermatozoides o frotis de espermatozoides utilizando sondas frente a los cromosomas sexuales X e Y. La sonda específica frente al cromosoma Y murino se obtuvo mediante PCR con las tres parejas de oligos 1S 5'-TAGGATGGTAAGCCCAATGC-3', 1AS 5'-TTGGTTGGTTAATT GTTTGGG-3'; 2S 5'-CATGCCCTTGGACTGAC-3', 2AS 5'-CTTTTTTTTCCCCCT CTGG-3'; 3S 5'-TCCTCTTGAGAGAAGGGAC-3', 3AS 5'-CCTCC GCTCCAATCC TATCA-' (Navin et al, 1996). La sonda del cromosoma X se obtuvo de un plásmido (Disteche et al, 1985). Las sondas fueron marcadas mediante Nick-translation en presencia de Dig-11-dUTP (Roche Applied Science) o Bio-16-dUTP (BIORON GmbH) (2 µg de DNA, 1X buffer Nick, 0,8 U de DNAsa Takara, 5 U de DNA pol I Takara, 20 nM de dATP / dGTP / dCTP, 13 nM de dTTP Amersham Biosciences y 7 nM de Dig-11-dUTP o Bio-16-dUTP en 50 µl totales, durante 75 min a 16° C). Los aplastados de espermatozoides fueron pre-tratados antes del FISH. Para ello, se incubaron 10 min con 0,005 % de pepsina a 37° C, se lavaron 5 min con 2X SSC, se lavaron con agua, se secaron al aire y se deshidrataron con 70 %, 80 % y 100 % de etanol durante 1 min cada uno. Después se incubaron 1 h a 80° C, se deshidrataron, se trataron durante 1 h con 100 µl/ml de RNAsa en PBS a 37° C y se secaron al aire. Seguidamente, se desnaturalizaron a 80° C en 50

% formamida y 2X SSC durante 2,5 min, se introdujeron en 70 % etanol a -20° C 1 min y se deshidrataron. Las sondas fueron desnaturalizadas en la solución de hibridación a 80° C durante 5 min y se añadieron a los portas para su hibridación durante 12 h a 37° C. Posteriormente, se dieron 3 lavados post-hibridación de 5 min con 50 % formamida/ 2X SSC a 42° C y un lavado en 0,2X SSC a 60°C. Los portas se bloquearon en 4X SSC/ 0,1 % Tween 20/ 3% BSA y se incubaron con Cy3-Streptavidina 1/200 y FITC anti-digoxigenina monoclonal 1/50 a 37° C durante 1 h. Tras tres lavados sucesivos de 5 min en 4X SSC/ 0,1 % Tween 20 a 42° C, se incubaron con anti-streptavidina biotinilada 1/100 y FITC anti-mouse policlonal de cabra 1/50 a 37° C durante 1 h. Seguidamente, se lavaron como en el paso anterior y se incubaron con Cy3-Streptavidina 1/200 y FITC anti-cabra 1/50. Por último, se realizaron 3 lavados similares y se montaron con Vectashield suplementado con DAPI.

- Estudio de la ploidía de testículos de ratón

Los testículos fueron destunicados y los túbulos seminíferos se resuspendieron en DMEM con 10 % FCS, 0,1 mM NEAA (aminoácidos no esenciales, Gibco), 1,5 mM piruvato de sodio, 4 mM L-glutamina (Gibco) y 75 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich). Posteriormente, se incubaron con 0,1 mg/ml de colagenasa 5 min a 37° C y después de dos lavados en DMEM se incubaron 2 min a 37° C con 2,5 µg/ml tripsina Gibco y 1U/ml DNAsa. Seguidamente, los túbulos seminíferos se trituraron con bisturí y se pasaron por una malla de 50 µm. Finalmente, la solución con las células se diluyó 1:1 utilizando una solución con 0,05 mg/ml de yoduro de propidio, 15 min antes de pasarlas por un citómetro FACSCalibur siguiendo la metodología habitual (Malkov et al, 1998). Los datos obtenidos se procesaron utilizando el programa informático Cell-Quest (Becton Dickinson). La ploidía se analizó utilizando el programa ModFit LT.

Análisis histológicos

- Tinción hematoxilina-eosina

Para realizar esta tinción los testículos y los ovarios se fijaron con Bouin. Las secciones de parafina se trataron con la metodología convencional.

- Ensayo TUNEL

Para estudiar la apoptosis en la espermatogénesis se utilizó el Kit In Situ Cell Death Detection (Roche) sobre secciones desparafinadas de testículos previamente fijados con formol y se tiñeron los núcleos con DAPI.

- Estudio de proliferación celular

La inmunohistoquímica para la detección de PCNA (1:200, Abcam) se llevó a cabo sobre secciones desparafinadas de testículos fijados en formol. El desenmascaramiento del antígeno se efectuó mediante incubación de las secciones con buffer citrato a pH 6.0. Estas tres técnicas histológicas fueron realizadas por el servicio de anatomía patológica del CIC (Campus Miguel de Unamuno, Salamanca).

- Toma y análisis de imágenes

La captura de las imágenes con fluorescencia se llevó a cabo con un microscopio Leica CTR y una cámara Hamamatsu Photonics C4742-95-12ERG controlado por el software Metamorph. Las imágenes histológicas se tomaron con un microscopio Olympus BX51 y una cámara digital DP70. Las imágenes se analizaron y procesaron con los softwares ImageJ, VirtualDub y Adobe Photoshop 7.0.

Generación de ratones mutantes por eliminación dirigida de genes

- Generación de los ratones *Rad21^{H-}*

El *insertional targeting vector* se construyó sobre el vector p5'HPRT mediante la clonación de dos brazos de homología separados por un "gap" cuya secuencia corresponde al intrón 6 y al exon 7 del gen. Para ello, se amplificó por PCR el brazo de homología 3', que corresponde a la región del gen entre el intrón 7 y el intrón 9, utilizando como molde el BAC RP23 52J6 y los *primers* 3'HA-S 5'-TT**GGCGCGCCCGGGCTGCCAGCATCCAGTT** TCC-3' y 3'HA-AS 5'-TT **GGCGCGCCG**AACTGCTGACCAGTCACGTGGAA-3'. El producto amplificado se clonó en la diana *Asc I*, la cual se incluyó en ambos cebadores (negrita) dando lugar al plásmido p5'HPRT-3'-arm. Seguidamente, se amplificó el brazo de homología 5', que abarca

desde el exon 4 al exón 6, con los primers 5'HA-S 5'-GGAGCCCCT TGCTCAGAACCAAA-3' y 5'HA-AS 5'-GGGAAGCTCAGGAGGCAGAGACTT-3' y se clonó en la diana *SmaI* (incluida en el oligonucleótido 3'HA-S (subrayado) del brazo 3') del plasmido p5'HPRT-3'-arm para dar lugar al vector insercional denominado p5'HPRT-5'-arm-3'-arm. Finalmente, antes de electroporar el vector insercional en células ES, éste se linealizó utilizando la diana *SmaI* que se regeneró mediante el primer 5'HA-AS (subrayado). Las células ES (G4, fondo mixto 129/C57BL/6) se crecieron en una placa de cultivo de 150 mm, se tripsinizaron, se lavaron con PBS y se resuspendieron en un volumen final de 800 µl de PBS. Posteriormente, se incubaron 5 min en hielo en una cubeta 0,4 cm gap (BioRad) con 30 µg del vector linealizado y se electroporaron a 240V, 500 µF y 400 Ω. Tras incubarse en hielo 5 min, el contenido de la cubeta se sembró en una placa de cultivo de 15 mm y tras 24 h de crecimiento se añadió G418 (240 µg/µl, Merk). Tras 8 días de selección, los clones resultantes fueron picados en placas de 24 pocillos, replicados y congelada una de las replicas. El medio de cultivo utilizado para crecer las células ES se elaboró con medio DMEM, 15 % FCS con calidad para uso en células ES (HyClone, Logan, UT), 1 % PSG, 0,1 mM NEAA, 10 mM HEPES, 1 mM piruvato de sodio, 0,1 mM β-mercaptoetanol y 2.000 unidades/ ml de LIF o factor inhibidor de leucemia. Las células ES fueron crecidas siempre sobre placas de cultivo cubiertas por una capa de 0,5 % gelatina porcina para garantizar su adherencia. Además, para estimular su crecimiento en clones indiferenciados, se forraron las placas con células "alimentadoras", mitóticamente inactivadas con mitomicina C (Sigma-Aldrich). El genotipado de los clones se efectuó mediante southern blot con los enzimas *EcoRV* o *SacI* empleando una sonda de 1 kb de la región del "gap" generada por PCR mediante los primers GAP-S 5'-TGTCTCTGCCTCCTGAGCTTC-3' y GAP-AS 5' GGAAACTGGATGCTGGGCAG-3'. Además, el genotipo de los clones recombinantes obtenidos se confirmó empleando dos sondas externas a los brazos de homología. Para el genotipado por la región 5' se digirió el DNA con el enzima *SpeI* y se hibridó con una sonda externa de 775 nt amplificada mediante los cebadores Rad21L1 HR5'-S 5'-ACTAGTCTAAATAAAGGTCTT-3' y Rad21L1 HR5'-AS 5'-GATTTAAGCATGAATGAAGTAAC-3'. Para realizar el genotipado por la región 3' se digirió el DNA con el enzima *BamHI* y se hibridó con una sonda externa de 1.226 nt que se amplificó por PCR con los cebadores Rad21L1 HR3'-S 5'-CCTATACAGTGAATTGCCATG-3' y Rad21L1 HR3'-AS 5'-CCCATT

CATTGAAGACAATCC-3'. Posteriormente, los clones fueron cariotipados y el más estable (>85% de las células con 2n=40) se agregó en mórulas CD1 en estadio de 4 células y tras su maduración a estadio de blastocistos se implantaron en hembras CD1 pseudopreñadas (Torres y Kuhn, 1997). Los descendientes con mayor grado de quimerismo, identificado fenotípicamente por una coloración del pelaje negro frente a blanco, fueron cruzados con ratones silvestres CD1 para transmitir la mutación por línea germinal. El agregado de las células ES, así como todos los pasos intermedios hasta la obtención de los ratones *Rad21*^{+/-}, fueron realizados por el Dr. Manuel Sánchez Martín (Unidad de animales modificados genéticamente de la Universidad de Salamanca). El genotipado de los descendientes de parentales *Rad21*^{+/-} se llevó a cabo mediante las dos sondas externas previamente mencionadas, ya que la sonda del "gap" no permite distinguir los animales heterocigotos de los knock-out.

- Generación del ratón *Rad21* condicional

El vector de reemplazamiento utilizado para generar la línea de ratones *Rad21* condicional fue proporcionado por el KOMP (Knockout Mouse Project, <http://www.komp.org/>). El vector incluye un casete complejo flanqueado por dos sitios FRT el cual contiene un sitio aceptor de splicing (En2 SA) seguido de un gen que codifica la β-galactosidasa o LacZ (con su propio sitio interno de entrada al ribosoma o IRES, que le permite traducirse de forma independiente del gen, y un terminador de la transcripción (pA)) y un gen de resistencia a neomicina o NEO (con el promotor de la β-actina humana o Ba, de expresión ubicua y un terminador de la transcripción). El casete completo puede escindirse por la recombinasa flipasa (FLP) empleando los dos sitios FRT. El exón 3 de *Rad21* se encuentra flanqueado por dos sitios LoxP y puede ser escindido por una reacción mediada por CRE. Ésta es, por tanto, la región que se elimina en el alelo condicional para dar lugar a un cambio prematuro en la pauta de lectura de la ORF de *Rad21*. El brazo de homología 5' incluye los dos primeros exones del gen y parte del intrón 2 (5,5 kb), mientras que el brazo 3' incluye desde el intrón 2 al intrón 4 (3,6 kb). La generación de los clones recombinantes, las quimeras y los ratones *Rad21*^{+/-Frt-βGeo-Frt loxP-E3-loxP} se llevó a cabo con la misma metodología que en el apartado anterior. El genotipado de los clones y los ratones se llevó a cabo mediante southern blot digiriendo el

DNA con *SacI* y con una sonda amplificada por PCR con los *primers* KOMP-21113'SCR S 5'-TCAGTCTCACTACTTAATCTAGTC-3' y KOMP-21113'SCR AS 5'-GAATACAAGAAGGATATCTATTCTAC-3'.

- Generación del ratón *Rad21* condicional knockout

Para generar el ratón *Rad21*^{fl/fl}, se llevaron a cabo cruzamientos de ratones *Rad21*^{fl/+}/Frt-βGeo-FrtloxP-E3-loxP con ratones transgénicos para la recombinasa Flipasa (FLP) y posteriormente con ratones transgénicos para una recombinasa *Cre* regulada bajo el promotor del gen *Sox2* y que se activa en el epiblasto a los 6,5 dpc (Hayashi et al, 2002). Finalmente, los ratones heterocigotos obtenidos con el alelo nulo se cruzaron entre sí. El genotipo de estos ratones se analizó por southern blot. Para comprobar la escisión mediada por FLP se digirió el DNA con *EcoRV* y se utilizó una sonda homóloga al NEO extraída por digestión de un plásmido pLKO-neo. Para verificar la escisión del exón 3 se digirió el DNA con *SacI* y se utilizó una sonda amplificada por PCR con los *primers* L1 cond CRE S 5'-GACGCAGTATTCGCTCAGCTC-3' y L1 cond CRE AS 5'-ATGGCAGAATTCCAAAGGGCTAT-3.

- Generación de ratones doble mutantes nulos

Mediante cruzamientos entre distintas líneas de ratones generamos dos nuevas líneas caracterizadas por ser nulas para dos genes de interés simultáneamente. Por un lado, cruzamos nuestros ratones *Sgo2*^{+/-} con ratones *Pttg1*^{-/-}, proporcionados por Wang et al (2001). El genotipado de estos ratones se llevó a cabo mediante southern blot. El locus *Sgo2* se genotipó por digestión del DNA con *EcoRV* e hibridación con una sonda homóloga al exón 2 y parte del intrón 2 amplificada por PCR con los *primers* ex2S5-CTGTTACCTCTGGAATTCAGAG-3 e in2AS5-CACTTGGCTCTCCTTGGCATACC-3. El locus *Pttg* se genotipó por digestión del DNA con *HindIII* e hibridación con dos sondas amplificadas por PCR con los *primers* 352S 5'-CCTTAATACTTTGGAGACAGAC-3', 352AS 5'-AAGTGGGAGGGAA GAAGAAG-3', 395S 5'-AGCTTTCTTGATCTACC ACTCA-3' y 395AS 5'-GAA CTTGTGGAAATTTGGCAGG-3'.

La segunda línea de ratones doble mutantes se generó cruzando nuestros ratones *Rad21^{+/−}* con ratones *Rec8^{+/−}*. Estos ratones tienen una mutación puntual que provoca un codón stop prematuro en el exón 6 (Bannister et al, 2004). El genotipado del locus *Rec8* se llevó a cabo mediante PCR, amplificando la mutación puntual con los primers Rec8ex6L 5-CCTTTACATCCCTGTTCTC-3 y Rec8ex6R 5-ACAGGAACACC AACTAACTC -3.

- Origen de los ratones *Sgo12^{+/−}Rec8-myc*

Estos ratones se generaron mediante cruzamientos entre nuestros ratones *Sgo12^{+/−}* y ratones transgénicos para *Rec8-Myc* del laboratorio de Kim Nasmyth (Universidad de Oxford, UK).

RESULTADOS

Estudios previos en el laboratorio

En mamíferos existen parálogos para la mayoría de subunidades del complejo de cohesinas, tanto en células somáticas como en meiocitos (**Tabla 1 Introducción**). Por ello y ante la posible existencia de parálogos desconocidos, en nuestro laboratorio se realizó una búsqueda *in silico* de kleisinas en bases de datos de ratón y humano, utilizando los residuos más conservados de las regiones N y C-terminal de REC8 y RAD21. Mediante el uso del algoritmo tBlastn, se identificaron en ambas especies dos pequeñas secuencias genómicas con los dos dominios Pfam característicos de las kleisinas, los cuales son necesarios para su interacción con SMC3 y SMC1 (Gruber et al, 2003). A partir de ellas, se amplificaron mediante RT-PCR las ORFs completas. Mediante la traducción y el alineamiento de estas ORFs con RAD21 y REC8, se comprobó que la proteína predicha en el ratón muestra una similitud del 56 % con RAD21 y del 35,7 % con REC8. Mediante análisis por RT-PCR de múltiples tejidos del ratón se comprobó que esta ORF se expresa *in vivo* en testículos, intestino, médula ósea, cerebelo, cerebro y ovario. No obstante, cuando estos tejidos se analizaron mediante northern blot, se observó que su expresión únicamente es abundante en testículos. Con el fin de caracterizar la proteína codificada por esta nueva ORF se llevaron a cabo diversos ensayos de inmunoprecipitación con extractos de células 293t transfectadas con su cDNA unido a un epítipo y de este modo se comprobó que interacciona con las subunidades del complejo de cohesinas SMC1 α , SMC1 β , SMC3 y STAG3. Este resultado sugiere que esta nueva ORF corresponde a una kleisina que forma sus propios complejos de cohesinas *in vitro*. Posteriormente estos resultados fueron validados *in vivo* mediante inmunoprecipitaciones con extractos de testículo, utilizando dos anticuerpos generados frente a la región carboxilo terminal de la proteína, uno frente a un péptido y el otro frente a un fragmento de la proteína. Además, mediante inmunofluorescencias (IFs) se observó que tanto en espermatoцитos como en oocitos esta kleisina co-localiza con los AE/LEs (Gutiérrez-Caballero et al, 2011). Por todo ello y con el fin de determinar las funciones que desempeña en mamíferos esta nueva kleisina, denominada RAD21L (RAD21 Like), decidimos desarrollar un modelo murino de pérdida de función.

Caracterización de la kleisina RAD21L en el ratón *in vivo*

Análisis de la localización de RAD21L durante la espermatogénesis

Dado que los estudios de expresión previos revelaron que *Rad21l* se expresa sólo de forma abundante en testículos, inicialmente decidimos analizar la localización y dinámica de la proteína en dicho tejido. Para ello se realizaron IFs frente a esta kleisina sobre esparcidos de espermatocitos de ratones silvestres (wt). De forma simultánea, se utilizó un anticuerpo frente a la proteína del AE SYCP3, la cual se utiliza de forma convencional para identificar el estadio de los espermatocitos. Como se observa en la **Figura 1**, RAD21L aparece por primera vez colocalizando con SYCP3 al inicio de leptotena, la etapa de la espermatogénesis en la que se empieza a ensamblar el AE. Conforme los espermatocitos van madurando a zigotena, el esta-

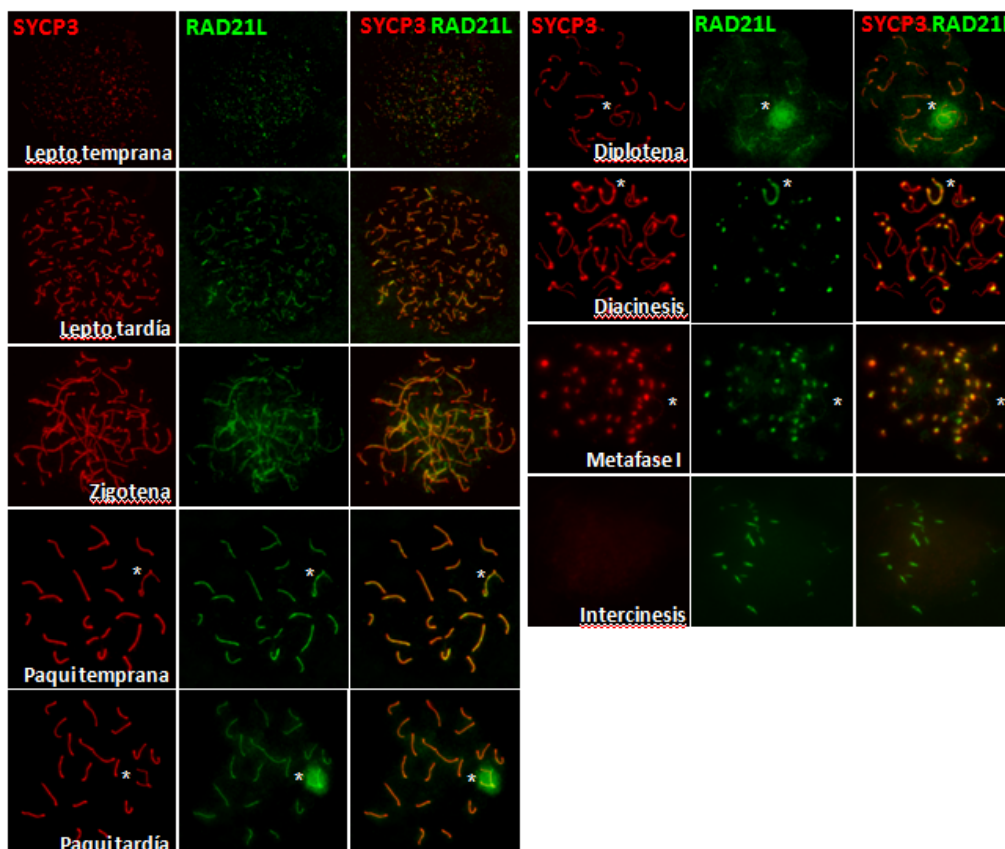


Figura 1. Dinámica de RAD21L durante la primeta división meiótica. IFs dobles frente a SYCP3 y RAD21L en esparcidos de espermatocitos wt. Asterisco: cuerpo sexual.

dio en el que comienza el proceso de sinapsis entre los cromosomas homólogos, la longitud del AE aumenta gradualmente hasta recorrer todo el cromosoma. Al mismo tiempo, las regiones de sinapsis se detectan por el incremento del grosor de SYCP3 a medida que el AE de cada cromosoma se aparea con el de su homólogo. De forma simultánea a SYCP3, los pequeños fragmentos de RAD21L incrementan su longitud y co-localizan en todo momento con los AE/LEs de todos los homólogos. En zigonema RAD21L alcanza su máxima intensidad. Seguidamente, en paquinema los homólogos alcanzan el grado máximo de sinapsis y se distingue el SC de los 19 bivalentes autosómicos, así como los AEs y la pequeña región de homología que tienen los cromosomas sexuales o región pseudoautosómica (PAR). Al inicio de esta etapa, RAD21L co-localiza con los AE/LEs de

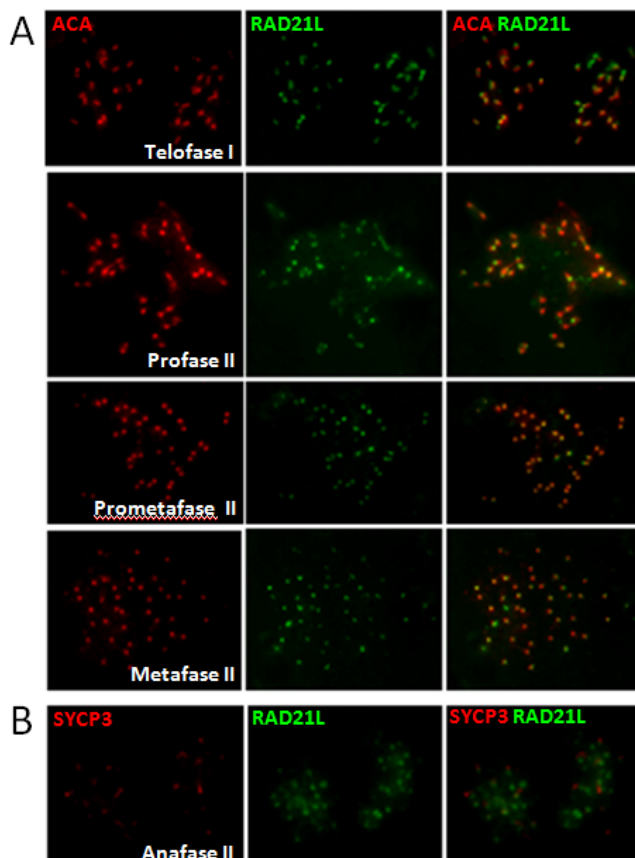


Figura 2. Localización de RAD21L en espermatozoides de telofase I a metafase II. IFs frente a RAD21L y las proteínas centroméricas (A) o SYCP3 (B) en espermatozoides de espermatozoides silvestres.

todos los bivalentes, pero además a mitad de paquitena también se detecta por toda la cromatina del cuerpo sexual a modo de señal difusa e intensa. A partir de diplotena, el estadio en el que se inicia la desinapsis, la señal de RAD21L va disminuyendo a lo largo de los AE/LEs de los bivalentes autosómicos hasta desaparecer, especialmente en las regiones en las que la desinapsis es visible por la repulsión que se produce entre los AEs de cada homólogo (**Figura 1**). Sin embargo, no ocurre lo mismo en los centrómeros, donde la señal de RAD21L se mantiene. Entre diplotena y diacinesis, la etapa en la que los AEs desaparecen de los brazos, RAD21L deja de localizarse en el dominio intercromatídico de los bivalentes autosómicos y de la cromatina del cuerpo sexual, pero perdura en el dominio intercromatídico XY. Además, en diacinesis tanto SYCP3 como RAD21L forman engrosamientos en los centrómeros de todos los cromosomas. Esta señal centromérica de RAD21L se mantiene en todos los cromosomas hasta telofase I, mientras que la señal del dominio intercromatídico del XY permanece hasta metafase I (**Figura 1**). En intercinesis, RAD21L no se detecta mientras que SYCP3 forma unas pequeñas barritas que se localizan en los cromocentros de los espermatozoides (**Figura 1**). Finalmente RAD21L reaparece en los centrómeros en profase II y perdura hasta la telofase II (**Figuras 2**).

Generación del ratón *Rad21l* mutante constitutivo

Con el fin de determinar las funciones que RAD21L desempeña *in vivo* en mamíferos, se decidió generar un modelo murino de pérdida de función. Para ello, y como se explicó en el apartado de materiales y métodos, se desarrolló un *insertional targeting vector* para interrumpir la transcripción del gen *Rad21l* (**Figura 3A**). Dicho vector se linealizó, se electroporó en células ES y mediante selección con G418 se obtuvieron los clones resistentes. Para determinar en cuáles de estos clones el vector se había integrado por recombinación homóloga se analizó su DNA por southern blot usando como sonda la región del "gap" (**Figura 3A**) y los positivos se sometieron a un estudio de la estabilidad cromosómica mediante análisis del cariotipo. Para generar los ratones quimeras, uno de los clones estables (> 85% con 2n= 40) se agregó en mórulas y los blastocitos obtenidos se implantaron en el útero de hembras pseudo-preñadas. Con el fin de obtener ratones heterocigotos para la mutación, los ratones quimeras se cruzaron

con ratones silvestres y el genotipo de sus descendientes se analizó mediante southern blot con la sonda del “gap”. Posteriormente, se cruzaron entre sí ratones con el alelo *Rad21l* mutante para llevar la mutación a homocigosis. El genotipado con la sonda del “gap” no permite distinguir si la mutación está en heterocigosis o en homocigosis. Por ello y para poder genotipar los descendientes de estos cruces, se diseñaron otras dos estrategias de genotipado con sondas externas a los brazos de homología (**Figura 3B**). A partir de estos cruzamientos entre ratones *Rad21l^{+/tg}* se obtuvieron descendientes *Rad21l^{+/-}*, *Rad21l^{+/tg}* y *Rad21l^{tg/tg}* en las proporciones mendelianas esperadas ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ respectivamente), lo que indica que la mutación no provoca mortalidad prenatal. Además se comprobó que los ratones *Rad21l^{+/tg}* y *Rad21l^{tg/tg}* muestran una apariencia, desarrollo y esperanza de vida similares a los de sus hermanos wt.

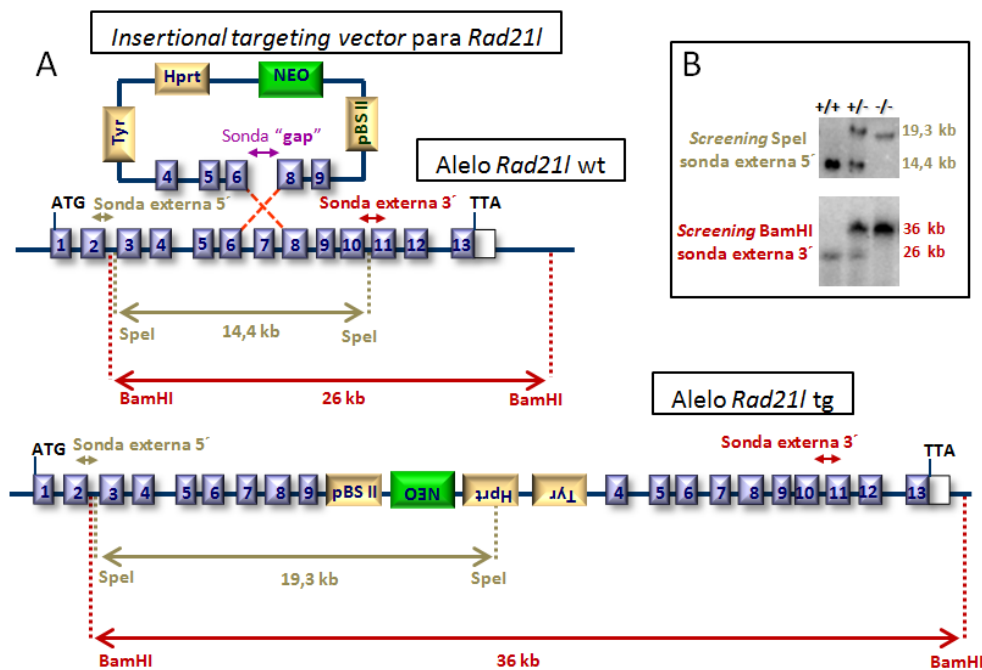


Figura 3. Representación esquemática de la estrategia de *gene targeting* utilizada para generar ratones con pérdida de función total de *Rad21l*. A) Esquema en el que se representan el alelo wt del locus *Rad21l*, el *insertional targeting vector* y el alelo mutante esperado. ATG: Codón iniciador/ TAA: Codón Stop/ SpeI: Sitios de corte del enzima SpeI para el *genotipado* con la sonda externa 5'. BamHI: Sitios de corte del enzima BamHI para el *genotipado* de los ratones mutantes con la sonda externa 3'. Sonda GAP: Sonda para identificar los clones con el vector integrado por recombinación homóloga. B) Análisis por southern blot de DNA procedente de ratones *Rad21l^{+/-}*, *Rad21l^{+/tg}* y *Rad21l^{tg/tg}* utilizando las sondas externas.

Caracterización del alelo mutante

Con el fin de determinar si en los ratones mutantes la inserción generada interrumpe la transcripción de *Rad21l* se realizó un análisis por RT-PCR en testículo de ratones silvestres y *Rad21^{tg/tg}* utilizando dos oligonucleótidos que anillan en los exones 1 y 13 del gen. Como se observa en la **Figura 4A**, sólo se detectó transcrito en los testículos del ratón silvestre. La ausencia de proteína se validó, además, mediante IF en espermatoцитos de ratones wt y *Rad21^{tg/tg}* con un anticuerpo anti-RAD21L, detectándose sólo señal fluorescente de RAD21L en los wt (**Figuras 4B**). Estos resultados indican que el alelo *Rad21^{tg}* provoca la pérdida de expresión de *Rad21l* y por tanto de aquí en adelante se considerará como un alelo nulo.

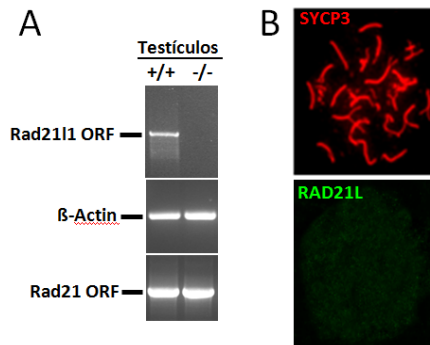


Figura 4. Caracterización del alelo *Rad21l* tg. A) Análisis de la transcripción de *Rad21l* por RT-PCR realizado en testículos wt y *Rad21^{tg/tg}* en el que sólo se detecta amplificación en el ratón wt. B) IF frente a SYCP3 y RAD21L en espermatoцитos *Rad21^{tg/tg}* en la que se comprueba la ausencia de expresión de RAD21L.

Estudio de los ratones *Rad21^{l-/-}*

A pesar de que los ratones mutantes son aparentemente normales, cuando se cruzaron entre sí ratones *Rad21^{l-/-}* no se obtuvieron descendientes. Dado que su comportamiento sexual es aparentemente normal, la ausencia de descendientes sugiere que los individuos deficientes para la kleisina son estériles. Para comprobarlo se cruzaron machos *Rad21^{l-/-}* con hembras wt y viceversa. En paralelo y como control se establecieron cruces también entre ratones wt. Después de dos meses en cruce se obtuvieron camadas en las jaulas de ratones wt y en las de hembras *Rad21^{l-/-}*, con un número de descendientes por camada similar. Sin embargo, los cruces entre machos *Rad21^{l-/-}* y hembras wt no dieron lugar a

descendientes. Estos resultados indican que la ausencia de RAD21L provoca esterilidad en los machos.

Caracterización de la espermatogénesis en ausencia de RAD21L

Para determinar las causas de la esterilidad masculina en los ratones mutantes, se decidió realizar un análisis histopatológico de testículos de ratones adultos. Durante su extracción se observó que en el ratón mutante se produce una reducción de su tamaño de aproximadamente un 70 %, comparándolos con los testículos de ratones wt (**Figura 5A**). Del mismo modo, cuando se analizaron histológicamente se observó que la estructura y organización celular de los túbulos seminíferos en los machos *Rad21^{-/-}* es similar a la observada en testículos wt, con presencia de células de Leydig, células de Sertoli, espermatogonias y espermatocitos. Sin embargo, los túbulos del mutante carecen de espermátidas redondas y alargadas y de espermatozoides (**Figura 5A-B**). Así mismo, los conductos del epidídimo de los machos mutantes están vacíos, mientras que en el wt están repletos de espermatozoides (**Figura 5A**). Para verificar si los machos mutantes carecen de células haploides se realizó un estudio de la ploidía de los testículos por citometría de flujo. La gráfica resultante de este experimento mostró que tanto en los machos *Rad21^{+/+}* como en los *Rad21^{-/-}* hay tres picos, uno que corresponde a las células haploides (79,7 %), otro a las diploides (8,9 %) y el tercero a las tetraploides (11,4 %). En cambio, los machos *Rad21^{-/-}* carecen del pico correspondiente a las células haploides (**Figura 5C**). Por tanto, estos resultados sugieren que en ausencia de RAD21L se produce un bloqueo de la espermatogénesis que impide la generación de las células haploides. Para determinar si la disminución del tamaño de los testículos de los ratones mutantes puede estar originada por defectos en la proliferación celular de las espermatogonias, se analizó por IF el marcador de proliferación PCNA en cortes histológicos de testículo. Este análisis reveló que la tasa de proliferación de las espermatogonias es similar entre ratones wt y *Rad21^{-/-}* (**Figura 5D**). Posteriormente y con el fin de determinar si la falta de la kleisina podría provocar un incremento de la apoptosis de los espermatocitos, se realizó un análisis TUNEL sobre cortes histológicos. Las imágenes obtenidas mostraron que en los túbulos seminíferos de los ratones *Rad21^{-/-}* hay muchas más células apoptóticas que en los túbulos de los ratones

silvestres (**Figura 5D**). Estos resultados sugieren que la deficiencia de RAD21L provoca muerte celular de los espermatocitos por apoptosis. La espermatogénesis en el ratón es un proceso dinámico e ininterrumpido, en el que sucesivas rondas de espermatogénesis tienen lugar cada 8-9 días, a pesar de que el proceso global dura aproximadamente 34,5 días. Dado que el inicio de cada ciclo se produce antes de que el ciclo que le precede haya finalizado, el epitelio seminífero contiene una mezcla de células germinales en diferentes estadios, estando las células más maduras desplazadas hacia el lumen como consecuencia del empuje que sufren por las nuevas células que entran en el ciclo de la espermatogénesis, las cuales se localizan basalmente. Por tanto, en cortes histológicos de los túbulos seminíferos, se pueden distinguir 12 estadios (I-XII) de acuerdo al grupo de células germinales que se encuentran simultáneamente en una sección del mismo. Siguiendo este criterio de clasificación basado en el desarrollo, se comprobó que la espermatogénesis del mutante está bloqueada en estadio IV. En ratones silvestres el estadio IV se caracteriza por la presencia de espermatidas de los tipos 4 y 14 (numeración que reciben según su morfología y la posición del acrosoma), de espermatogonias intermedias mitóticas o muy tardías y de paquitenas intermedias (Ahmed & de Rooij, 2009). Dado que en los testículos del mutante no hay espermatidas, la identificación del estadio en el que se produce la apoptosis masiva de los espermatocitos se llevó a cabo por la presencia de espermatogonias intermedias grandes a punto de entrar en mitosis (**Figura 5A**). De forma adicional, para comprobar si este bloqueo de la espermatogénesis se produce desde la primera ronda meiótica (la única sincrónica) o si por el contrario afecta a los ratones como consecuencia de la acumulación crónica de daño, se analizaron cortes histológicos de crías de 13 y 19 días, edades en las que se generan las primeras leptonemas y paquinemas respectivamente. Como se observa en la **Figura 5A**, la deficiencia de RAD21L no altera la estructura de los túbulos seminíferos ni la distribución de las células (espermatogonias, células de Sertoli, células de Leydig) en los testículos de ratones de 13 y 19 días. Además, en los testículos de ratones de 13 días, en los que se detectan los primeros meiocitos, no se observan diferencias entre el ratón wt y el mutante. Sin embargo, los túbulos del ratón *Rad21^{-/-}* de 19 días se parecen a los del mutante adulto, ya que se detectan espermatocitos apoptóticos. Estos resultados indican que la ausencia de RAD21L no altera la entrada en meiosis, pero

provoca defectos que promueven un bloqueo de la espermatogénesis entre leptotena y paquitena, dando lugar a individuos estériles por azoospermia.

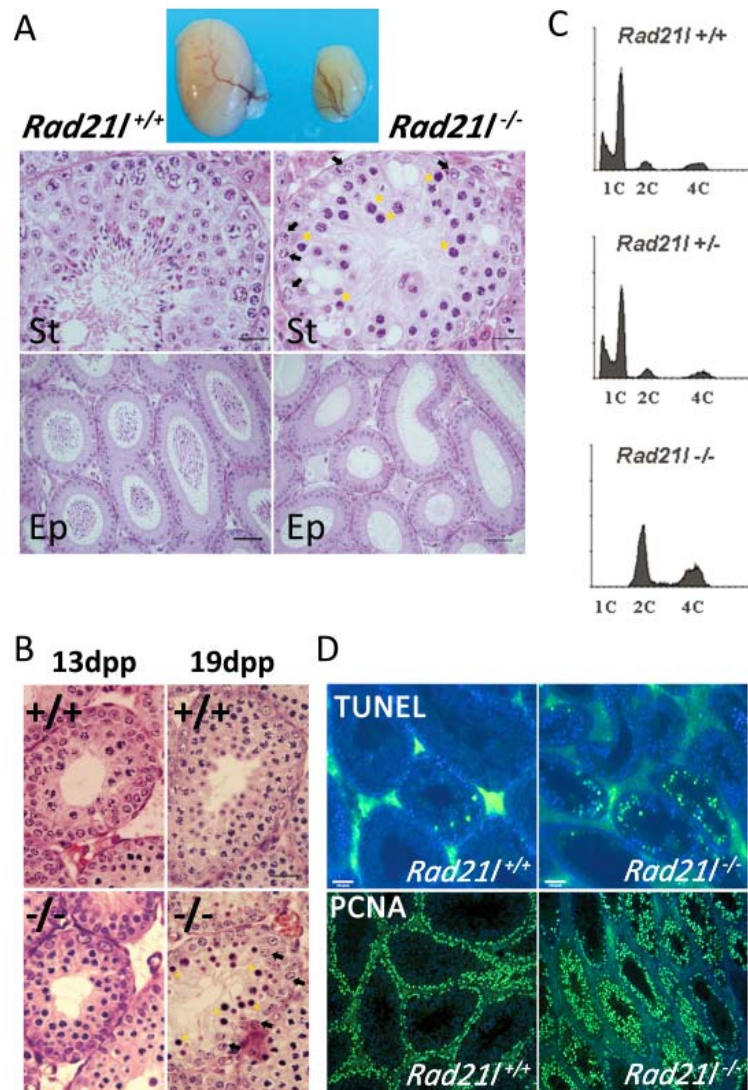


Figura 5. Caracterización de los testículos *Rad21*^{-/-}. A) Imagen macroscópica de testículos y H&E de cortes de testículo y de epidídimo de ratones wt y *Rad21*^{-/-} adultos. Barra: en los paneles superiores representa 100 μ m y en los inferiores 25 μ m. B) H&E de testículos *Rad21*^{+/+} y *Rad21*^{-/-} de 13 y 19 días de edad. Barras: 100 μ m. Flechas: espermatogonia intermedia. Asterisco: espermatoцитos apoptóticos. C) Estudio de la ploidía por FACs de testículos *Rad21*^{+/+}, *Rad21*^{+/-} y *Rad21*^{-/-}. 1C, 2C y 4C: células haploides, diploides y tetraploides respectivamente. D) Análisis TUNEL y con anti-PCNA en cortes histológicos de testículos wt y *Rad21*^{-/-}. Barras: 25 μ m.

Con el fin de determinar las causas del bloqueo de la espermatogénesis, se llevó a cabo un estudio exhaustivo mediante IFs sobre esparcidos de espermatocitos *Rad21^{H/-}* frente a diferentes proteínas implicadas en los distintos procesos de la meiosis. Para determinar el estadio citológico en el que se produce el bloqueo de la espermatogénesis y valorar cómo afecta la ausencia de RAD21L al ensamblaje del AE y al proceso de sinapsis, se analizó la distribución de las proteínas del SC SYCP3 y SYCP1 y se contabilizó el número de centrómeros con antisuero anti-ACA (Anti-Centromere Antibody). En las zigonemas wt, SYCP1 aparece en las regiones de sinapsis a modo de pequeños fragmentos que se van alargando conforme avanza la sinapsis. Después, en paquitena SYCP1 co-localiza completamente con SYCP3 en los 19 bivalentes autosómicos y la PAR del bivalente sexual (**Figura 6A**). Sin embargo, se observó que en los espermatocitos deficientes en RAD21L los AEs de los cromosomas homólogos están incompletos, presentan longitudes muy variables y la mayoría son muy cortos. Además, se comprobó que el ensamblaje de SYCP1 a lo largo de los AE/LEs también está alterado, ya que se detectan regiones con sinapsis sin señal de SYCP1 y regiones asinapsadas con parches de SYCP1. Como resultado de estas alteraciones, los espermatocitos mutantes no completan la sinapsis (**Figura 6A**). La cuantificación del número de centrómeros por espermatocito muestra que las zigonemas wt presentan entre 30 y 35 señales de ACA y este número va disminuyendo a medida que la célula avanza hacia paquinema, en la que se detectan 21 señales localizadas en los extremos de los AE/LEs (1 señal en los autosómicos y 2 en el par XY). A diferencia de esto, el número de señales ACA en los espermatocitos *Rad21^{H/-}* es mayor que las 21 esperadas ($30 \pm 3,5$ señales por célula; **Figura 6B**). Además, en estas preparaciones se detectaron otras alteraciones como la presencia de varias señales de ACA localizadas a lo largo de una misma región de sinapsis, regiones de asinapsis intercaladas entre regiones con sinapsis y LEs con forma de anillo con dos señales de ACA juntas (**Figura 6B**). Tomando todos estos resultados en conjunto se deduce que, a pesar de que en los espermatocitos de los ratones *Rad21^{H/-}* se inicia el proceso de sinapsis, estos nunca llegan a un estado de sinapsis completa y sufren un bloqueo en el estadio citológico de zigotena. Por esta razón, los espermatocitos *Rad21^{H/-}* se compararán de aquí en adelante con zigonemas wt.

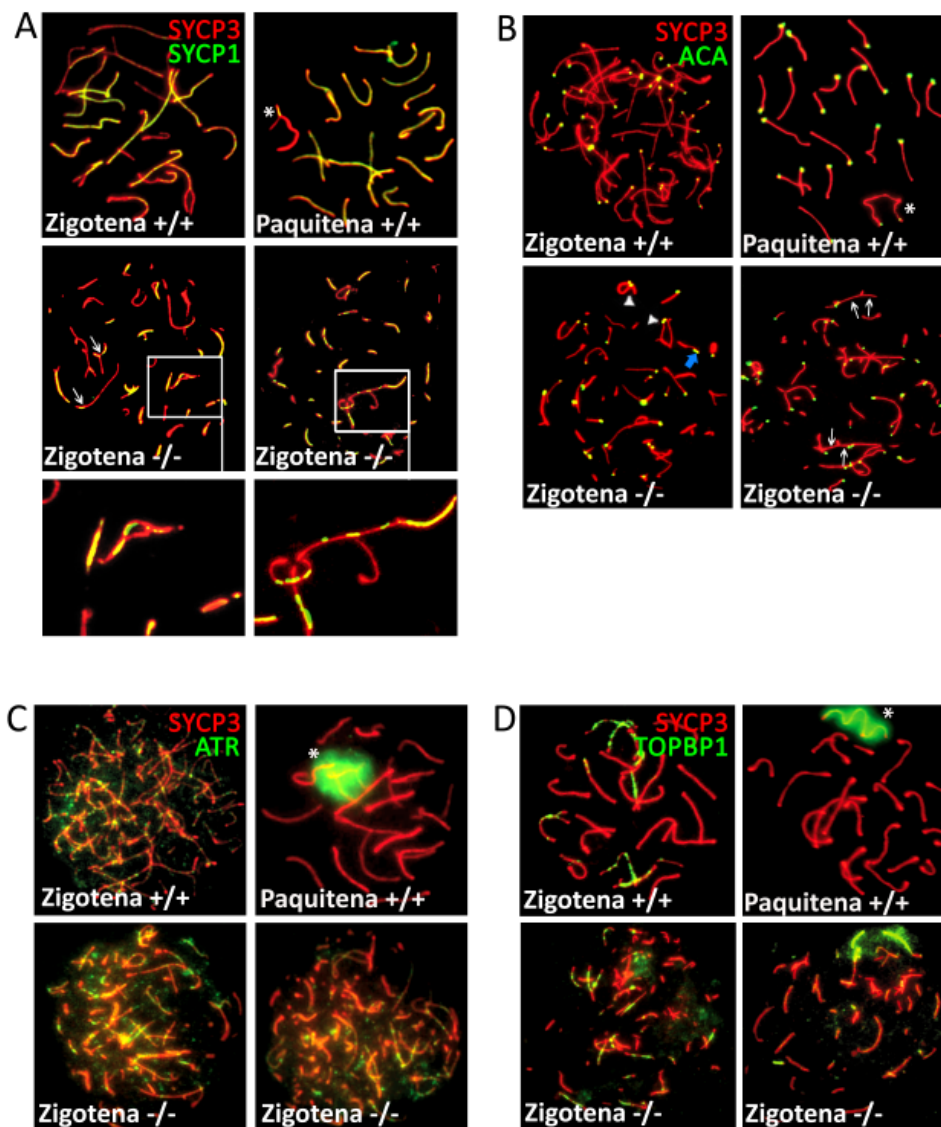


Figura 6. Estudio de la sinapsis y el bloqueo de la espermatogénesis en machos *Rad21*^{-/-}. IFs dobles frente a SYCP3 y SYCP1 (A), las proteínas centroméricas (B), ATR (C) o TOPBP1 (D) en esparcidos de espermatocitos *Rad21*^{+/+} y *Rad21*^{-/-} que muestran el bloqueo del mutante en zigotena, con múltiples defectos en la sinapsis. Flechas finas: AEs sin sinapsis localizadas entre dos regiones de sinapsis. Flecha azul: dos cinetocoros juntos en una misma región de sinapsis. Cabezas de flechas: AE/LEs formando anillos con dos cinetocoros íntimamente unidos. Asterisco: Cuerpo sexual.

A pesar de que la espermatogénesis de los mutantes *Rad21^{-/-}* sufre un bloqueo anterior a paquitena, éste podría estar promovido por ATR y TOPBP1, dos proteínas de reparación supuestamente implicadas en la maquinaria que monitoriza la recombinación y en el bloqueo de paquitena en mamíferos (Perera et al, 2004). Por ello, y con el fin de determinar cómo afecta la falta de RAD21L a la dinámica de ATR y TOPBP1, ambas proteínas fueron analizadas mediante IFs en esparcidos de espermatocitos. Los resultados muestran que estas dos proteínas se cargan en zigotena en los AEs no sinapsados. Posteriormente, se observa que a medida que avanza la sinapsis, tanto ATR como TOPBP1 van desapareciendo de los autosómicos y sólo perduran en el bivalente XY durante toda la paquitena de los espermatocitos wt, tanto en la cromatina como en el dominio intercromatídico de los cromosomas (**Figura 6C-D**). Sin embargo, en las zigonemas del mutante se observa que estas dos proteínas perduran en los AEs en las regiones de asinapsis (**Figura 6C-D**). Por tanto, la localización permanente de ATR y TOPBP1 en las regiones libres de sinapsis en los espermatocitos mutantes podría estar relacionada con el bloqueo de la espermatogénesis.

Dado que ATR y TOPBP1 co-localizan con los AEs en dominios de los cromosomas con DSBs (Perera et al, 2004), que en el mutante ambas se acumulan en los cromosomas autosómicos y que la ausencia de Rec8 provoca defectos de reparación tanto en levaduras como en ratón (Klein et al, 1999; Xu et al, 2005), decidimos determinar si los espermatocitos deficientes en RAD21L presentan defectos en reparación. Para ello, analizamos mediante IFs la histona H2AX fosforilada en su serina 139, la cual se detecta en las DSBs generadas por SPO11 al inicio de leptotena y desaparece gradualmente a medida que las DSBs son reparadas. Este análisis mostró que en las zigonemas de ratones wt γ H2AX se detecta por toda la cromatina y en las paquinemas su señal se reduce a la cromatina del cuerpo sexual (**Figura 7**). Del mismo modo, se observó que en las zigonemas *Rad21^{-/-}*, γ H2AX se localiza por toda la cromatina, aunque su señal no llega a desaparecer por completo de los cromosomas autosómicos (**Figura 7**). No obstante, dado que las zigonemas del mutante muestran cierta variabilidad fenotípica, pudimos comprobar que en las más avanzadas (con AE/LEs más largos y mayor grado de sinapsis), la señal de γ H2AX se reduce (**Figura 7**). Este

resultado indica que la falta de RAD21L provoca la acumulación de DSBs no reparadas en los espermatocitos bloqueados.

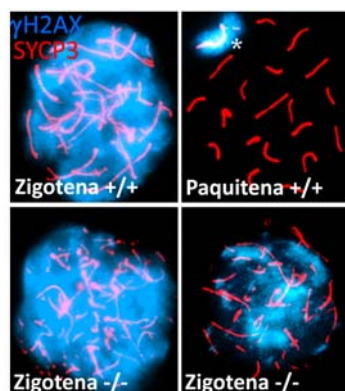


Figura 7. Estudio de la formación y reparación de DSBs en espermatocitos *Rad21*^{-/-}. IFs dobles frente a SYCP3 y γ H2AX realizadas sobre esparcidos de espermatocitos *Rad21*^{+/+} y *Rad21*^{-/-} que muestran que la ausencia de RAD21L no impide la formación de DSBs y que en los espermatocitos *Rad21*^{-/-} mas avanzados (derecha) parte de esas roturas se reparan. Asterisco: Bivalente XY.

En el ratón, la formación de DSBs y la sinapsis entre los homólogos son dos procesos interrelacionados esenciales para que la recombinación se lleve a cabo (Romanienko & Camerini-Otero, 2000; de Vries et al, 2005). Además, los modelos murinos previos de mutantes de cohesinas para REC8 y SMC1 β muestran que sus deficiencias provocan defectos en la recombinación, la cual no es capaz de completarse (Bannister et al, 2004; Xu et al, 2005; Revenkova et al, 2004). Por ello y con el fin de determinar si la falta de RAD21L altera la recombinación homóloga en los espermatocitos, decidimos analizar mediante IFs algunas de las recombinasas que participan en los nódulos de recombinación en distintos momentos. Inicialmente se analizó RAD51, característica de los nódulos de recombinación tempranos (Moens et al, 1997; Tarsounas et al, 1999). En espermatocitos silvestres, los focos de RAD51 se localizan en los AE/LEs en leptotena y su número va disminuyendo, hasta que a mitad de paquitena sólo se detectan foci a lo largo del par XY (**Figura 8A**). En los espermatocitos del mutante la localización de RAD51 es similar a la de los wt en zigotena, sin embargo, los focos de RAD51 no desaparecen de los cromosomas autosómicos, sino que perduran en todos los cromosomas (**Figura 8A**). A medida que avanza la profase, algunos de los nódulos tempranos maduran a nódulos de transición, los cuales se caracterizan por la presencia inicial de la proteí-

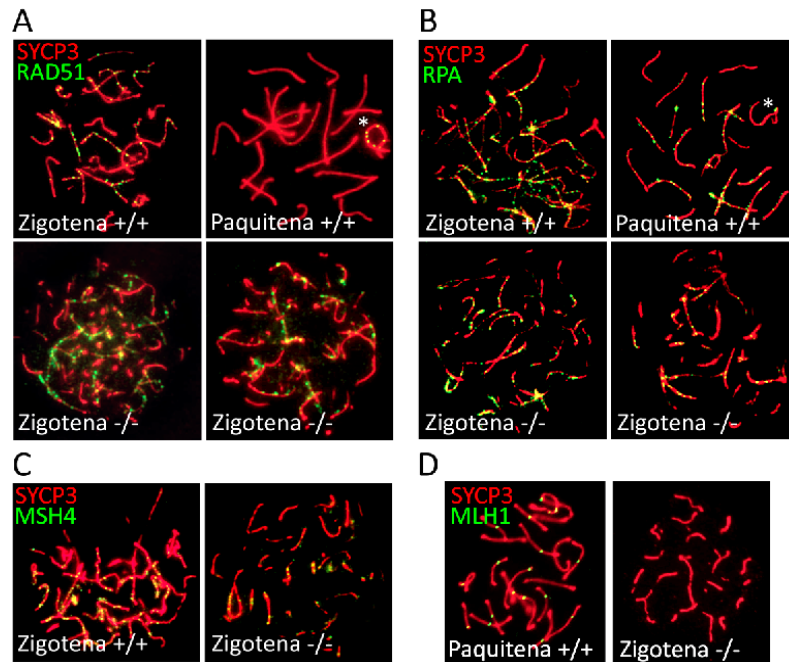


Figura 8. Estudio de la recombinación homóloga en machos *Rad21*^{-/-}. IF dobles frente a SYCP3 y RAD51 (A), RPA (B), MSH4 (C) o MLH1 (D) realizadas sobre esparcidos de espermatocitos *Rad21*^{+/+} y *Rad21*^{-/-}. En los mutantes se forman los nódulos tempranos (RAD51) y de transición (RPA, MSH4), pero no los nódulos de recombinación (MLH1). Asterisco: Bivalente XY.

na RPA y los más tardíos por contener MSH4 (Moens et al, 2002), por lo que decidimos analizar ambas proteínas en el ratón *Rad21*^{-/-}. Las IFs frente a RPA muestran que en las zigonemas del ratón wt esta proteína forma focos que co-localizan con los AE/LEs de todos los cromosomas, mientras que en las paquinemas sólo perduran los focos que se localizan en el XY y una pequeña parte de los que se formaron en los bivalentes autosómicos (**Figura 8B**). Sin embargo, en las zigonemas del mutante los focos de RPA permanecen a lo largo de los AE/LEs de todos los cromosomas (**Figura 8B**). Con respecto a MSH4, tanto en los espermatocitos wt como en los mutantes ésta co-localiza con los LEs en zigotena. No obstante, se observó que en el mutante su señal no es tan intensa como en el wt (**Figura 8C**). Finalmente, en las paquinemas, una pequeña proporción de los nódulos de transición se convierten en nódulos de recombinación en las regiones donde posteriormente se formarán los quiasmas. Dado que MLH1 es una de las proteínas integrantes de los nódulos de

recombinación, decidimos analizarla en los ratones mutantes para determinar si la falta de RAD21L provoca alteraciones en las últimas etapas de la recombinación. Como se observa en la **Figura 8D**, en espermatoцитos wt MLH1 forma al menos un foco por bivalente. En cambio, en los espermatoцитos del mutante no se detecta ninguna señal de MLH1. La interpretación de todos estos datos en conjunto sugiere que RAD21L es dispensable para el inicio de la recombinación y para la formación de los nódulos de transición. Para determinar si es la ausencia de RAD21L la que impide finalizar la recombinación homóloga o es el bloqueo en zigotena el que no permite proceder a estadios mas avanzados, decidimos hacer uso de una técnica que permite inducir la transición de profase I a metafase I *in vitro* (Wiltshire et al, 1995).

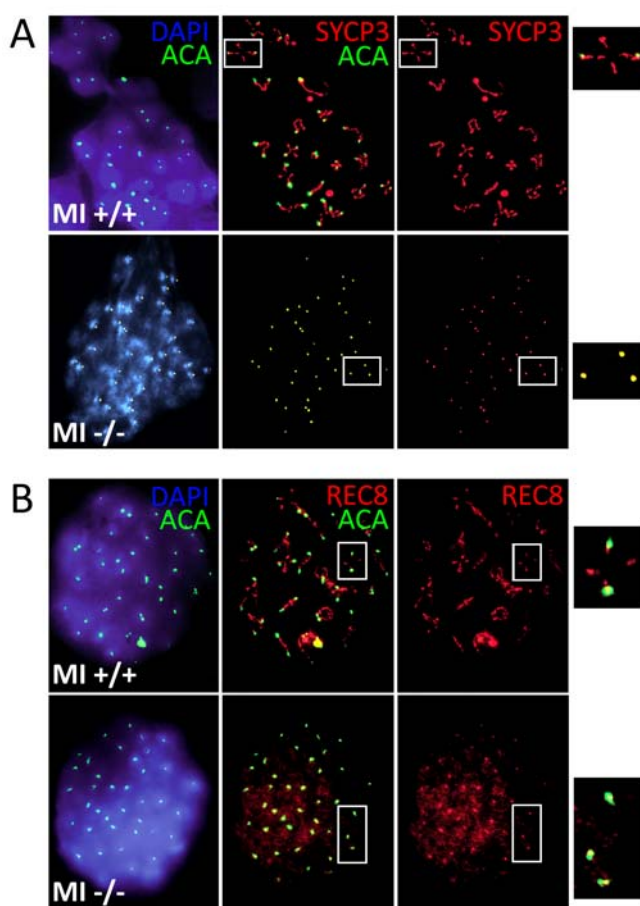


Figura 9. Análisis de los quiasmas y la cohesión en ausencia de RAD21L. IF dobles con anti-SYCP3 y antisuero ACA (A) o REC8 (B) en espermatoцитos *Rad21^{+/+}* y *Rad21^{-/-}* incubados con ácido okadaico. La falta de RAD21L impide la formación de quiasmas pero no provoca pérdida de cohesión prematura. DNA teñido con DAPI. Los recuadros blancos se corresponden con la región de la imagen ampliada a la derecha de cada célula.

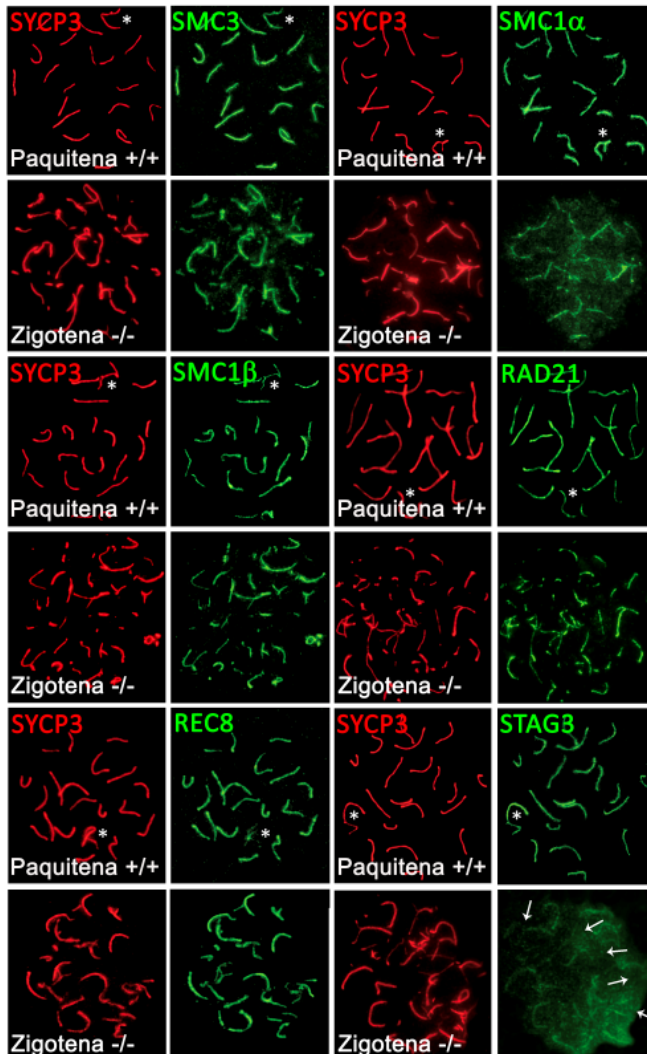


Figura 10. Estudio de la carga de subunidades del complejo de cohesinas en espermatocitos carentes de RAD21L. IF dobles frente a SYCP3 y SMC3, SMC1 α , SMC1 β , RAD21, REC8 o STAG3 en esparcidos de espermatocitos *Rad21*^{+/+} y *Rad21*^{-/-} en las que se observa que la deficiencia de RAD21L altera la carga de SMC1 α y STAG3 a lo largo de los AE/LEs. Asteriscos: Bivalente XY. Flechas: Regiones de los AE/LEs del ratón mutante en las que no se detecta STAG3.

Para ello se cultivaron espermatocitos *Rad21*^{+/+} y *Rad21*^{-/-} con ácido okadaico durante 5 h y después se analizaron mediante esparcido. Dado que los cromosomas homólogos en metafase I sólo están unidos por los quiasmas, la ausencia de recombinación daría lugar a 40 univalentes. Como se observa en la **Figura 9A**, las metafases I del ratón wt presentan 20 bivalentes unidos por al menos un quiasma, con SYCP3 localizado a lo largo del dominio intercromatídico y dos señales centroméricas, una por cada homólogo. En cambio, en las

metafases I del mutante los 40 univalentes aparecen sueltos y además no hay señal de SYCP3 en el dominio intercromatídico, lo que indica que no se han formado quiasmas (**Figura 9A**). Con el fin de determinar la posible implicación de RAD21L en el mantenimiento de la cohesión centromérica, analizamos los centrómeros y REC8 en las metafases I inducidas por ácido okadaico. En la **Figura 9B** se observa que las metafases I del wt presentan 40 señales de ACA y muestran señal de REC8 en los centrómeros y por todo el dominio intercromatídico. En las metafases I del mutante también se cuentan 40 señales de ACA, no obstante, REC8 no se detecta a lo largo del dominio intercromatídico. A pesar de ello, esta kleisina sí se detecta en los centrómeros de los univalentes. Por tanto, el hecho de que en las metafases I del ratón mutante se cuentan 40 centrómeros con señal de REC8 sugiere que la ausencia de RAD21L no provoca pérdida de cohesión centromérica, al menos hasta metafase I. Por último, se consideró la posibilidad de que la falta de RAD21L pudiera afectar la carga de otras subunidades del complejo de cohesinas durante la profase I de la espermatogénesis. Para comprobar esta hipótesis se analizaron por IF las cohesinas que interactúan con RAD21L: SMC3, SMC1 α/β y STAG3 (Gutiérrez-Caballero et al, 2011) y también las otras dos kleisinas, REC8 y RAD21, cuya distribución podría sufrir alteraciones. En las IFs frente a SMC3, RAD21, SMC1 β y REC8 no se observaron diferencias entre los espermatoцитos wt y mutantes, ni en la intensidad ni en su localización a lo largo de los AE/LEs (**Figuras 10**). Sin embargo, las profases del mutante presentan menos STAG3 que las del wt e incluso en algunos AE/LEs ni siquiera se detecta su señal (**Figuras 10**). Del mismo modo, en el mutante también se detecta una menor señal de SMC1 α , aunque en este caso la diferencia es más sutil (**Figura 10**). Estos resultados demuestran por primera vez que RAD21L forma un complejo de cohesinas *in vivo* con STAG3 y SMC1 α .

Caracterización de la meiosis femenina en hembras *Rad21*^{-/-}

Como ya se ha mencionado anteriormente, las hembras *Rad21*^{-/-} son fértiles y tienen camadas similares a las hembras wt. Sin embargo, observamos que a partir de los 6 meses de edad el número de crías por camada en las mutantes (5,2 crías) es menor que en las wt (8,9 crías). Además, a los 10 meses de edad las hembras *Rad21*^{-/-} son estériles, mientras que sus

hermanas wt aún son fértiles. La pérdida de cohesión que se produce con la edad en los oocitos de mamíferos puede afectar al mantenimiento de los quiasmas que todos los oocitos permanecen arrestados en el estadio de dictiotena o dictiata hasta la ovulación. Estos oocitos primarios están rodeados por células foliculares y epiteliales planas que forman el folículo primordial, el cual alberga el oocito para nutrirlo y protegerlo. Poco antes de la ovulación se lleva a cabo la primera segregación meiótica y después de la fecundación se completa la segunda. En los ovarios de hembras adultas los (Hodges et al, 2005). Por ello y para determinar si en las hembras *Rad21*^{-/-} la esterilidad precoz se produce por esta causa, se analizaron los sobrecruzamientos en metafase I. Como se observa en la **Figura 11**, tanto los bivalentes de los oocitos wt como los de oocitos *Rad21*^{-/-} tienen al menos un quiasma. Estas ob observaciones sugieren que la ausencia de RAD21L no provoca una pérdida prematura de la cohesión en los oocitos. Para intentar determinar las causas de la sub-fertilidad femenina, decidimos realizar estudios histológicos de ovarios de hembras de un año de edad. En el ratón, la meiosis femenina empieza durante el desarrollo embrionario y se detiene en diplotena, de forma folículos primarios crecen y pasan por varios estadios de maduración hasta convertirse en folículos de Graaf antes de ovular. Después de la ovulación los folículos se denominan cuerpos lúteos y constituyen glándulas endocrinas temporales. Como se observa en la **Figura 12**, en los cortes histológicos de las hembras silvestres de un año, hay folículos en distinto grado de maduración y cuerpos lúteos. Sin embargo, las hembras mutantes presentan ovarios atrofiados con ausencia de folículos. Para intentar determinar el origen de esta atrofia decidimos analizar histológicamente ovarios de hembras adultas más jóvenes (4 Meses). Mediante este análisis se observó que el número de folículos primordiales en las hembras

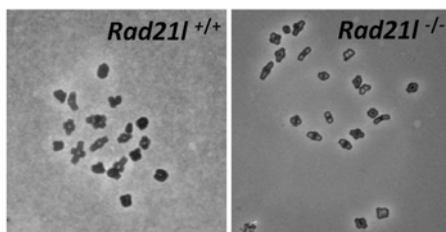


Figura 11. Estudio de los sobrecruzamientos en oocitos deficientes para RAD21L. Tinción con Giemsa realizada en oocitos *Rad21*^{+/+} y *Rad21*^{-/-} en metafase I, en los que se observan 20 bivalentes.

Rad21^{-/-} es inferior al esperado para su edad, pero el número de cuerpos lúteos es similar entre ambos genotipos (**Figura 12**). Posteriormente, para comprobar en que momento del desarrollo se produce esta disminución decidimos analizar ovarios de crías de 6 días, edad en la que todos los oocitos han finalizado la profase I y se encuentran arrestados en dictiata. De este modo se observó que en las hembras mutantes la cantidad de oocitos pequeños en la región externa del córtex está 4 veces reducida con respecto a un ovario wt ($4,1 \pm 0,6$; n=4). No obstante, el número de oocitos en crecimiento que se encuentran en la región más interna del cortex es similar en ambos genotipos (**Figura 12**). Estos resultados muestran que la falta de RAD21L provoca una reducción del número de oocitos primarios en el ovario, pero no provoca alteraciones en su maduración, ni impide la ovulación. Por tanto parece probable que

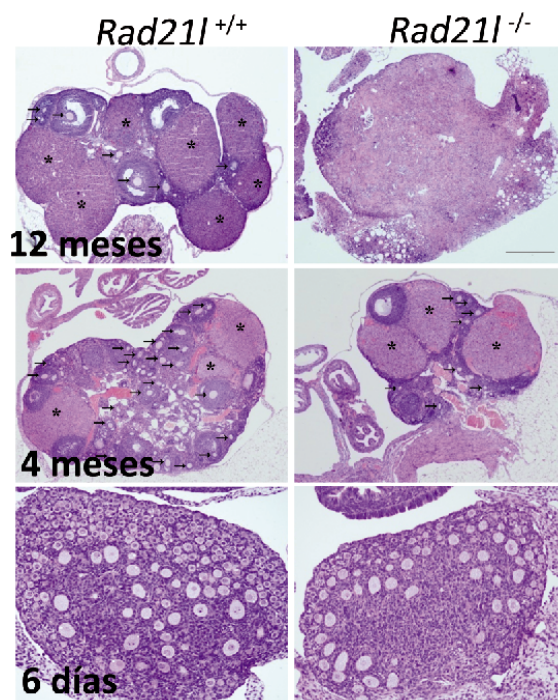


Figura 12. Análisis histológico de los ovarios en hembras *Rad21*^{-/-}. Análisis con H&E de cortes de ovarios de hembras *Rad21*^{+/+} y *Rad21*^{-/-} de 1 año, 4 meses y 6 días de edad. La falta de RAD21L provoca atrofia prematura del ovario por una reducción en la dotación de oocitos primarios. Asteriscos: Cuerpos lúteos. Flechas: Folículos primordiales. Las barras representan 500µm en los ovarios de 4 y 12 meses y 100µm en los de 6 días.

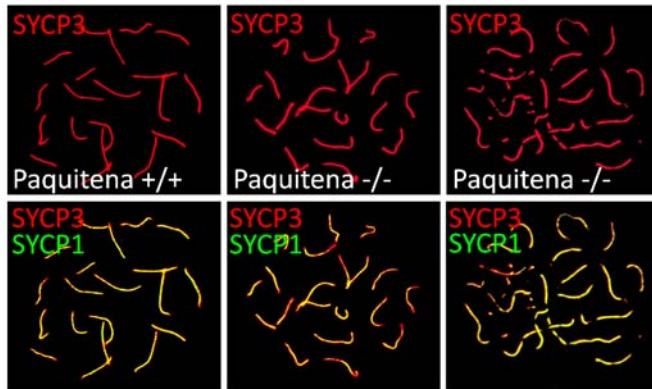


Figura 13. Estudio de la sinapsis en oocitos deficientes para RAD21L. IF doble frente a SYCP3 y SYCP1 en oocitos *Rad21^{+/+}* y *Rad21^{-/-}* en paquítana.

la esterilidad prematura de las hembras mutantes se deba a que éstas nacen con una menor reserva ovárica que las hembras wt. Con el fin de determinar si la pérdida de los oocitos que sufren las hembras *Rad21^{-/-}* está asociada a defectos en el proceso de sinapsis, como ocurre en los machos *Rad21^{-/-}*, se realizó un estudio de SYCP3/SYCP1 en oocitos en paquítana. A diferencia de lo observado en la espermatogénesis, en los oocitos *Rad21^{-/-}* se forman 20 bivalentes, aunque con un grado variable de sinapsis (**Figura 13**), ya que la mayoría de los oocitos muestran un ligero defecto en la sinapsis de algunos bivalentes, observándose pequeñas discontinuidades de SYCP1/SYCP3 a lo largo del SC ($69 \pm 4,3 \%$, $n= 30$). Estas alteraciones se observan también en los oocitos wt pero con mucha menor frecuencia ($12 \pm 3,6\%$) (**Figura 13**). Estas observaciones indican que RAD21L es prescindible para la sinapsis en la ovogénesis, a pesar de que su ausencia provoca alteraciones en este proceso. De forma adicional, para comprobar si en las hembras mutantes también se producen defectos en la carga de las subunidades del complejo de cohesinas SMC1 α y STAG3, éstas se analizaron en los oocitos mediante IF. A diferencia de lo que se observa en los machos, tanto SMC1 α como STAG3 co-localizan completamente con los LEs de los bivalentes en paquítana y con intensidades similares en ambos genotipos (**Figura 14**). Por tanto, la ausencia de RAD21L no altera la carga de las cohesinas SMC1 α y STAG3 en la ovogénesis.

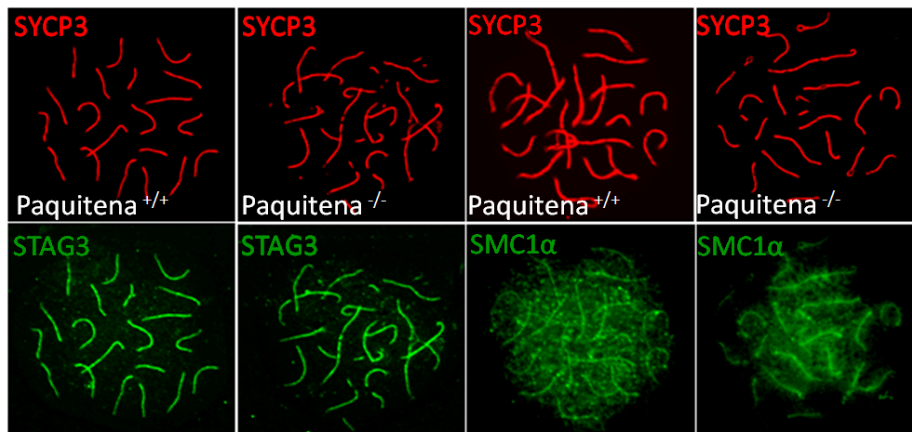


Figura 14. Estudio de STAG3 y SMC1 α en oocitos *Rad21*^{-/-}. IF dobles frente a SYCP3 y STAG3 o SMC1 α en oocitos *Rad21*^{+/+} y *Rad21*^{-/-} en paquitena que no muestran diferencias entre genotipos.

Generación de un modelo murino *Rad21*^{-/-} condicional

Dado que la ausencia de RAD21L provoca el bloqueo de la espermatogénesis en zigotena en el modelo de ratón *knockout* constitutivo, no se pudieron analizar las funciones que esta kleisina desempeña en la cinética cromosómica durante las divisiones meióticas, por lo que abordamos el desarrollo de un ratón mutante condicional de tejido. Para ello, se adquirió una construcción *Rad21*^{-/-} condicional en el KOMP (*Knockout Mouse Project*; USA; **Figura 15**). Esta construcción se linealizó, se electroporó en células ES y mediante selección con G418 se obtuvieron clones resistentes. Para determinar en cuáles de ellos se integró por recombinación homóloga, los analizamos por southern blot con sondas externas a los brazos de homología. Posteriormente se analizó el cariotipo de los clones positivos y el de mayor estabilidad cromosómica (2n= 40) se utilizó para generar los ratones quimeras. Los ratones quimeras se cruzaron con ratones wt y de este modo se obtuvieron los ratones heterocigotos *Rad21*^{+/Frt- β Geo-Frt loxP-E3-loxP}. Seguidamente, para eliminar en el alelo mutante el casete β Geo, flanqueado por los sitios FRT, se cruzaron ratones *Rad21*^{+/Frt- β Geo-Frt loxP-E3-loxP} con animales transgénicos para la recombinasa flipasa (FLP). En el 90% de los descendientes *Rad21*^{+/Frt- β Geo-Frt loxP-E3-loxP} que heredaron el gen de la FLP, el casete flanqueado por los sitios FRT se escindió y se generó un

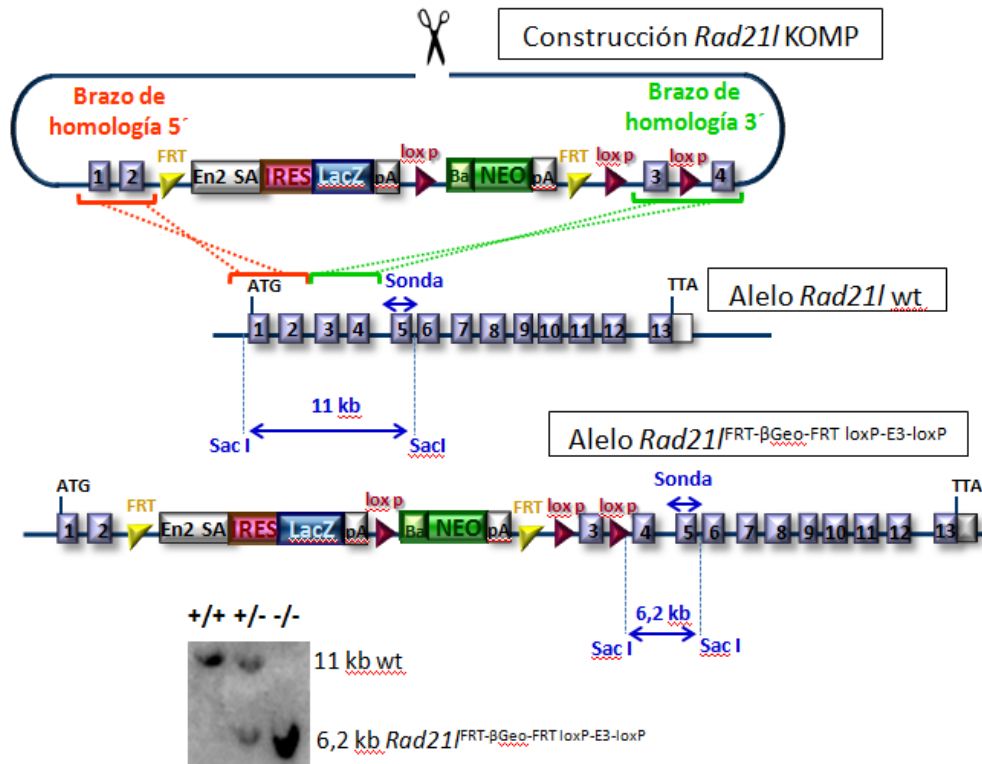


Figura 15. Estrategia de *gene targeting* para la construcción *Rad21* condicional. Esquema que representa la construcción solicitada al KOMP, el alelo *Rad21* wt y alelo *Rad21* mutante esperado (*Rad21*^{FRT-βGeo-Frt loxP-E3-loxP}). *SacI*: Dianas utilizadas para el genotipado de células ES y ratones por southern blot utilizando una sonda externa homóloga al exón 5.

nuevo alelo denominado *Rad21*^{+/-loxP-E3-loxP}, que se comporta como un alelo silvestre (Figura 16).

Para comprobar la funcionalidad de los sitios *loxP* y verificar que al eliminar el exón 3 el alelo que se genera se comporta como un alelo nulo, se llevaron a cabo cruzamiento entre ratones *Rad21*^{+/-loxP-E3-loxP} y ratones transgénicos *Sox2Cre* que expresan la recombinasa en todas las células del epiblasto a día E6.5 (Figura 17). Los descendientes con este nuevo alelo denominado *Rad21*^Δ se cruzaron entre sí para obtener animales *Rad21*^{Δ/Δ}. Los descendientes de este cruce nacen en las proporciones mendelianas esperadas y no muestran alteraciones

fenotípicas aparentes. Para determinar si los ratones *Rad21*^{Δ/Δ} son estériles, se cruzaron con ratones silvestres durante dos meses. En este periodo de tiempo se obtuvieron descendientes en los cruces de ratones silvestres y en los cruces de hembras *Rad21*^{Δ/Δ}, en número similar con independencia del genotipo, pero no en los cruces de machos *Rad21*^{Δ/Δ}. Con el fin de caracterizar la espermatogénesis de estos mutantes, llevamos a cabo estudios similares a los descritos en los apartados anteriores. Como se observa en la **Figura 18**, los túbulos seminíferos de los ratones *Rad21*^{Δ/Δ}, así como sus espermatocitos, son indistinguibles de los del mutante constitutivo, ya que muestran defectos sinápticos similares y un bloqueo en zigotena. Estos resultados indican que, funcionalmente, *Rad21*^Δ y *Rad21*ⁱ son alelos nulos equivalentes.

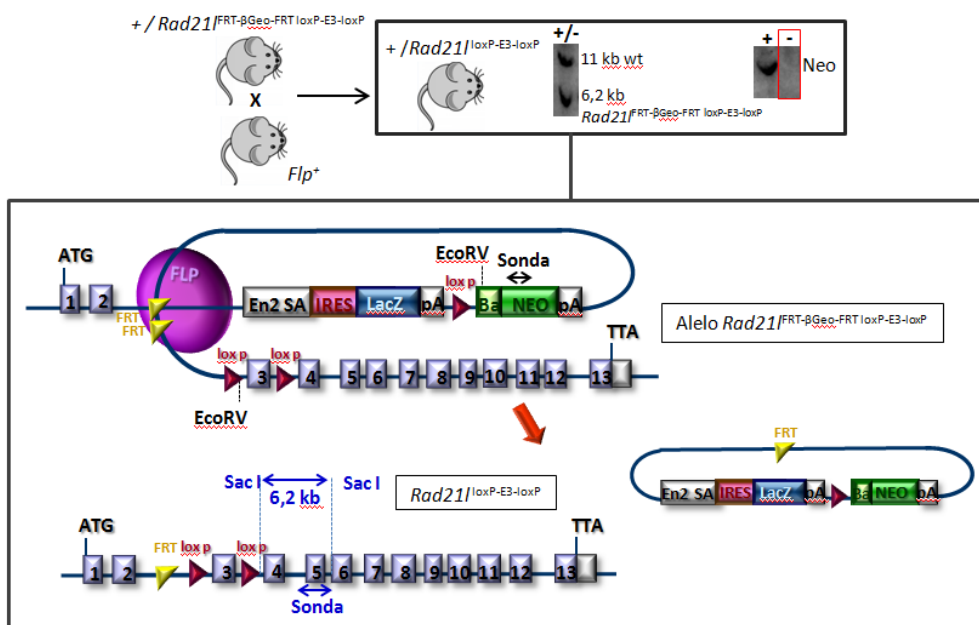


Figura 16. Representación esquemática de la generación del alelo *Rad21*^{Δ/loxP-E3-loxP}. SacI: Dianas para el genotipado de los ratones por southern blot con una sonda homologa al exón 5. Con este *screening* se identifican los ratones portadores del alelo *Rad21*^{Δ/Flp-βGeo-Frt loxP-E3-loxP}. EcoRV: Dianas utilizadas para el genotipado de los ratones por southern blot utilizando una sonda homologa al NEO. Con este segundo genotipado se determina si se ha producido la escisión NEO (negativo).

Actualmente, mediante cruzamientos entre ratones *Rad21^{loxP-E3-loxP/Δ}* y *Spo11Cre*, se están generando ratones *Rad21* condicionales en los que la delección del gen se produzca a partir de paquítina para poder abordar la función que desempeña RAD21L en la cinética cromosómica de las dos divisiones meióticas.

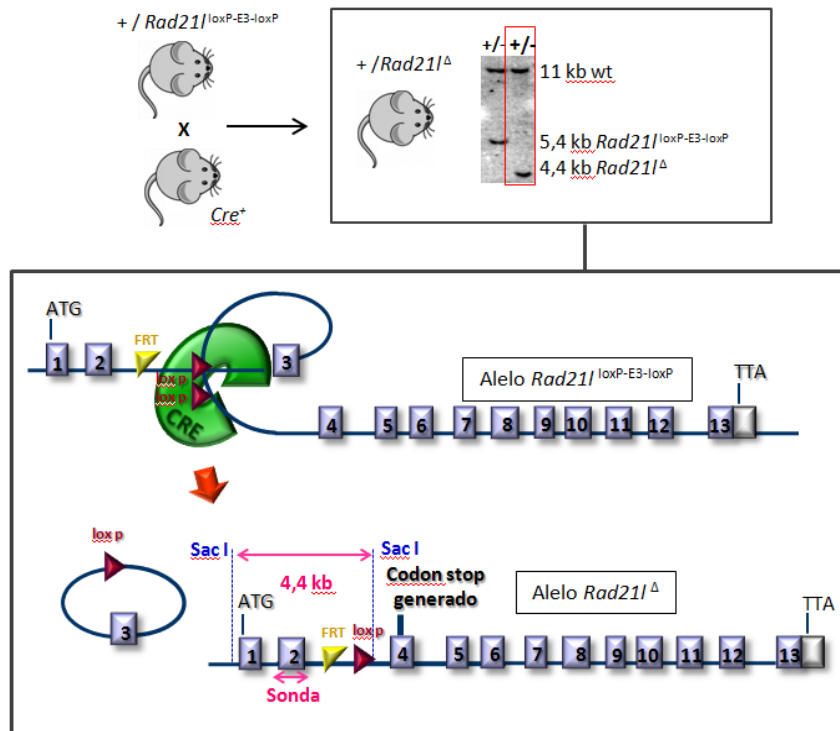


Figura 17. Diagrama que representa la escisión del exón 3 del alelo condicional. La escisión del exón 3 provoca un cambio de pauta de lectura de la ORF de *Rad21*. SacI: Dianas utilizadas para el genotipado de los ratones por southern blot utilizando una sonda homóloga al exón 2. Con este genotipado se pueden distinguir el alelo wt, el *Rad21^{loxP-E3-loxP}* y el alelo *Rad21^Δ*.

Generación de un ratón doble mutante *Rec8^{-/-}Rad21^{-/-}*

En *S. cerevisiae*, Rec8 es esencial para el montaje de los AEs (Klein et al, 1999). Sin embargo, en ratón el ensamblaje del AE se lleva a cabo a pesar de la pérdida de función de RAD21L, REC8 (Bannister et al, 2004) o SMC1β (Revenkova et al, 2004). La identificación y

caracterización funcional de RAD21L en ratón, revela que en mamíferos co-existen varios complejos de cohesinas en meiosis, estando al menos uno de ellos formado por REC8 y el otro por RAD21L (Gutiérrez- Caballero et al, 2011; Ishiguro et al, 2011; Lee & Hirano, 2011). Por ello y con el fin de determinar si en mamíferos las cohesinas son esenciales para el ensamblaje del AE y del SC, abordamos el desarrollo de una línea de ratones mutantes con pérdida de función simultánea para las dos kleisinas meióticas RAD21L y REC8. Para ello, se cruzaron nuestros ratones *Rad21^{+/−}* con ratones *Rec8^{+/−}* proporcionados por el grupo del Dr. Schimenti (Bannister et al, 2004). Los descendientes de padres doble heterocigotos *Rad21^{+/−}Rec8^{+/−}* nacen en las proporciones esperadas, se desarrollan con normalidad y su apariencia es similar a la de sus hermanos wt. A pesar de ello, los ratones doble mutantes *Rec8^{−/−}Rad21^{−/−}* (denominados dKO-cls) son estériles. Con el fin de caracterizar la espermatogénesis de los ratones dKO-cls se realizó un análisis histológico de testículos. Al igual que los mutantes sencillos *Rad21^{−/−}* y *Rec8^{−/−}*, los testículos de los dKO-cls muestran una reducción del tamaño del 70 % con respecto a ratones silvestres (**Figura 19A**). El análisis histológico de cortes de testículo reveló que, a pesar de que los túbulos seminíferos de los dKO-cls contienen células

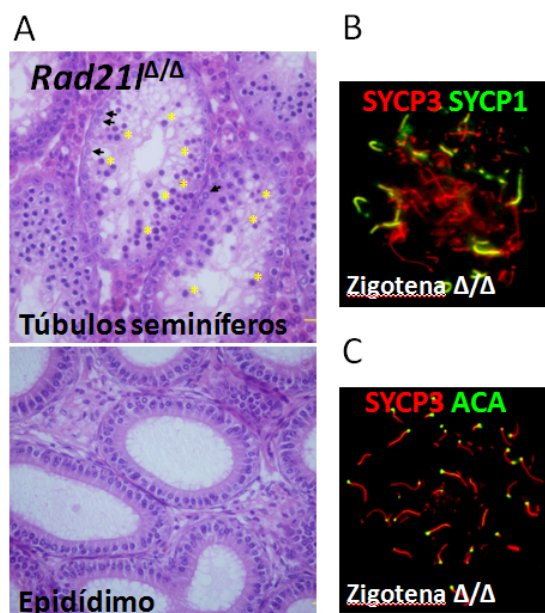


Figura 18. Estudio de la espermatogénesis en los machos *Rad21^{Δ/Δ}*. A) H&E de cortes de testículo y epidídimo *Rad21^{Δ/Δ}*. Las flechas señalan espermatogonias intermedias tardías y los asteriscos amarillos espermatoцитos en apoptosis. Barras: 100μm. B-C) Análisis de la sinapsis mediante IF dobles frente a SYCP3 y SYCP1 (B) o ACA (C) en esparcidos de espermatoцитos *Rad21^{Δ/Δ}*. Estos machos muestran un fenotipo similar a los *Rad21^{−/−}*.

de Leydig y de Sertoli y espermatogonias, no producen espermátidas ni espermatozoides y además se detecta apoptosis de espermatocitos (**Figura 19B**). La presencia de espermatogonias intermedias tardías y la apoptosis masiva de espermatocitos que no sobrepasan la etapa de paquitena indican que estos dobles mutantes sufren un bloqueo de la espermatogénesis en el estadio IV, al igual que los mutantes *Rad21^{H/-}* y *Rec8^{-/-}*.

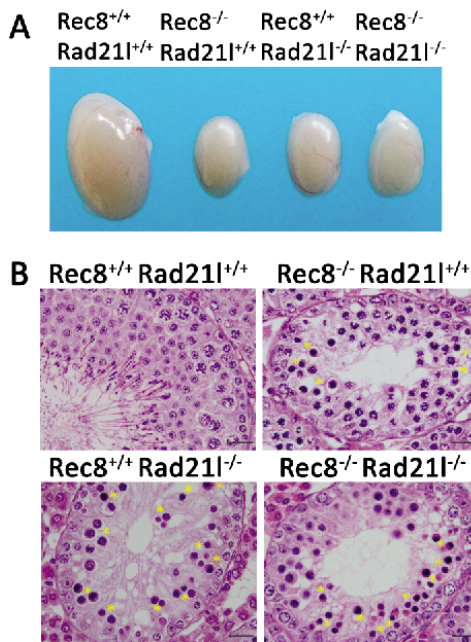


Figura 19. Caracterización de los testículos dKO-kls. **A)** Imágenes macroscópicas de testículos *Rec8^{+/+}Rad21^{+/+}*, *Rec8^{-/-}Rad21^{+/+}*, *Rec8^{+/+}Rad21^{-/-}* y *Rec8^{-/-}Rad21^{-/-}*. **B)** Cortes histológicos procedentes de los testículos del apartado **A** teñidos con H&E. En los testículos dKO-kls se observa una reducción de tamaño y un bloqueo de la espermatogénesis similares a los de los ratones mutantes sencillos. Asteriscos amarillos: células apoptóticas. Flechas: espermatogonias intermedias tardías. Barras: 100µm.

Para estudiar el bloqueo meiótico, se realizaron IFs frente a las proteínas SYCP3 y SYCP2. Como se muestra en la **Figura 20A**, los espermatocitos del dKO-kls no ensamblan sus AEs y la señal SYCP3 sólo se detecta a modo de puntos y pequeñas barras. Del mismo modo, SYCP2 tampoco se ensambla en AEs y sólo se detecta en forma de pequeñas barras y puntos que co-localizan con SYCP3. A diferencia de ello, los mutantes sencillos forman AEs, con SYCP3 y SYCP2 (**Figura 20B**), que pueden llegar a decorar la longitud completa de un cromosoma en zigotena. Posteriormente, para comprobar como afecta la ausencia de RAD21L y REC8 al proceso de sinapsis se analizó por IF la proteína del elemento central SYCP1. A diferencia de lo que ocurre en los espermatocitos bloqueados de los mutantes *Rad21^{H/-}* y *Rec8*

^{-/-}, en los que se ven parches de SYCP1 co-localizando con SYCP3 a lo largo de los AEs, en los espermatocitos del dKO-klis no se detecta señal de SYCP1 (**Figura 20B**). En conjunto todos estos resultados sugieren que los espermatocitos del ratones dKO-klis están citológicamente bloqueados en el estadio de leptotena. Por ello, los análisis comparativos llevados a cabo con el resto de marcadores meióticos utilizados en este estudio se realizaron frente a leptonemas de ratones wt y mutantes sencillos. Estos resultados demuestran por primera vez que en mamíferos las kleisin meióticas son esenciales para el ensamblaje de los AE/LEs. Seguidamente, para determinar si la falta de estas dos kleisin altera la función de SPO11 al

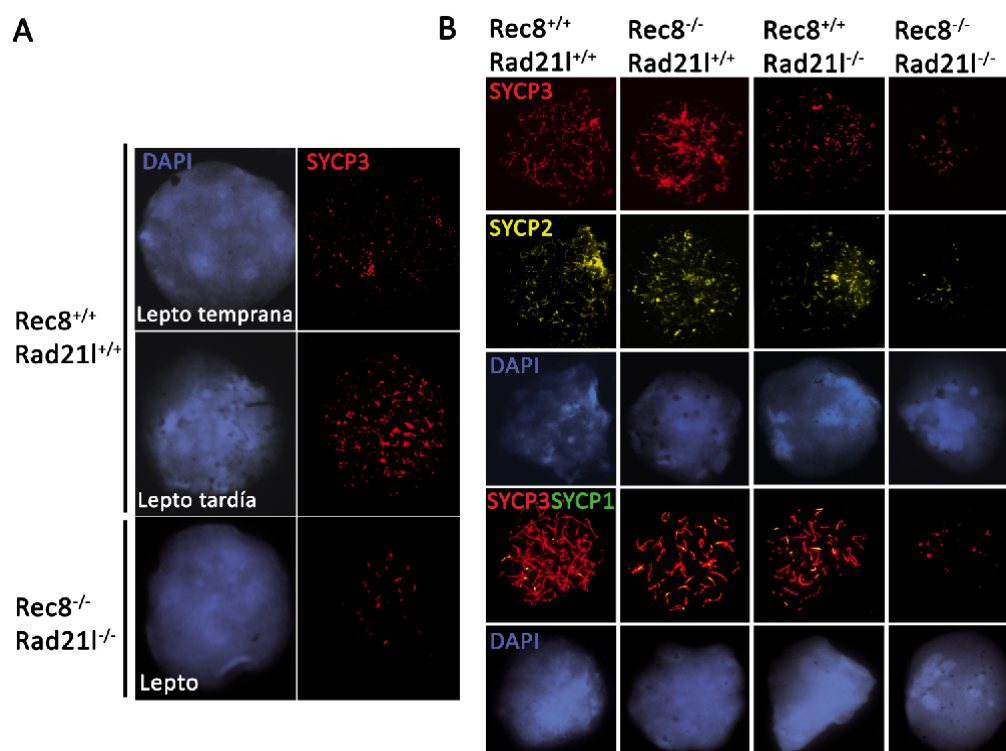


Figura 20. Estudio de las proteínas del SC en los espermatocitos dKO-klis. A) Estudio comparativo entre espermatocitos silvestres en leptotena y los espermatocitos bloqueados dKO-klis mediante IF frente a SYCP3. B) IF dobles frente a SYCP3 y SYCP2 o SYCP1 en esparcidos de espermatocitos *Rec8^{+/+}Rad21^{+/+}*, *Rec8^{-/-}Rad21^{+/+}*, *Rec8^{+/+}Rad21^{-/-}* y *Rec8^{-/-}Rad21^{-/-}*. En ausencia de las kleisin meióticas no se forman AE/LEs, ni se inicia la sinapsis. El DNA se tiñó con DAPI.

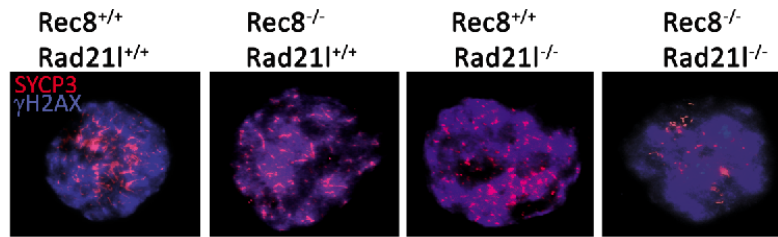


Figura 21. Análisis de la formación de DSBs en los espermatocitos dKO-klis. IF dobles frente a SYCP3 y γ H2AX en esparcidos de espermatocitos wt, *Rec8^{-/-}Rad21^{+/+}*, *Rec8^{+/+}Rad21^{-/-}* y *Rec8^{-/-}Rad21^{-/-}*.

inicio de la meiosis o la activación de las rutas de reparación, analizamos mediante IFs la histona γ H2AX. Como se observa en la **Figura 21**, γ H2AX se localiza difusamente y con una intensidad similar por el núcleo de todas las leptonemas procedentes del ratón wt, los mutantes sencillos y el doble mutante. Además, en los espermatocitos del doble mutante, γ H2AX nunca desaparece de los cromosomas autosómicos. Por tanto, la ausencia simultánea de RAD21L y REC8 no impide que se lleve a cabo el programa de DSBs, ni que se activen las rutas de reparación, aunque la mayoría de las roturas no son reparadas. Posteriormente, para comprobar por qué las DBS no eran reparadas analizamos el proceso de recombinación en los espermatoocitos dKO-klis mediante análisis por IF de la recombinasa RAD51 y su paróloga

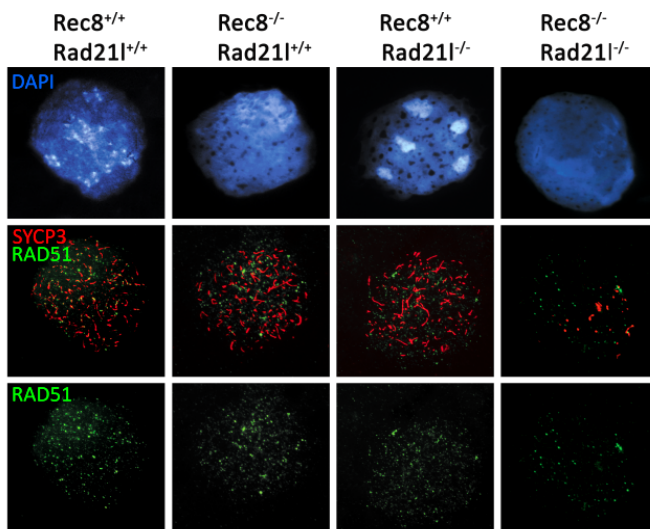


Figura 22. Análisis de RAD51 en el ratón dKO-klis. IF dobles frente a SYCP3 y RAD51 en esparcidos de espermatocitos wt, *Rec8^{-/-}Rad21^{+/+}*, *Rec8^{+/+}Rad21^{-/-}* y *Rec8^{-/-}Rad21^{-/-}*. En el doble mutante se produce una reducción en la carga de RAD51. El DNA se tiñó con DAPI.

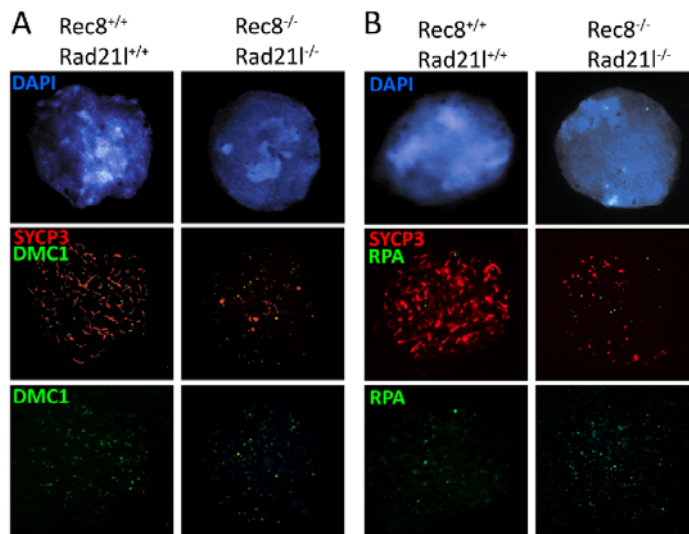


Figura 23. Análisis de la carga de DMC1 y RPA en las leptotenas dKO-cls. IF dobles frente a SYCP3 y DMC1 (A) o RPA (B) en esparcidos de espermatocitos wt y dKO-cls. La falta de las dos kleisinas meióticas no afecta al número de focos de DMC1, pero provoca una mayor acumulación de RPA en los espermatocitos. DNA teñido con DAPI.

meiótica DMC1 (Bishop et al, 1992). El número de foci de RAD51 en los espermatocitos bloqueados del dKO-cls es menor que en las leptotemas de los ratones silvestres, *Rad21*^{-/-} y *Rec8*^{-/-} (dKO-cls: $13,7 \pm 5,4$ vs wt: $110,7 \pm 31,8$; **Figura 22**). Sin embargo, el número de focos de DMC1 es similar en los espermatocitos dKO-cls y en los silvestres ($53,9 \pm 19,4$ vs $51,8 \pm 20,9$; **Figura 23A**). El hecho de que el mutante dKO-cls presente un número de focos de DMC1 similar al del wt indica que las DSBs detectadas por γ H2AX en leptotema probablemente son inducidas por SPO11. No obstante, dado que DMC1 y RAD51 co-localizan en los nódulos tempranos (Tarsounas et al, 1999), la reducción de RAD51 sugiere que en el mutante el inicio de la recombinación está alterado. Para determinar si en los espermatocitos dKO-cls los nódulos tempranos maduran adecuadamente, se analizó la presencia de RPA. Como se muestra en la **Figura 23B**, los espermatocitos dKO-cls presentan más focos de RPA que los del wt.

Con el fin de determinar si la ausencia simultánea de REC8 y RAD21L altera la carga de otras subunidades del complejo de cohesinas, se realizaron IFs en esparcidos de espermatocitos frente a las cohesinas SMC3, SMC1 β , STAG3 y RAD21. En la **Figura 24** se observa que en los espermatocitos de los mutantes sencillos y del wt todas estas subunidades co-localizan con

SYCP3 en los AEs. En cambio, en el mutante dKO-cls no se detecta señal de SMC1 β , ni de STAG3 y la señal de SMC3 se detecta con una intensidad más tenue co-localizando con SYCP3. RAD21 es la única subunidad que presenta una intensidad similar a la que se observa en los otros mutantes, aunque en el dKO-cls sólo se detecta a modo de puntos y pequeñas barras. Por lo tanto, en mamíferos REC8 y RAD21L son responsables de la formación de los complejos de cohesinas meióticos que posibilitan el ensamblaje del AE y del SC.

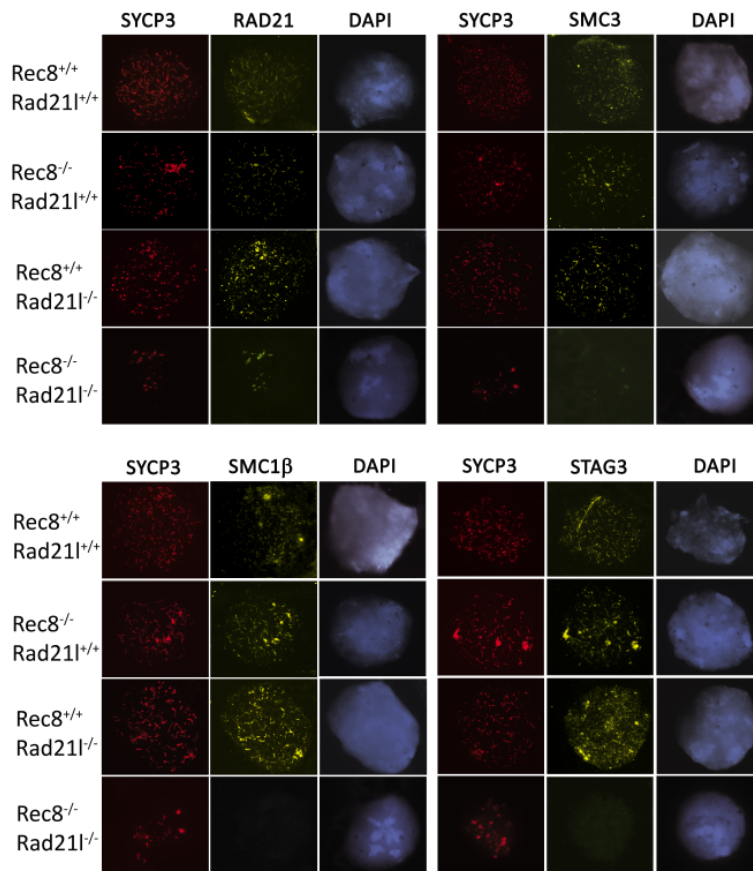


Figura 24. Análisis de RAD21, SMC3, SMC1 β y STAG3 en ausencia de las kleisinias meióticas. IFs dobles frente a SYCP3 y RAD21, SMC3, SMC1 β o STAG3 en esparcidos de espermatocitos wt, *Rec8^{-/-}Rad21^{+/+}*, *Rec8^{+/+}Rad21^{-/-}* y *Rec8^{-/-}Rad21^{-/-}*. La falta de las dos kleisinias meióticas impide la carga SMC1 β y STAG3, pero no la de RAD21 y, en menor medida, la de SMC3. DNA teñido con DAPI.

Dado que la cohesión de las cromátidas hermanas depende de los complejos de cohesinas desde fase S hasta anafase (Guacci et al, 1997; Furuya et al, 1998; Waizenegger et al, 2000), la deficiencia de dos de las tres kleisinas podría afectar al establecimiento / mantenimiento de la cohesión de las células germinales o a su replicación. Para comprobarlo analizamos la ploidía de de las células de los tubulos seminíferos mediante citometría de flujo. En la gráfica obtenida se observa que los testículos dKO-cls presentan una proporción de células 4C/2C comparable a la de los machos *Rad21*^{-/-} y wt (**Figura 25A**), lo que sugiere que la falta de las cohesinas no perturba la replicación del DNA. Finalmente, llevamos a cabo un estudio de la cohesión en los espermatocitos mediante FISH, utilizando sondas específicas para los cromosomas sexuales. Como se observa en la **Figura 25B**, tanto los espermatocitos silvestres como los dKO-cls muestran una única señal para cada cromosoma sexual, lo que descarta que en el ratón dKO-cls se produzcan alteraciones en el establecimiento de la cohesión en fase S o pérdida de cohesión prematura en las leptonemas bloqueadas.

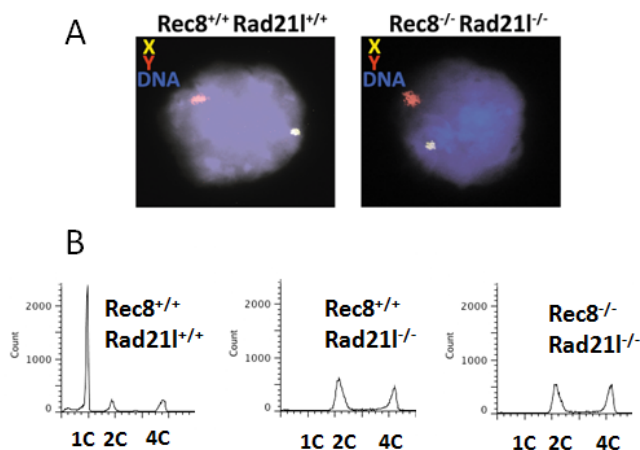


Figura 25. Análisis de la replicación y la cohesión en la meiosis de machos dKO-cls. A) Estudio de la ploidía en testículos de ratones wt, *Rad21*^{-/-} y dKO-cls. B) Estudio por FISH en esparcidos de espermatocitos wt y *Rec8*^{-/-} *Rad21*^{-/-} con una sonda homóloga al cromosoma Y y una sonda homóloga al cromosoma X. La ausencia de las kleisinas meióticas no provoca defectos de replicación ni de cohesión. DNA teñido con DAPI.

Estudio de RAD21L en el ratón *Sgol2*^{-/-}

Recientemente en nuestro laboratorio se desarrolló un modelo murino con pérdida de función de la shugoshina SGOL2 (Llano et al, 2008). En el ratón, *Sgol2* se expresa en el tejido

somático y en las gónadas y se localiza en los centrómeros tanto en mitosis como meiosis. A pesar de ello, los ratones *Sgol2^{-/-}* son aparentemente normales, no sufren mortalidad prenatal y su tasa de supervivencia es similar a la de ratones wt. En concordancia, cuando se analizó la segregación cromosómica, la cohesión y la reparación del DNA en MEFs *Sgol2^{-/-}* no se detectaron alteraciones, ni siquiera ante el estrés generado por radiación y exposición a drogas que alteran el huso mitótico (Llano et al, 2008). En meiosis, por el contrario, SGOL2 es esencial para el mantenimiento de la cohesión hasta anafase II. En ausencia de SGOL2, la subunidad REC8 del complejo de cohesinas de los centrómeros es cortada por Separasa en anafase I, lo que provoca la pérdida de cohesión prematura de las cromátidas hermanas y en consecuencia, la esterilidad de los ratones *Sgol2^{-/-}*. Debido a que RAD21L se localiza en los centrómeros durante las dos metafases meióticas (**Figuras 1 y 2**) y que SGOL2 protege complejos de cohesinas centroméricos en la transición metafase I - anafase I (Lee et al, 2008; Llano et al, 2008), se decidió analizar si la ausencia de SGOL2 afecta al mantenimiento de RAD21L en los centrómeros hasta metafase II. Para ello, se realizaron IFs sobre esparcidos de espermatocitos de ratones *Sgol2^{-/-}Rec8-myc* (originados mediante cruces de nuestra línea de ratones mutantes

Sgol2^{-/-} Rec8-myc

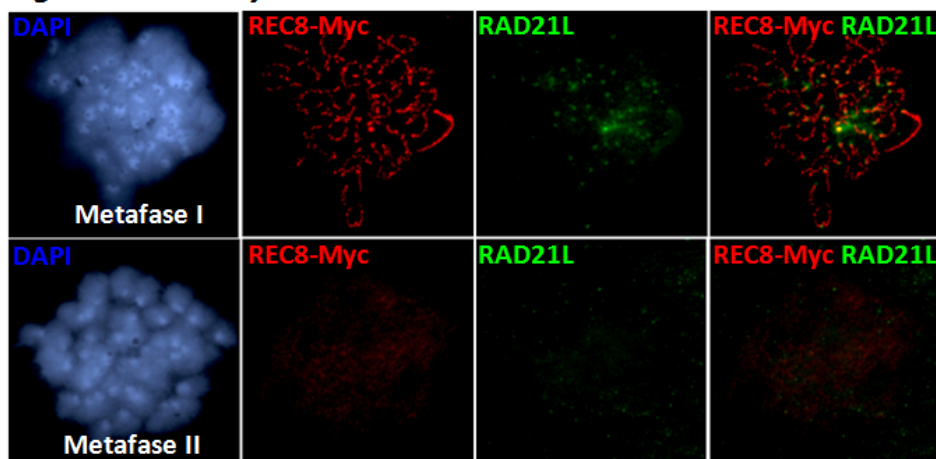


Figura 26. Estudio de RAD21L en las divisiones meióticas en ausencia de SGOL2. IFs dobles realizadas sobre esparcidos de espermatocitos *Sgol2^{-/-}Rec8-myc* frente a RAD21L y Myc. La falta de SGOL2 altera la carga y/o permanencia de RAD21L en los centrómeros de las metafases I y II. EL DNA está teñido con DAPI.

Sgol2 y ratones transgénicos *Rec8-myc*, procedentes del laboratorio del Dr. Nasmyth), con anticuerpos anti-RAD21L y anti-Myc. Como se observa en la **Figura 26**, en las metafases II del ratón *Sgol2^{-/-}Rec8-myc*, RAD21L está ausente de los centrómeros, al contrario de lo que se observa en las metafases II de ratones silvestres (**Figura 2**). Además se observó que en la metafase I del ratón *Sgol2^{-/-}Rec8-myc* (**Figura 26**) la señal de RAD21L en los centrómeros es menos intensa que en una metafase I de un ratón wt (**Figura 1**). Por tanto, el mantenimiento y/o la carga de RAD21L en los centrómeros en metafase I y en mayor medida en metafase II son dependientes de SGOL2.

Estudio de los ratones doble mutantes *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}*

En eucariotas, Securina mantiene inhibida a Separasa hasta la segregación cromosómica (Funabiki et al, 1996; Zou et al, 1999; Waizenegger et al, 2002). De forma adicional, en *S. cerevisiae* Sgo1 colabora con PP2A^{cdc55} en la inhibición de Separasa (Clift et al, 2009). En el caso de que esta función se encontrase conservada en mamíferos, la eliminación simultánea de ambos mecanismos inhibitorios podría provocar letalidad o graves defectos en las células somáticas. Para comprobarlo se generó un ratón con pérdida de función de SGOL2 y Securina simultáneamente. Además, se analizó la espermatogénesis de ratones carentes de Securina (*Pttg1^{-/-}*), ya que no existen estudios previos que lo hayan abordado a pesar de que se ha reportado que los ratones *Pttg1^{-/-}* presentan hipoplasia del testículo (Wang et al, 2001).

Generación de los ratones *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}*

Para obtener los ratones deficientes dobles de SGOL2 y Securina se cruzaron ratones *Sgol2^{+/-}* con ratones *Pttg1^{-/-}* (Wang et al, 2001) y posteriormente sus descendientes entre sí. En cada nuevo cruzamiento se calcularon las frecuencias genotípicas y se comprobó que se ajustan a las esperadas. Los ratones obtenidos *Sgol2^{+/-}Pttg1^{+/-}*, *Sgol2^{+/-}Pttg1^{-/-}*, *Sgol2^{-/-}Pttg1^{+/-}* y *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}* son aparentemente normales y no muestran anomalías ni en el desarrollo ni en la supervivencia en comparación a los ratones wt. Además, mediante cruces con ratones sil-

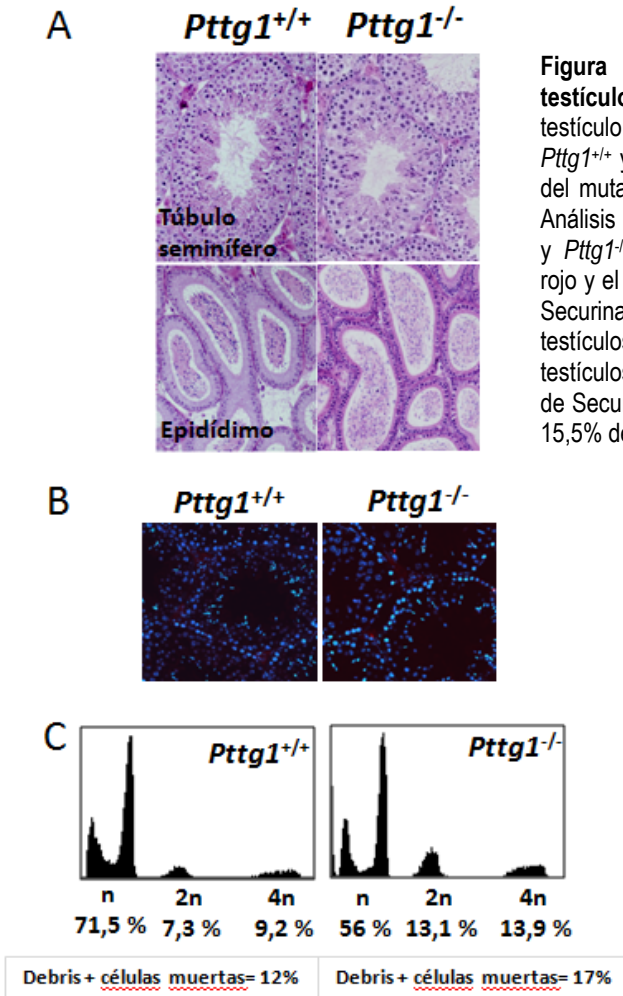


Figura 27. Caracterización de los testículos *Pttg1*^{-/-}. A) H&E en cortes de testículo y epidídimo de ratones adultos *Pttg1*^{+/+} y *Pttg1*^{-/-}. Los túbulos seminíferos del mutante no muestran alteraciones. B) Análisis TUNEL en cortes de testículos wt y *Pttg1*^{-/-} con las células apoptóticas en rojo y el DNA teñido con DAPI. La falta de Securina no incrementa la apoptosis en testículos. C) Análisis por FACs en testículos *Pttg1*^{+/+} y *Pttg1*^{-/-}. En ausencia de Securina se produce una reducción del 15,5% de las células haploides.

vestres se comprobó que únicamente los ratones deficientes en SGOL2 son estériles, tanto machos como hembras. Por lo tanto, dado que los ratones *Sgol2*^{-/-}*Pttg1*^{-/-} no sufren mortalidad ni alteraciones evidentes del fenotipo, probablemente SGOL2 no constituye un nivel adicional de represión de la actividad de Separasa en mamíferos. A pesar de que la deficiencia de ambas proteínas pueda provocar alteraciones sutiles en células somáticas, decidimos no abordar su caracterización en profundidad, ya que la ausencia de alteraciones fenotípicas severas en el ratón sugiere que la función principal de SGOL2 en el tejido somático no es

inhibir a Separasa. No obstante, dadas las alteraciones que se producen en la meiosis de los ratones *Sgol2^{-/-}* y que los ratones *Pttg1^{-/-}* muestran hipoplasia en los testículos, se decidió caracterizar la espermatogénesis de los ratones *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}* y la de los ratones *Pttg1^{-/-}*, para determinar cómo afecta la falta de Securina a la meiosis masculina y si pudiera existir epistasia entre ambos genes en la espermatogénesis.

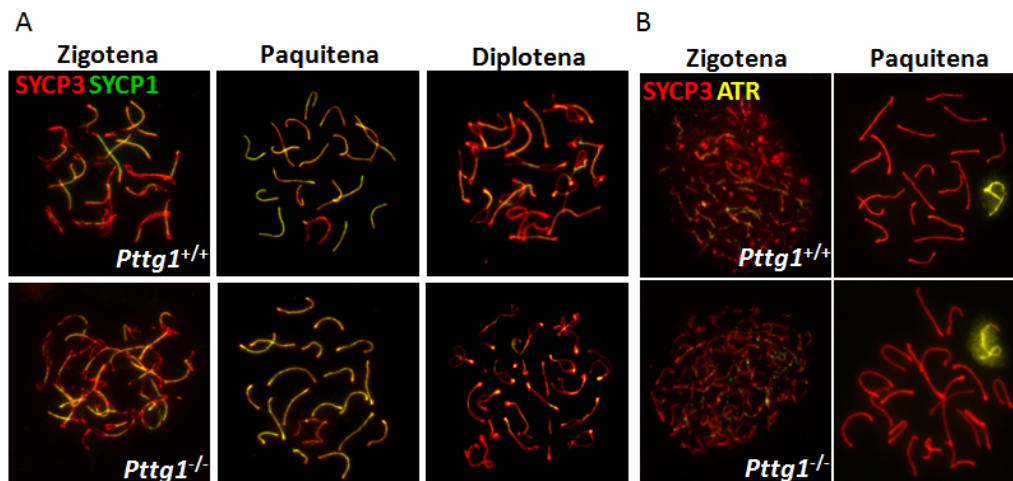


Figura 28. Estudio de la profase I de los ratones *Pttg1^{-/-}*. IFs dobles marcando SYCP3 y SYCP1 (A) o ATR (B) en esparcidos de espermatocitos wt y *Pttg1^{-/-}*. La falta de Securina no afecta a la sinapsis ni a la reparación de las DSBs.

Caracterización de la espermatogénesis en ratones *Pttg1^{-/-}*

Con el fin de determinar la causa de la reducción del tamaño de los testículos de los ratones *Pttg1^{-/-}*, se analizaron histológicamente cortes de testículo y epidídimo. Las imágenes obtenidas muestran que la estructura de los túbulos seminíferos del ratón *Pttg1^{-/-}* es similar a la de un ratón wt, con células de Leydig y de Sertoli y con todos los estadios celulares característicos de la espermatogénesis (Figura 27A). Además, el análisis del epidídimo mostró que en el ratón *Pttg1^{-/-}*, los conductos presentan espermatozoides en una cantidad aparentemente similar a los del wt (Figura 27A). Para comprobar si el defecto en el tamaño de los testículos de los machos *Pttg1^{-/-}* se produce por un incremento de la apoptosis, se realizó un análisis TUNEL sobre cortes de testículos. Los resultados muestran niveles apoptóticos comparables a los del ratón

silvestre (**Figura 27B**). Con el fin de determinar si la espermatogénesis del ratón *Pttg1^{-/-}* presenta alteraciones en la ploidía, se realizó un estudio por FACS en testículos wt y *Pttg1^{-/-}* (**Figura 27C**). Las gráficas obtenidas muestran que en ambos genotipos se aprecian todos los picos, correspondientes a las células n, 2n y 4n. Sin embargo, el ratón mutante sufre una reducción de las células haploides (56 vs 71,5 %), mientras que las células diploides y tetraploides aumentan (2n: 13,1 vs 7,3 %; 4n: 13,9 vs 9,2 %), así como el debris y/o las células muertas (17 vs 12 %). Estos resultados conjuntamente con la reducción del tamaño de los testículos sugieren la existencia de un defecto en la meiosis en los ratones deficientes en Securina.

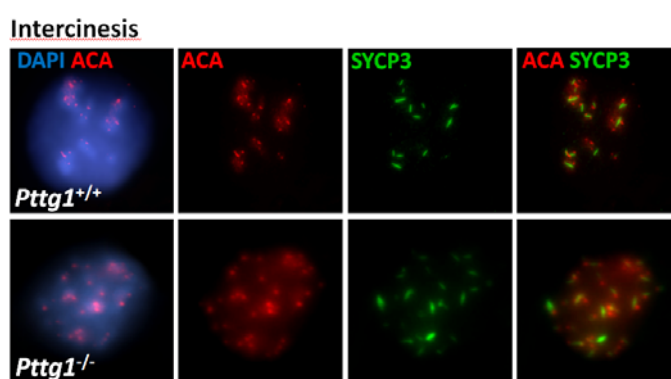


Figura 29. Estudio de las intercinesis en ratones *Pttg1^{-/-}*. IFs dobles marcando SYCP3 y las proteínas centroméricas en aplastados de túbulos seminíferos de ratones wt y *Pttg1^{-/-}*. En el mutante se observan un mayor número de señales de ACA y de SYCP3 que en el wt. DNA teñido con DAPI.

Con el fin de analizar en detalle las posibles alteraciones meióticas, se llevó a cabo un estudio de las distintas etapas de la espermatogénesis mediante IFs. Para el estudio de la profase I se analizaron los marcadores SYCP3 y SYCP1 en esparcidos de espermatocitos. Como se observa en la **Figura 28A**, en los machos *Pttg1^{-/-}* el ensambaje de SYCP3 desde leptotena, la carga de SYCP1 a partir de zigotena, la sinapsis de los 19 bivalentes autosómicos, la formación del cuerpo sexual y el proceso de desinapsis se dan de forma similar que en los ratones wt. Seguidamente, para determinar si la falta de Securina provoca

alteraciones en la reparación de DSBs, se realizaron IFs frente a ATR. Como se observa en la **Figura 28B**, tanto en los espermatocitos wt como en los *Pttg1^{-/-}*, ATR se localiza en los AEs sin sinapsis en zigotena y únicamente en el cuerpo sexual en paquitena. Por tanto, estos resultados sugieren que la ausencia de Securina no altera el ensamblaje del SC ni la reparación de las DSBs. Posteriormente, se realizó un estudio de las divisiones meióticas

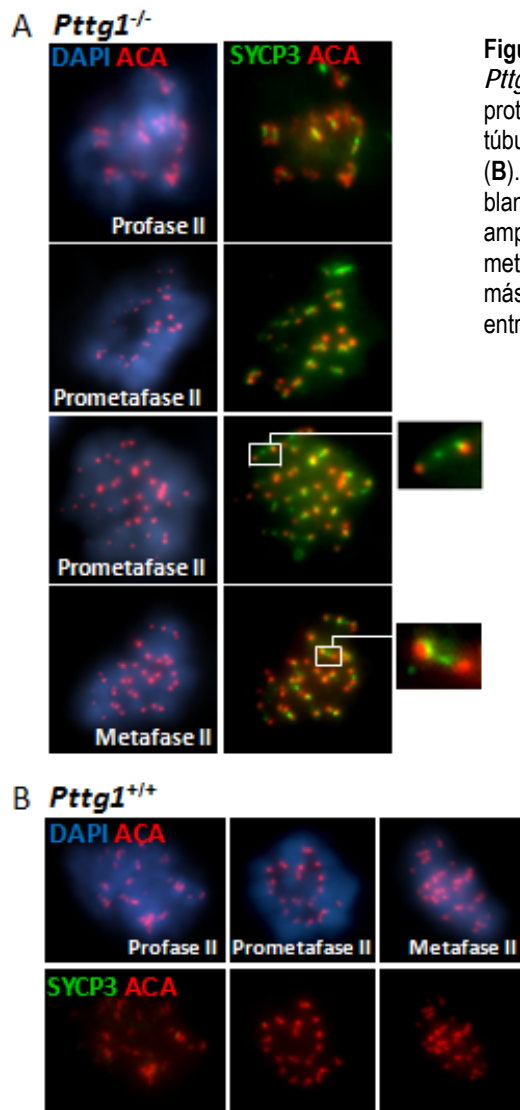


Figura 30. Estudio de la meiosis II en machos *Pttg1^{-/-}*. IFs dobles marcando SYCP3 y las proteínas centroméricas en aplastados de túbulos seminíferos de ratones *Pttg1^{-/-}* (A) y wt (B). El DNA está teñido con DAPI. Los recuadros blancos indican la región de la imagen que se ha ampliado a la derecha de la prometafase y la metafase II. Estas ampliaciones muestran en más detalle la presencia de una barra de SYCP3 entre dos cinetocoros hermanos.

mediante IFs sobre aplastados de túbulos seminíferos con un anticuerpo anti-SYCP3 y antisuero ACA. En las metafases I del ratón *Pttg1*^{-/-} no se detectan alteraciones en el alineamiento de los cromosomas en la placa ecuatorial, ni defectos en la segregación cromosómica en anafase I. Sin embargo, las intercinesis *Pttg1*^{-/-} presentan cromocentros desorganizados, con más señales de ACA y más barras de SYCP3 que las intercinesis del wt (**Figura 29**). Además, se detectó un exceso de prometafases II, coincidiendo con una señal de SYCP3 más intensa en los centrómeros que la correspondiente en un wt (**Figura 30**). Asimismo, se observó que éstas prometafases dan lugar también a metafases II alteradas ya que presentan barras de SYCP3 localizadas en la región intercinetocórica (**Figura 30A**), mientras que las metafases II wt carecen de SYCP3 (**Figura 30B**). De forma similar, en las

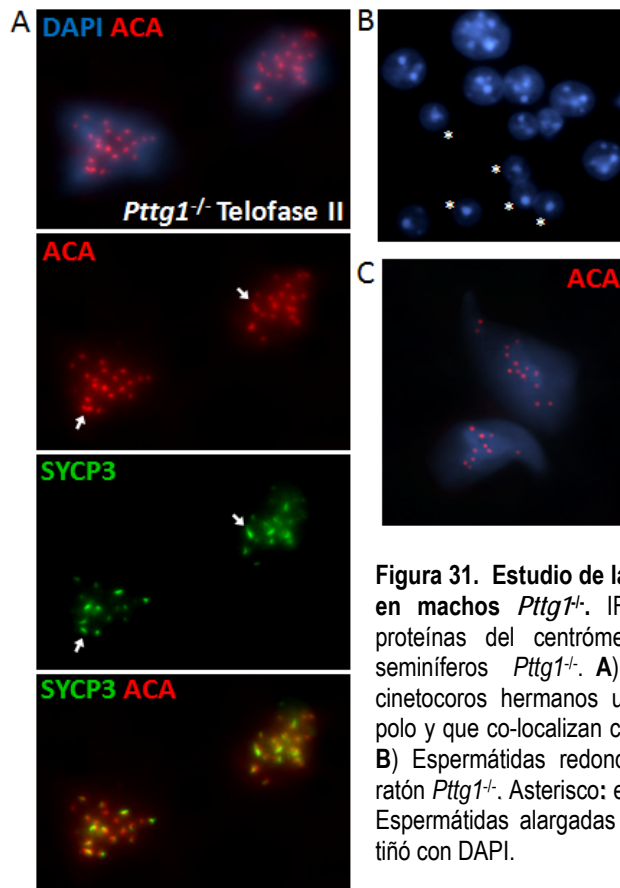


Figura 31. Estudio de la segunda segregación meiótica en machos *Pttg1*^{-/-}. IF doble frente a SYCP3 y las proteínas del centrómeros en aplastados de túbulos seminíferos *Pttg1*^{-/-}. **A)** Telofase II con dos parejas de cinetocoros hermanos unidos migrando hacia el mismo polo y que co-localizan con una barra de SYCP3 (flechas). **B)** Espermatidas redondas de distintos tamaños en un ratón *Pttg1*^{-/-}. Asterisco: espermatidas similares a las wt. **C)** Espermatidas alargadas aneuploides *Pttg1*^{-/-}. El DNA se tiñó con DAPI.

telofases II del ratón *Pttg1*^{-/-} todavía hay señal de SYCP3 en forma de barras y en algunos casos éstas co-localizan con dos cinetocoros hermanos íntimamente unidos migrando hacia el mismo polo (**Figura 31A**). Finalmente, se observó que las espermatidas de los mutantes muestran variabilidad de tamaños entre sí y se comprobó que algunas de ellas contienen un número de señales de ACA distinto de 20, mientras que en los ratones wt las espermatidas tienen 20 señales de ACA y son similares de tamaño (**Figura 31B-C**). Para cuantificar estos defectos realizamos un análisis por FISH de espermatocitos utilizando sondas específicas frente a los cromosomas sexuales. Como se observa en la **Figura 32A**, en el ratón *Pttg1*^{-/-} algunas de las espermatidas muestran dos señales del cromosoma Y, dos señales del cromosoma X o ninguna señal, mientras que las espermatidas del ratón wt muestran una señal, o bien para el Y o bien para el X (13,13 % vs 0 % wt; n=160). Además, el análisis por FISH de espermatozoides mostró que una fracción de los *Pttg1*^{-/-} también muestran los mismos defectos que los observados en las espermatidas (9,35 % vs 0% wt; n=246 **Figura 32B**). De forma adicional, se analizó la morfología de los espermatozoides *Pttg1*^{-/-} mediante tinción con

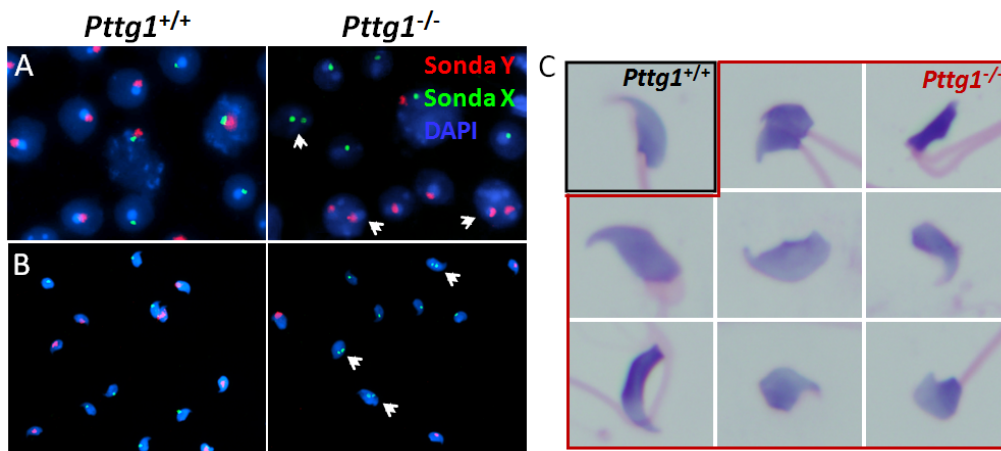


Figura 32. Cuantificación de las aneuploidías en células post-meióticas *Pttg1*^{-/-} y estudio morfológico de los espermatozoides. Análisis por FISH realizado en esparcidos de espermatocitos (**A**) y en frotis de espermatozoides (**B**) con sondas homólogas a los cromosomas sexuales. Las flechas señalan espermatidas y espermatozoides aneuploides. DNA teñido con DAPI. **C**) H&E en frotis de espermatozoides wt y *Pttg1*^{-/-}. Las imágenes muestran los defectos observados en algunos espermatozoides del ratón mutante.

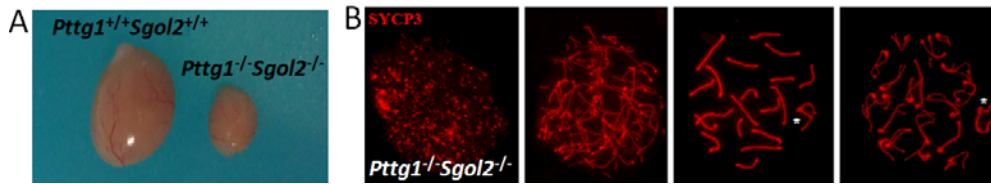


Figura 33. Estudio de los testículos *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}*. A) Imagen macroscópica de testículos wt y *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}*. Los testículos del mutante son un 80% más pequeños que los wt. B) Estudio de la profase I mediante IFs frente a SYCP3 en esparcidos de espermatocitos *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}*. La ausencia simultánea de las dos proteínas no provoca alteraciones de la profase I. Asterisco: cuerpo sexual.

H&E y se comprobó que un 15 % muestra alteraciones en la forma y el tamaño de la cabeza y/o aparecen unidos entre sí (**Figura 32C**). Por lo tanto, todos estos resultados indican que la ausencia de Securina provoca la no disyunción de algunas parejas de cromátidas en anafase II y como consecuencia se generan alrededor de un 10 % de espermatozoides aneuploides y con morfología aberrante.

Caracterización de la espermatogénesis en ratones *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}*

En las células germinales primordiales de ratón, la relación estequiométrica entre Securina y Separasa es tan baja que el mecanismo principal para mantener la inhibición de Separasa es la fosforilación (Huang et al, 2008). Dado que en los testículos de ratones adultos la relación Securina/Separasa es mayor que en el embrión, que la ausencia de Securina provoca hipoplasia del testículo y que el mecanismo de inhibición de Separasa dependiente de Sgo-PP2A^{cdc55} (Clift et al, 2009) podría tener un papel importante en la gametogénesis de mamíferos, decidimos analizar en detalle la espermatogénesis de los ratones *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}*. Para ello, en primer lugar se realizó un estudio de la profase I mediante IFs frente a SYCP3 en esparcidos de espermatocitos *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}*. Los testículos de estos mutantes son aproximadamente un 88 % más pequeños que los de sus hermanos wt (**Figura 33A**).

Posteriormente, se observó que en los espermatocitos *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}* y wt tanto el ensamblaje de los AE/LEs como la sinapsis se llevan a cabo de forma similar (**Figura 33B**). Seguidamente se analizaron las divisiones meióticas mediante IFs sobre aplastados de túbulos

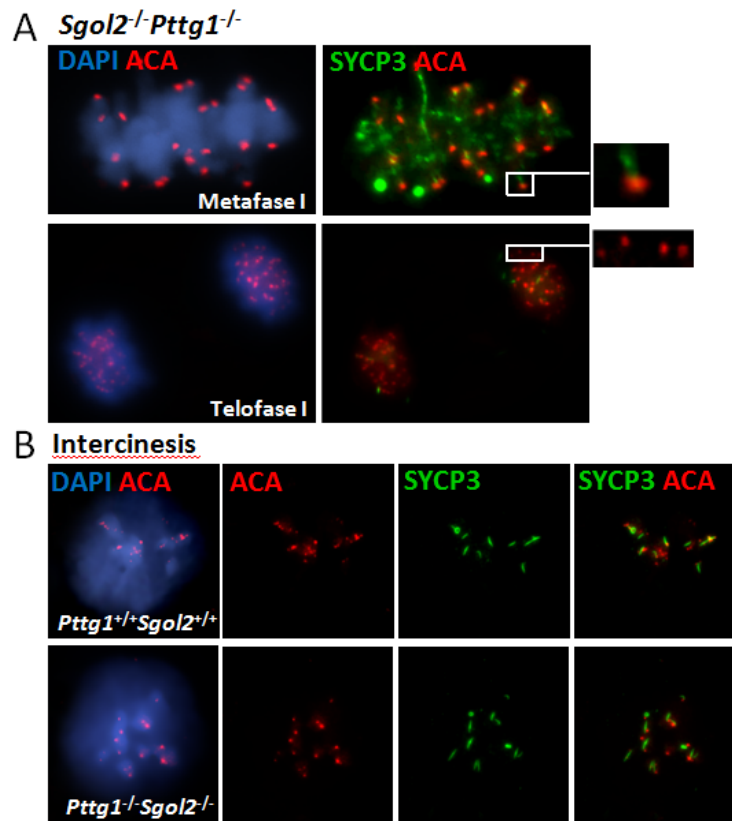


Figura 34. Estudio de la primera división meiótica en machos *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}*. IF doble frente a SYCP3 y las proteínas centroméricas en aplastados de túbulos seminíferos de ratones *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}*. **A)** Metafase I y telofase I. Los recuadros blancos indican la región ampliada a la derecha de cada imagen con los que se muestran cinetocoros hermanos íntimamente unidos en metafase I y separados prematuramente en telofase I. **B)** Las intercinesis del *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}* son similares a las wt. El DNA está teñido con DAPI.

seminíferos con un anticuerpo frente a SYCP3 y antisuero ACA. En las metafases I de ratones silvestres, SYCP3 se detecta a lo largo del dominio intercromatídico de todos los bivalentes y su señal es más intensa en la región centromérica, donde forma un cono invertido bajo los cinetocoros hermanos de cada homólogo. De forma similar, en las metafases I del ratón *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}* la señal de SYCP3 se detecta a lo largo del dominio intercromatídico. Sin embargo, la señal centromérica de SYCP3 en forma de cono se sustituye por una pequeña barrita perpendicular a los cinetocoros hermanos (**Figura 34 A**). Este fenotipo es característico de los mutantes *Sgol2^{-/-}* (Llano et al, 2008). Seguidamente, se analizaron las intercinesis del mutante

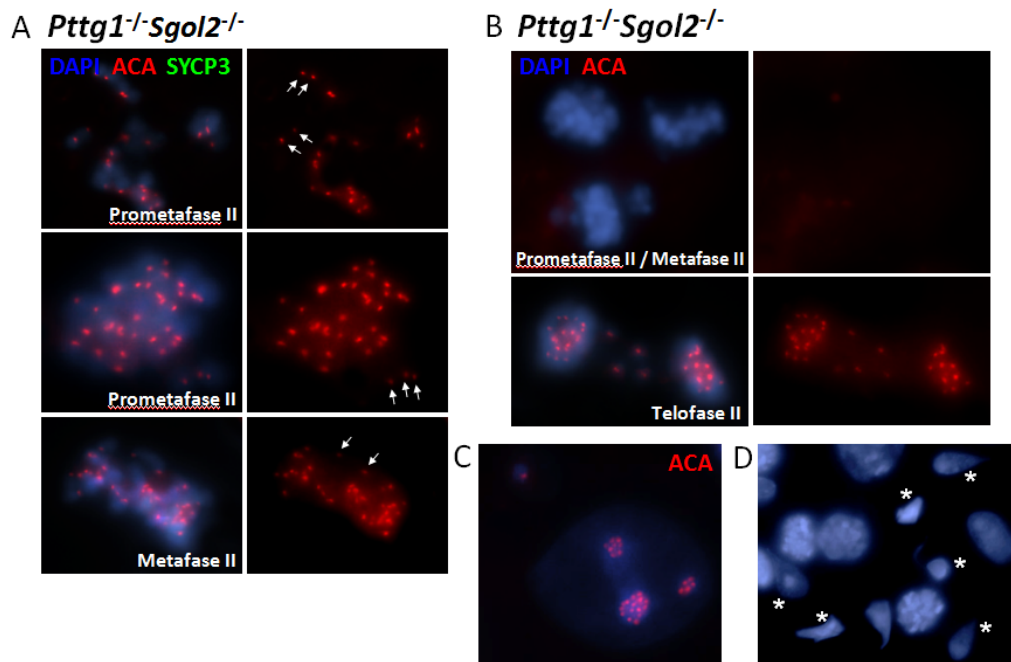


Figura 35. Análisis de la meiosis II en el mutante *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}*. IF doble con anticuerpo anti-SYCP3 y antisuero ACA sobre aplastados de túbulos seminíferos *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}*. **A)** Análisis entre prometafase y metafase II. Flechas: cromátidas hermanas separadas prematuramente. **B)** Análisis de la segunda segregación meiótica. La falta de SGOL2 provoca bloqueo y degeneración de una fracción de las metafases/anafases II, las cuales carecen de señal de ACA. El resto de las metafases II evaden el bloqueo y dan lugar a *chromosome lagging*. **C)** Espermatidas redondas aneuploides con 1 señal de ACA (izquierda) y con 28 (derecha). **D)** Espermatidas alargadas y espermatozoides con morfología aberrante (asteriscos). Todos estos defectos son característicos del ratón mutante *Sgol2^{-/-}*. Sin embargo, en estas células no se detecta señal de SYCP3, a diferencia de las metafases-anafases II del ratón *Pttg1^{-/-}*. El DNA está teñido con DAPI

Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-} y se observó que éstas no muestran las alteraciones observadas en el mutante *Pttg1^{-/-}*, sino que son similares a las de los ratones wt (**Figura 34B**). Por último, se realizó un análisis de la meiosis II en el mutante *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}*. Como se muestra en la **Figura 35A**, a diferencia del mutante *Pttg1^{-/-}*, en el doble mutante *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}* no se detecta SYCP3 ni en prometafase II ni en metafase II. No obstante, a partir de prometafase II se produce la pérdida de cohesión prematura de las cromátidas hermanas (**Figura 35B**), característica de la deficiencia en SGOL2 (Llano et al, 2008). Además, se observa que gran parte de las metafases

II del mutante *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}* degeneran, ya que pierden la señal de proteínas del cinetocoro y los cromosomas se aglomeran (**Figura 35B**). Sin embargo, algunas de estas metafases II progresan a anafases II con defectos en la segregación cromosómica (**Figura 35B**). Finalmente, se observa que los ratones doble mutantes producen espermátidas redondas, alargadas y espermatozoides, aunque las espermátidas presentan tamaños muy variables, morfologías aberrantes y son aneuploides, ya que contienen entre 1 y 40 señales de ACA (**Figura 35C-D**). Todas estas alteraciones en los espermatocitos *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}* a partir de prometafase II fueron observadas previamente en los machos *Sgol2^{-/-}* durante su caracterización (Llano et al, 2008). Todo ello indica que la espermatogénesis de los ratones *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}* presenta defectos similares a los descritos en los machos *Sgol2^{-/-}*, mientras que carece de las alteraciones que afectan a los machos *Pttg1^{-/-}* entre intercinesis y telofase II. Por ello, es probable que al menos parte de las funciones de Securina durante la intercinesis sean dependientes de complejos de cohesinas formados por REC8 o RAD21L.

DISCUSIÓN

La nueva kleisina RAD21L es específica de meiosis

En nuestro laboratorio se identificó una nueva kleisina, que por su similitud con RAD21 fue denominada RAD21L, la cual se expresa de forma abundante en testículos y en oocitos y muy ligeramente en tejidos somáticos (Gutiérrez-Caballero et al, 2011). Bioquímicamente se comprobó que RAD21L interacciona con SMC3, SMC1 α/β y con STAG3 tanto en un sistema de sobreexpresión en células 293 como en extractos de testículo de ratón (Gutiérrez-Caballero et al, 2011). Estos resultados conjuntamente con las observaciones de que RAD21L co-localiza con los AE/LEs de los meiocitos y que no aparece ni en las espermatogonias ni en células somáticas de testículos, indican que esta nueva kleisina es específica de meiosis (Gutiérrez-Caballero et al, 2011). A pesar de que la mayoría de las subunidades del complejo de cohesinas co-localizan con los AE/LEs (Pezzi et al, 2000; Prieto et al; 2002; Parra et al, 2004; Prieto et al, 2004), RAD21L es la única subunidad que, además de localizarse en los AEs/LEs desde leptotema a diplonema, ha sido detectada en la cromatina del cuerpo sexual, lo que sugiere que pueda estar implicada en su formación. En este sentido, se ha identificado recientemente en roedores la proteína del AE XLR6, la cual comparte gran similitud con SYCP3 pero cuya localización es específica del bivalente XY. XLR6 se acumula en el cuerpo sexual en paquitena, tanto en las regiones de asinapsis como formando parte del nucléolo asociado al XY, y se ha sugerido que está implicada en el MSCI (Tres, 2005; Tsutsumi et al, 2011). Al igual que XLR6 podría ser una adaptación de SYCP3 en los cromosomas sexuales, los espermatocitos podrían disponer de RAD21L para satisfacer procesos específicos relacionados con la remodelación de su cromatina y su regulación transcripcional. De forma adicional, la localización de RAD21L en la cromatina del cuerpo sexual, así como su permanencia en los centrómeros de los espermatocitos en telofase II, dos propiedades únicas de esta nueva kleisina, sugieren aunque solo sea desde un punto de vista citológico, que RAD21L pueda desempeñar funciones como una proteína individual e independiente del complejo de cohesinas al que pertenece.

Durante el transcurso de este trabajo otros dos grupos identificaron simultáneamente RAD21L (Lee & Hirano, 2011; Ishiguro et al, 2011). Ishiguro et al. concluyen que RAD21L se

elimina gradualmente de los AE/LEs de los autosomas a partir de paquitena tardía, mientras que según nuestras observaciones RAD21L desaparece de los autosomas en el momento de la desinapsis. No obstante, y coincidiendo con nuestros resultados, sostienen que RAD21L perdura en el dominio intercromatídico del XY y en los centrómeros de todos los cromosomas hasta anafase I. Por el contrario, en la IF llevada a cabo por el grupo de Hirano, RAD21L deja de observarse a partir de paquitena en los bivalentes autosómicos y en los AEs del bivalente sexual. Así mismo, es especialmente discordante con nuestros resultados la localización que este mismo grupo observa de RAD21. Mientras que en nuestras manos y otras (Prieto et al, 2002), RAD21 se localiza en los AEs/LEs durante toda la profase (de leptotena a diplotena) coincidiendo por tanto con RAD21L y REC8, el grupo de Hirano sólo detecta RAD21 desde paquitena hasta diacinesis. Teniendo en cuenta, además, que este mismo laboratorio detecta RAD21L solo en las primeras etapas de la profase (de leptotena a zigotena), concluyen que RAD21L sustituye a RAD21 entre leptotena y paquitena tardía para promover la recombinación entre homólogos y no entre cromátidas hermanas (Lee & Hirano, 2011). De forma adicional, ambos grupos muestran que RAD21L, REC8 y RAD21 se localizan de forma discontinua a lo largo de los AE/LEs, sin solaparse (Lee & Hirano, 2011; Ishiguro et al, 2011). Esta observación ha dado lugar al grupo de Watanabe a postular un modelo en “código de barras”, en el cual los distintos complejos de cohesinas se distribuyen por el cromosoma de forma alterna y discreta promoviendo el apareamiento. Independientemente de la localización de cada una de las kleisinas en el espacio a lo largo de los AE/LEs de los espermatozoides, la señal que nosotros detectamos de RAD21L, REC8 y RAD21 a lo largo de los AE/LEs se mantiene desde de leptotena a diplotena. Por otra parte, y en lo que a la alternancia de las tres kleisinas a lo largo de los AE/LEs se refiere, nunca hemos observado una localización discontinua, aunque dado que todos los anticuerpos que hemos utilizado han sido generados en conejo, no se ha podido analizar su co-localización de forma simultánea. En cualquier caso, y dada la controversia generada, se testó y corroboró, mediante el empleo de ratones nulos y/o de vectores de expresión en transfecciones transitorias en células 293, que los anticuerpos empleados contra las tres kleisinas son específicos de cada una de ellas, lo que sustenta nuestras conclusiones (Herrán et al, 2011). De cualquier forma, todas estas discrepancias entre los tres grupos son difíciles de explicar y pueden deberse a que cada anticuerpo reconozca distintas

conformaciones de su antígeno y/o a diferencias metodológicas en el procesamiento de los espermatoцитos o en la composición del fijador.

RAD21L es esencial para la espermatogénesis del ratón

Con el fin de abordar la función que desempeña *in vivo* la nueva kleisina RAD21L, se generaron dos ratones deficientes para RAD21L, uno constitutivo y otro condicional. Los resultados obtenidos en ambos modelos mostraron que RAD21L es prescindible para el desarrollo embrionario y la supervivencia del ratón. Sin embargo, los ratones machos resultaron ser estériles. Dicha esterilidad no se debió a defectos en la proliferación de las espermatogonias o a defectos en los túbulos seminíferos, sino a un bloqueo de la espermatogénesis en zigotena. La manifestación histológica de este bloqueo en la sección de un tubo seminífero es un arresto de la espermatogénesis en estadio epitelial IV. Este tipo de bloqueo es característico de modelos murinos en los que la pérdida de función de la proteína impide completar los procesos meióticos de sinapsis, reparación y/o recombinación, lo que provoca la apoptosis masiva de los espermatoцитos y la esterilidad del ratón (Pitmann et al, 1998; Yoshida et al, 1998; de Vries et al, 1999; Edelman et al, 1999; Baudat et al, 2000; Romanienko & Camerini-Otero, 2000; Ahmed et al, 2007).

Los meiocitos de levaduras con defectos en sinapsis y recombinación evaden el bloqueo de paquitena en ausencia de las proteínas Pch1, Pch2 (San-Segundo & Roeder, 1999; 2000), Mek1 y Red1 (Bailis et al, 2000), lo que avala su consideración como un auténtico *checkpoint*. En mamíferos, sin embargo, hasta la fecha no se han identificado proteínas cuya deficiencia evada el frecuente bloqueo que se produce en paquitena, por lo que de forma estricta no se puede hablar de *checkpoint* de paquitena. A pesar de ello, en el ratón, ATR y TOPBP1 podrían estar implicadas en la maquinaria que monitoriza la recombinación y en la promoción del bloqueo de paquitena, ya que en zigotena ambas co-localizan en regiones asinapsadas y con DSBs. Además, en un modelo de ratón con asinapsis, TOPBP1 aparece acumulada en los AEs asinapsados de las paquinemas (Perera et al, 2004). En este sentido, TOPBP1 y ATR se localizan en los AEs de los espermatoцитos deficientes en RAD21L

bloqueados en zigotena. Esta acumulación de ambas proteínas podría ser, por tanto, el mecanismo responsable de la activación del bloqueo de la espermatogénesis que tiene lugar en los espermatoцитos *Rad21^{-/-}* a través del mal llamado *checkpoint* de paquitena, el cual se corresponde con el estadio epitelial IV. De forma adicional, dada la supuesta implicación de ATR, TOPBP1 y γ H2AX en el MSCI (Ichijima et al, 2011; Fernandez-Capetillo et al, 2003), las alteraciones en su reclutamiento en el bivalente XY provocadas por los defectos de sinapsis en ausencia de RAD21L podrían también cooperar en el bloqueo (Burgoyne et al, 2009).

RAD21L es dispensable para la generación de DSBs

Al inicio de la profase I del ratón, la endonucleasa SPO11 produce DSBs imprescindibles para el inicio de la recombinación y la sinapsis entre los homólogos (Keeney et al, 1997; Baudat et al, 2000). Seguidamente, se activa la transducción de la señal en respuesta a daño en el DNA dependiente de la quinasa ATM y como consecuencia la histona H2AX es fosforilada, localizándose en las DSBs. Ello promueve el reclutamiento de múltiples proteínas de reparación (Mahadevaiah et al, 2001; Bellani et al, 2005). El hecho de que la señal de γ H2AX sea similar en leptoneemas wt y *Rad21^{-/-}*, sugiere que RAD21L es dispensable para la inducción del programa de DSBs mediado por SPO11 y la activación de la ruta de reparación dependiente de ATM (Romanienko & Camerini-Otero, 2000; Bellani et al, 2005). Además, la reducción de la señal de γ H2AX en los espermatoцитos bloqueados más avanzados citológicamente, frente a los bloqueados en un estadio más temprano (zigotena temprana vs zigotena tardía) sugiere que RAD21L no es esencial para el inicio de la reparación de las DSBs.

RAD21L no es esencial para el inicio de la recombinación

Para que las DSBs puedan ser reparadas por recombinación homóloga es necesaria la resección en los extremos 5', de forma que los extremos 3' quedan como hebras simples. Esto garantiza la unión de las proteínas de recombinación RAD51/DCM1 a los extremos 3', las cuales reconocen hebras simples de DNA y promueven la invasión del cromosoma homólogo,

dando lugar a los denominados nódulos de recombinación tempranos (Moens et al, 1997; Mimitou and Symington, 2009). A medida que avanza la profase, algunos de estos nódulos tempranos maduran a nódulos de transición, caracterizados por la presencia de las proteínas de reparación RPA y MSH4 (Moens et al, 2002). Finalmente, en paquitena sólo un pequeño porcentaje de los nódulos de transición se convierten en nódulos de recombinación, caracterizados por la presencia de MLH1 en los futuros quiasmas (Moens et al, 2007). La persistente localización de RAD51 y RPA en los AE/LEs de los espermatocitos deficientes en RAD21L, sugiere que los nódulos de recombinación tempranos y de transición son capaces de formarse. Sin embargo, la ausencia de MLH1 indica que la recombinación no se completa. De forma similar, los espermatocitos deficientes en las cohesinas meióticas REC8 y SMC1 β (Revenkova et al, 2004; Xu et al, 2005), en proteínas del SC (de Vries et al, 2005; Shin et al, 2010; Kouznetsova et al, 2011; Schramm et al, 2011) y en otras proteínas de reparación (Xu et al, 2003; Roig et al, 2010) tampoco forman focos de MLH1. Por el contrario, y a diferencia de los machos, las hembras deficientes en algunas de estas proteínas como SMC1 β , SYCP3 o BRCA1 sí son capaces de progresar a través de la profase para, finalmente, formar quiasmas (Revenkova et al, 2004; Yuan et al, 2002; Xu et al, 2003). Por tanto, es posible que todas estas proteínas no sean esenciales para la formación de los quiasmas y que en los machos, dado el dimorfismo sexual existente en los niveles de control de calidad de la gametogénesis (Morelli & Cohen, 2005), MLH1 no se detecte porque el bloqueo en estadio IV es anterior a su carga en paquitena (Ashley et al, 2001). Para poder responder a esta pregunta en nuestro mutante, se cultivaron los espermatocitos deficientes en RAD21L en presencia de ácido okadaico, lo que permite desbloquear la espermatogénesis *in vitro*. Los resultados que se obtuvieron mostraron una ausencia de quiasmas en las metafases *Rad21L*^{-/-}, lo que sugiere que RAD21L es probablemente necesaria para la progresión adecuada de la profase y la resolución de la recombinación. En consecuencia, RAD21L podría ser indispensable para la primera segregación meiótica de los machos, ya que los quiasmas son necesarios para el alineamiento de las cromosomas en metafase I y la segregación equitativa en anafase I (Eaker et al, 2002). Por el contrario, RAD21L no es esencial en los oocitos, ni para la formación de los quiasmas ni para la primera segregación cromosómica, ya que las hembras mutantes son fértiles.

RAD21L no promueve la cohesión de cromátidas hermanas

Para abordar si RAD21L participa en la cohesión de las cromátidas hermanas en metafases I se empleó el modelo *in vitro* de desbloqueo con ácido okadaico. Los resultados que se obtuvieron mostraron metafases I caracterizadas por la presencia de 40 univalentes, las cuales presentaron además marcaje de REC8 en sus centrómeros, lo que sugiere que RAD21L es prescindible para mantener la cohesión. De acuerdo con ello, los oocitos de las hembras mutantes de RAD21L no presentaron defectos de cohesión centromérica.

La espermatogénesis de los ratones deficientes en REC8 no ha podido ser analizada para la pérdida de cohesión centromérica debido a su bloqueo en estadio IV y a la ausencia de estudios *in vitro* de desbloqueo. De igual manera, en la oogenesis de las ratonas deficientes en REC8 no se han analizado los posibles defectos en cohesión por la existencia de un bloqueo en profase que da lugar a atrofia de los ovarios (Xu et al, 2005). Pese a ello, estudios indirectos y citológicos indican firmemente, aunque no lo demuestran, que REC8 es la kleisina responsable de mantener la cohesión centromérica en la meiosis de mamíferos (Revenkova et al, 2004; Lee et al, 2008; Llano et al, 2008; Tachibana-Konwalski et al, 2010).

El análisis de los ratones deficientes en SMC1 β , la otra cohesina analizada funcionalmente en el ratón, ha permitido profundizar en la participación de esta cohesina en la cohesión de las cromátidas hermanas. Así, el desbloqueo de los espermatoцитos *Smc1 β ^{-/-}* con ácido okadaico da lugar a una fracción de células con univalentes formados por 80 cromátidas sueltas y sin señal centromérica de REC8 (Revenkova et al, 2004). De forma similar, los oocitos deficientes en SMC1 β presentan pérdida de cohesión prematura y esterilidad (Revenkova et al, 2004). Por tanto, los complejos de cohesinas meióticas encargados de la cohesión hasta metafase II estarían formados por REC8 y SMC1 β .

La pérdida de RAD21L provoca defectos en la carga de SMC1 α y STAG3 en los espermatocitos

La deficiencia observada en la carga de la subunidad STAG3 y en menor medida de SMC1 α en los AE/LEs de espermatocitos deficientes en RAD21L, constituye la mejor prueba de que esta nueva kleisina está formando *in vivo* complejos de cohesinas específicos con estas subunidades. La ausencia de defectos en la carga de SMC1 β sugiere, por tanto, que esta subunidad tiene una mayor versatilidad en su capacidad para formar complejos con las otras dos kleisinas, pese a que se ha descrito *in vitro* que RAD21L interacciona de forma similar con SMC1 α y SMC1 β (Gutiérrez-Caballero et al, 2011). De acuerdo con ello, es probable que la mayoría de los complejos de cohesinas en los que RAD21L está presente estén formados por SMC1 α , STAG3 y SMC3, de modo que la falta de RAD21L perturbaría la carga del resto de subunidades y/o su estabilidad en el DNA, o al menos las de las subunidades SMC1 α y STAG3. Además, el hecho de que en los espermatocitos bloqueados no se produzca un incremento en la señal de RAD21 y REC8 sugiere que la deficiencia de RAD21L no se compensa con otros complejos de cohesinas formados por las otras dos kleisinas.

En los oocitos, es de destacar sin embargo, que la falta de RAD21L no altera la carga de SMC1 α ni de STAG3. La posible explicación para este hecho, no es fácil, y menos aun, testarla experimentalmente. Una posibilidad es que en los oocitos, STAG3 no sea la subunidad HEAT preferente de RAD21L en el complejo o bien que la mayoría de los complejos de cohesinas meióticos estén formados por REC8 y SMC1 β , aunque, en este caso sería difícil de explicar que el marcaje de RAD21L en los AEs de los oocitos sea similar al de los espermatocitos. Finalmente, puede asimismo especularse con la posibilidad de que en los cromosomas de oocitos, RAD21L no este acompañada con ninguna subunidad STAG o yendo aun más lejos, que no se encuentre formando un complejo canónico de cohesinas con el resto de subunidades.

RAD21L produce esterilidad precoz en las hembras

La deficiencia de RAD21L provoca una reducción en la dotación de oocitos primarios, lo cual podría explicar la esterilidad precoz de las hembras mutantes. A pesar de que RAD21L

es dispensable para la sinapsis, la disminución de folículos primordiales observada podría deberse a defectos en este proceso, ya que el 70 % de los oocitos mostró SC discontinuos y ausencia de SYCP1 en algunas regiones con sinapsis, frente al 12 % de los wt. A pesar de que los mecanismos de control de calidad de la ovogénesis se consideran tolerantes en comparación con los mecanismos mucho más exigentes de la espermatogénesis (Hunt & Hassold, 2002; Cohen et al, 2006; Kolano et al, 2012), los oocitos con defectos son eliminados, ya que las hembras mutantes de 6 días sólo presentan un 25 % de los oocitos esperados para su edad. Previamente se ha descrito que para que se lleve a cabo el MSUC en los oocitos, los defectos de asinapsis no deben afectar a más del 10 % de sus LEs, porque de lo contrario la concentración necesaria de BRCA1 para inducir el silenciamiento no es suficiente debido a su reclutamiento en las regiones asinapsadas (Kouznetsova et al, 2009). Por tanto y dado que los oocitos mutantes mostraron sólo ligeros defectos de sinapsis, es probable que estos se eliminen por el MSUC en paquitena. De cualquier forma y aunque RAD21L co-localice con los AE/LEs en oocitos (Gutiérrez-Caballero et al, 2011; Ishiguro et al, 2011, este trabajo) y esté implicada en la formación del SC, atendiendo a nuestros resultados, esta kleisina parece desempeñar funciones menos importantes en la ovogénesis que en la espermatogénesis. Una posible explicación podría ser que la función de RAD21L este parcialmente remplazada por REC8 o RAD21, las cuales co-localizan también en los AEs en los oocitos (Lee et al, 2008). Otra posible explicación, que no excluye necesariamente a la primera, radicaría en la función que RAD21L pueda desempeñar en la inactivación del bivalente XY, dando lugar al cuerpo sexual. Por tanto, en la ovogénesis la presencia de un bivalente formado por dos cromosomas X, cuyo comportamiento es similar al del resto de bivalentes autosómicos en cuanto a sinapsis y a la ausencia de MSIC se refiere (Royo et al, 2010), no exigiría la actuación de RAD21L.

Otras posibles funciones de RAD21L

Dado que las cohesinas están implicadas en el la regulación transcripcional (Poleshko et al, 2010; Nitzsche et al, 2011; Remeseiro et al, 2012), que los espermatoцитos presentan una actividad transcripcional muy baja desde el inicio de zigotena hasta la mitad de paquitena (Kierszenbaum & Tres, 1974) y que la intensidad de señal de RAD21L en AE/LEs de los

bivalentes autosómicos es máxima entre estas dos etapas, RAD21L podría estar implicada en la reducción transcripcional de los bivalentes autosómicos. De manera similar, podría también participar en el silenciamiento del cuerpo sexual entre mitad y final de paquitena, dada su localización en la cromatina y en los AE/LEs del bivalente XY durante estas mismas etapas. Recientemente se ha propuesto que la proteína MDC1 (Mediator of DNA Checkpoint 1) actuaría en la formación del cuerpo sexual en ratón y en el silenciamiento de los cromosomas XY mediante la dispersión del complejo ATR-TOPBP1 desde el AE del XY a la cromatina del cuerpo sexual. Así, la ausencia de esta proteína provoca un bloqueo de la espermatogénesis a mitad de paquitena con reclutamiento de γ H2AX, TOPBP1 y ATR a los AE/LEs del XY únicamente y no a su cromatina. Esto ha sugerido que MDC1 sea esencial para la señalización del MSCI a través del esparcimiento del complejo ATR-TOPBP1 a la cromatina del cuerpo sexual y la subsecuente fosforilación por este complejo de H2AX (Ichijima et al, 2011). Por ello y para abordar la posible función de RAD21L en el MSCI, una primera aproximación podría ser el estudio de su dinámica en espermatoцитos deficientes en MDC1, con el fin de determinar si se produce una reducción de su carga en el cuerpo sexual, como ocurre con las proteínas γ H2AX, TOPBP1 y ATR. De forma adicional, el hecho de que a partir de diplotena RAD21L se realice en los centrómeros de todos los bivalentes coincidiendo con H3K9me3 (Page et al, 2012), la cual está vinculada a la formación de la heterocromatina (Cowell et al, 2002), sugiere que RAD21L podría, así mismo, participar en dicho proceso.

Finalmente, otra posible función en la que podría participar RAD21L estaría relacionada con la supuesta implicación del complejo de cohesinas en la carga de la proteína protectora de la cohesión Shugoshina-like-2 (SGOL2). En este sentido, se ha reportado que la ausencia de SMC1 β provoca una reducción en la carga de SGOL2 en los centrómeros de los oocitos de ratón (Lister et al, 2010). Teniendo en cuenta que el patrón de localización de RAD21L en los centrómeros de las diplomemas, su enriquecimiento en los centrómeros del cromosoma Y en metafase I y que su distribución centromérica en metafase II es muy similar al de SGOL2 y MCAK, la función centromérica que RAD21L desempeña podría ser colaborando en el reclutamiento de SGOL2 y de forma más general, en la organización del dominio interno del centrómero de los cromosomas de los espermatoцитos.

La localización centrómerica de RAD21L en meiosis es dependiente de SGOL2

El hecho de que SGOL2 proteja los complejos de cohesinas centroméricos en meiosis (Lee et al, 2008), junto con que hayamos observado RAD21L en los centrómeros en las dos divisiones meióticas, nos indujeron a pensar que esta shugoshina también podría proteger a RAD21L. Para abordarlo, se llevó a cabo un estudio de RAD21L en metafases meióticas de ratones *Sgol2^{-/-}Rec8-myc*, generados a partir de cruzamientos entre ratones *Sgol2^{+/-}* y ratones transgénicos para *Rec8-myc*. De esta forma se observó que en ausencia de SGOL2, la señal de RAD21L es menos intensa de lo esperado en metafase I y desaparece precozmente en metafase II, en vez de mantenerse en los centrómeros hasta telofase II. Dado que en nuestro laboratorio se ha comprobado mediante un ensayo TNT (un sistema de transcripción / traducción *in vitro*) que RAD21L es susceptible al corte por Separasa, SGOL2 podría ser necesaria para evitar la degradación prematura de RAD21L en anafase I, como lo es para REC8 (Lee et al, 2008). No obstante, esto explicaría la desaparición de RAD21L en metafase II, pero no su reducción en metafase I. La parcial deslocalización de RAD21L de los centromeros en metafase I en ausencia de SGOL2, podría ser explicada considerando que SGOL2 participa en la organización de los centrómeros en diplotena, primer momento en el que SGOL2 se detecta en los espermatoцитos (Gómez et al, 2007). De forma similar, en esta misma etapa RAD21L se empieza a acumular en los centrómeros, al igual que SYCP3 (Parra et al, 2004), la cual sufre también una reducción en los centrómeros de las metafase I *Sgol2^{-/-}* (Llano et al, 2008). Por tanto, la carga de RAD21L y SYCP3 en los centrómeros podría ser dependiente de SGOL2 y además, la de RAD21L y SGOL2 podrían ser interdependientes.

Al contrario que en los machos, RAD21L y SYCP3 están ausentes de los centrómeros de los cromosomas de los oocitos en metafase I. Este dimorfismo sexual podría estar causado por el post-bloqueo de la profase I específico de la oogenesis que tiene lugar en dictiata (entre diplotena y diacinesis). A pesar de que el estado de dictiata se considera un lapso de inactividad para el oocito hasta la ovulación, en realidad es un periodo transcripcionalmente activo, al contrario que los estadios anteriores entre zigotena y paquitena, principalmente

durante el crecimiento y la foliculogénesis (Hyttel & Madsen, 1987). Esto nos sugiere que la descarga irreversible de proteínas que formaban parte de los AE/LEs como SYCP3 y RAD21L, que tiene lugar durante este periodo, se produce como consecuencia de la reorganización y des-condensación de la cromatina, necesario para su transcripción (Voronina & Wessel, 2003). La recondensación que tiene lugar en diacinesis previa a metafase I se produce partiendo de un estadio (dictiata) en el que los LEs del SC están ausentes, lo que imposibilita la relocalización centromérica que tiene lugar durante la diacinesis de los espermatocitos (este trabajo; Parra et al, 2004).

Los ratones *Rad21^{ΔΔ}* fenocopian la esterilidad de los *Rad21^{fl/fl}*

El bloqueo que sufren los espermatocitos *Rad21^{fl/fl}* en zigotena nos impidió determinar las posibles funciones que RAD21L lleva a cabo en estadios posteriores. Dada su localización en los centrómeros de los cromosomas en las dos divisiones meióticas, la pérdida de RAD21L podría provocar alteraciones en la segregación cromosómica que den lugar a otros problemas reproductivos menos severos que la azoospermia. Por ello, decidimos generar un alelo condicional de RAD21L que nos permitiese eliminar RAD21L ulteriormente al bloqueo de paquitena. Como paso previo, se comprobó que los ratones *Rad21^{ΔΔ}*, *knock-out* constitutivos, generados mediante cruzamientos con la cepa delecionadora *Sox2Cre*, fenocopiaban a los *Rad21^{fl/fl}* previamente desarrollados. Una vez confirmada la nulidad y equivalencia del nuevo alelo, se procedió a la generación de un ratón mutante condicional mediante cruzamientos de los ratones *Rad21^{loxP-E3-loxP/Δ}* con ratones *Spo11-Cre*, un transgénico que expresa la recombinasa Cre bajo el promotor de *Spo11* y cuya expresión más elevada se produce en paquitena (Pellegrini et al, 2011). En la actualidad se está llevando a homocigosis la mutación condicional en presencia del transgen.

RAD21L y fertilidad humana

Como ocurre en los ratones, la pérdida de RAD21L podría ser responsable de problemas de fertilidad en humanos y permanecer silenciada hasta la aparición de la

esterilidad, dada su aparente dispensabilidad somática. La pérdida de función de esta kleisina en humanos provocaría muy probablemente esterilidad masculina por azoospermia, dada la conservación de los procesos reproductivos fundamentales entre ratón y humanos (Liska, 2003; Yan, 2009). Además, de producirse, la existencia de otro tipo de mutaciones que sólo causen una pérdida parcial de su función podría provocar alteraciones sutiles en la segregación cromosómica durante las divisiones meióticas dando lugar a la producción de gametos aberrantes. En el caso de la reproducción femenina, la falta de RAD21L podría ser la responsable de algunos casos de menopausia precoz vinculados a una reducción en el número de ovocitos (Goswami & Conway, 2005). En cuanto a las aneuploidías asociadas a la edad, uno de los problemas reproductivos mas importantes en salud pública, parece poco probable que esta kleisina pueda tener una implicación directa (Hodges et al, 2005), ya que si en humanos RAD21L se comporta de forma similar que en el ratón, ésta desaparece después de la profase I y probablemente no participe en la formación de los quiasmas ni en la cinética cromosómica.

Los complejos de cohesinas meióticas son esenciales para la formación del AE

En levaduras, la pérdida de Rec8 o de Smc3 (Klein et al, 1999) y mas recientemente en *C. elegans* la pérdida simultánea de sus tres kleisinas meióticas Rec8, COH-3 y COH-4 (Severson et al, 2009), impide el ensamblaje del AE. Por el contrario, en mamíferos, dado que los mutantes murinos de REC8 y SMC1 β son capaces de ensamblar sus AE/LEs hasta paquitena temprana, se ha considerado que los complejos de cohesinas no son esenciales para ello y por tanto, su función meiótica no estaría conservada en todos los eucariotas (Revenkova et al, 2004; Xu et al, 2005). La identificación durante este trabajo de una nueva kleisina meiótica con funciones esenciales durante la gametogenesis nos permitió la posibilidad de testar experimentalmente esta presunción. Para ello, mediante cruzamientos genéticos se generaron ratones doble mutantes para REC8 y RAD21L. La eliminación de los complejos de cohesinas meióticos resultante provocó un bloqueo de la espermatogénesis en leptotena, que se reflejó histológicamente en un estadio del desarrollo epitelial IV. Los espermaticitos resultantes presentaron incapacidad para ensamblar sus AEs. Además, los espermaticitos

dKO-kls únicamente presentaron señal de RAD21 con intensidad comparable a la de los mutantes sencillos, mientras que no se detectó señal para las restantes subunidades meióticas del complejo de cohesinas SMC1 β y STAG3. Estas observaciones conjuntamente con que SYCP2 y SYCP3 son prescindibles para que SYCP1 se ensamble (Yuan et al, 2000; Peltari et al, 2001; Yang et al, 2006) y viceversa (de Vries et al, 2005), sugieren que en mamíferos los complejos de cohesinas serían esenciales para el ensamblaje de los elementos estructurales SYCP3 y SYCP2 de los AEs. Por tanto y dado que la eliminación simultánea de SYCP3 y SYCP1 no imposibilita la carga de las cohesinas meióticas SMC1 β , REC8 y STAG3 en las estructuras axiales residuales (Kouznetsova et al, 2011), los complejos de cohesinas meióticos de mamíferos no sólo forman parte del SC, sino que son la estructura principal del mismo.

Los complejos de cohesinas meióticos son prescindibles para la cohesión

Los complejos de cohesinas son esenciales para el establecimiento de la cohesión en fase S y su mantenimiento hasta anafase (Sumara et al, 2000; Waizenegger et al, 2000; Uhlmann, 2003). En consecuencia, la pérdida de dos de sus tres kleisinias podría afectar al establecimiento de la cohesión y a su mantenimiento en los meiocitos o a la replicación de los pre-meiocitos. Sin embargo, y como se demostró con la presencia de la población 4n de espermatoцитos mediante el análisis por FACs de las poblaciones celulares de los tubulos seminíferos del doble mutante, la ablación genética de los complejos de cohesinas meióticos no impide la replicación del DNA en los pre-meiocitos. Asimismo, mediante FISH con dos sondas pericentroméricas del X y del Y se descartó que hubiese pérdida de cohesión de las cromátidas hermanas en los espermatoцитos bloqueados. Estos resultados concuerdan con que RAD21L no forma parte de los complejos de cohesinas implicados en cohesión y con que los espermatoцитos bloqueados *Rec8^{-/-}* no presenten más de 40 señales centroméricas (Bannister et al, 2004; Xu et al, 2005). Por tanto, aunque REC8 y SMC1 β mantengan la cohesión centromérica en meiosis, es posible que éstas no establezcan cohesión hasta después de paquitena, ya que los espermatoцитos bloqueados *Smc1 β ^{-/-}*, al igual que los *Rec8^{-/-}*, tampoco muestran más de 40 señales centroméricas (Revenkova et al, 2004). Por otra parte, en el caso de que en mamíferos se produzca un apareamiento entre cromátidas similar al apareamiento

somático que tiene lugar entre homólogos en células meióticas tempranas de levaduras (Brar et al., 2009), imposibilitaría distinguir la pérdida de cohesión en un bloqueo tan prematuro como leptotena.

El inicio de la recombinación homóloga es dependiente de los complejos de cohesinas meióticas

Dado que los procesos de recombinación meiótica se encuentran estrechamente relacionados con el ensamblaje de los AE/LEs, se abordó su estudio haciendo uso del mutante deficiente en kleisin meióticas. El análisis de los DSBs en los meiocitos del dKO-cls medido indirectamente a través de la IF con γ H2AX, reveló una intensidad fluorescente similar a la de un meiocito silvestre. Por tanto, esta observación constituye la primera evidencia de que los complejos de cohesinas meióticas de mamíferos son prescindibles para la función de SPO11 al inicio de la meiosis. Esto coincide con la observación citológica de que las DSBs en los espermatoцитos de ratón se generen antes de que las cohesinas sean detectadas a lo largo de los AEs (Mahadevaiah et al, 2001). Seguidamente, analizamos la carga de las proteínas que integran la maquinaria de recombinación temprana e intermedia en ausencia de cohesinas meióticas. Los análisis por IF llevados a cabo en los espermatoцитos bloqueados dKO-cls mostraron un menor número de focos de RAD51 que en los wt, pero igual número de focos de DMC1, probablemente debido a defectos en el inicio de la recombinación homóloga. Ambas proteínas, RAD51 y DMC1, son las dos recombinasas que forman los filamentos de nucleoproteínas que inician la invasión del cromosoma homólogo y la recombinación en meiosis (Tarsounas et al, 1999). Por tanto, el hecho de que DMC1 no esté alterada sugiere que ambas recombinasas están reguladas por mecanismos diferentes que pueden ser genéticamente diseccionados. Además, la presencia de focos de DMC1 en ausencia de cohesinas meióticas es una prueba indirecta de que las DSBs que se observan en los espermatoцитos bloqueados se llevaron a cabo de forma específica por la endonucleasa SPO11.

A pesar de que RPA es una proteína característica de nódulos intermedios, los cuales aparecen en estadios meióticos más avanzados que leptotena (Ashley et al, 2004), los espermatoцитos dKO-klf presentaron un mayor número de focos de RPA que los wt. Esta acumulación prematura de RPA puede ser debida a que el defecto en la carga de RAD51 en los extremos 3' provoque su acumulación, ya que RPA se une a los extremos 3' justo después de la resección y rápidamente es desplazada por RAD52 para permitir la unión de RAD51 a RAD52 en esas regiones (Summers et al, 2011). De forma similar, en otros mutantes con pérdida de función de proteínas de reparación/recombinación como TRIP13/PCH2, TEX15 y BRCA2 también se ha descrito una reducción de RAD51 y un incremento de RPA en los espermatoцитos (Roig et al, 2010; Yang et al, 2008; Sharan et al, 2004). Por tanto, la carga de RAD51 en las DSBs podría ser dependiente de otras proteínas de reparación/recombinación y éstas a su vez depender de las cohesinas meióticas.

El bloqueo en estadio IV es independiente del estadio citológico de los espermatoцитos

La deficiencia simultanea de RAD21L y REC8 provoca un bloqueo de la meiosis en estadio epitelial IV y el arresto de los espermatoцитos en el estadio citológico de leptotena. Este arresto es el más temprano descrito hasta la fecha en modelos de ratones con pérdida de función de cohesinas (Revenkova et al, 2004; Xu et al, 2005), proteínas del SC (Yuan et al, 2000; de Vries et al, 2005; Yang et al, 2006; Shin et al, 2010) o proteínas de reparación/recombinación (de Vries et al, 1999; Pittman et al, 1998). Sin embargo, independientemente de que el arresto meiótico tenga lugar en leptotena, zigotena (Yoshida et al, 1998; de Vries et al, 1999) o paquitena (Baudat et al, 2000; Schramm et al, 2011), la eliminación de los espermatoцитos mutantes bloqueados por apoptosis siempre se produce en el estadio IV. En este sentido, la visión más aceptada defiende que los meiocitos cuentan con un mecanismo de regulación autónomo que induce la entrada en apoptosis si en paquitena el espermatoцитo tiene defectos de sinapsis que bloquean la formación del cuerpo sexual. En referencia a esto, se ha postulado que defectos en el MSC1 podrían ser los responsables de la eliminación de los espermatoцитos bloqueados en estadio IV, debido a que la no inactivación

del cromosoma Y conlleva la expresión de genes proapoptóticos presentes en este cromosoma, lo que induciría la entrada en apoptosis (Burgoyne et al, 2009, Royo et al, 2010, Vernet et al, 2011). Alternativamente, puede también pensarse que las señales que inducen la entrada en apoptosis no dependan exclusivamente del espermatozoido. Dado que la espermatogénesis tiene lugar a expensas de las células de Sertoli (Mancini et al, 1967), es posible que éstas participen en el control de calidad que tiene lugar durante la espermatogénesis y/o que el estadio IV sea el momento en el cual se requiera un intercambio de señales entre el espermatozoido y la célula de Sertoli para proseguir con su maduración, de tal forma que los espermatozoidos bloqueados sean incapaces de responder a dichas señales, lo que dispararía su entrada en apoptosis (Barchi et al, 2005).

SGOL2 no es esencial en ausencia de Securina

En mamíferos, Securina es prescindible para la cohesión de células somáticas y para la supervivencia del organismo (Mei et al, 2001; Wang et al, 2001; Pflieger et al, 2005), a pesar de que por su función como inhibidor de Separasa hasta anafase podría pensarse que es esencial (Ciosk et al, 1998; Waizenegger et al, 2000; Nagao et al, 2004). En *S. cerevisiae*, Securina tampoco es esencial para la vida (Yamamoto et al, 1996). Además, en este organismo Separasa está regulada por otro mecanismo de inhibición independiente de Securina mediado por Sugoshina-1 y PP2A^{cdc55} (Clift et al, 2009). Teniendo en cuenta este doble mecanismo de regulación, se abordó el desarrollo de un ratón doble mutante para SGOL2 y Securina en busca de un posible mecanismo de inhibición similar en el ratón. Sin embargo, la pérdida simultánea de ambas proteínas no provocó letalidad ni defectos fenotípicos severos, lo que sugiere que SGOL2 no está inhibiendo a Separasa en células somáticas de ratón. Por tanto, Separasa se encontraría regulada por los dos mecanismos previamente conocidos; a través de su inhibidor Securina, y por fosforilación de sus residuos Ser 1121 y Thr 1341 dependiente del complejo CDK1/Ciclina B (Stemmann et al, 2001; Gorr et al, 2005), aunque en las células germinales primordiales del ratón se ha reportado que la inhibición de Separasa se lleva a cabo sólo por fosforilación (Huang et al, 2008).

Los machos *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}* muestran los mismos defectos en la espermatogénesis que los *Sgol2^{-/-}*

Los ratones *Sgol2^{-/-}* y *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}* generados mediante cruzamientos genéticos de los mutantes sencillos fueron aparentemente normales aunque presentaron infertilidad (Llano et al, 2008). En ausencia de SGOL2, los complejos de cohesinas centroméricas son eliminados prematuramente por Separasa en anafase I. En consecuencia, en metafase II las cromátidas hermanas carecen de la cohesión centromérica, lo que da lugar a una ausencia de tensión que impide que los cromosomas se alineen en placa (Bernard et al, 2001; Kitajima et al, 2004; Rabitsch et al, 2004). Como consecuencia, en las metafases II de estos mutantes las proteínas del SAC BUBR1, implicada en la activación del MCC (Chao et al, 2012) y CENP-E, que estabiliza los microtúbulos capturados por los cinetocoros (Parra et al, 2002; Weaver et al, 2003), se mantienen localizadas en los centrómeros. A pesar de esta activación crónica del SAC, casi la mitad de los espermatoцитos sobrepasan el bloqueo y tras una anafase II aberrante finalmente dan lugar a espermatozoides morfológicamente normales, pero con un contenido cromosómico casi aleatorio (1 a 40 cromátidas) (Llano et al, 2008). De igual forma, la ausencia de Securina en un fondo genético nulo para SGOL2 provocó pérdida de cohesión en metafase II que dio lugar a anafases/telofases II con retrasos de los cromosomas, a un reparto no equitativo del material genético y finalmente a gametos aneuploides. A pesar de que por azar estos mutantes puedan producir espermatozoides euploides, su proporción probablemente sea tan baja que la probabilidad de que fecunden un óvulo es casi nula, lo que explicaría que los machos *Sgol2^{-/-}* y *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}* sean estériles.

La ausencia de Securina provoca aneuploidías en los espermatozoides del ratón

Los ratones *Pttg1^{-/-}* son fértiles, aunque presentan hipoplasia del testículo (Wang et al, 2001). A pesar de que en levaduras Securina está involucrada en la reparación del DNA (Nagao et al, 2004), en la formación de las DSBs, en la recombinación homóloga y en la formación del SC (Cooper et al, 2009), los espermatoцитos *Pttg1^{-/-}* no mostraron ningún defecto notable en el apareamiento, sinapsis, recombinación y desinapsis durante la profase I. El análisis ulterior que se llevó a cabo mediante FISH utilizando una sonda del cromosoma X y

otra del cromosoma Y que permitía seguir la segregación de un bivalente durante la gametogenesis, , mostró un 10 % de gametos aneuploides. Las células más tempranas en las que se observaron aneuploidías fueron las espermátidas redondas. El patrón de señales FISH que se observó, 2 señales del X, 2 señales del Y o ninguna señal por célula, únicamente es compatible con que los errores de segregación ocurran durante la segunda división meiótica. De acuerdo con ello, el análisis de las divisiones meióticas mostró defectos durante la segunda segregación, debido a la no disyunción de algunas cromátidas hermanas en una pequeña proporción de divisiones, pero no en metafase-anafase I. Dado que en las metafases II deficientes en *Securina* no se observaron cromátidas sueltas, que sus cromosomas alinean adecuadamente en placa y que durante anafase/telofase II no se produce retraso de los cromosomas ni micronúcleos, *Securina* es prescindible para mantener la cohesión de los cromosomas en meiosis, al igual que ocurre en fibroblastos y células ES de ratón (Mei et al, 2001; Wang et al, 2001; Huang et al, 2005). Sin embargo, nuestros trabajos mostraron que en ausencia de *Securina* se producen defectos en la organización de los centrómeros durante la intercinesis, y probablemente por eso, los espermátocitos del mutante presentan SYCP3 centromérica hasta telofase II, mientras que en los wt está ausente desde prometafase II. Por tanto, es posible que en el ratón *Pttg1^{-/-}* las aneuploidías surjan como consecuencia de los defectos en la remodelación centromérica que tiene lugar en intercinesis.

Previamente y en base a su localización, se ha sugerido que SYCP3 podría estar implicada en la mono-orientación durante la primera división meiótica (Parra et al, 2004) y en ese caso, su eliminación de los centrómeros a partir de intercinesis probablemente promovería la bi-orientación. No obstante, el hecho de que sólo una pequeña proporción de anafases II del mutante sufran defectos de segregación, considerando que todas las metafases II observadas mostraron señal de SYCP3, sugiere que la permanencia de SYCP3 no provoca la no disyunción de los cromosomas por este mecanismo. Sin embargo, la acumulación de esta proteína y, de forma más general, la desorganización de otras proteínas centroméricas, podrían dificultar el anclaje de los microtúbulos en prometafase II, lo que explicaría la prolongación de esta etapa en los mutantes. Además, una pequeña fracción de las metafases II podría ser más susceptible a estos defectos en los centrómeros, lo que provocaría las

anomalías en la segregación. En caso de que así fuera, las cromátidas hermanas que migran hacia el mismo polo lo harían por mono-orientación mediada por anclajes sintéticos de los microtúbulos (Yuan et al, 2010). De forma adicional, las alteraciones en la remodelación de los centrómeros podrían disminuir la accesibilidad de REC8 frente a las kinasas CK1 y DDK o frente a Separasa. En cualquier caso, y dado que los espermatoцитos *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}* no presentan las alteraciones de los ratones *Pttg1^{-/-}* en los centromeros, la función que desempeña Securina en su remodelación probablemente es dependiente de los complejos de cohesinas con REC8 y/o RAD21L. De acuerdo con ello, es posible que Securina participe en la eliminación o relocalización de SYCP3 en intercinesis, la cual se ensambla sobre las cohesinas, como hemos mostrado en el ratón dKO-klis. En consecuencia, en los espermatoцитos mutantes para Securina, SYCP3 perduraría hasta telofase II y en los *Sgol2^{-/-}Pttg1^{-/-}*, al no haber cohesinas a partir de metafase I, la reorganización de SYCP3 no se llevaría a cabo.

En conclusión, nuestros estudios han revelado que RAD21L, una nueva kleisina meiótica recientemente identificada en nuestro laboratorio, es esencial para la espermatogénesis y está asociada a insuficiencia ovárica prematura en el ratón. A pesar de que los datos obtenidos han sugerido que RAD21L no está implicada en cohesión, su localización y/o permanencia en los centrómeros es dependiente de SGOL2. Además, hemos demostrado que los complejos de cohesinas meióticos son esenciales para el ensamblaje de los AEs y el SC en mamíferos y, por tanto, que esta función está conservada evolutivamente desde levaduras. De forma adicional hemos comprobado que la falta de Securina provoca aneuploidías en un 10 % de los espermatozoides y que probablemente parte de su función es dependiente de complejos de cohesinas meióticos.

Nuestros resultados suponen un pequeño paso más para el desciframiento de los mecanismos moleculares que integran la meiosis del ratón. Dado que la meiosis humana no puede ser analizada funcionalmente de forma directa, la mejor alternativa actual para profundizar en su conocimiento es, sin duda, a través de la extrapolación de los resultados obtenidos con modelos murinos mutantes. En este sentido, *Rad21l* y *Sgol2* pueden añadirse como genes candidatos a la larga lista de infertilidades humanas huérfanas y como posibles

dianas en programas para el desarrollo de nuevos métodos anticonceptivos masculinos. Asimismo, la posible existencia de mutaciones que provoquen la pérdida parcial de función en SGOL2, RAD21L o de alteraciones que provoquen la pérdida total de función de Securina podrían ser responsables de una fracción de las aneuploidías congénitas humanas.

CONCLUSIONES

1. RAD21L es una kleisina meiótica que forma complejos de cohesinas *in vivo* al menos con las subunidades STAG3 y SMC1 α .
2. RAD21L es la única subunidad del complejo de cohesinas que se ha detectado en la cromatina del cuerpo sexual y en telofase II.
3. La pérdida de RAD21L provoca esterilidad completa en los ratones macho y esterilidad precoz en las hembras.
4. RAD21L es esencial para la sinapsis y para la formación de quiasmas en los machos y su deficiencia provoca un bloqueo de la espermatogénesis en zigotena.
5. RAD21L es prescindible para la sinapsis en las hembras, pero su ausencia provoca una reducción en la dotación de folículos primordiales.
6. Los complejos de cohesinas meióticos forman la estructura principal para el ensamblaje del AE, el SC y la recombinación homóloga en mamíferos.
7. La carga y/o permanencia de RAD21L en los centrómeros de los cromosomas meióticos es en parte dependiente de SGOL2.
8. La doble deficiencia de SGOL2 y Securina es viable en el ratón.
9. La deficiencia de Securina provoca aneuploidías en los espermatozoides por la no disyunción de cromátidas hermanas durante la segunda división meiótica.
10. La función de Securina en la reorganización de los centrómeros en intercinesis es probablemente dependiente de complejos de cohesinas meióticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed EA, van der Vaart A, Barten A, Kal HB, Chen J, Lou Z, Minter-Dykhouse K, Bartkova J, Bartek J, de Boer P, de Rooij DG. (2007). Differences in DNA double strand breaks repair in male germ cell types: lessons learned from a differential expression of Mdc1 and 53BP1. *DNA Repair (Amst)* 6:1243-1254.
- Ahmed EA, de Rooij DG. (2009). Staging of mouse seminiferous tubule cross-sections. *Methods Mol Biol.* 558:263-277. Review.
- Anderson LK, Offenberger HH, Verkuijlen WM, Heyting C. (1997). RecA-like proteins are components of early meiotic nodules in lily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6868-6873.
- Anderson DE, Losada A, Erickson HP, Hirano T. (2002). Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. *J Cell Biol.* 156:419-424.
- Ashley T, Walpita D, de Rooij DG. (2001). Localization of two mammalian cyclin dependent kinases during mammalian meiosis. *J Cell Sci.* 114:685-693.
- Ashley T, Gaeth AP, Creemers LB, Hack AM, de Rooij DG. (2004). Correlation of meiotic events in testis sections and microspreads of mouse spermatocytes relative to the mid-pachytene checkpoint. *Chromosoma* 113:126-136.
- Bailis JM, Smith AV, Roeder GS. (2000). Bypass of a meiotic checkpoint by overproduction of meiotic chromosomal proteins. *Mol Cell Biol.* 20:4838-4848.
- Baker SM, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC, Yao X, Christie DM, Monell C, Arnheim N, Bradley A, Ashley T, Liskay RM. (1996). Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat Genet.* 13:336-342.
- Bannister LA, Reinholdt LG, Munroe RJ, Schimenti JC. (2004). Positional cloning and characterization of mouse mei8, a disrupted allele of the meiotic cohesin Rec8. *Genesis.* 40:184-194.
- Barbanis S, Ioannou M, Kouvaras E, Karasavvidou F, Nakou M, Papamichali R, Koukoulis G. (2009). INCENP (inner centromere protein) is overexpressed in high grade non-Hodgkin B-cell lymphomas. *Pathol Oncol Res.* 15:11-17.
- Barchi M, Mahadevaiah S, Di Giacomo M, Baudat F, de Rooij DG, Burgoyne PS, Jasin M, Keeney S. (2005). Surveillance of different recombination defects in mouse spermatocytes yields distinct responses despite elimination at an identical developmental stage. *Mol Cell Biol.* 25:7203-7215.
- Barford D. (2011). Structure, function and mechanism of the anaphase promoting complex (APC/C). *Q Rev Biophys.* 44:153-190.
- Barlow C, Liyanage M, Moens PB, Tarsounas M, Nagashima K, Brown K, Rottinghaus S, Jackson SP, Tagle D, Ried T, Wynshaw-Boris A. (1998). Atm deficiency results in severe meiotic disruption as early as leptotema of prophase I. *Development.* 125:4007-4017.
- Bastians H, Topper LM, Gorbsky GL, Ruderman JV. (1999). Cell cycle-regulated proteolysis of mitotic target proteins. *Mol Biol Cell* 10:3927-3941.
- Baudat F, Manova K, Yuen JP, Jasin M, Keeney S. (2000). Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Mol Cell* 6:989-998.
- Bellani MA, Romanienko PJ, Cairatti DA, Camerini-Otero RD. (2005). SPO11 is required for sex-body formation, and Spo11 heterozygosity rescues the prophase arrest of Atm^{-/-} spermatocytes. *J Cell Sci.* 118:3233-3245.
- Benoff S, Jacob A, Hurley IR. (2000). Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Hum Reprod Update* 6:107-121.
- Bernard P, Maure JF, Partridge JF, Genier S, Javerzat JP, Allshire RC. (2001). Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science* 294:2539-2542.

- Birkenbihl RP, Subramani S. (1992). Cloning and characterization of rad21 an essential gene of *Schizosaccharomyces pombe* involved in DNA double-strand-break repair. *Nucleic Acids Res.* 20:6605-6611.
- Bishop DK, Park D, Xu L, Kleckner N. (1992). DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* 69:439-456.
- Bolcun-Filas E, Costa Y, Speed R, Taggart M, Benavente R, De Rooij DG, Cooke HJ. (2007). SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. *J Cell Biol.* 176:741-747.
- Bolor H, Mori T, Nishiyama S, Ito Y, Hosoba E, Inagaki H, Kogo H, Ohye T, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Nishizawa H, Pryor-Koishi K, Kitaoka E, Sawada T, Nishiyama Y, Udagawa Y, Kurahashi H. (2009). Mutations of the SYCP3 gene in women with recurrent pregnancy loss. *Am J Hum Genet.* 84:14-20.
- Brar GA, Hochwagen A, Ee LS, Amon A. (2009). The multiple roles of cohesin in meiotic chromosome morphogenesis and pairing. *Mol Biol Cell* 20:1030-1047.
- Brown TA. (2006). *Gene cloning & DNA analysis: An introduction*. Fifth edition. Blackwell Publishing, Oxford. UK.
- Buonomo SB, Clyne RK, Fuchs J, Loidl J, Uhlmann F, 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.
- Burt A. (2000). Perspective: sex, recombination, and the efficacy of selection--was Weismann right? *Evolution* 54:337-351.
- Burgoyne PS, Mahadevaiah SK, Turner JM. (2009). The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat Rev Genet.* 10:207-216.
- Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. (1998). Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 392:300-303.
- Carramolino L, Lee BC, Zaballos A, Peled A, Barthelemy I, Shav-Tal Y, Prieto I, Carmi P, Gothelf Y, González de Buitrago G, Aracil M, Márquez G, Barbero JL, Zipori D. (1997). SA-1, a nuclear protein encoded by one member of a novel gene family: molecular cloning and detection in hemopoietic organs. *Gene* 195:151-159.
- Chao WC, Kulkarni K, Zhang Z, Kong EH, Barford D. (2012). Structure of the mitotic checkpoint complex. *Nature* 484:208-213.
- Chestukhin A, Pfeffer C, Milligan S, DeCaprio JA, Pellman D. (2003). Processing, localization, and requirement of human separase for normal anaphase progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4574-4579.
- Ciosk R, Zachariae W, Michaelis C, Shevchenko A, Mann M, Nasmyth K. (1998). An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* 93:1067-1076.
- Ciosk R, Shirayama M, Shevchenko A, Tanaka T, Toth A, Shevchenko A, Nasmyth K. (2000). Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. *Mol Cell* 5:243-254.
- Clift D, Bizzari F, Marston AL. (2009). Shugoshin prevents cohesin cleavage by PP2A(Cdc55)-dependent inhibition of separase. *Genes Dev.* 23:766-780.
- Cohen PE, Pollack SE, Pollard JW. (2006). Genetic analysis of chromosome pairing, recombination, and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. *Endocr Rev.* 27:398-426.

- Cohen-Fix O, Peters JM, Kirschner MW, Koshland D. (1996). Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev.* 10:3081-3093.
- Cooke CA, Heck MMS, William C. (1987) The Inner Centromere Protein (INCENP) Antigens: Movement from inner centromere to midbody during mitosis. *The Journal of Cell Biology*, 105:2053-2067.
- Cooper KF, Mallory MJ, Guacci V, Lowe K, Strich R. (2009). Pds1p is required for meiotic recombination and prophase I progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 181:65-79.
- Costa Y, Speed R, Ollinger R, Alsheimer M, Semple CA, Gautier P, Maratou K, Novak I, Höög C, Benavente R, Cooke HJ. (2005). Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *J Cell Sci.* 118:2755-2762.
- Cowell IG, Aucott R, Mahadevaiah SK, Burgoyne PS, Huskisson N, Bongiorno S, Prantera G, Fanti L, Pimpinelli S, Wu R, Gilbert DM, Shi W, Fundele R, Morrison H, Jeppesen P, Singh PB. (2002). Heterochromatin, HP1 and methylation at lysine 9 of histone H3 in animals. *Chromosoma* 111:22-36.
- Cukurcam S, Sun F, Betzendahl I, Adler ID, Eichenlaub-Ritter U. (2004). Trichlorfon predisposes to aneuploidy and interferes with spindle formation in in vitro maturing mouse oocytes. *Mutat Res.* 64:165-178.
- Darwiche N, Freeman LA, Strunnikov A. (1999). Characterization of the components of the putative mammalian sister chromatid cohesion complex. *Gene.* 233:39-47.
- Deardorff MA, Kaur M, Yaeger D, Rampuria A, Korolev S, Pie J, Gil-Rodríguez C, Arnedo M, Loeys B, Kline AD, Wilson M, Lillquist K, Siu V, Ramos FJ, Musio A, Jackson LS, Dorsett D, Krantz ID. (2007). 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.* 80:485-494.
- 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, et al. (2012). RAD21 Mutations Cause a Human Cohesinopathy. *Am J Hum Genet.* 90:1014-1027.
- de Vries SS, Baart EB, Dekker M, Siezen A, de Rooij DG, de Boer P, te Riele H. (1999). Mouse MutS-like protein Msh5 is required for proper chromosome synapsis in male and female meiosis. *Genes Dev.* 13:523-531.
- de Vries FA, de Boer E, van den Bosch M, Baarends WM, Ooms M, Yuan L, Liu JG, van Zeeland AA, Heyting C, Pastink A. (2005). Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev.* 19:1376-1389.
- Dernburg AF, McDonald K, Moulder G, Barstead R, Dresser M, Villeneuve AM. (1998). Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell* 94:387-398.
- DiNardo S, Voelkel K, Sternglanz R. (1984) DNA topoisomerase II mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: Topoisomerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:2616-2620.
- Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, Ritchey JK, Young MA, Lamprecht T, McLellan MD, McMichael JF, Wallis JW, Lu C, Shen D, Harris CC, Dooling DJ, Fulton RS, et al. (2012). Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 481:506-510.
- Disteche CM, Tantravahi U, Gandy S, Eisenhard M, Adler D, Kunkel LM. (1985). Isolation and characterization of two repetitive DNA fragments located near the centromere of the mouse X chromosome. *Cytogenet Cell Genet* 39: 262-268.

- Eaker S, Cobb J, Pyle A, Handel MA. (2002). Meiotic prophase abnormalities and metaphase cell death in MLH1-deficient mouse spermatocytes: insights into regulation of spermatogenic progress. *Dev Biol.* 249:85-95.
- Edelmann W, Cohen PE, Kane M, Lau K, Morrow B, Bennett S, Umar A, Kunkel T, Cattoretti G, Chaganti R, Pollard JW, Kolodner RD, Kucherlapati R. (1996). Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. *Cell* 85:1125-1134.
- Edelmann W, Cohen PE, Kneitz B, Winand N, Lia M, Heyer J, Kolodner R, Pollard JW, Kucherlapati R. (1999). Mammalian MutS homologue 5 is required for chromosome pairing in meiosis. *Nat Genet.* 21:123-127.
- Eijpe M, Heyting C, Gross B, Jessberger R. (2000). Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes. *J Cell Sci.* 113:673-682.
- Eijpe M, Offenbergh H, Jessberger R, Revenkova E, Heyting C. (2003). Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3. *J Cell Biol.* 160:657-670.
- Fauser BC, Hsueh AJ. (1995). Genetic basis of human reproductive endocrine disorders. *Hum Reprod.* 10:826-846.
- Fernandez-Capetillo O, Mahadevaiah SK, Celeste A, Romanienko PJ, Camerini-Otero RD, Bonner WM, Manova K, Burgoyne P, Nussenzweig A. (2003). H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell* 4:497-508.
- Funabiki H, Kumada K, Yanagida M. (1996). Fission yeast Cut1 and Cut2 are essential for sister chromatid separation, concentrate along the metaphase spindle and form large complexes. *EMBO J.* 15:6617-6628.
- Funabiki H, Yamano H, Nagao K, Tanaka H, Yasuda H, Hunt T, Yanagida M. (1997). Fission yeast Cut2 required for anaphase has two destruction boxes. *EMBO J.* 16:5977-5987.
- Furuya K, Takahashi K, Yanagida M. (1998). Faithful anaphase is ensured by Mis4, a sister chromatid cohesion molecule required in S phase and not destroyed in G1 phase. *Genes Dev.* 12:3408-3418.
- Gandhi R, Gillespie PJ, Hirano T. (2006). Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase. *Curr Biol.* 16:2406-2417.
- Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, Petersen S, Thaesler Z, Pacyna-Gengelbach M, van de Rijn M, Rosen GD, Perou CM, Whyte RI, Altman RB, Brown PO, Botstein D, Petersen I. (2001). Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:13784-13789.
- Gerkes EH, van der Kevie-Kersemaekers AM, Yakin M, Smeets DF, van Ravenswaaij-Arts CM. (2010). The importance of chromosome studies in Roberts syndrome/SC phocomelia and other cohesinopathies. *Eur J Med Genet.* 53:40-44.
- Gethmann RC. (1984). The genetic analysis of a chromosome-specific meiotic mutant that permits a premature separation of sister chromatids in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 107:65-77.
- Gillis LA, McCallum J, Kaur M, DeScipio C, Yaeger D, Mariani A, Kline AD, Li HH, Devoto M, Jackson LG, Krantz ID. (2004). NIPBL mutational analysis in 120 individuals with Cornelia de Lange syndrome and evaluation of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet.* 75:610-623.
- Gómez R, Valdeolmillos A, Parra MT, Viera A, Carreiro C, Roncal F, Rufas JS, Barbero JL, Suja JA. (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.
- Gorr IH, Boos D, Stemmann O. (2005). Mutual inhibition of separase and Cdk1 by two-step complex formation. *Mol Cell* 19:135-141.
- Goswami D, Conway GS. (2005). Premature ovarian failure. *Hum Reprod Update.* 11:391-410.

- Grelon M, Vezon D, Gendrot G, Pelletier G. (2001). AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J.* 20:589-600.
- Gruber S, Haering CH, Nasmyth K. (2003). Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell* 112:765-777.
- Guacci V, Hogan E, Koshland D. (1994) Chromosome condensation and sister chromatid pairing in budding yeast. *The Journal of Cell Biology*, 125:517-530.
- Guacci V, Koshland D, Strunnikov A. (1997) Chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell*, 91: 47–57.
- Gutiérrez-Caballero C, Herrán Y, Sánchez-Martín M, Suja JA, Barbero JL, Llano E, Pendás AM. (2011). Identification and molecular characterization of the mammalian α -kleisin RAD21L. *Cell Cycle*. 10:1477-1487
- Gutiérrez-Caballero C, Cebollero LR, Pendás AM. (2012). Shugoshins: from protectors of cohesion to versatile adaptors at the centromere. *Trends Genet.* [Epub ahead of print]
- Haering CH, Löwe J, Hochwagen A, Nasmyth K. (2002). Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol Cell* 9:773-788.
- Haering CH, Nasmyth K. (2003). Building and breaking bridges between sister chromatids. *Bioessays*. 25:1178-1191. Review.
- Haering CH, Farcas AM, Arumugam P, Metson J, Nasmyth K. (2008). The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. *Nature* 454:297-301.
- Hamant O, Golubovskaya I, Meeley R, Fiume E, Timofejeva L, Schleiffer A, Nasmyth K, Cande WZ. (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.
- Harrison CJ, Jack EM, Allen TD, Harris R. (1985). Light and scanning electron microscopy of the same human metaphase chromosomes. *J Cell Sci*. 77:143-153.
- Haruki N, Saito H, Harano T, Nomoto S, Takahashi T, Osada H, Fujii Y, Takahashi T. (2001). Molecular analysis of the mitotic checkpoint genes BUB1, BUBR1 and BUB3 in human lung cancers. *Cancer Lett*. 162:201-205.
- Hauf S, Waizenegger IC, Peters JM. (2001). Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science* 293:1320-1323.
- Hauf S, Roitinger E, Koch B, Dittrich CM, Mechtler K, Peters JM. (2005). Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol*. 3:e69.
- Hauf S, Biswas A, Langegger M, Kawashima SA, Tsukahara T, Watanabe Y. (2007). Aurora controls sister kinetochore mono-orientation and homolog bi-orientation in meiosis-I. *EMBO J*. 26:4475-4486.
- Hayashi S, Lewis P, Pevny L, McMahon AP. (2002). Efficient gene modulation in mouse epiblast using a Sox2Cre transgenic mouse strain. *Gene Expr Patterns* 2:93-97.
- Herrán Y, Gutiérrez-Caballero C, Sánchez-Martín M, Hernández T, Viera A, Barbero JL, de Álava E, de Rooij DG, Suja JA, Llano E, Pendás AM. (2011). The cohesin subunit RAD21L functions in meiotic synapsis and exhibits sexual dimorphism in fertility. *EMBO J*. 30:3091-3105.
- Heyting C. (1996). Synaptonemal complexes: structure and function. *Curr Opin Cell Biol*. 8:389-396.
- Hirano T, Mitchison TJ. (1994) A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro. *Cell* 79, 449-458.
- Hirano M, Hirano T. (1998). ATP-dependent aggregation of single-stranded DNA by a bacterial SMC homodimer. *EMBO J*. 17:7139-7148.
- Hodges CA, Revenkova E, Jessberger R, Hassold TJ, Hunt PA. (2005). SMC1beta-deficient female mice provide evidence that cohesins are a missing link in age-related nondisjunction. *Nat Genet*. 37:1351-1355.

- Holloway SL, Glotzer M, King RW, Murray AW. (1993) Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell*, 73:1393-1402.
- Horsfield JA, Anagnostou SH, Hu JK, Cho KH, Geisler R, Lieschke G, Crosier KE, Crosier PS. (2007). Cohesin-dependent regulation of Runx genes. *Development* 134:2639-2649.
- Hsu WS, Erickson SL, Tsai HJ, Andrews CA, Vas AC, Clarke DJ. (2011). S-phase cyclin-dependent kinases promote sister chromatid cohesion in budding yeast. *Mol Cell Biol*. 31:2470-2483.
- Huang X, Hatcher R, York JP, Zhang P. (2005). Securin and separase phosphorylation act redundantly to maintain sister chromatid cohesion in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 16:4725-4732.
- Huang H, Feng J, Famulski J, Rattner JB, Liu ST, Kao GD, Muschel R, Chan GK, Yen TJ. (2007). Tripin/hSgo2 recruits MCAK to the inner centromere to correct defective kinetochore attachments. *J Cell Biol*. 177:413-424.
- Huang X, Andreu-Vieyra CV, York JP, Hatcher R, Lu T, Matzuk MM, Zhang P. (2008). Inhibitory phosphorylation of separase is essential for genome stability and viability of murine embryonic germ cells. *PLoS Biol*. 6:e15.
- Huitorel P, Kirschner MW. (1988). The polarity and stability of microtubule capture by the kinetochore. *J Cell Biol*. 106:151-159.
- Hunt PA, Hassold TJ. (2002). Sex matters in meiosis. *Science* 296:2181-2183.
- Hyttel P, Madsen I. (1987). Rapid method to prepare mammalian oocytes and embryos for transmission electron microscopy. *Acta Anat (Basel)* 129:12-14.
- Ichijima Y, Ichijima M, Lou Z, Nussenzweig A, Camerini-Otero RD, Chen J, Andreassen PR, Namekawa SH. (2011). MDC1 directs chromosome-wide silencing of the sex chromosomes in male germ cells. *Genes Dev*. 25:959-971.
- Inagaki A, Schoenmakers S, Baarends WM. (2010). DNA double strand break repair, chromosome synapsis and transcriptional silencing in meiosis. *Epigenetics* 5:255-266.
- Indjeian VB, Stern BM, Murray AW. (2005). The centromeric protein Sgo1 is required to sense lack of tension on mitotic chromosomes. *Science* 307:130-133.
- Ishiguro K, Kim J, Fujiyama-Nakamura S, Kato S, Watanabe Y. (2011). A new meiosis-specific cohesin complex implicated in the cohesin code for homologous pairing. *EMBO Rep*. 12:267-275.
- Ivanov D, Nasmyth K. (2005). A topological interaction between cohesin rings and a circular minichromosome. *Cell* 122:849-860.
- 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. (2009). Human Sgo1 downregulation leads to chromosomal instability in colorectal cancer. *Gut*. 58:249-260.
- Jang JK, Sherizen DE, Bhagat R, Manheim EA, McKim KS (2003) Relationship of DNA double-strand breaks to synapsis in *Drosophila*. *J Cell Sci* 116:3069–3077.
- Jessberger R, Riwar B, Baechtold H, Akhmedov AT. (1996). SMC proteins constitute two subunits of the mammalian recombination complex RC-1. *EMBO J*. 15:4061-4068.
- 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. (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* 467:430-435.
- Kahyo T, Iwaizumi M, Shinmura K, Matsuura S, Nakamura T, Watanabe Y, Yamada H, Sugimura H. (2011). A novel tumor-derived SGOL1 variant causes abnormal mitosis and unstable chromatid cohesion. *Oncogene* 30:4453-4463.
- Kan R, Sun X, Kolas NK, Avdievich E, Kneitz B, Edelmann W, Cohen PE. (2008). Comparative Analysis of Meiotic Progression in Female Mice Bearing Mutations in Genes of the DNA Mismatch Repair Pathway. *Biology of Reproduction* 78: 462–471.

- Katis VL, Galova M, Rabitsch KP, Gregan J, 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 SA, Tsukahara T, Langegger M, Hauf S, Kitajima TS, Watanabe Y. (2007). Shugoshin enables tension-generating attachment of kinetochores by loading Aurora to centromeres. *Genes Dev.* 21:420-435.
- Keegan KS, Holtzman DA, Plug AW, Christenson ER, Brainerd EE, Flaggs G, Bentley NJ, Taylor EM, Meyn MS, Moss SB, Carr AM, Ashley T, Hoekstra MF. (1996). The Atr and Atm protein kinases associate with different sites along meiotically pairing chromosomes. *Genes Dev.* 10:2423-2437.
- Keeney S, Giroux CN, Kleckner N. (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88:375-384.
- Kerrebrock AW, Moore DP, Wu JS, Orr-Weaver TL. (1995). Mei-S332, a Drosophila protein required for sister-chromatid cohesion, can localize to meiotic centromere regions. *Cell* 83:247-256.
- Kiburz BM, Amon A, Marston AL. (2008). Shugoshin promotes sister kinetochore biorientation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 19:1199-1209.
- Kierszenbaum AL, Tres LL. (1974). Transcription sites in spread meiotic prophase chromosomes from mouse spermatocytes. *J Cell Biol.* 63:923-935.
- Kim BJ, Li Y, Zhang J, Xi Y, Li Y, Yang T, Jung SY, Pan X, Chen R, Li W, Wang Y, Qin J. (2010). Genome-wide reinforcement of cohesin binding at pre-existing cohesin sites in response to ionizing radiation in human cells. *J Biol Chem.* 285:22784-22792.
- Kimura K, Hirano T. (1997). ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation. *Cell* 90:625-634.
- King RW, Peters JM, Tugendreich S, Rolfe M, Hieter P, Kirschner MW. (1995). A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* 81:279-288.
- Kitajima TS, Yokobayashi S, Yamamoto M, Watanabe Y. (2003). Distinct cohesin complexes organize meiotic chromosome domains. *Science* 300:1152-1155.
- Kitajima TS, Kawashima SA, Watanabe Y. (2004). The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* 427:510-517.
- Kitajima TS, Sakuno T, Ishiguro K, Iemura S, Natsume T, Kawashima SA, Watanabe Y. (2006). Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* 441:46-52.
- Klein F, Mahr P, Galova M, Buonomo SB, Michaelis C, Nairz K, Nasmyth K. (1999). A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* 98:91-103.
- Kneitz B, Cohen PE, Avdievich E, Zhu L, Kane MF, Hou H Jr, Kolodner RD, Kucherlapati R, Pollard JW, Edelman W. (2000). MutS homolog 4 localization to meiotic chromosomes is required for chromosome pairing during meiosis in male and female mice. *Genes Dev.* 14:1085-1097.
- Kolano A, Brunet S, Silk AD, Cleveland DW, Verlhac MH. (2012). Error-prone mammalian female meiosis from silencing the spindle assembly checkpoint without normal interkinetochore tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Epub ahead of print]
- Kollareddy M, Dzubak P, Zheleva D, Hajduch M. (2008). Aurora kinases: structure, functions and their association with cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 152:27-33.
- Kouznetsova A, Wang H, Bellani M, Camerini-Otero RD, Jessberger R, Höög C. (2009). BRCA1-mediated chromatin silencing is limited to oocytes with a small number of asynapsed chromosomes. *J Cell Sci.* 122:2446-2452.

- Kouznetsova A, Benavente R, Pastink A, Höög C. (2011). Meiosis in mice without a synaptonemal complex. *PLoS One* 6: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. (2004). Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homolog of *Drosophila melanogaster* Nipped-B. *Nat Genet.* 36:631-635.
- Kucej M, Zou H. (2010). DNA-dependent cohesin cleavage by separase. *Nucleus* 1:4-7.
- 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. (2006). Resolution of chiasmata in oocytes requires separase-mediated proteolysis. *Cell* 126:135-146.
- Lafont AL, Song J, Rankin S. (2010). Sororin cooperates with the acetyltransferase Eco2 to ensure DNA replication-dependent sister chromatid cohesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:20364-20369.
- Larionov VL, Karpova TS, Kouprina NY, Jouravleva GA. (1985). A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* with impaired maintenance of centromeric plasmids. *Curr Genet.* 10:15-20.
- Lee J, Kitajima TS, Tanno Y, Yoshida K, Morita T, Miyano T, Miyake M, Watanabe Y. (2008). Unified mode of centromeric protection by shugoshin in mammalian oocytes and somatic cells. *Nat Cell Biol.* 10:42-52.
- Lee J, Hirano T. (2011). RAD21L, a novel cohesin subunit implicated in linking homologous chromosomes in mammalian meiosis. *J Cell Biol.* 192:263-276.
- Li X, Nicklas RB. (1995). Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. *Nature* 373:630-632.
- Li X, Nicklas RB. (1997). Tension-sensitive kinetochore phosphorylation and the chromosome distribution checkpoint in praying mantid spermatocytes. *J Cell Sci.* 110:537-545.
- Lica LM, Narayanswami S, Hamkalo BA. (1986). Mouse satellite DNA, centromere structure, and sister chromatid pairing. *J Cell Biol.* 103:1145-1151.
- Liska F. (2003). Selected genetic aspects of male infertility--what animal models tell us. *Folia Biol (Praha)* 49:129-141.
- 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. (2010). Age-related meiotic segregation errors in mammalian oocytes are preceded by depletion of cohesin and Sgo2. *Curr Biol.* 20:1511-1521.
- Llano E, Gómez R, Gutiérrez-Caballero C, Herrán Y, Sánchez-Martín M, Vázquez-Quiñones L, Hernández T, de Alava E, Cuadrado A, Barbero JL, Suja JA, Pendás AM. (2008). Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Genes Dev.* 22:2400-2413.
- Lorenz A, Wells JL, Pryce DW, Novatchkova M, Eisenhaber F, McFarlane RJ, Loidl J. (2004). *S. pombe* meiotic linear elements contain proteins related to synaptonemal complex components. *J Cell Sci.* 117:3343-3351.
- Losada A, Hirano M, Hirano T. (1998) Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev.* 12:1986-1997.
- Losada A, Yokochi T, Kobayashi R, Hirano T. (2000). Identification and characterization of SA/Scp3p subunits in the *Xenopus* and human cohesin complexes. *J Cell Biol.* 150:405-416.
- Losada A, Yokochi T, Hirano T. (2005). Functional contribution of Pds5 to cohesin-mediated cohesion in human cells and *Xenopus* egg extracts. *J Cell Sci.* 118:2133-2141.
- Löwe J, Cordell SC, van den Ent F. (2001). Crystal structure of the SMC head domain: an ABC ATPase with 900 residues antiparallel coiled-coil inserted. *J Mol Biol.* 306:25-35.

- Mahadevaiah SK, Turner JM, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, Blanco-Rodríguez J, Jasin M, Keeney S, Bonner WM, Burgoyne PS. (2001). Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet.* 27:271-276.
- Malkov M, Fisher Y, Don J. (1998). Developmental Schedule of the Postnatal Rat Testis Determined by Flow Cytometry. *Biology of reproduction* 59: 84–92.
- Malmanche N, Maia A, Sunkel CE. (2006). The spindle assembly checkpoint: preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis. *FEBS Lett.* 580:2888-2895.
- Mancini RE, Castro A, Seiguer AC. (1967). Histologic localization of follicle-stimulating and luteinizing hormones in the rat testis. *J Histochem Cytochem.* 15:516-525.
- McKay MJ, Troelstra C, van der Spek P, Kanaar R, Smit B, Hagemeyer A, Bootsma D, Hoeijmakers JH. (1996). Sequence conservation of the rad21 Schizosaccharomyces pombe DNA double-strand break repair gene in human and mouse. *Genomics.* 36:305-315.
- Mei J, Huang X, Zhang P. (2001). Securin is not required for cellular viability, but is required for normal growth of mouse embryonic fibroblasts. *Curr Biol.* 11:1197-1201.
- Meyer R, Fofanov V, Panigrahi A, Merchant F, Zhang N, Pati D. (2009). Overexpression and mislocalization of the chromosomal segregation protein separase in multiple human cancers. *Clin Cancer Res.* 15:2703-2710.
- Michaelis C, Ciosk R, Nasmyth K. (1997) Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell*, 91: 35–45.
- Miles DC, van den Bergen JA, Sinclair AH, Western PS. (2010). Regulation of the female mouse germ cell cycle during entry into meiosis. *Cell Cycle* 9:408-418.
- Mimitou EP, Symington LS. (2009). DNA end resection: many nucleases make light work. *DNA Repair (Amst).* 8:983-995.
- Miyamoto T, Hasuike S, Yogev L, Maduro MR, Ishikawa M, Westphal H, Lamb DJ. (2003). Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *Lancet* 362:1714-1719.
- Moens PB, Chen DJ, Shen Z, Kolas N, Tarsounas M, Heng HH, Spyropoulos B. (1997). Rad51 immunocytology in rat and mouse spermatocytes and oocytes. *Chromosoma* 106:207-215.
- Moens PB, Kolas NK, Tarsounas M, Marcon E, Cohen PE, Spyropoulos B. (2002). The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA-DNA interactions without reciprocal recombination. *J Cell Sci.* 115:1611-1622.
- Moens PB, Marcon E, Shore JS, Kochakpour N, Spyropoulos B. (2007). Initiation and resolution of interhomolog connections: crossover and non-crossover sites along mouse synaptonemal complexes. *J Cell Sci.* 120:1017-1027.
- Molnar M, Bähler J, Sipiczki M, Kohli J. (1995) The rec8 gene of Schizosaccharomyces pombe is involved in linear element formation, chromosome pairing and sister-chromatid cohesion during meiosis. *Genetics*, 141:61-73.
- Mönnich M, Kuriger Z, Print CG, Horsfield JA. (2011). A zebrafish model of Roberts syndrome reveals that Esco2 depletion interferes with development by disrupting the cell cycle. *PLoS One* 6:e20051.
- Morelli MA, Cohen PE. (2005). Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction* 130:761-781.
- Mukherjee M, Ge G, Zhang N, Huang E, Nakamura LV, Minor M, Fofanov V, Rao PH, Herron A, Pati D. (2011). 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.* 6:e22167.
- Musio A, Selicorni A, Focarelli ML, Gervasini C, Milani D, Russo S, Vezzoni P, Larizza L. (2006). X-linked Cornelia de Lange syndrome owing to SMC1L1 mutations. *Nat Genet.* 38:528-530.

- Nagao K, Adachi Y, Yanagida M. (2004). Separase-mediated cleavage of cohesin at interphase is required for DNA repair. *Nature* 430:1044-1048.
- Nakajima M, Kumada K, Hatakeyama K, Noda T, Peters JM, Hirota T. (2007). The complete removal of cohesin from chromosome arms depends on separase. *J Cell Sci.* 120:4188-4196.
- Nasim A, Smith BP. (1975). Genetic control of radiation sensitivity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 79:573-582.
- Nasmyth K. (2011). Cohesin: a catenase with separate entry and exit gates? *Nat Cell Biol.* 13:1170-1177.
- Navarro-Costa P, Plancha CE, Gonçalves J. (2010). Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility? *J Biomed Biotechnol.* 2010:936569.
- Navin A, Prekeris R, Lisitsyn NA, Sonti MM, Grieco DA, Narayanswami S, Lander ES, Simpson EM. (1996). Mouse Y-specific repeats isolated by whole chromosome representational difference analysis. *Genomics.* 36:349-353.
- Neyton S, Lespinasse F, Moens PB, Paul R, Gaudray P, Paquis-Flucklinger V, Santucci-Darmanin S. (2004). Association between MSH4 (MutS homologue 4) and the DNA strand-exchange RAD51 and DMC1 proteins during mammalian meiosis. *Mol Hum Reprod.* 10:917-924.
- Nishiyama T, Ladurner R, Schmitz J, Kreidl E, Schleiffer A, Bhaskara V, Bando M, Shirahige K, Hyman AA, Mechtler K, Peters JM. (2010). Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl. *Cell* 43:737-749.
- 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. (2011). RAD21 cooperates with pluripotency transcription factors in the maintenance of embryonic stem cell identity. *PLoS One* 6:e19470.
- Novak I, Wang H, Revenkova E, Jessberger R, Scherthan H, Höög C. (2008). Cohesin Smc1beta determines meiotic chromatin axis loop organization. *J Cell Biol.* 180:83-90.
- Ohlsson R, Renkawitz R, Lobanenkov V. (2001). CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet.* 17:520-527.
- Oikawa K, Ohbayashi T, Kiyono T, Nishi H, Isaka K, Umezawa A, Kuroda M, Mukai K. (2004). Expression of a novel human gene, human wings apart-like (hWAPL), is associated with cervical carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res.* 64:3545-3549.
- Orth M, Mayer B, Rehm K, Rothweiler U, Heidmann D, Holak TA, Stemmann O. (2011). Shugoshin is a Mad1/Cdc20-like interactor of Mad2. *EMBO J.* 30:2868-2880.
- Page J, de la Fuente R, Manterola M, Parra MT, Viera A, Berríos S, Fernández-Donoso R, Rufas JS. (2012). Inactivation or non-reactivation: what accounts better for the silence of sex chromosomes during mammalian male meiosis? *Chromosoma* 121:307-326.
- Papi M, Berdugo E, Randall CL, Ganguly S, Jallepalli PV. (2005). Multiple roles for separase auto-cleavage during the G2/M transition. *Nat Cell Biol.* 7:1029-1035.
- Parelho V, Hadjir 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, Merkschlagler M. (2008). Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell* 132:422-433.
- Parisi S, McKay MJ, Molnar M, Thompson MA, van der Spek PJ, van Drunen-Schoenmaker E, Kanaar R, Lehmann E, Hoeijmakers JH, Kohli J. (1999). Rec8p, a meiotic recombination and sister chromatid cohesion phosphoprotein of the Rad21p family conserved from fission yeast to humans. *Mol Cell Biol.* 19:3515-3528.
- Parra MT, Page J, Yen TJ, He D, Valdeolmillos A, Rufas JS, Suja JA. (2002). Expression and behaviour of CENP-E at kinetochores during mouse spermatogenesis. *Chromosoma* 111:53-61.

- Parra MT, Viera A, Gómez R, Page J, Benavente R, Santos JL, Rufas JS, Suja JA. (2004). Involvement of the cohesin Rad21 and SCP3 in monopolar attachment of sister kinetochores during mouse meiosis I. *J Cell Sci.* 2004 Mar 1;117(Pt 7):1221-1234.
- Pasierbek P, Jantsch M, Melcher M, Schleiffer A, Schweizer D, Loidl J. (2001). A *Caenorhabditis elegans* cohesion protein with functions in meiotic chromosome pairing and disjunction. *Genes Dev.* 15:1349-1360.
- Pei L, Melmed S. (1997). Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol.* 11:433-441.
- Pelttari J, Hoja MR, Yuan L, Liu JG, Brundell E, Moens P, Santucci-Darmanin S, Jessberger R, Barbero JL, Heyting C, Höög C. (2001). A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells. *Mol Cell Biol.* 21:5667-5677.
- Perera D, Perez-Hidalgo L, Moens PB, Reini K, Lakin N, Syväoja JE, San-Segundo PA, Freire R. (2004). TopBP1 and ATR colocalization at meiotic chromosomes: role of TopBP1/Cut5 in the meiotic recombination checkpoint. *Mol Biol Cell* 15:1568-1579.
- Persani L, Rossetti R, Cacciatore C. (2010). Genes involved in human premature ovarian failure. *J Mol Endocrinol.* 45:257-279.
- Peters AH, Plug AW, van Vugt MJ, de Boer P. (1997). A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome Res.* 5:66-68.
- Pezzi N, Prieto I, Kremer L, Pérez Jurado LA, Valero C, Del Mazo J, Martínez-A C, Barbero JL. (2000). STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of STAG3-related genes flanking the Williams-Beuren syndrome deletion. *FASEB J.* 14:581-592.
- Pfleghaar K, Heubes S, Cox J, Stemmann O, Speicher MR. (2005). Securin is not required for chromosomal stability in human cells. *PLoS Biol* 3: e416.
- Pittman DL, Cobb J, Schimenti KJ, Wilson LA, Cooper DM, Brignull E, Handel MA, Schimenti JC. (1998). Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for *Dmc1*, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell.* 1:697-705.
- Poleshko A, Einarson MB, Shalginskikh N, Zhang R, Adams PD, Skalka AM, Katz RA. (2010). Identification of a functional network of human epigenetic silencing factors. *J Biol Chem.* 285:422-433.
- Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. (2009). Genetics of human male infertility. *Singapore Med J.* 50:336-347.
- Prieto I, Suja JA, Pezzi N, Kremer L, Martínez-A C, Rufas JS, Barbero JL (2001) Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat Cell Biol* 3: 761–766.
- Prieto I, Pezzi N, Buesa JM, Kremer L, Barthelemy I, Carreiro C, Roncal F, Martinez A, Gomez L, Fernandez R, Martinez-A C, Barbero JL. (2002). STAG2 and Rad21 mammalian mitotic cohesins are implicated in meiosis. *EMBO Rep.* 3: 543-550.
- Prieto I, Tease C, Pezzi N, Buesa JM, Ortega S, Kremer L, Martínez A, Martínez-A C, Hultén MA, Barbero JL. (2004). Cohesin component dynamics during meiotic prophase I in mammalian oocytes. *Chromosome Res* 12: 197–213.
- Rabitsch KP, Gregan J, Schleiffer A, Javerzat JP, Eisenhaber F, 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.
- Remeseiro S, Cuadrado A, Gómez-López G, Pisano DG, Losada A. (2012). A unique role of cohesin-SA1 in gene regulation and development. *EMBO J.* 31:2090-2102.

- Revenkova E, Eijpe M, Heyting C, Gross B, Jessberger R. (2001). Novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1. *Mol Cell Biol.* 21:6984-6998.
- Revenkova E, Eijpe M, Heyting C, Hodges CA, Hunt PA, Liebe B, Scherthan H, Jessberger R. (2004). Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat Cell Biol.* 6:555-562.
- Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, Barrette T, Pandey A, Chinnaiyan AM. (2004). Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:9309-9314.
- Rieder CL, Cole RW, Khodjakov A, Sluder G. (1995). The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J Cell Biol.* 130:941-948.
- Rivera T, Ghenoiu C, Rodríguez-Corsino M, Mochida S, Funabiki H, Losada A. (2012). Xenopus Shugoshin 2 regulates the spindle assembly pathway mediated by the chromosomal passenger complex. *EMBO J.* 31:1467-1479.
- Rocquain J, Gelsi-Boyer V, Adélaïde J, Murati A, Carbuccia N, Vey N, Birnbaum D, Mozziconacci MJ, Chaffanet M. (2010). Alteration of cohesin genes in myeloid diseases. *Am J Hematol.* 85:717-719.
- Roeder GS. (1995). Sex and the single cell: meiosis in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10450-10456.
- Roig I, Dowdle JA, Toth A, de Rooij DG, Jasin M, Keeney S. (2010). Mouse TRIP13/PCH2 is required for recombination and normal higher-order chromosome structure during meiosis. *PLoS Genet.* 6: e1001062.
- Rollins RA, Morcillo P, Dorsett D. (1999). Nipped-B, a Drosophila homologue of chromosomal adherins, participates in activation by remote enhancers in the cut and Ultrabithorax genes. *Genetics.* 152:577-593.
- Rollins RA, Korom M, Aulner N, Martens A, Dorsett D. (2004). Drosophila nipped-B protein supports sister chromatid cohesion and opposes the stromalin/Scs3 cohesion factor to facilitate long-range activation of the cut gene. *Mol Cell Biol.* 24:3100-3111.
- Romanienko PJ, Camerini-Otero RD. (2000). The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell* 6:975-987.
- Royo H, Polikiewicz G, Mahadevaiah SK, Prosser H, Mitchell M, Bradley A, de Rooij DG, Burgoyne PS, Turner JM. (2010). Evidence that meiotic sex chromosome inactivation is essential for male fertility. *Curr Biol.* 20:2117-2123.
- Ru HY, Chen RL, Lu WC, Chen JH. (2002). hBUB1 defects in leukemia and lymphoma cells. *Oncogene* 21:4673-4679.
- Rubinek T, Chesnokova V, Wolf I, Wawrowsky K, Vlotides G, Melmed S. (2007). Discordant proliferation and differentiation in pituitary tumor-transforming gene-null bone marrow stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 293:C1082-1092.
- Salic A, Waters JC, Mitchison TJ. (2004). Vertebrate shugoshin links sister centromere cohesion and kinetochore microtubule stability in mitosis. *Cell* 118:567-578.
- Sambrook and Russell (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 978-0-87969-577-4.
- San-Segundo PA, Roeder GS. (1999). Pch2 links chromatin silencing to meiotic checkpoint control. *Cell* 97:313-324.
- San-Segundo PA, Roeder GS. (2000). Role for the silencing protein Dot1 in meiotic checkpoint control. *Mol Biol Cell* 11:3601-3615.

- Santucci-Darmanin S, Neyton S, Lespinasse F, Saunières A, Gaudray P, Paquis-Flucklinger V. (2002). The DNA mismatch-repair MLH3 protein interacts with MSH4 in meiotic cells, supporting a role for this MutL homolog in mammalian meiotic recombination. *Hum Mol Genet.* 11:1697-1706.
- Schalk JA, Dietrich AJ, Vink AC, Offenberg HH, van Aalderen M, Heyting C. (1998). Localization of SCP2 and SCP3 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Chromosoma* 107:540-548.
- Schär P, Fäsi M, Jessberger R. (2004). SMC1 coordinates DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Res.* 32:3921-3929. Shugoshin MEI-S332 in *Drosophila*. *Dev Cell* 11:57-68.
- Schleiffer A, Kaitna S, Maurer-Stroh S, Glotzer M, Nasmyth K, Eisenhaber F. (2003). Kleisins: a superfamily of bacterial and eukaryotic SMC protein partners. *Mol Cell* 11:571-575.
- Schmekel K, Meuwissen RL, Dietrich AJ, Vink AC, van Marle J, van Veen H, Heyting C. (1996). Organization of SCP1 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Exp Cell Res.* 226:20-30.
- Schmiesing JA, Ball AR Jr, Gregson HC, Alderton JM, Zhou S, Yokomori K. (1998). Identification of two distinct human SMC protein complexes involved in mitotic chromosome dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:12906-12911.
- Schmitz J, Watrin E, Lénárt P, Mechtler K, Peters JM. (2007). Sororin is required for stable binding of cohesin to chromatin and for sister chromatid cohesion in interphase. *Curr Biol.* 17:630-636.
- Schoenmakers S, Wassenaar E, Hoogerbrugge JW, Laven JS, Grootegoed JA, Baarends WM. (2009). Female meiotic sex chromosome inactivation in chicken. *PLoS Genet.* 5:e1000466.
- Schoenmakers S, Wassenaar E, Laven JS, Grootegoed JA, Baarends WM. (2010). Meiotic silencing and fragmentation of the male germline restricted chromosome in zebra finch. *Chromosoma* 119:311-324.
- Schramm S, Fraune J, Naumann R, Hernandez-Hernandez A, Höög C, Cooke HJ, Alsheimer M, Benavente R. (2011). A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination, and fertility. *PLoS Genet.* 7:e1002088.
- 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. (2006). Metazoan Scc4 homologs link sister chromatid cohesion to cell and axon migration guidance. *PLoS Biol.* 4:e242.
- Seitan VC, Hao B, Tachibana-Konwalski K, Lavagnoli T, Mira-Bontenbal H, Brown KE, Teng G, Carroll T, Terry A, Horan K, Marks H, Adams DJ, Schatz DG, Aragon L, Fisher AG, Krangel MS, Nasmyth K, Merkenschlager M. (2011). A role for cohesin in T-cell-receptor rearrangement and thymocyte differentiation. *Nature* 476:467-471.
- Severson AF, Ling L, van Zuylen V, Meyer BJ. (2009). 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.* 23:1763-1778.
- Sharan SK, Pyle A, Coppola V, Babus J, Swaminathan S, Benedict J, Swing D, Martin BK, Tessarollo L, Evans JP, Flaws JA, Handel MA. (2004). BRCA2 deficiency in mice leads to meiotic impairment and infertility. *Development* 131:131-142.
- Shin YH, Choi Y, Erdin SU, Yatsenko SA, Kloc M, Yang F, Wang PJ, Meistrich ML, Rajkovic A. (2010). Hormad1 mutation disrupts synaptonemal complex formation, recombination, and chromosome segregation in mammalian meiosis. *PLoS Genet.* 6(11):e1001190.
- Shintomi K, Hirano T. (2009). Releasing cohesin from chromosome arms in early mitosis: opposing actions of Wapl-Pds5 and Sgo1. *Genes Dev.* 23:2224-2236.
- Simmler MC, Rouyer F, Vergnaud G, Nyström-Lahti M, Ngo KY, de la Chapelle A, Weissenbach J. (1985). Pseudoautosomal DNA sequences in the pairing region of the human sex chromosomes. *Nature* 317:692-697.

- Sjögren C, Nasmyth K. (2001). Sister chromatid cohesion is required for postreplicative double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol*. 11:991-995.
- Skibbens RV, Skeen VP, Salmon ED. (1993). Directional instability of kinetochore motility during chromosome congression and segregation in mitotic newt lung cells: a push-pull mechanism. *J Cell Biol*. 122:859-875.
- Small S, Keerthivasan G, Huang Z, Gurbuxani S, Crispino JD. (2010). Overexpression of survivin initiates hematologic malignancies in vivo. *Leukemia* 24:1920-1926.
- Solomon DA, Kim T, Diaz-Martinez LA, Fair J, Elkahoul AG, Harris BT, Toretsky JA, Rosenberg SA, Shukla N, Ladanyi M, Samuels Y, James CD, Yu H, Kim JS, Waldman T. (2011). Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer. *Science* 333:1039-1043.
- Soshnikova N, Montavon T, Leleu M, Galjart N, Duboule D. (2010). Functional analysis of CTCF during mammalian limb development. *Dev Cell* 19:819-830.
- Stedman W, Kang H, Lin S, Kissil JL, Bartolomei MS, Lieberman PM. (2008). Cohesins localize with CTCF at the KSHV latency control region and at cellular c-myc and H19/Igf2 insulators. *EMBO J*. 27:654-666.
- Stemmann O, Zou H, Gerber SA, Gygi SP, Kirschner MW. (2001). Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell* 107:715-726.
- Steuerwald NM, Steuerwald MD, Mailhes JB. (2005). Post-ovulatory aging of mouse oocytes leads to decreased MAD2 transcripts and increased frequencies of premature centromere separation and anaphase. *Mol Hum Reprod*. 11:623-630.
- Stratmann R, Lehner CF. (1996). Separation of sister chromatids in mitosis requires the *Drosophila* pimpls product, a protein degraded after the metaphase/anaphase transition. *Cell* 84:25-35.
- Storchová Z, Becker JS, Talarek N, Kögelsberger S, Pellman D. (2011). Bub1, Sgo1, and Mps1 mediate a distinct pathway for chromosome biorientation in budding yeast. *Mol Biol Cell*. 22:1473-1485.
- Strunnikov AV, Larionov VL, Koshland D. (1993) SMC1: An essential yeast gene encoding a putative head-rod-tail protein is required for nuclear division and defines a new ubiquitous protein family. *The Journal of Cell Biology*, 123:1635-1648.
- Strunnikov AV, Hogan E, Koshland D. (1995) SMC2, a *Saccharomyces cerevisiae* gene essential for chromosome segregation and condensation, defines a subgroup within the SMC family. *Genes Dev*, 9:587-599.
- Stursberg S, Riwar B, Jessberger R. (1999). Cloning and characterization of mammalian SMC1 and SMC3 genes and proteins, components of the DNA recombination complexes RC-1. *Gene* 228:1-12.
- Sudakin V, Ganoth D, Dahan A, Heller H, Hershko J, Luca FC, Ruderman JV, Hershko A. (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol Biol Cell* 6:185-197.
- Sudakin V, Chan GK, Yen TJ. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol*. 154:925-936.
- Sumara I, Vorlaufer E, Gieffers C, Peters BH, Peters JM. (2000). Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J Cell Biol*. 151:749-762.
- Sumara I, Vorlaufer E, Stukenberg PT, Kelm O, Redemann N, Nigg EA, Peters JM. (2002). The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol Cell* 9:515-525.
- Summers KC, Shen F, Sierra Potchanant EA, Phipps EA, Hickey RJ, Malkas LH. (2011). Phosphorylation: the molecular switch of double-strand break repair. *Int J Proteomics* 2011;373816.
- Symington LS, Gautier J. (2011). Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet*. 45:247-271.

- Tachibana-Konwalski K, Godwin J, van der Weyden L, Champion L, Kudo NR, Adams DJ, Nasmyth K. (2010). Rec8-containing cohesin maintains bivalents without turnover during the growing phase of mouse oocytes. *Genes Dev.* 24:2505-2516.
- Tarsounas M, Morita T, Pearlman RE, Moens PB. (1999). RAD51 and DMC1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and synaptonemal complexes. *J Cell Biol.* 147:207-220.
- Tfelt-Hansen J, Kanuparthi D, Chattopadhyay N. (2006). The emerging role of pituitary tumor transforming gene in tumorigenesis. *Clin Med Res.* 4:130-137. Review.
- Tonkin ET, Wang TJ, Lisgo S, Bamshad MJ, Strachan T. (2004). 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.* 36:636-641.
- Torres RM, Kuhn R. (1997). *Laboratory protocols for conditional gene targeting.* Oxford: Oxford University press. New York.
- Tóth A, Ciosk R, Uhlmann F, Galova M, Schleiffer A, Nasmyth K. (1999) Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. *Genes & Dev.* 13:320–333.
- Tres LL. (2005). XY chromosomal bivalent: nucleolar attraction. *Mol Reprod Dev.* 72:1-6.
- Tsutsumi M, Kogo H, Kowa-Sugiyama H, Inagaki H, Ohye T, Kurahashi H. (2011). Characterization of a novel mouse gene encoding an SYCP3-like protein that relocalizes from the XY body to the nucleolus during prophase of male meiosis I. *Biol Reprod.* 85:165-171.
- Turner JM, Aprelikova O, Xu X, Wang R, Kim S, Chandramouli GV, Barrett JC, Burgoyne PS, Deng CX. (2004). BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Curr Biol.* 14:2135-2142.
- Turner JM, Mahadevaiah SK, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig A, Xu X, Deng CX, Burgoyne PS. (2005). Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat Genet.* 37:41-47.
- Tyson JJ, Novak B. (2001). Regulation of the eukaryotic cell cycle: molecular antagonism, hysteresis, and irreversible transitions. *J Theor Biol.* 210:249-263.
- Uhlmann F, Nasmyth K. (1998). Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. *Curr Biol.* 8:1095-1101.
- Uhlmann F, Wernic D, Poupart MA, Koonin EV, Nasmyth K. (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* 103:375-386.
- Uhlmann F. (2003). Chromosome cohesion and separation: from men and molecules. *Curr Biol.* 13:R104-114.
- Unal E, Heidinger-Pauli JM, Koshland D. (2007). DNA double-strand breaks trigger genome-wide sister-chromatid cohesion through Eco1 (Ctf7). *Science* 317:245-248.
- van der Heijden GW, Derijck AA, Pósfai E, Giele M, Pelczar P, Ramos L, Wansink DG, van der Vlag J, Peters AH, de Boer P. (2007). Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet.* 39:251-258.
- 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. (2005). 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.* 37:468-470.
- Vernet N, Mahadevaiah SK, Ojarikre OA, Longepied G, Prosser HM, Bradley A, Mitchell MJ, Burgoyne PS. (2011). The Y-encoded gene *zfy2* acts to remove cells with unpaired chromosomes at the first meiotic metaphase in male mice. *Curr Biol.* 21:787-793.

- Viera A, Santos JL, Page J, Parra MT, Calvente A, Cifuentes M, Gómez R, Lira R, Suja JA, Rufas JS. (2004). DNA double-strand breaks, recombination and synapsis: the timing of meiosis differs in grasshoppers and flies. *EMBO Rep.* 5:385-391.
- Visintin R, Prinz S, Amon A. (1997). CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science* 278:460-463.
- Vorlaufer E, Peters JM. (1998). Regulation of the cyclin B degradation system by an inhibitor of mitotic proteolysis. *Mol Biol Cell* 9:1817-1831.
- Voronina E, Wessel GM. (2003). The regulation of oocyte maturation. *Curr Top Dev Biol.* 58:53-110.
- Wada N, Yoshida A, Miyagi Y, Yamamoto T, Nakayama H, Suganuma N, Matsuzo K, Masudo K, Hirakawa S, Rino Y, Masuda M, Imada T. (2008). Overexpression of the mitotic spindle assembly checkpoint genes hBUB1, hBUBR1 and hMAD2 in thyroid carcinomas with aggressive nature. *Anticancer Res.* 28:139-144.
- Waizenegger IC, Hauf S, Meinke A, Peters JM. (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* 103:399-410.
- Waizenegger I, Giménez-Abián JF, Wernic D, Peters JM. (2002). Regulation of human separase by securin binding and autocleavage. *Curr Biol.* 12:1368-1378.
- Wang Z, Melmed S. (2000). Characterization of the murine pituitary tumor transforming gene (PTTG) and its promoter. *Endocrinology* 141:763-771.
- Wang Z, Yu R, Melmed S. (2001). Mice lacking pituitary tumor transforming gene show testicular and splenic hypoplasia, thymic hyperplasia, thrombocytopenia, aberrant cell cycle progression, and premature centromere division. *Molecular Endocrinology* 15: 1870–1879.
- Wang F, Yoder J, Antoshechkin I, Han M. (2003). *Caenorhabditis elegans* EVL-14/PDS-5 and SCC-3 are essential for sister chromatid cohesion in meiosis and mitosis. *Mol Cell Biol.* 23:7698-7707.
- Wang X, Yang Y, Duan Q, Jiang N, Huang Y, Darzynkiewicz Z, Dai W. (2008). sSgo1, a major splice variant of Sgo1, functions in centriole cohesion where it is regulated by Plk1. *Dev Cell* 14:331-341.
- Watanabe Y, Nurse P. (1999). Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* 400:461-464.
- Watanabe Y, Yokobayashi S, Yamamoto M, Nurse P. (2001). Pre-meiotic S phase is linked to reductional chromosome segregation and recombination. *Nature* 409:359-363.
- Watrín E, Schleiffer A, Tanaka K, Eisenhaber F, Nasmyth K, Peters JM. (2006). Human Scc4 is required for cohesin binding to chromatin, sister-chromatid cohesion, and mitotic progression. *Curr Biol.* 16:863-874.
- Weaver BA, Bonday ZQ, Putkey FR, Kops GJ, Silk AD, Cleveland DW. (2003). Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *Cell Biol.* 162:551-563.
- Weaver BA, Cleveland DW. (2009). The role of aneuploidy in promoting and suppressing tumors. *J Cell Biol.* 185:935-937.
- Weitzer S, Lehane C, Uhlmann F. (2003). A model for ATP hydrolysis-dependent binding of cohesin to DNA. *Curr Biol.* 13:1930-1940.
- 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. (2008). Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* 451:796-801.
- West AG, Gaszner M, Felsenfeld G. (2002). Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev.* 16:271-288.

- Whelan G, Kreidl E, Wutz G, Egner A, Peters JM, Eichele G. (2011). Cohesin acetyltransferase Esco2 is a cell viability factor and is required for cohesion in pericentric heterochromatin. *EMBO J.* 31:71-82.
- Williams BR, Prabhu VR, Hunter KE, Glazier CM, Whittaker CA, Housman DE, Amon A. (2008). Aneuploidy affects proliferation and spontaneous immortalization in mammalian cells. *Science* 322:703-709.
- Wiltshire T, Park C, Caldwell KA, Handel MA. (1995). Induced premature G2/M-phase transition in pachytene spermatocytes includes events unique to meiosis. *Dev Biol.* 169:557-567.
- Wojtasz L, Daniel K, Roig I, Bolcun-Filas E, Xu H, Boonsanay V, Eckmann CR, Cooke HJ, Jasin M, Keeney S, McKay MJ, Toth A. (2009). Mouse HORMAD1 and HORMAD2, two conserved meiotic chromosomal proteins, are depleted from synapsed chromosome axes with the help of TRIP13 AAA-ATPase. *PLoS Genet.* 5(10):e1000702.
- Wu FM, Nguyen JV, Rankin S. (2011). A conserved motif at the C terminus of sororin is required for sister chromatid cohesion. *J Biol Chem.* 286:3579-3586.
- Xu Y, Ashley T, Brainerd EE, Bronson RT, Meyn MS, Baltimore D. (1996). Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Dev.* 10:2411-2422.
- Xu X, Aprelikova O, Moens P, Deng CX, Furth PA. (2003). Impaired meiotic DNA-damage repair and lack of crossing-over during spermatogenesis in BRCA1 full-length isoform deficient mice. *Development.* 130:2001-2012.
- Xu H, Beasley MD, Warren WD, van der Horst GT, McKay MJ. (2005). Absence of mouse REC8 cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis. *Dev Cell* 8:949-961.
- Xu H, Balakrishnan K, Malaterre J, Beasley M, Yan Y, Essers J, Appeldoorn E, Tomaszewski JM, Vazquez M, Verschoor S, Lavin MF, Bertonecello I, Ramsay RG, McKay MJ. (2010). Rad21-cohesin haploinsufficiency impedes DNA repair and enhances gastrointestinal radiosensitivity in mice. *PLoS One* 5:e12112.
- Yamamoto A, Guacci V, Koshland D. (1996). Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). *J Cell Biol.* 133:99-110. a)
- Yamamoto A, Guacci V, Koshland D. (1996). Pds1p is required for faithful execution of anaphase in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 133:85-97. b)
- Yan W. (2009). Male infertility caused by spermiogenic defects: lessons from gene knockouts. *Mol Cell Endocrinol.* 306:24-32.
- Yang F, De La Fuente R, Leu NA, Baumann C, McLaughlin KJ, Wang PJ. (2006). Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis. *J Cell Biol.* 173:497-507.
- Yang F, Eckardt S, Leu NA, McLaughlin KJ, Wang PJ. (2008). Mouse TEX15 is essential for DNA double-strand break repair and chromosomal synapsis during male meiosis. *J Cell Biol.* 180:673-679.
- Yokobayashi S, Yamamoto M, Watanabe Y. (2003). Cohesins determine the attachment manner of kinetochores to spindle microtubules at meiosis I in fission yeast. *Mol. Cell Biol.* 23, 3965-3973.
- Yokobayashi S, Watanabe Y. (2005). The kinetochore protein Moa1 enables cohesion-mediated monopolar attachment at meiosis I. *Cell* 123:803-817.
- Yoshida K, Kondoh G, Matsuda Y, Habu T, Nishimune Y, Morita T. (1998). The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol Cell* 1:707-718.
- Yuan L, Liu JG, Zhao J, Brundell E, Daneshmandi B, Höög C. (2000). The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell* 5:73-83.

- Yuan J, Xu BZ, Qi ST, Tong JS, Wei L, Li M, Ouyang YC, Hou Y, Schatten H, Sun QY. (2010). MAPK-activated protein kinase 2 is required for mouse meiotic spindle assembly and kinetochore-microtubule attachment. *PLoS One* 5:e11247.
- Zalevsky J, MacQueen AJ, Duffy JB, Kempfues KJ, Villeneuve AM. (1999). Crossing over during *Caenorhabditis elegans* meiosis requires a conserved MutS-based pathway that is partially dispensable in budding yeast. *Genetics* 153:1271-1283.
- 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. (2008). Acetylation of Smc3 by Eco1 is required for S phase sister chromatid cohesion in both human and yeast. *Mol Cell* 31:143-151. (a)
- 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. (2008). Overexpression of Separase induces aneuploidy and mammary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:13033-13038. (b)
- 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. (2009). Dosage effects of cohesin regulatory factor PDS5 on mammalian development: implications for cohesinopathies. *PLoS One*. 4:e5232.
- Zhang N, Panigrahi AK, Mao Q, Pati D. (2011). Interaction of Sororin protein with polo-like kinase 1 mediates resolution of chromosomal arm cohesion. *J Biol Chem*. 286:41826-41837.
- Zou H, McGarry TJ, Bernal T, Kirschner MW. (1999). Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science* 285:418-422.
- Zou H, Stemman O, Anderson JS, Mann M, Kirschner MW. (2002). Anaphase specific auto-cleavage of separase. *FEBS Lett*. 528:246-250.

PUBLICACIONES

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

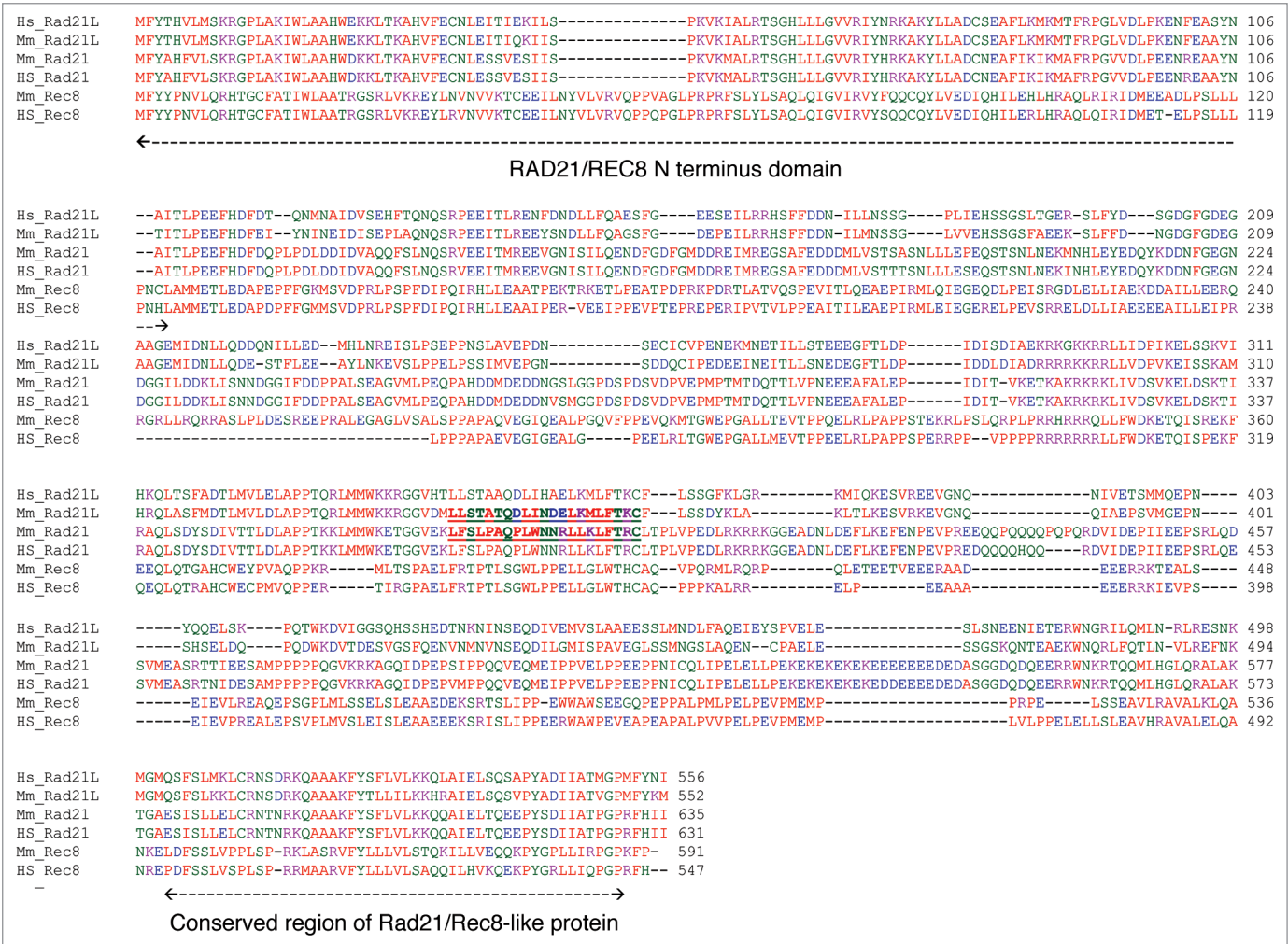


Figure 1. Alignment of the three members of the α -kleisin family (RAD21L, RAD21 and REC8) from mouse (Mm) and human (Hs). The mouse and human ORFs of RAD21L, RAD21 and REC8 were translated and the proteins aligned using CLUSTAL. The mouse RAD21L protein has 56% similarity (41% identity) with mouse RAD21 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

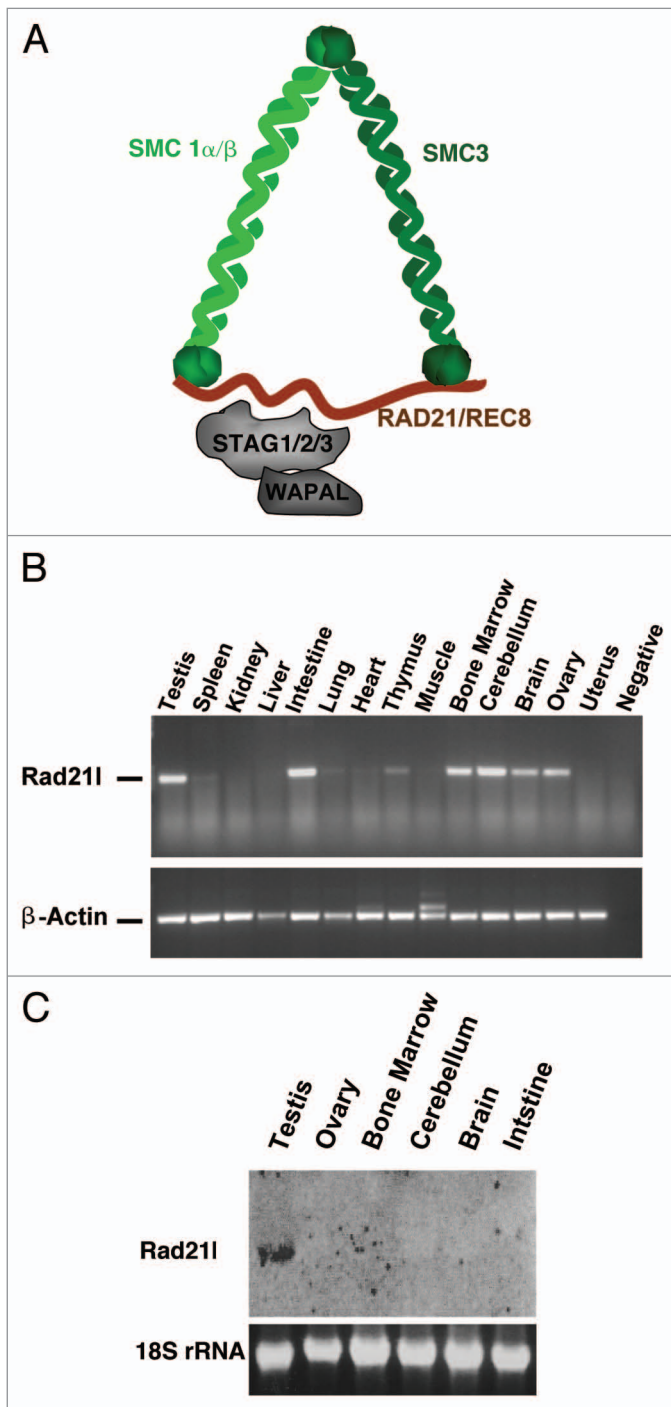


Figure 2. Model of the cohesin complex and mouse tissue expression pattern of *Rad21l*. (A) Schematic representation of the ring-like model of the mammalian CC and the cohesin-regulator WAPAL. In the ring model of the CC two members of the SMC family (SMC1 α/β and SMC3) associate with one α -kleisin 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.

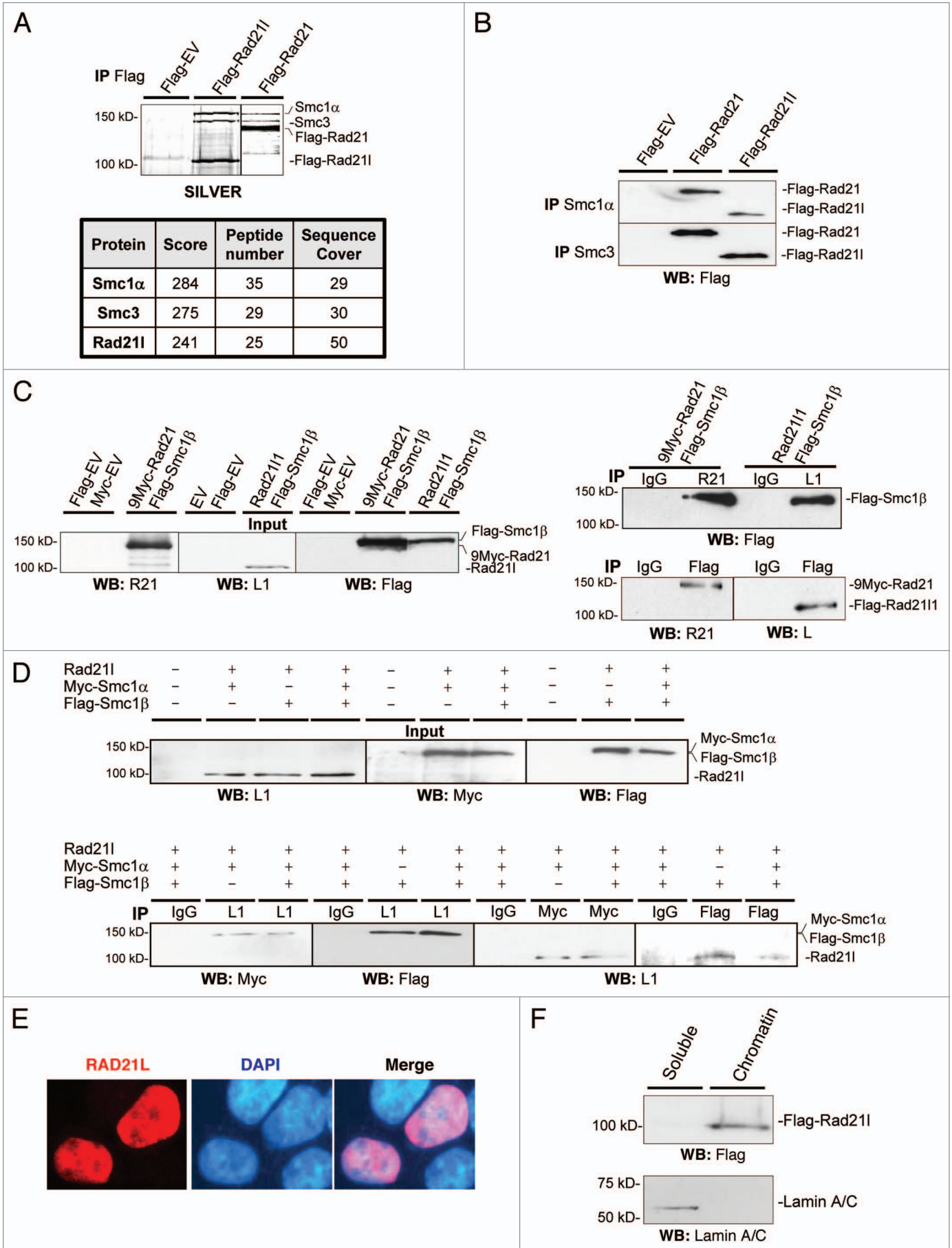
Finally, we analyzed the genetic relationship of RAD21L with their paralogs RAD21 and REC8 by using an in silico analysis of sequenced genomes from sea urchin to humans. This evolutionary analysis shows that RAD21L is most likely a paralog of RAD21 and is present from bony fish to mammals including reptiles 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.



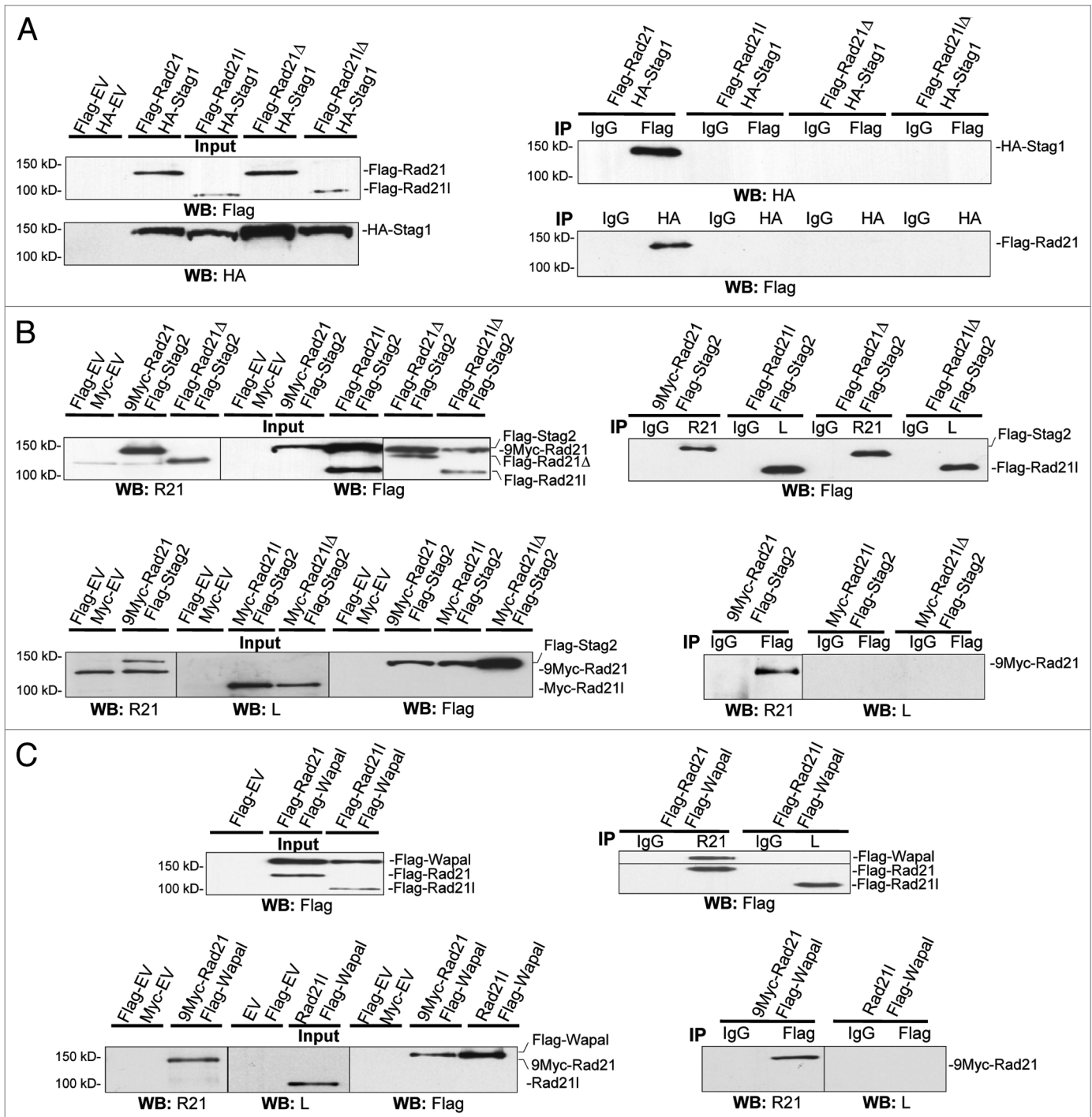


Figure 4. STAG1, STAG2 and WAPAL do not interact with RAD21L. HEK 293T cells were transfected or cotransfected with the indicated expression vectors or empty vector. IP was performed with the indicated antibody. IP samples were resolved by SDS-PAGE and western-blotted with the indicated antibody. Immunoprecipitation 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 Δ , $\Delta_{345,365}$ 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.

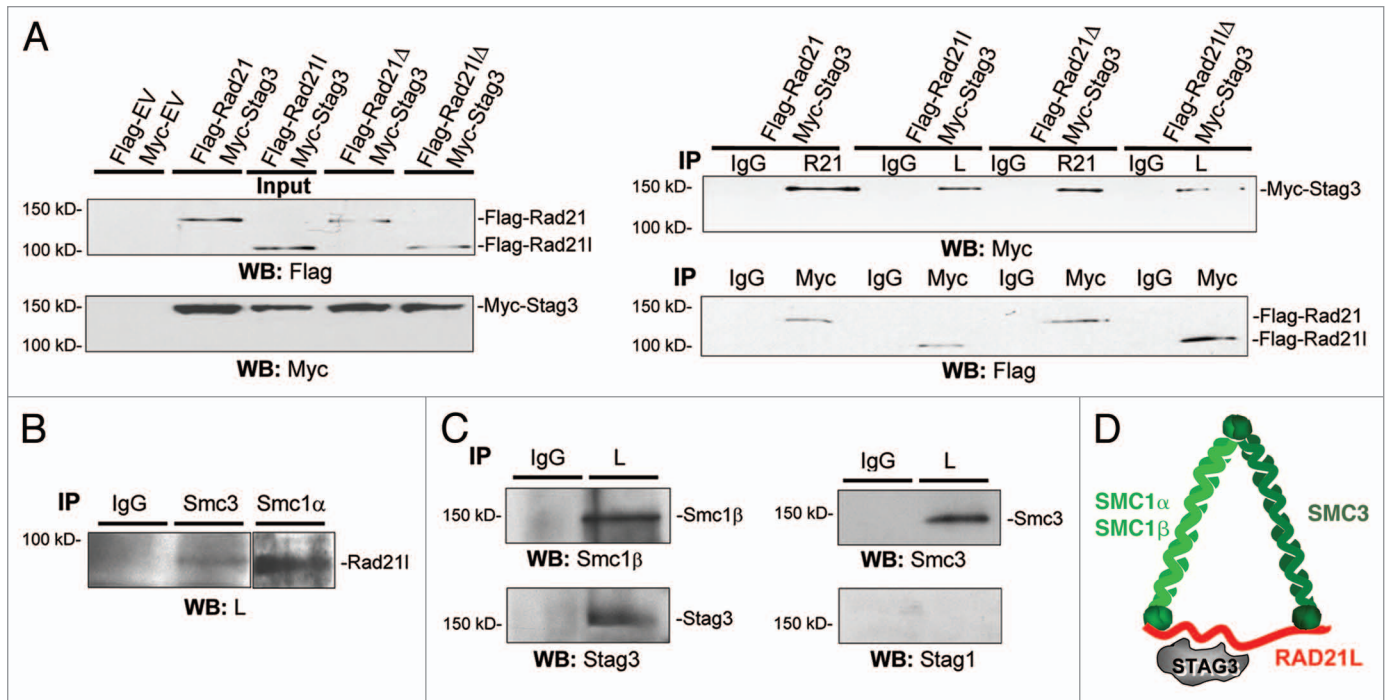


Figure 5. Analysis of the interactions of the subunits of the cohesin complex with RAD21L and proposed model of the new cohesin complex. (A) Flag-RAD21L and Flag-RAD21 immunoprecipitate Myc-STAG3 and the IP is not disturbed by the deletion of the interacting region in RAD21 (RAD21Δ) or in its counterpart region in RAD21L (RAD21Δ). (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; Rad21Δ, $\Delta_{372,392}$ RAD21; Rad21Δ, $\Delta_{345,365}$ RAD21L.

Generation of plasmids. Full-length cDNAs encoding *Rad21l*, *Rad21* and *Wapal* were RT-PCR amplified from murine testis RNA. *Smc1β* 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-*Smc1α* 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 SMC1α serum K988,³⁴ (1:250), rabbit α SMC3 serum K987,³⁵ (1:250),

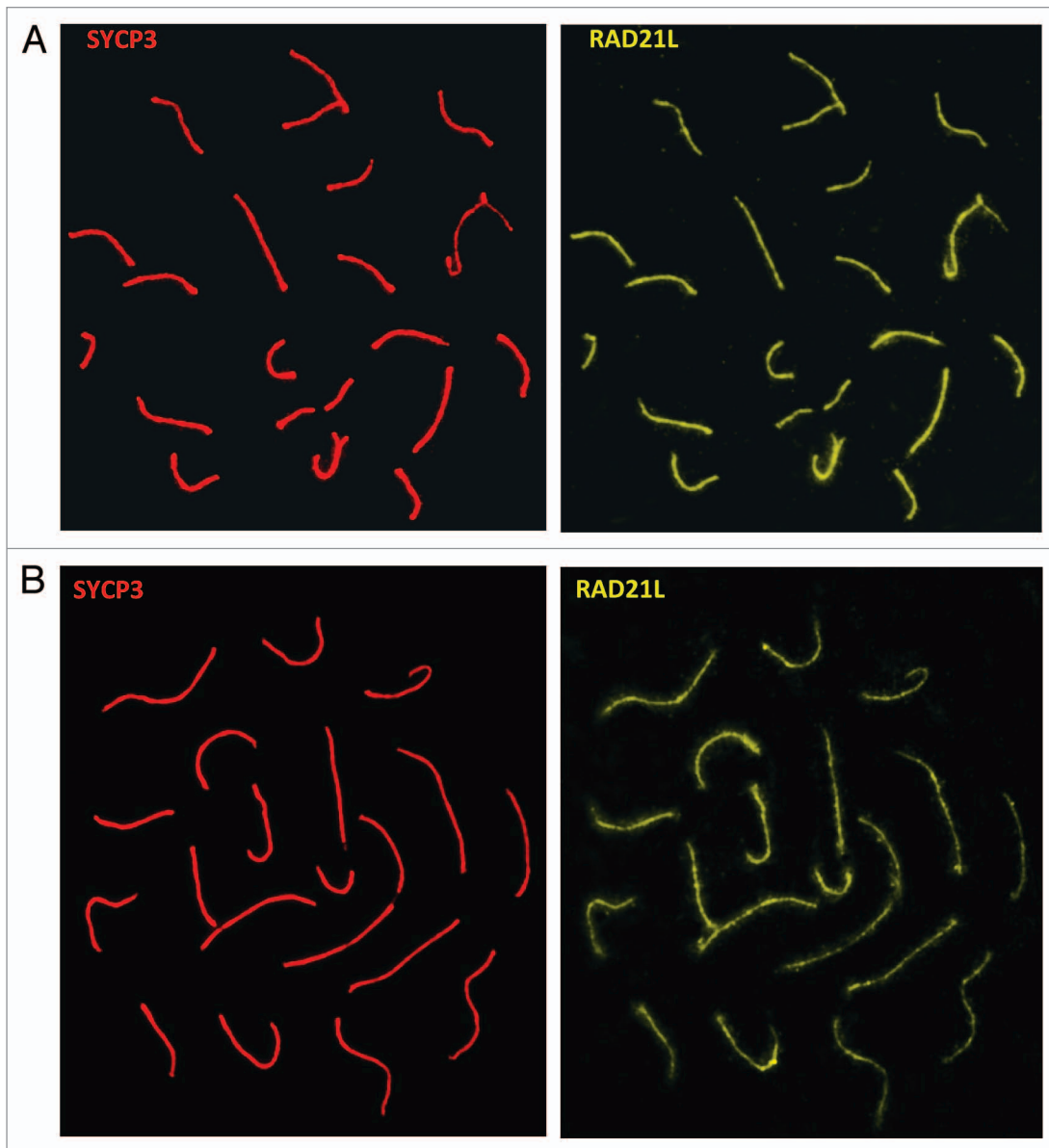


Figure 6. RAD21L is located at the LEs of the SC of mouse meiocytes. (A) Double immunolabeling of RAD21L (green) and SYCP3 (red) in a wild-type spermatocyte at early pachytene. (B) Double immunolabeling of RAD21L and SYCP3 in a pachytene oocyte.

mouse α HA.11 IgG MMS-(5 μ L, approx. 10 μ g/1 mg prot.; 101R, Covance), ChromPure 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

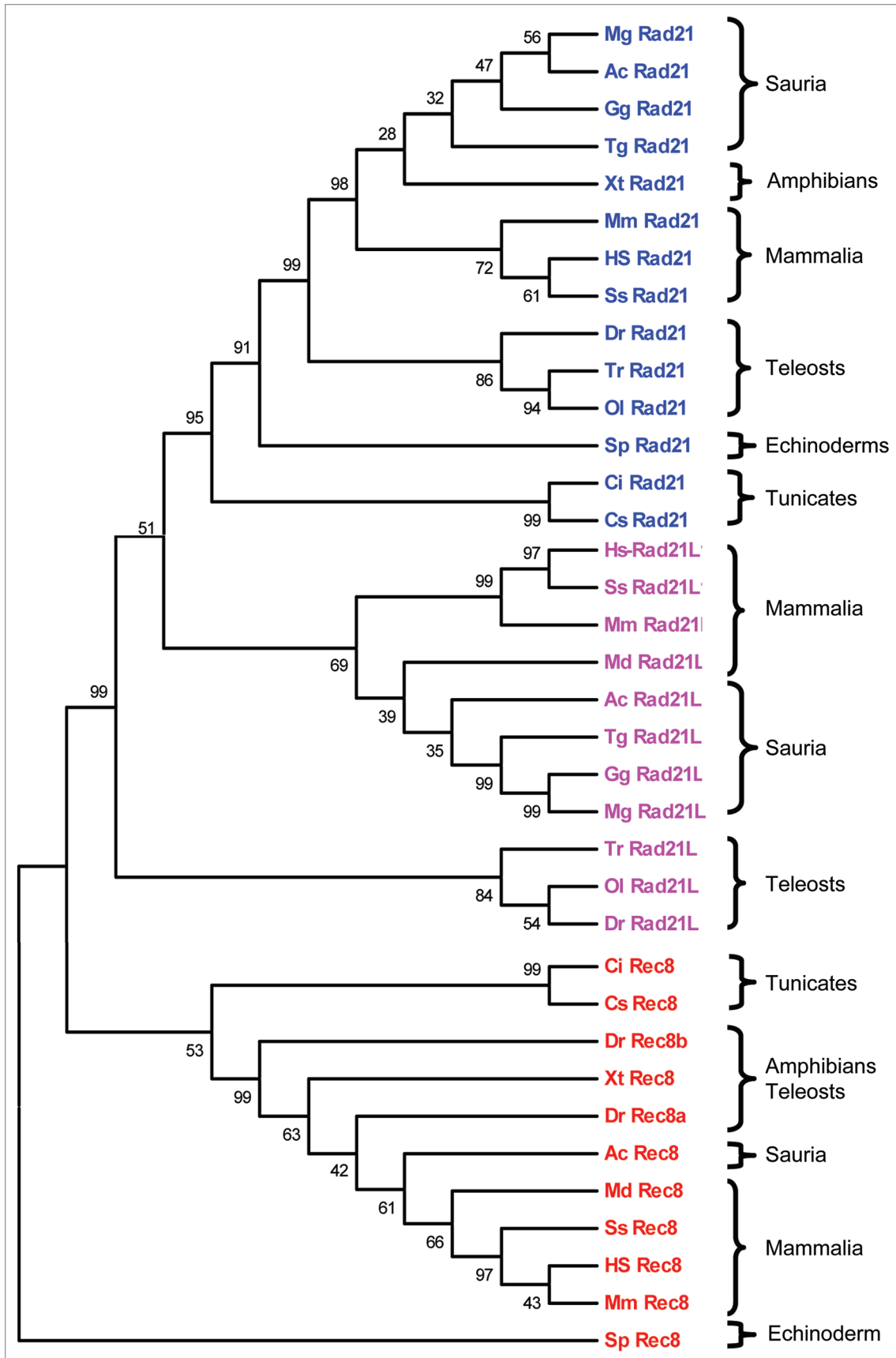


Figure 7. Phylogenetic tree of presumed RAD21L, RAD21 and REC8 orthologs. The database sequence accession number of each protein is presented in Table 1. The indicated numbers represent the bootstrap values. Major phylogenetic groups are indicated.

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 workHQ603828	+/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	+/ENSDDARP00000074083	+/Q7ZW30	+/ENSDDARP00000091417 +/ENSDDARP00000091005
<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-Quifones 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, Lehan 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 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; 23:1763-78.
- 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.

The cohesin subunit RAD21L functions in meiotic synapsis and exhibits sexual dimorphism in fertility

Yurema Herrán^{1,7}, Cristina Gutiérrez-Caballero^{1,7}, Manuel Sánchez-Martín², Teresa Hernández¹, Alberto Viera³, José Luis Barbero⁴, Enrique de Álava¹, Dirk G de Rooij⁵, José Ángel Suja³, Elena Llano^{1,6,*} and Alberto M Pendás^{1,*}

¹Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (CSIC-USAL), Campus Miguel de Unamuno S/N, Salamanca, Spain, ²Departamento de Medicina, Campus Miguel de Unamuno S/N, Salamanca, Spain, ³Unidad de Biología Celular, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, ⁴Departamento de Proliferación Celular y Desarrollo, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, Spain, ⁵Center for Reproductive Medicine, Academic Medical Center, University of Amsterdam, The Netherlands and ⁶Departamento de Fisiología, Campus Miguel de Unamuno S/N, Salamanca, Spain

The cohesin complex is a ring-shaped proteinaceous structure that entraps the two sister chromatids after replication until the onset of anaphase when the ring is opened by proteolytic cleavage of its α -kleisin subunit (RAD21 at mitosis and REC8 at meiosis) by separase. RAD21L is a recently identified α -kleisin that is present from fish to mammals and biochemically interacts with the cohesin subunits SMC1, SMC3 and STAG3. RAD21L localizes along the axial elements of the synaptonemal complex of mouse meiotic cells. However, its existence as a bona fide cohesin and its functional role awaits *in vivo* validation. Here, we show that male mice lacking RAD21L are defective in full synapsis of homologous chromosomes at meiotic prophase I, which provokes an arrest at zygotene and leads to total azoospermia and consequently infertility. In contrast, RAD21L-deficient females are fertile but develop an age-dependent sterility. Thus, our results provide *in vivo* evidence that RAD21L is essential for male fertility and in females for the maintenance of fertility during natural aging.

The EMBO Journal advance online publication, 8 July 2011; doi:10.1038/emboj.2011.222

Subject Categories: cell cycle

Keywords: chromosome; cohesin; kleisin; meiosis

*Corresponding authors. E Llano or AM Pendás, Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (CSIC-USAL), Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain. Tel.: +34 92 329 4809; Fax: +34 92 329 4743; E-mail: ellano@usal.es or amp@usal.es

⁷These authors contributed equally to this work

Received: 15 April 2011; accepted: 16 June 2011

Introduction

Structurally, the somatic cohesin complex consists of four subunits: two members of the family of proteins responsible for the structural maintenance of chromosome (SMC1 α and SMC3) that heterodimerize, one kleisin subunit that closes the ring (Scc1/RAD21) and is the substrate for the protease separase, and a HEAT repeat domain protein (SA1/STAG1 or SA2/STAG2). In vertebrates, during prophase, most of the cohesins are dissociated from the chromatid arms by phosphorylation of the STAG1/2 subunit by PLK1 (polo-like-kinase 1) (Losada *et al.*, 2002; Sumara *et al.*, 2002). The remaining centromeric cohesins are released from chromosomes at the onset of anaphase by the cleavage of RAD21 by separase (Musacchio and Salmon, 2007).

During meiosis, two rounds of chromosome segregation follow a single round of replication to generate haploid gametes. The first meiotic division differs from mitosis in that homologous chromosomes pair, synapse, recombine and segregate to opposite poles as a result of their mono-orientation. The second meiotic division is similar to mitosis since the two recombined chromatids segregate to opposite poles (bi-orientation). During the onset of anaphase I, loss of sister chromatid arm cohesion occurs following separase-dependent cleavage of REC8, that replaces RAD21 during meiosis (Kudo *et al.*, 2006, 2009). However, centromeric cohesion is maintained by the protective action of shugoshin-like-2 preventing separase-mediated cleavage of REC8 (Llano *et al.*, 2008). This mechanism enables bi-orientation of recombined homologues. Once chromosomes have congressed at the metaphase II plate, separase is reactivated and centromeric cohesin complexes are released to allow chromatid segregation. In addition to REC8 (Parisi *et al.*, 1999), a meiotic paralogue of RAD21, there are also meiosis-specific mammalian homologues of SMC1 α , and STAG1–2, that is SMC1 β and STAG3, respectively (Prieto *et al.*, 2001; Gruber *et al.*, 2003).

Aside from these canonical functions, the cohesin complexes also participate in somatic homologous recombination between sister chromatids allowing the assembly of recombinational repair complexes, as well as recombination between homologous chromatids by assembly of the synaptonemal complex (SC) in meiotic cells (Klein *et al.*, 1999; Hartsuiker *et al.*, 2001). The SC consists of a proteinaceous structure, the axial element (AE), allowing the association of each pair of sister chromatids. After pairing, the AEs are called lateral elements (LEs) to which transverse filaments (TFs) associate to give rise to the tripartite SCs. The SC provides the structural framework for synapsis, double-strand break (DSB) repair and exchange between homologues (Henderson and Keeney, 2005). During prophase I, most if not all, cohesin subunits expressed in mammalian spermatocytes colocalize with SYCP3, a structural AE/LE component (reviewed in Suja and Barbero, 2009). In fission and budding

yeast, the RAD21/Sccl1 α -kleisin of the cohesin complex is replaced by the meiosis-specific REC8 protein. Yeast *rec8* mutants exhibit premature sister chromatid separation during prophase I, that are defective for the assembly of the SC (Klein *et al*, 1999). It has been assumed that most eukaryotes display a dual α -kleisin system (REC8 versus RAD21) similar to the well-studied system of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*, aside from the notable exception of *Caenorhabditis elegans* (Severson *et al*, 2009). Very recently, we and two other groups have biochemically characterized a new member of the α -kleisin family of proteins, RAD21L (Gutiérrez-Caballero *et al*, 2011; Ishiguro *et al*, 2011; Lee and Hirano, 2011). RAD21L, is a paralogue of RAD21 and it is transcribed more abundantly in testis and has been postulated to be a canonical cohesin subunit. RAD21L interacts with SMC3, SMC1 α/β and STAG3 (Gutiérrez-Caballero *et al*, 2011; Ishiguro *et al*, 2011; Lee and Hirano, 2011). Consequently, the protein is localized to the AEs/LEs in meicytes.

From the four meiotic-specific cohesins described (REC8, STAG3, SMC1 β and RAD21L), loss of function mouse models for REC8 (Bannister *et al*, 2004; Xu *et al*, 2005) and SMC1 β (Revenkova *et al*, 2004) have been developed. REC8 mutant male and female mice are sterile and show severe defects in synapsis, and chiasma formation (Bannister *et al*, 2004; Xu *et al*, 2005). SMC1 β -deficient males show a pachytene arrest whereas mutant females present a premature loss of cohesion at metaphase II that leads to sterility (Revenkova *et al*, 2004).

In this work, we describe the precise localization of RAD21L in mouse spermatocytes and its functional characterization by a gene targeted mutation in the mouse. We provide cytological and *in vivo* evidence showing that the roles of RAD21L differ from those of RAD21 and REC8, and that RAD21L is as essential as REC8 for driving the initial steps of prophase I in male meiosis. RAD21L-deficient males show a defect in chromosome synapsis at prophase I, which provokes an arrest at a zygotene-like stage leading to total azoospermia. In contrast, RAD21L-deficient females are fertile but develop an age-dependent sterility. Thus, our results demonstrate for the first time that the recently identified RAD21L is a functionally relevant meiotic α -kleisin, which is essential for male fertility and for the maintenance of fertility during natural aging.

Results and discussion

Immunolocalization of the RAD21L protein

The recently identified third member of the α -kleisin protein family in mammals, RAD21L, is expressed in spermatocytes throughout meiosis I (Ishiguro *et al*, 2011; Lee and Hirano, 2011), with some discrepancies in relation with its time of disappearance (pachytene versus metaphase I). In order to assess the localization of RAD21L, we carried out a detailed analysis of mouse spermatocytes spreads using immunofluorescent (IF) antibodies. RAD21L was first detected at the leptotene stage as short threads that colocalized with SYCP3 along developing AEs (Figure 1A–D). During zygotene, RAD21L colocalized with SYCP3 at both the autosomal AEs/LEs, and the unsynapsed AEs of the sex chromosomes (Figure 1E–H). In early pachytene, RAD21L was detected as lines along the autosomal SCs where it colocalized with

SYCP3. Further signals for RAD21L were found at the pseudoautosomal region of homology between the sex chromosomes, where their AEs are synapsed. Furthermore, there was some additional staining in the unsynapsed AEs of the XY bivalent (Figure 1I and J). By late pachytene, there was an increase in RAD21L labelling on the sex chromosomal AEs and on the chromatin of the sex body (Figure 1K and L). This localization contrasts with the observed weak staining of REC8 at the AEs of the sex chromosomes at pachytene (see asterisks in Figure 7Q and R). In early diplotene, the intensity of the RAD21L labelling decreased along the desynapsing and still synapsed LEs (Figure 1M–P) to finally disappear by mid-diplotene (Figure 1Q and R). Concomitantly, RAD21L labelling began to accumulate at centromeres (Figure 1O–T) while it was progressively lost from the AEs and the chromatin of the sex chromosomes (Figure 1M–T). During diakinesis, RAD21L was highly enriched at the centromeres of all autosomes and was not detected along the desynapsed LEs. However, there was a faint RAD21L signal at the unsynapsed AEs of the sex chromosomes (Figure 2A and B). This pattern of RAD21L distribution remained during metaphase I (Figure 2C–F). At higher magnification, metaphase I autosomal bivalents show RAD21L signal at their centromeres but the labelling did not completely colocalize with SYCP3 at the inner centromere domain (ICD) (Figure 2G–I). With regards to the metaphase I sex bivalent, a faint RAD21L signal was observed along its interchromatid domain (Figure 2J). In addition, the centromeric RAD21L signal at the Y was larger than that at the centromere of the X chromosome (Figure 2J). The labelling of RAD21L was similar for both metaphase I and anaphase I (Figure 2F and K). During the second meiotic division, RAD21L was detected as a pair of brightly stained spots at the centromeres of metaphase II chromosomes (Figure 2L), and as single spots in segregating chromatids at anaphase II (Figure 2M).

Our results partially agree with those very recently reported on the distribution of RAD21L in mouse spermatocytes by Ishiguro *et al* (2011) and to a lesser extent with those reported by Hirano's group (Lee and Hirano, 2011). However, there are some differences with respect to the distribution pattern of RAD21L along the AEs/LEs. Besides the remarkable divergence in the timing of disappearance of RAD21L during meiosis I (pachytene versus metaphase I), these two groups described that RAD21L and REC8 localize as discontinuous (mutually exclusive) lines along zygotene AEs/LEs and pachytene SCs. Based on this, Ishiguro *et al* (2011) have proposed a cohesin 'barcode' model where meiosis-specific cohesin complexes with either RAD21L or REC8 have intrinsic and alternating loading sites along the AEs/LEs, which might facilitate homologous pairing. However, our antibodies detected continuous lines along SCs. These discrepancies might be due to differences in image acquisition, different sensitivity of the antibodies used, or dilutions employed. This aspect will need further clarification.

The three kinds of cohesin complexes comprised of RAD21, RAD21L or REC8 might have different functions during both meiotic divisions since their distribution and dynamics are different not only during prophase I, but also during metaphase I and metaphase II. For instance, in metaphase II chromosomes, RAD21L appears as two separate signals at each centromere (Figure 2L), which is in contrast to RAD21 that has not been detected at centromeres (Parra *et al*,

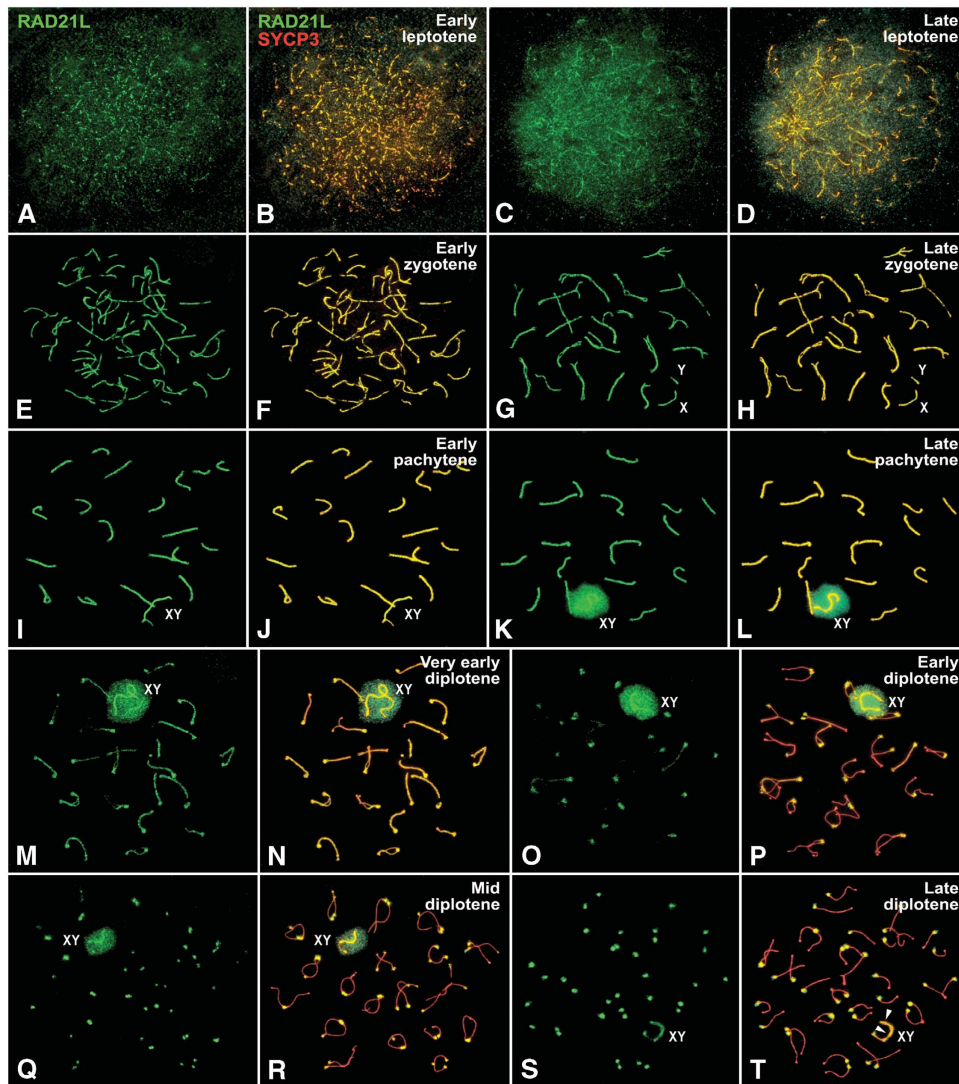


Figure 1 Distribution of RAD21L during prophase I. Double immunolabelling of RAD21L (green) and SYCP3 (red) in spread spermatocytes. (A–D) During leptotene, RAD21L appears as a succession of small dots that colocalize with SYCP3 along developing AEs. (E–H) During zygotene, RAD21L and SYCP3 colocalize along AEs/LEs. Sex chromosomes (X, Y) have still not synapsed. (I–L) RAD21L colocalizes with SYCP3 along autosomal SCs and sex chromosomes (XY) AEs. In late pachytene (K, L), RAD21L appears enriched at the chromatin of the sex body (XY) and at their AEs. (M–P) In early diplotene, RAD21L vanishes along desynapsing autosomal LEs, but is still enriched at the sex AEs and at the sex body (XY). (Q–T) In mid and late diplotene, RAD21L appears at the centromeres and along the sex AEs, and faintly at the sex body (XY).

2004), while REC8 appears at the ICD as one spot between sister kinetochores consistent with its role in centromere cohesion (Kudo *et al*, 2006). While the distribution of REC8 is consistent with its function in maintaining both arm and centromere cohesion during the two meiotic divisions (Kudo *et al*, 2006, 2009; Tachibana-Konwalski *et al*, 2010), the localization of RAD21 and RAD21L suggests that they might have different roles. In this regard, the accumulation of RAD21L at centromeres during diplotene, its enrichment at the centromere of the Y chromosome during metaphase I, and its distribution at metaphase II centromeres is strikingly similar to the distribution of the shugoshin-like-2 (Gómez *et al*, 2007; Llano *et al*, 2008) and MCAK (Parra *et al*, 2006) during male mouse meiosis. Thus, the enrichment of RAD21L at centromeres during diplotene might contribute to the assembly of the ICD (Parra *et al*, 2009).

Gene disruption of *Rad21l*

To address the function of RAD21L and to validate genetically that it constitutes a functional subunit of a novel meiotic cohesin, we created a targeted mutation of the murine *Rad21l* locus by an insertional strategy that disrupts the open reading frame (ORF) of the locus (Supplementary Figure S1A and B; Adams *et al*, 2004). Heterozygous targeted mice transmitted the mutation to the offspring at Mendelian frequencies (1:2:1). RT-PCR was used to evaluate the interruption of the ORF of the *Rad21l* gene in the homozygous targeted mice (Supplementary Figure S1C; see Materials and methods). The absence of the protein in these homozygous targeted mice was also validated using two different antibodies, which were specific against RAD21L (Supplementary Figures S1E and S2; Gutiérrez-Caballero *et al*, 2011). Consequently, spermatocytes from homozygous targeted mice did not show RAD21L immunofluorescence (Supplementary Figure S1D).

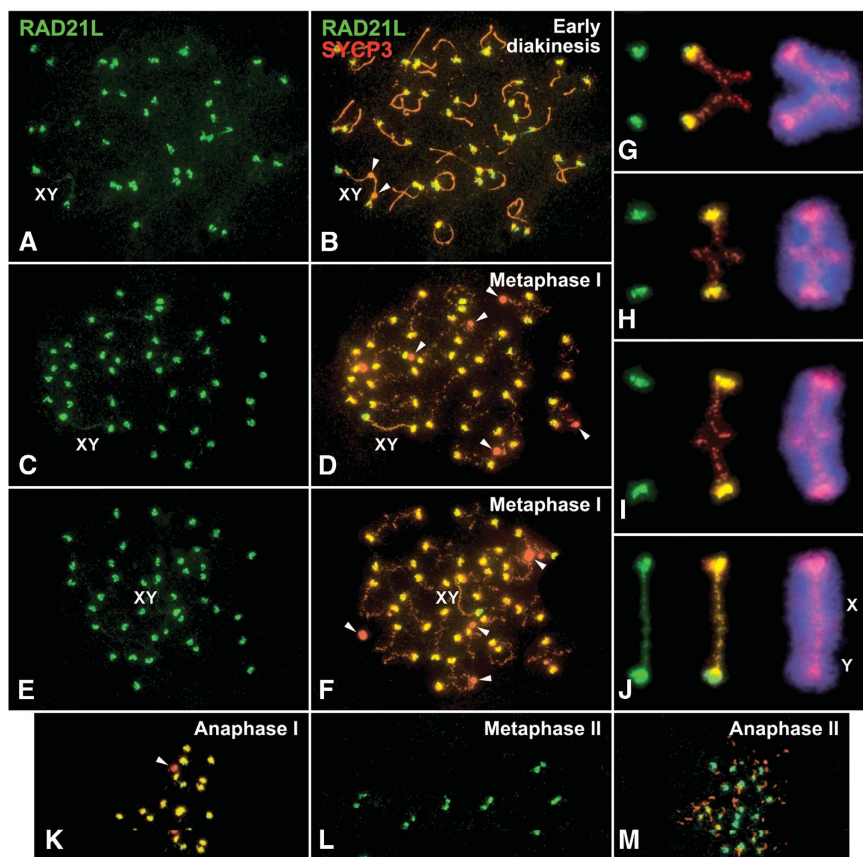


Figure 2 Distribution of RAD21L during diakinesis and meiotic divisions. Double immunolabelling of RAD21L (green) and SYCP3 (red) and counterstaining of chromatin with DAPI (blue) in spread spermatocytes. (A–F) During early diakinesis (A, B) and metaphase I (C–F), RAD21L is present at the centromeres of all chromosomes and at the interchromatid domain of the sex bivalent (XY). Arrowheads mark the enlargements of SYCP3 along the X chromosome in diakinesis, and the large agglomerates of SYCP3 in the cytoplasm of metaphase I spermatocytes. (G–I) Enlargements of three selected metaphase I bivalents. RAD21L is enriched at the centromeres but does not completely localize with SYCP3, and is not present at the interchromatid domain where SYCP3 is detected. (J) Selected metaphase I sex bivalent. RAD21L appears as a faint signal along the interchromatid domain and as bright signals at the centromeres. The RAD21L signal at the centromere of the Y chromosome (Y) is larger than that present at the X chromosome (X). (K) RAD21L partially colocalizes with SYCP3 at anaphase I centromeres. Arrowhead marks an SYCP3 agglomerate. (L, M) RAD21L appears as a pair of signals at metaphase II centromeres (L) and as single signals at anaphase II centromeres (M).

Heterozygous targeted mice showed neither cellular nor aberrant organismal phenotypes (indicative of the lack of a gain of function). Thus, we concluded that the mutation is functionally a null allele of *Rad21l*.

Histological analysis and male infertility in *Rad21l*^{-/-} mice

Rad21l^{-/-} mice developed normally and displayed no overt phenotype. However, while female mice lacking RAD21L were fertile, males were sterile since they failed to produce offspring. Testes from *Rad21l*^{-/-} mice were on average 70% smaller than those from wild-type mice, and their epididymides lacked spermatozoa (Figure 3A and B). Histopathological analysis revealed an absence of postmeiotic cell types despite of the presence of spermatogonia, and Sertoli and Leydig cells (Figure 3A). Within a mouse testis, the seminiferous epithelium contains a mixture of germ cells at various developmental stages. Staging of each tubule section is defined (from I to XII) according to the group of associated germ cell types that are present (Russell, 1990). Following this criteria, mutant mice appeared to be arrested at stage IV of the epithelial cycle (Figure 3A). FACS analysis of whole cells from seminiferous tubules was carried out and

sustained the prophase I arrest by the absence of the haploid compartment in *Rad21l*^{-/-} testes (Figure 3B). In order to rule out proliferation defects in spermatogonia, PCNA immunostaining of wild-type and *Rad21l*^{-/-} tubules was performed and no differences in the basal layer of PCNA-positive cells were found (Figure 3C). Given the lack of spermatozoa, we carried out TUNEL staining and showed that the prevalence of apoptotic cells in *Rad21l*^{-/-} tubules was higher than in wild type (Figure 3C). Finally, studying the histology of the testis, it became clear that spermatogenesis proceeds apparently normal up to prophase I. Then, in stage IV, there is a massive apoptosis of spermatocytes. Extensive apoptosis was also observed at 19 days of age (Figure 3D), indicating that spermatocytes of the first wave of spermatogenesis were already affected. Thus, we conclude that RAD21L is essential for spermatogenesis in the mouse and its deficiency provokes total azoospermia that leads to infertility.

SC morphology and synapsis in mutant spermatocytes

To functionally analyse the infertility in the mutant mice and to more precisely characterize the meiotic arrest, we first studied the assembly of the SC. Spermatocytes spreads were studied and staged by staining for SYCP3. It appeared that in

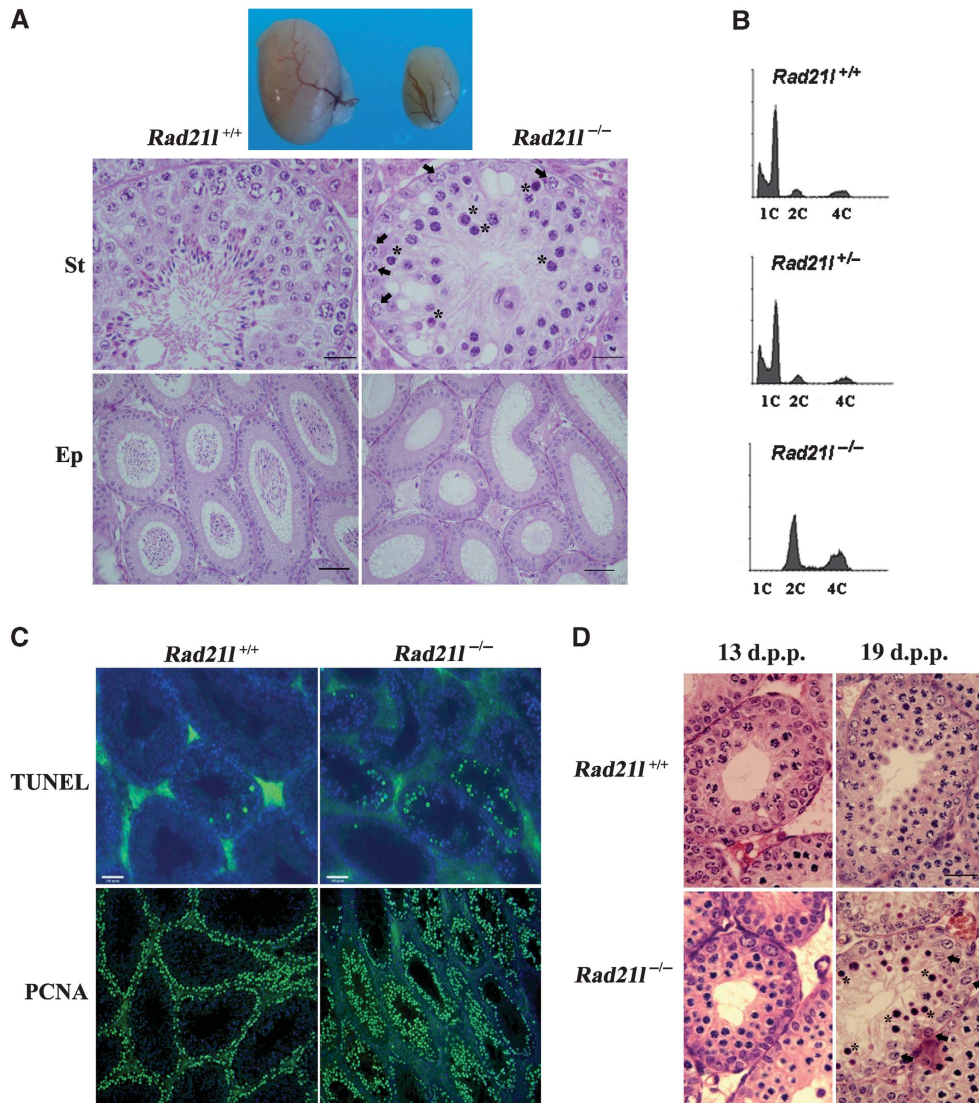


Figure 3 The absence of RAD21L provokes azoospermia. (A) The deficiency of RAD21L promotes a complete block of mouse spermatogenesis. Genetic ablation of *Rad21l* leads to a reduction of the testis size, and an arrest of spermatogenesis in epithelial stage IV, identified by the presence of intermediate spermatogonia (arrows) about to divide into B spermatogonia. Massive apoptosis of spermatocytes (asterisks) can be seen. The spermatogenic arrest leads to empty epididymides and azoospermia. Bar in upper panels, 100 μm and in lower panels, 25 μm. (St) Seminiferous tubules. (Ep) Epididymides. (B) Abnormal ploidy of *Rad21l*^{-/-} spermatocytes. FACS analysis of cells from seminiferous tubules showing the absence of the haploid compartment in *Rad21l*^{-/-} testes. (C) Immunohistochemical detection of proliferating cells with anti-PCNA and apoptotic cells by TUNEL staining show the absence of proliferative defects and an increase of apoptotic cells in *Rad21l*^{-/-} seminiferous tubules, respectively. Bar in both panels, 25 μm. (D) Tubule degeneration in juvenile mice (13 days postpartum (d.p.p.) and 19 d.p.p.) lacking RAD21L and spermatogenic arrest prior to pachytene studied by histology of testes from *Rad21l*^{+/+} and *Rad21l*^{-/-} males. At 13 d.p.p., spermatogenesis has reached to late zygotene and at 19 d.p.p. to late pachytene. Spermatocyte apoptosis (asterisks) was first seen in 19 d.p.p.

the absence of RAD21L, synapsis between homologues was not completed (Figure 4A and B). To determine the extent of the disruption of synapsis, we monitored the distribution of the TF protein SYCP1 as colabelling of SYCP3 and SYCP1 highlights regions of synapsis in wild types. Mutant spermatocytes did not proceed beyond zygotene-like stage (Figure 4A). This blockade was further supported by the absence of immunolabelling for the mid-pachytene-specific histone variant HIT (Supplementary Figure S3), supporting the observed arrest at epithelial stage IV as determined by histological analysis (Figure 3A). Using SYCP3 staining of the zygotene-like spermatocytes from *Rad21l*^{-/-} mice, we observed discontinuous/fragmented stretches of AEs that did not progress to the expected 19 fully synapsed autosomal bivalent chromosomes (Figure 4A and B). Furthermore, a

fraction of the arrested spermatocytes displayed ring-like structures (Figure 4B, arrowhead) and synapsis between non-homologous chromosomes occurred (Figure 4A and B, arrows). To further analyse the synaptic defects, we investigated the centromere distribution by immunolabelling with a human anti-centromere antibody (ACA) (Figure 4B). In wild-type leptotene spermatocytes, the number of centromere signals never exceeded 40. As synapsis progressed, these centromeric foci diminished to 21 (19 signals from synapsed autosomes + 2 signals of the XY bivalent) at pachytene when homologous pairing of autosomes is complete and their centromeres are very closely juxtaposed (Figure 4B). In *Rad21l*^{-/-} zygotene-like spermatocytes, we scored on average 30 ± 3.5 foci (30 nuclei analysed). This result also points to a deficient synapsis between homologues, at least at

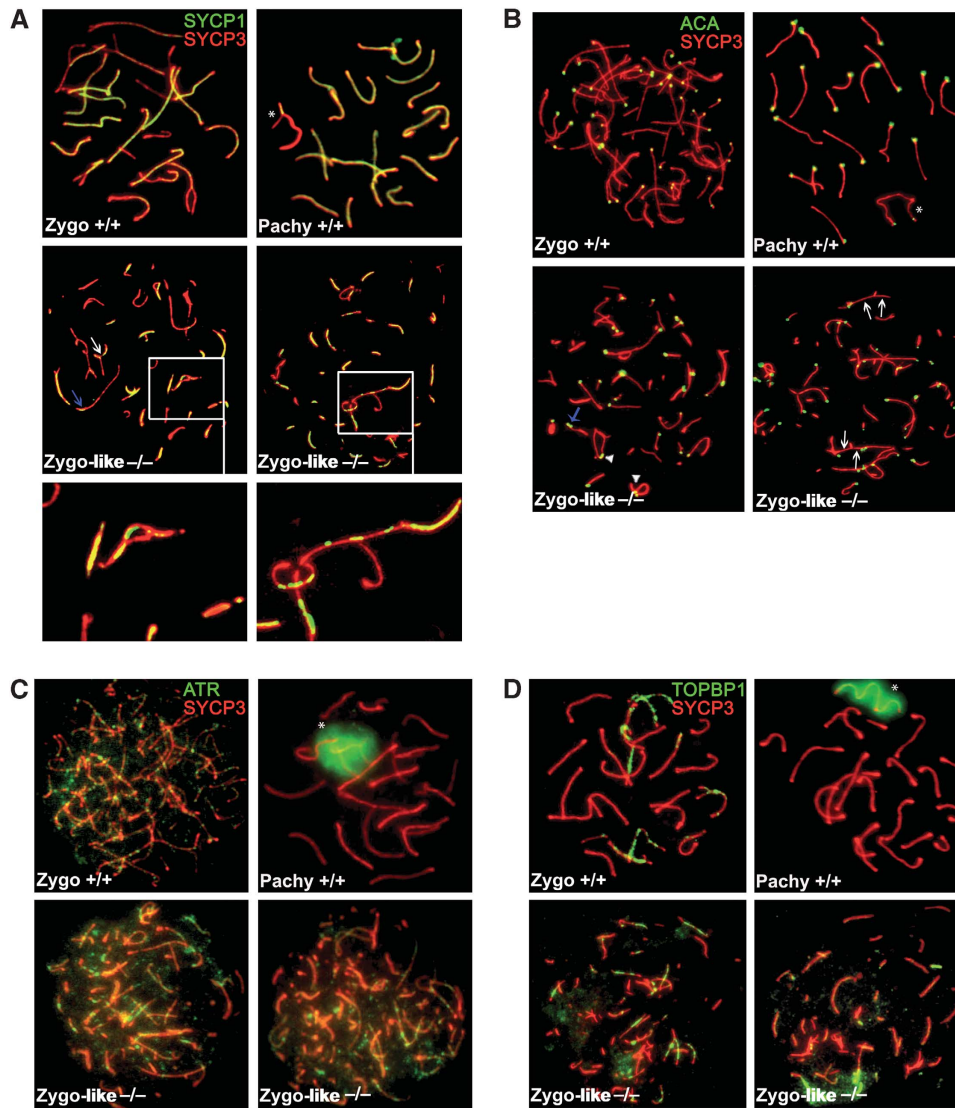


Figure 4 *Rad21l*^{-/-} spermatocytes show defects in synapsis. (A) Double labelling of SYCP3 (red) and SYCP1 (green) showing fragmented AEs/LEs with aberrant synapsis and with patches of SYCP1 in mutant spermatocytes (arrow) as compared with their wild-type control. (B) Double immunolabelling of SYCP3 (red) and kinetochores (anti-centromere autoantibody, ACA (green)) in *Rad21l*^{+/+} and *Rad21l*^{-/-} spermatocytes. In wild-type spermatocytes, the number of ACA signals is reduced from 40 to 21 between zygotene to pachytene stage. These signals localize at one end of the AEs/SCs. In *Rad21l*^{-/-} spermatocytes, synapsis is incomplete and the number of ACA signals is always higher than 21. The presence of some centromeres along the same synapsed region (blue arrow), some unsynapsed AEs between synapsed regions (arrow) and the presence of ring structures formed by chromosomes with two neighbouring centromeres (arrowhead) are indicative of non-homologous synapsis. (C, D) Double immunolabelling of SYCP3 (red) and ATR or TOPBP1 (green) in wild-type or *Rad21l*^{-/-} spermatocytes. In wild-type spermatocytes, ATR (C) and TOPBP1 (D) proteins localize to unsynapsed AEs. At pachytene, these proteins only appear at the sex body. In *Rad21l*^{-/-} zygotene-like spermatocytes, these proteins remain accumulated at AEs. *Sex body (XY).

their centromeric regions (Figure 4B). In order to further study this failure of synapsis, we stained spermatocytes for the kinase ATR and the DNA-binding protein TOPBP1 as these reliably stain the unsynapsed AEs/LEs at leptotene–zygotene and the unsynapsed AEs and the chromatin of the sex body at pachytene (Perera *et al*, 2004). Moreover, TOPBP1 and ATR also accumulate at the unsynapsed AEs of mutant spermatocytes with a meiotic arrest such as *Dmcl*^{-/-} and *Msh5*^{-/-} spermatocytes (Barchi *et al*, 2005). Our immunolabelling results on wild-type spermatocytes revealed that ATR and TOPBP1 appeared as foci along the unsynapsed leptotene and zygotene AEs/LEs, whereas at mid-pachytene both proteins were restricted to the sex body (Figure 4C and D). RAD21L-deficient and wild-type spermatocytes showed a similar

number of ATR and TOPBP1 foci at leptotene and zygotene AEs. However, as meiosis arrested at a zygotene-like stage in *Rad21l*^{-/-}, these foci also persisted and were not eliminated (Figure 4C and D). In summary, RAD21L deficiency in mouse spermatocytes leads to abnormal AEs/LEs, which are fragmented and poorly aligned/synapsed (a large number of AEs are kept individually), some stretches of AEs and LEs are decorated with SYCP1 and synapsis between non-homologous chromosomes occurs.

Defective DSB processing in the mutant spermatocytes

The absence of REC8 leads to severe defects in DSB processing in yeast and to a lesser extent in mouse meiosis (Klein *et al*, 1999; Xu *et al*, 2005). Taking into account these data

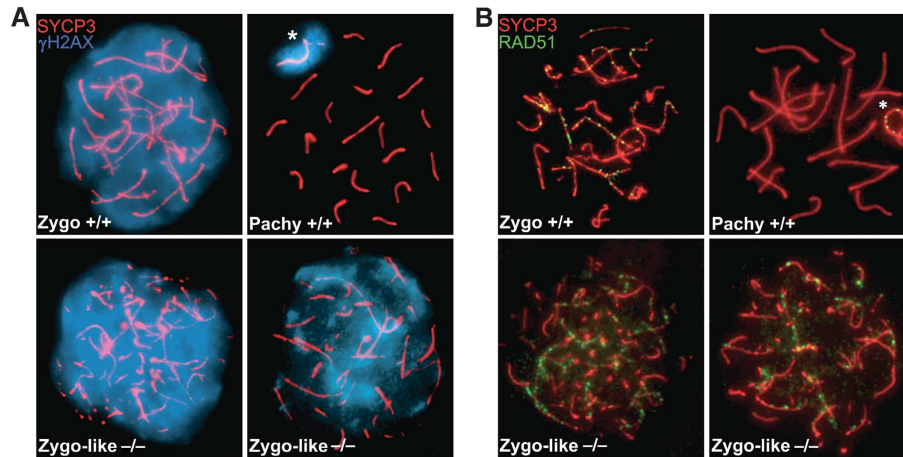


Figure 5 DSB-associated proteins in *Rad21L*^{-/-} spermatocytes. (A, B) Double immunolabelling of SYCP3 (red) with γ -H2AX (blue) and RAD51 (green) in wild-type and *Rad21L*^{-/-} spermatocytes. In wild-type zygotenes, γ -H2AX (A) labels the chromatin and RAD51 (B) labels multiple foci on the AEs/LEs. At wild-type pachytene, γ -H2AX labelling is reduced to the sex body and RAD51 foci are restricted to the XY bivalent. In RAD21L-deficient spermatocytes, γ -H2AX (A) and RAD51 (B) labelling is sustained in the zygotene-like-arrested spermatocytes. *Sex body (XY).

and the arrest observed in the *Rad21L* mutant, we studied whether RAD21L deficiency promotes a deficit in the repair of the programmed DSBs generated by the nuclease SPO11 at early leptotene, a frequent cause of meiotic arrest (Viera *et al*, 2009). Thus, we first monitored the formation of DSBs and analysed the presence of γ -H2AX histone variant, which is phosphorylated at prophase I in response to the SPO11-induced DSBs in an ATM-dependent manner. At zygotene, γ -H2AX labelling was equally strong in both *Rad21L*^{-/-} and *Rad21L*^{+/+} spermatocytes (Figure 5A). As pairing proceeds, γ -H2AX staining diminished in wild-type pachytene spermatocytes and appeared mainly at the chromatin of the sex body (Figure 5A). However, in *Rad21L*^{-/-} spermatocytes arrested at a zygotene-like stage, the γ -H2AX labelling remained in the chromatin of synapsed and unsynapsed chromosomes, although this staining was reduced when compared with an earlier zygotene-like stage (Figure 5A). This result suggests an accumulation of unrepaired DSBs and/or asynapsis in *Rad21L*^{-/-}-arrested spermatocytes.

We next analysed the kinetics of proteins involved in this DSB-induced signalling cascade. After DSBs are induced, RAD51 is recruited to these early recombination nodules, which promotes homologous strand invasion (Mimitou and Symington, 2009). In wild-type zygotene spermatocytes, RAD51 assembles on the AEs/LEs of bivalents and disappears towards pachytene, with the exception of the unsynapsed sex AEs (Figure 5B). In *Rad21L*^{-/-} zygotene-like spermatocytes, RAD51 immunolabelling was similar to wild-type zygotene controls (Figure 5B). These results suggest that RAD51 nodules are sustained in mutant spermatocytes either because RAD21L is required for their resolution or because meiotic progression arrests before the stage at which this process takes place because of the synapsis defects.

Subsequently, we determined the distribution of the replication protein A (RPA) in RAD21L-deficient spermatocytes. RPA is a single-strand DNA-binding protein that interacts with RAD51 during the strand exchange and appears after RAD51 at the AEs/LEs (Moens *et al*, 2007). We observed a large number of RPA foci in both *Rad21L*^{-/-} and wild-type zygotene spermatocytes (Supplementary Figure S4A). In wild-type

pachytene spermatocytes, RPA foci were present mainly over the synapsed LEs of the autosomes and more abundantly along the pseudoautosomal region of the sex chromosomes. In RAD21L-deficient zygotene-like spermatocytes, the RPA foci were mainly present at the LEs similar to wild-type zygotene controls (Supplementary Figure S4A).

Finally, we analysed the presence of MLH1 foci in mutant spermatocytes. MLH1 is a component of the postreplicative mismatch repair system and the number of its foci during pachytene matches those of chiasmata (Moens *et al*, 2007). MLH1 foci were absent in *Rad21L*^{-/-} zygotene-like nuclei (Figure 6A), while one/two MLH1 foci per bivalent were observed in wild-type pachytene nuclei. Based on these results, we studied the recombination intermediary protein MSH4 since it mediates the transition from the initial recombination proteins RPA to MLH1 (Santucci-Darmanin *et al*, 2000). In *Rad21L*^{-/-} zygotene-like spermatocytes, MSH4 signal was slightly decreased to that found in wild-type controls (Supplementary Figure S4B), suggesting that early/intermediate steps of recombination might be already altered in RAD21L null spermatocytes.

Okadaic acid-induced metaphase I-like spermatocytes

We further investigated whether crossing over (CO) and chiasmata could be formed in the absence of the meiotic arrest that precludes the *Rad21L*^{-/-} spermatocytes to enter into pachytene, as well as the involvement of RAD21L in centromeric cohesion. To this end, we exposed the mutant spermatocytes to the PP2A inhibitor okadaic acid (OA), to allow *in vitro* transition from pachytene to metaphase I (Wiltshire *et al*, 1995). After OA treatment of wild-type spermatocytes, there was a rapid induction of SC disassembly, bivalent separation and chiasmata formation, which does not affect centromere cohesion. Treated wild-type spermatocytes revealed 20 bivalents, positive for SYCP3 immunolabelling at the interchromatid and centromeric domain, with two pairs of unseparated sister kinetochores, which were stained with ACA serum, and at least one chiasma (Figure 6Ba-c). In contrast, OA-treated *Rad21L*^{-/-} spermatocytes displayed 40 unattached univalents with a characteristic labelling for

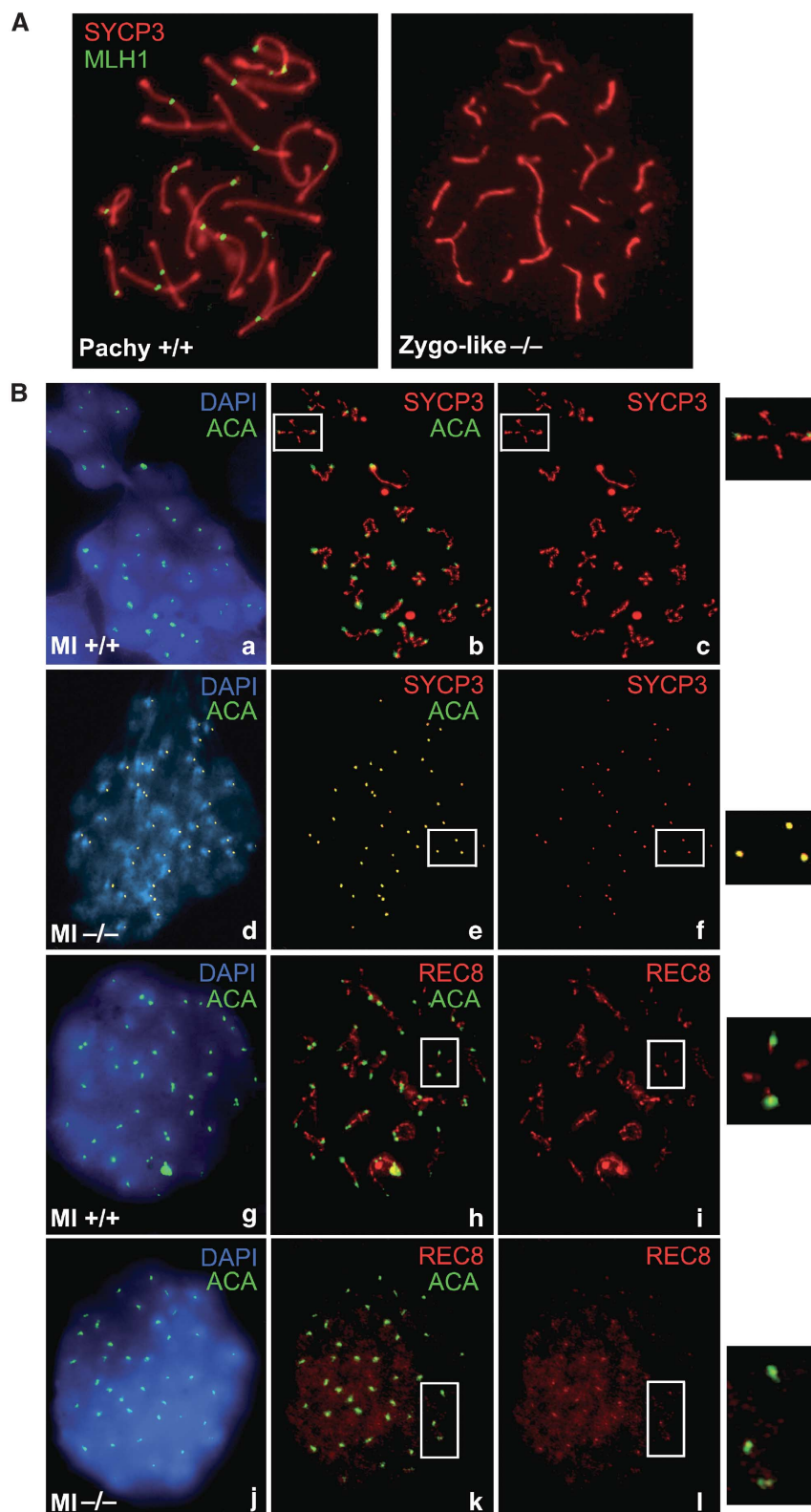


Figure 6 The deficiency of RAD21L prevents CO and does not affect centromeric cohesion. **(A)** Double immunolabelling of SYCP3 (red) with MLH1 (green). MLH1 foci are absent at the AEs/LEs of *Rad21l*^{-/-} spermatocytes whereas at least one focus is present along each autosomal SC in wild-type pachytene spermatocytes. **(B)** Double immunolabelling of SYCP3 or REC8 (red) with ACA (green) and DAPI (blue) in wild-type and *Rad21l*^{-/-} spermatocytes. OA-induced metaphase I plates of wild-type spermatocytes give rise to 20 bivalents each with two opposed centromere signals (**Ba–Bc**, **Bg–Bi**), whereas *Rad21l*^{-/-} spermatocytes lead to 40 separated centromere signals (**Bd–Bf**, **Bj–Bl**). The absence of spermatocytes with >40 independent signals of ACA (**Bd–Bf**) and REC8 (**Bj–Bl**) revealed the preservation of the centromeric cohesion in the absence of RAD21L. Islets represent magnification of one wild-type bivalent and some *Rad21l*^{-/-} unjoined chromosomes.

SYCP3 only at the centromeric domain (Figure 6Bd–f) (20 cells per individual; 3 individuals from each genotype). To further demonstrate that centromeric cohesion was not affected by the absence of RAD21L, we stained these pseudometaphases with REC8 and ACA and showed that REC8 staining persisted at centromeres in metaphase I-like spermatocytes from *Rad21*^{-/-} mice (Figure 6Bj–l). Altogether, these results reveal that the DSBs can start as part of the meiotic recombination programme in the absence of RAD21L, but they are not processed appropriately and accumulate in an intermediate unrepaired state before reciprocal recombination and CO take place. The observation of 40 rather than 80 centromere signals associated with separated chromatids is indicative of the persistence of centromeric cohesion. These results are in agreement with the apparent release of RAD21L from the desynapsed LEs at diplotene, whereas RAD21 and REC8 persist and do not relocate to centromeres (Eijpe *et al*, 2003; Parra *et al*, 2004), suggesting that RAD21L-containing cohesin complexes are not required for maintaining sister chromatid arm cohesion from diplotene up to the metaphase I/anaphase I transition. These results, together with the preferential localization of RAD21L at the sex chromosomal AEs at the expense of REC8 (Figure 7Q and R), make it tempting to speculate that RAD21L is involved in the arrangement of specific cohesin complexes that despite not participating in arm chromosome cohesion have important roles in the assembly of the SC, progression of synapsis and recombination and in sex body formation in spermatocytes.

In *Smc1β*^{-/-} mice, metaphase II chromosomes from oocytes and metaphase I OA-induced chromosomes from spermatocytes are defective in centromere cohesion (Revenkova *et al*, 2004). This chromosomal phenotype has not been analysed in *Rec8* mutant mice since males (in the absence of OA experiments) and females show a premature arrest prior to pachytene due to a lack of full homologous synapsis. However, it is widely assumed that REC8 is the essential kleisin involved in chromosome cohesion in meiosis I and II based on the phenotype of *Rec8* null mutant models in several species (Klein *et al*, 1999; Bannister *et al*, 2004; Xu *et al*, 2005; Severson *et al*, 2009). This is also confirmed using genetically modified mice with mutations in the *Rec8* gene (Kudo *et al*, 2009; Tachibana-Konwalski *et al*, 2010). Although the OA-induced chromosomes from *Rad21*^{-/-} spermatocytes do not fully resemble metaphase I stage with a functional meiotic spindle, the maintenance of centromeric cohesion under these experimental conditions in *Rad21* mutant spermatocytes (Figure 6Bd–f and Bj–l), together with the cytological localization of RAD21L in metaphase I and II (Figure 2D, F and L), indicates that RAD21L is not involved in chromosome cohesion in males. Thus, and although not strictly demonstrated in all of these experimental models, it is very likely that the only α -kleisin supporting chromosome cohesion in mammalian meiosis is REC8 by forming a cohesin complex with SMC3, SMC1 β and STAG3.

Cohesion complexes in mutant spermatocytes

RAD21L has recently shown to be a component of the cohesin complex together with SMC1 α/β , SMC3 and STAG3 (Gutiérrez-Caballero *et al*, 2011; Ishiguro *et al*, 2011; Lee and Hirano, 2011). Therefore, also considering the stoichiometric relationship of each subunit within a cohesin complex, the genetic ablation of RAD21L could alter the

loading at the cohesin axis of other subunits. We thus undertook a direct analysis of the presence of different cohesin subunits in the absence of RAD21L. There was no substantial variation in the loading of REC8, SMC1 β , RAD21 or SMC3 along the cohesin axis at the AEs/LEs in mutant zygotene-like spermatocytes (Figure 7F, N, P and V). However, the existence of STAG3, and to a lesser extent SMC1 α , was partially reduced from leptotene to zygotene-like arrest when compared with wild-type spermatocytes (Supplementary Figures S5 and S6; Figure 7H and X). In mouse testis extracts, it has been shown by immunoprecipitation analysis that STAG3 associates with the three α -kleisins (Ishiguro *et al*, 2011; Lee and Hirano, 2011). We now provide *in vivo* evidence that lack of RAD21L is sufficient to promote a partial loss of STAG3 from the AEs/LEs. Overall, these data show that RAD21L is interacting *in vivo* with STAG3, leading to a functional and meiosis-specific cohesin complex, together with SMC3 and SMC1, that is essential for the synapsis of homologous chromosomes.

From a more functional point of view, STAG3 is normally assembled in the AEs/LEs of REC8-deficient spermatocytes (Bannister *et al*, 2004). Taken together, and given the impossibility to analyse spermatocytes in *Rad21*^{-/-} mice due to their embryonic lethality (Xu *et al*, 2010), these results strongly suggest that RAD21L is quantitatively an important α -kleisin involved in STAG3 complexing.

Telomere behaviour in mutant spermatocytes

The formation of a cluster of telomeres very early during meiotic prophase is important for accurate pairing and recombination (Scherthan, 2001). Mice deficient for the cohesin SMC1 β show an incomplete attachment of telomeres to the nuclear envelope (Adelfalk *et al*, 2009). We therefore investigated telomere distribution in RAD21L-deficient spermatocytes. We analysed this feature on squashed spermatocytes to preserve the separation of peripheral and internal nuclear domains. While in wild-type pachytene spermatocytes, all telomeric signals were close to the nuclear envelope (Supplementary Figure S7Aa), in *Rad21*^{-/-} zygotene-like spermatocytes some telomeric signals (from 1 to 6) appeared within the nucleus (Supplementary Figure S7Ab and c and B). These results indicate that in the absence of RAD21L, the attachment of telomeres to the nuclear envelope is partially misregulated.

The function of SMC1 β in telomere protection rather than its role in AE assembly may be responsible for defective bouquet formation (Adelfalk *et al*, 2009). It is unclear whether the mild telomere disorganization observed is due to the general reduction of functional cohesin complexes caused by the loss of the subset of cohesin complexes containing RAD21L or due to the lack of RAD21L, specifically.

Meiosis in mutant female mice

In contrast to RAD21L-deficient males, *Rad21*^{-/-} females were fertile up to 6 months of age and generated healthy offspring with litter sizes similar to wild-type females. However, the mutant females exhibited premature onset of subfertility around this age, showing on average 5.2 pups per litter compared with 8.9 in wild-type females. Around 10 months of age, *Rad21*^{-/-} females became sterile, whereas their wild-type counterparts remained fertile. To analyse the underlying loss of fertility with age, we conducted IF and

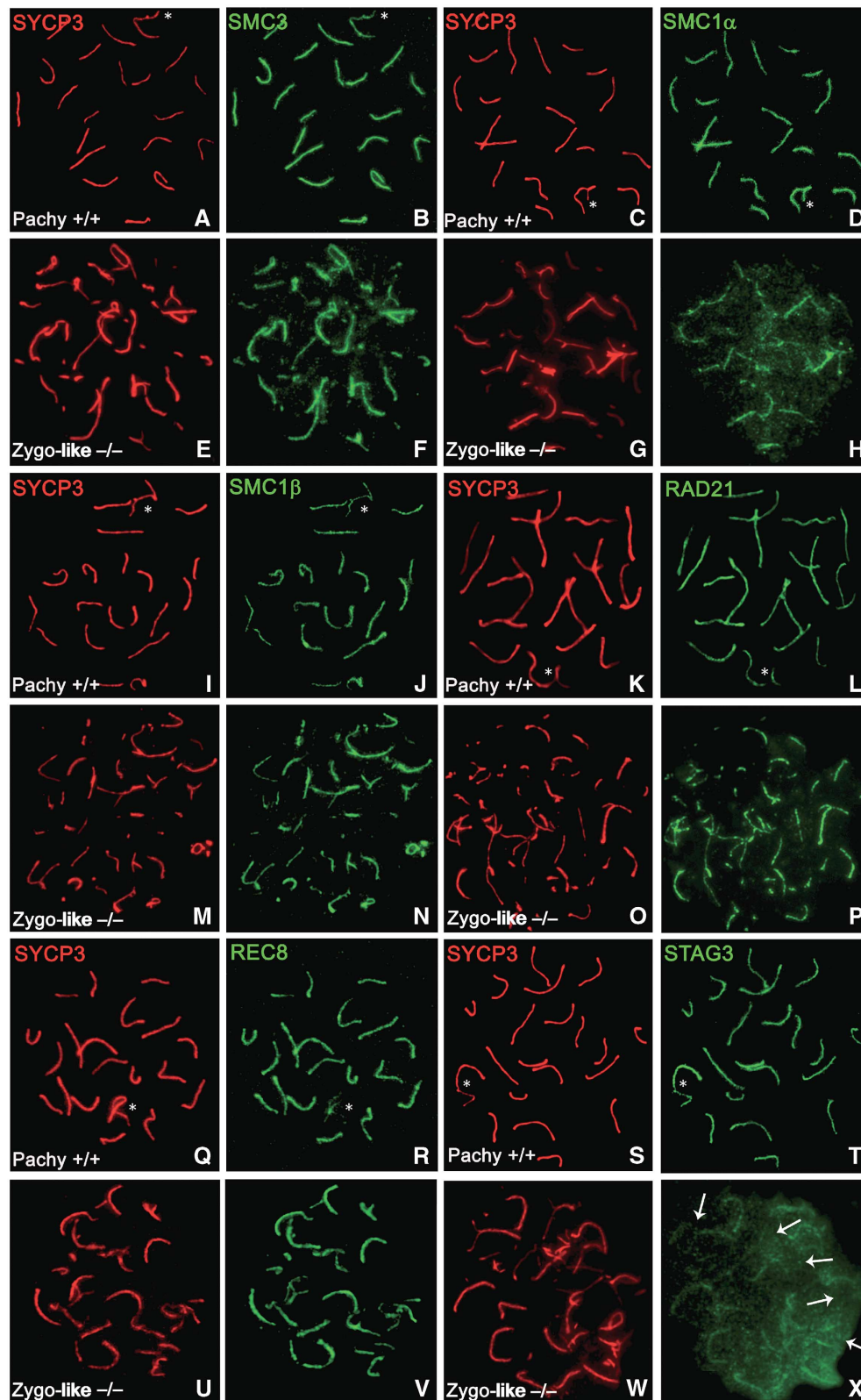


Figure 7 Immunolabelling of the cohesin subunits SMC3, SMC1 α , SMC1 β , RAD21, REC8 and STAG3 in *Rad21*^{+/+} and *Rad21*^{-/-} spermatocytes. Double immunofluorescence of SYCP3 (red) with either SMC3, SMC1 α , SMC1 β , RAD21, REC8 or STAG3 (green) in wild-type or *Rad21*^{-/-} spermatocytes. In wild-type pachytene spermatocytes, the cohesins SMC3 (B), SMC1 α (D), SMC1 β (J), RAD21 (L), REC8 (R) and STAG3 (T) colocalize with SYCP3 (A, C, I, K, Q, S) along the autosomal SCs and sex AEs with the exception of REC8 labelling at the XY bivalent, which is weaker in comparison with SYCP3. In *Rad21*^{-/-}-arrested spermatocytes, the intensity and localization of the fluorescent signal corresponding to SMC3 (F), SMC1 β (N), RAD21 (P) and REC8 (V) along the AE/LEs of the zygotene-like chromosomes is comparable to their wild-type controls and coincident with SYCP3 (E, G, M, O, U). However, the fluorescent signal of STAG3 (X) is notably decreased and absent in some regions where SYCP3 (W) labelling is present (arrows), whereas the intensity of the SMC1 α (H) labelling is only partially reduced and delocalized. *Sex body (XY).

histological analysis of oocytes and ovarian sections. RAD21L has been localized to the AEs/LEs of the SC from early leptotene to pachytene, with loss of staining at later stages such as dictyate and metaphase I (Ishiguro *et al*, 2011). However, despite the fact that in oocytes the lack of RAD21L did not fully abolish synapsis as observed in spermatocytes and that fully synapsed bivalents were observed with a normal loading of STAG3 and SMC1 α at their AE/LEs (Supplementary Figure S8A), a high proportion of the pachy-

tene oocytes showed a slight defect in synapsis as determined by discontinuities in the labelling of SYCP3/SYCP1 at the synapsed LEs of the pachytene chromosomes ($69 \pm 4.3\%$ of cells in *Rad21l*^{-/-} versus $12 \pm 3.6\%$ in wild type, $N=30$, at 17.5 d.p.c. of age; Figure 8A). Chiasmata maintenance requires meiotic cohesion from yeast to mammals (Buonomo *et al*, 2000; Hodges *et al*, 2005). The cohesin-dependent mechanism for stabilizing sites of CO and centromeric cohesion is altered in an age-dependent manner

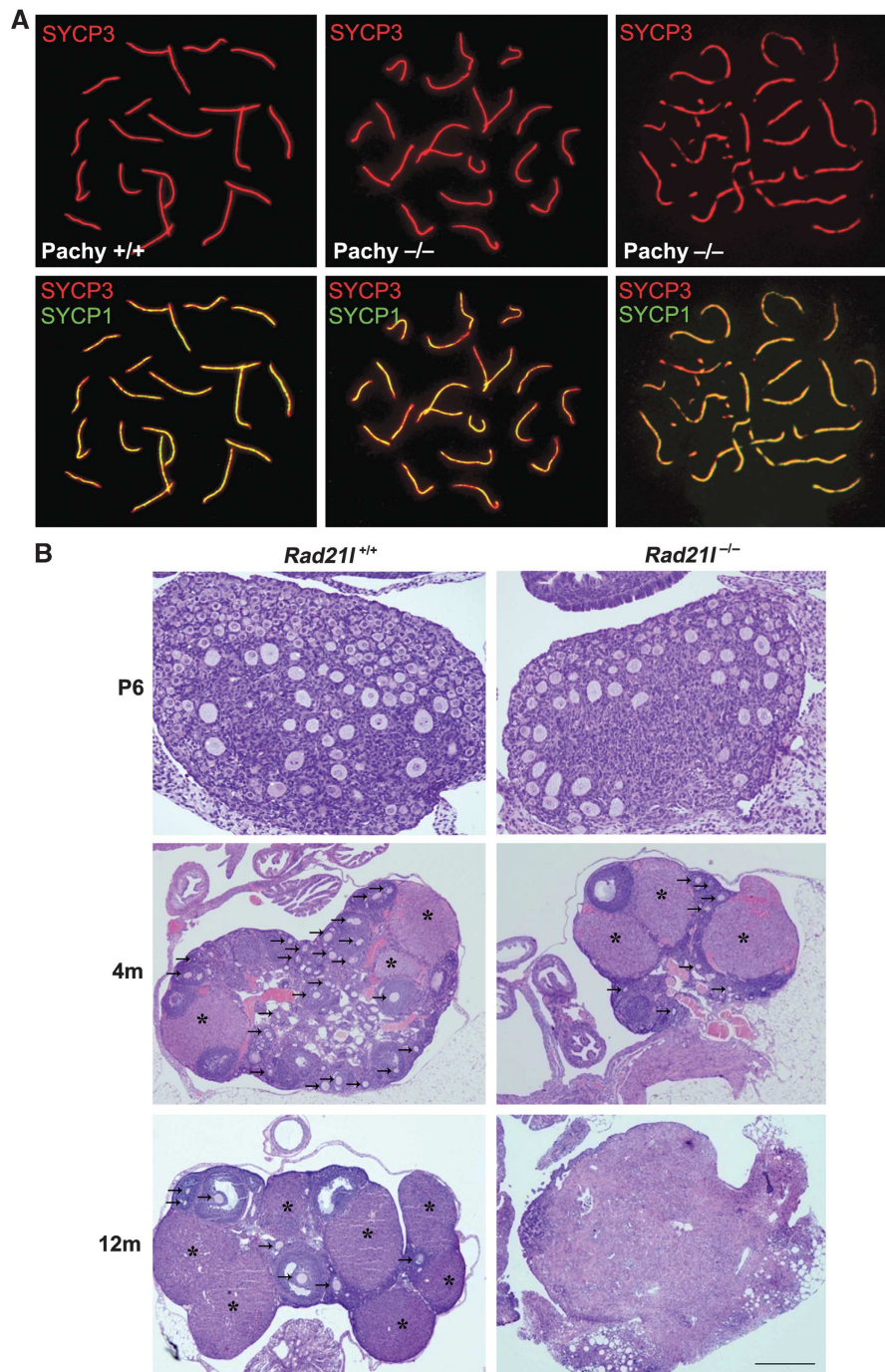


Figure 8 Female meiosis. (A) Double immunolabelling of SYCP3 (red) and SYCP1 (green) in pachytene oocytes from wild-type and mutant females showing normal (middle) and abnormal pairing (right). (B) Ovaries from RAD21L-deficient mice show atrophy with fibrosis and depletion of follicles. Comparative histological analysis of ovaries from *Rad21l*^{-/-} and wild-type mice at 6 days (P6), 4 months (4m) and 12 months (12m) of age. Arrows indicate follicles and asterisks corpora lutea. Bar represents 500 μm in 4m and 12m, and 100 μm in P6.

leading to chromosome missegregation and aneuploidy (Hodges *et al*, 2005; Revenkova *et al*, 2010). Diakinesis/metaphase I chromosomes from RAD21L-deficient oocytes were normal and 20 bivalents were always observed (Supplementary Figure S8B), indicating that RAD21L is not involved in chromosome cohesion during female meiosis. Taken together, these results suggest that a cohesion defect was not the underlying cause of the age-dependent infertility (Hodges *et al*, 2005; Chiang *et al*, 2010; Lister *et al*, 2010). Next, we comparatively studied the histology of ovaries from 12-month-old wild-type and mutant female mice and observed remarkable differences. While control ovaries showed more than five follicles at different stages of folliculogenesis and several corpora lutea, mutant ovaries displayed atrophy with a complete loss of primordial follicles (Figure 8B). In 4-month-old mice, the mutant ovaries presented a reduced number of follicles but a similar number of corpora lutea as wild-type littermates (Figure 8B). Thus, the ratio between the numbers of follicles and the numbers of corpora lutea is reduced in the *Rad21l*^{-/-} when compared with controls. To further delineate at which stage during development this reduction is achieved, we histologically analysed ovaries from 6-day-old females (P6), a time point at which all oocytes are already arrested in dictyate (Peters, 1969). A four-fold decrease (4.1 ± 0.6 , $N=4$) in the number of small oocytes in the outer cortex where primordial follicles occur was found in *Rad21l*^{-/-} compared with *Rad21l*^{+/+}. However, no substantial differences in the numbers of growing oocytes in the preantral stage of follicle development, which occupy the inner part of the cortex, were observed (Figure 8B; Peters, 1969). This demonstrates that young mutant females are able to ovulate physiologically in a similar way as the controls, and predicts that females will exhaust their pool of oocytes earlier than their wild-type counterparts leading to premature infertility.

In terms of human disease, this pathology resembles premature ovarian failure and its aetiology includes a strong genetic component (Shelling, 2010). In addition, women who suffer from ovarian failure after cancer chemotherapy or older healthy women also demonstrate a strikingly similar atrophy of the ovaries as we here observed in *Rad21l*^{-/-} female mice (Meirow *et al*, 2007).

Sexual dimorphism in fertility in mouse mutants

Defects in early stages of the meiotic prophase I are common in several mouse mutants where meiotic genes have been ablated, these include *Spo11*, *Sycp3*, *Sycp2*, *Fkbp6* and *Trip13* (Baudat *et al*, 2000; Yuan *et al*, 2000; Crackower *et al*, 2003; Yang *et al*, 2006; Li and Schimenti, 2007). *Smc1 β* and *Rec8* null mice are the only cohesin-deficient mice analysed meiotically and are infertile, while *Rad21l* null mice are not viable (Xu *et al*, 2010). REC8-deficient mice fail to maintain interhomologous synapsis, which leads to meiotic arrest in both genders (Bannister *et al*, 2004; Xu *et al*, 2005). *Smc1 β* mutant mice show an arrest in pachytene stage in males, whereas females have weaker synapsis defect allowing progression up to the second division but they show unjoined chromatids due to a loss of centromeric cohesion (Revenkova *et al*, 2004). The RAD21L-deficient males generated and analysed in the present study reveal a phenotype as severe as the one observed in the *Rec8* mutant male mice, which also show a zygotene-like arrest. However, the subfertility of the RAD21L-deficient females is much milder than in *SMC1 β* and *REC8*

female mice (Bannister *et al*, 2004; Revenkova *et al*, 2004; Xu *et al*, 2005).

Sexual dimorphism in meiotic genes has been previously observed in SYCP3 and SYCP2 mutant mice, where males are infertile whereas females are only subfertile (Yuan *et al*, 2000, 2002; Yang *et al*, 2006). This dimorphism has been attributed to a very weak synapsis surveillance mechanism and a reduced stringency of the spindle assemble checkpoint in oocytes in comparison to spermatocytes (Hunt and Hassold, 2002; Nagaoka *et al*, 2011), but this can also be explained by the prolonged prophase arrest following bivalent formation, which lasts from birth until ovulation. After this long-term arrest of oocytes at dictyate, most of the components of the former AEs/LEs of the disassembled SC do not remain/relocate to the centromere or to the interchromatid domain of the bivalents at the next metaphase I. For instance, SYCP3, SYCP2 and RAD21 have been localized at the AEs/LEs of the SC during both male and female mouse meiosis, and also at the centromeres of metaphase I bivalents in spermatocytes (Offenberg *et al*, 1998; Parra *et al*, 2004; Ishiguro *et al*, 2011) but not in oocytes (Hodges *et al*, 2001; Tachibana-Konwalski *et al*, 2010). Likewise, RAD21L disappears from the AEs/LEs at dictyate and never labels the centromeres of metaphase I bivalents in oocytes (Ishiguro *et al*, 2011). In agreement with this, RAD21L-deficient females do not show premature loss of cohesion at metaphase I (20 bivalents are observed; Supplementary Figure S8B) and are therefore fertile. Thus, it can be speculated that mutations in this set of proteins (SYCP2, Yang *et al*, 2006; SYCP3, Yuan *et al*, 2000; Yuan *et al*, 2002; and RAD21L, this study), yield male infertility and female subfertility not only because of differences in the checkpoints between genders, but also because these proteins are not part of the segregation machinery of the chromosomes during female meiosis. This difference between male and female meiosis might contribute to the vulnerability of the female meiotic process by increasing the likelihood of premature sister chromatid separation.

From the spermatogenic point of view, it has been claimed that the meiotic sex chromosome inactivation (MSCI) that takes place in the sex bivalent in mid-pachytene spermatocytes can underlie the dimorphic infertility of several mouse mutants with a common type IV meiotic arrest (Barchi *et al*, 2005; Mahadevaiah *et al*, 2008). Recently, it has been elucidated that when MSCI fails at mid-pachytene, two proapoptotic transcription factors located at the Y chromosome (ZFY1/2) drive pachytene-arrested spermatocytes into a programmed cell death (Royo *et al*, 2010). We postulate that these same genes could also lead to the apoptosis observed in other mouse mutants with a developmental stage IV arrest, which are blocked well before MSCI take place at mid-pachytene. For instance, both DMC1- and SPO11-deficient spermatocytes arrest at developmental stage IV and their spermatocytes show similar level of apoptosis; however, their arrest corresponds to zygotene and to a mid-pachytene prophase, respectively (Yoshida *et al*, 1998; Baudat *et al*, 2000). Thus, we believe that the activation of the apoptotic programme in zygotene-like-arrested mutants, such as *Rad21l*^{-/-} spermatocytes, can be caused by the expression of these and/or other unidentified pro-apoptotic genes for an indefinite lapse of time during the zygotene-like arrest.

Finally, it has been highlighted that the sexual dimorphism in fertility is dependent on those proteins that affect the

organization of the AEs/chromatin of the male XY bivalent (Kolas *et al*, 2005). This observation is also consistent with RAD21L playing a specific role in the pairing and the development of the sex body.

In yeast and vertebrates, a dual model of the ring closure of the cohesin complex by the kleisins REC8/RAD21 has long been accepted (Klein *et al*, 1999; Sonoda *et al*, 2001; Kudo *et al*, 2006; Tachibana-Konwalski *et al*, 2010). This model has been challenged by the existence of three meiosis-specific paralogues of the α -kleisins family of proteins in *C. elegans* (REC8, COH3, COH4). Similarly in mammals, the observed severity and penetrance of the phenotype in mice lacking RAD21L is comparable to the genetic ablation of the canonical meiotic kleisin REC8 in mouse spermatogenesis (Bannister *et al*, 2004; Xu *et al*, 2005), further demonstrating that these kleisins are not redundant and are similarly important in male meiotic prophase. Overall, these results provide *in vivo* evidence for the functional relevance of the α -kleisin RAD21L in SC assembly, homologous recombination, and synapsis during mammalian meiosis and suggest a re-examination of the contribution of the α -kleisin paralogues in mammalian meiosis.

Materials and methods

Immunocytology

Testes were detunicated and processed for spreading using a conventional 'dry-down' technique or squashing (Parra *et al*, 2004). Oocytes from fetal ovaries (E17.5 embryos) were digested with collagenase, incubated in hypotonic buffer, disaggregated, fixed in paraformaldehyde and incubated with the indicated antibodies for immunofluorescence (see Supplementary data). Both polyclonal antibodies against RAD21L (Gutiérrez-Caballero *et al*, 2011) were used indistinctly for the IF and western blot data presented throughout this work. In all the cases, the results were validated with both antibodies.

Mice

We developed a non-conditional mutant mouse by standard gene targeting methods using an insertional strategy. Briefly, two homology arms separated apart by a gap were PCR amplified from a BAC clone enclosing RAD21L and cloned into the plasmid p5'HPRT (Adams *et al*, 2004). The targeting vector was linearized at a new restriction site generated between both ends flanking the gap, and electroporated in ES cells following standard procedures (see Supplementary data). The genetic background under which the mutation was analysed 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 the institutional guidelines (CSIC and USAL). *Rad21l*^{+/-} and *Rad21l*^{+/+} were used as controls in all the experiments throughout the study. To simplify, we only show the *Rad21l*^{+/+} and *Rad21l*^{-/-} results.

FACS analysis

Wild-type, *Rad21l*^{+/-} and *Rad21l*^{-/-} testicular cells preparation and their DNA content measurement were performed by a standard procedure (Kudo *et al*, 2009).

References

- Adams DJ, Biggs PJ, Cox T, Davies R, van der Weyden L, Jonkers J, Smith J, Plumb B, Taylor R, Nishijima I, Yu Y, Rogers J, Bradley A (2004) Mutagenic insertion and chromosome engineering resource (MICER). *Nat Genet* **36**: 867–871
- Adelfalk C, Janschek J, Revenkova E, Blei C, Liebe B, Göb E, Alsheimer M, Benavente R, de Boer E, Novak I, Höög C, Scherthan H, Jessberger R (2009) Cohesin SMC1beta protects telomeres in meiocytes. *J Cell Biol* **187**: 185–199

OA assay

Testes from wild-type and *Rad21l*^{-/-} were detunicated and cultured as previously described (Revenkova *et al*, 2004). Briefly, 5×10^6 cell/ml were plated in 35×10 mm² culture dishes containing complete culture medium supplemented with 25 mM HEPES. Cells were cultured at 32 °C for 5–6 h with 5 μ M OA (Sigma-Aldrich). Spreading and immunofluorescence were performed as previously mentioned.

Telomeric analysis

Squashed tubules were double immunolabelled with SYCP3 and RAP1. For each nucleus, partial Z projections of the top, equator and bottom portions were captured using an Olympus DP70 digital camera controlled by AnalySIS software (Soft Imaging System). All projections result from the superimposition of 15 focal planes throughout a certain nuclear region.

Histology

For adult male histological analysis, mice were perfused and their testes/ovaries were processed into serial paraffin sections and stained with haematoxylin-eosin. For TUNEL assay, sections were deparaffinized and apoptotic cells were detected with the *In Situ* Cell Death Detection Kit (Roche) and counterstained with DAPI. Apoptotic cells were pseudocoloured in green. Immunohistochemical detection of proliferating cells with α -PCNA ab29 (1:200, Abcam) involved antigen retrieval with citrate buffer at pH 6.0. For histological studies of 13 and 19 days mice, testes were fixed in Bouin's fixative.

Giemsa staining of diakinesis-stage mouse oocytes

To analyse crossovers at diakinesis, we did chromosome preparations of oocytes ($n \geq 15$ per female) from three females of 18 weeks of age from each genotype following the method described previously (Kan *et al*, 2008).

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online (<http://www.embojournal.org>).

Acknowledgements

We acknowledge Drs C López-Otín and Vera Knauper for helpful comments. We express our sincere thanks to Drs E de Boer, T de Lange, R Freire, MA Handel and E Marcon for providing antibodies and reagents and I Ramos-Fernández for technical assistance. This work was supported by SAF (2008-0317), J CyLe (SA), BFU (2008-00300/BCM) and BFU (2009-08975/BMC). CGC and YS are supported by FIS and FPI fellowships, respectively. EL is recipient of a Ramón y Cajal Research contract.

Author contributions: EL and AMP designed the project and planned the experiments. YH and CGC developed the targeted mutation and carried out the analysis of the mice. JLB provided essential reagents and developed one of the polyclonal antibodies. JAS and AV performed immunological studies and the telomeric analysis. DGdR and EdA carried out the staging of seminiferous tubules and histopathological analysis. TH performed the histology and immunohistochemistry. MSS injected the targeted ES cells and participated in the experimental analysis of oocytes in conjunction with EL. EL and AMP wrote the paper with input and discussion from the co-authors.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

- Baudat F, Manova K, Yuen JP, Jasin M, Keeney S (2000) Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Mol Cell* **6**: 989–998
- Buonomo SB, Clyne RK, Fuchs J, Loidl J, Uhlmann F, 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
- Chiang T, Duncan FE, Schindler K, Schultz RM, Lampson MA (2010) Evidence that weakened centromere cohesin is a leading cause of age-related aneuploidy in oocytes. *Curr Biol* **20**: 1522–1528
- Crackower MA, Kolas NK, Noguchi J, Sarao R, Kikuchi K, Kaneko H, Kobayashi E, Kawai Y, Koziaradzki I, Landers R, Mo R, Hui CC, Nieves E, Cohen PE, Osborne LR, Wada T, Kunieda T, Moens PB, Penninger JM (2003) Essential role of Fkbp6 in male fertility and homologous chromosome pairing in meiosis. *Science* **300**: 1291–1295
- Eijpe M, Offenberger H, Jessberger R, Revenkova E, Heyting C (2003) Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3. *J Cell Biol* **160**: 657–670
- Gómez R, Valdeolmillos A, Parra MT, Viera A, Carreiro C, Roncal F, Rufas JS, Barbero JL, Suja JA (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
- Gruber S, Haering CH, Nasmyth K (2003) Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell* **112**: 765–777
- Gutiérrez-Caballero C, Herrán Y, Sánchez-Martín MS, Suja JA, Barbero JL, Llano E, Pendás AM (2011) Identification and molecular characterization of the mammalian kleisin RAD21L. *Cell Cycle* **10**: 1477–1487
- Hartsuiker E, Vaessen E, Carr AM, Kohli J (2001) Fission yeast Rad50 stimulates sister chromatid recombination and links cohesion with repair. *EMBO J* **20**: 6660–6671
- Henderson KA, Keeney S (2005) Synaptonemal complex formation: where does it start? *Bioessays* **7**: 995–998
- Hodges CA, LeMaire-Adkins R, Hunt PA (2001) Coordinating the segregation of sister chromatids during the first meiotic division: evidence for sexual dimorphism. *J Cell Sci* **114**: 2417–2426
- Hodges CA, Revenkova E, Jessberger R, Hassold TJ, Hunt PA (2005) SMC1beta-deficient female mice provide evidence that cohesins are a missing link in age-related nondisjunction. *Nat Genet* **37**: 1351–1355
- Hunt PA, Hassold TJ (2002) Sex matters in meiosis. *Science* **296**: 2181–2183
- Ishiguro KI, Kim J, Fujiyama-Nakamura S, Kato S, Watanabe Y (2011) A new meiosis-specific cohesin complex implicated in the cohesin code for homologous pairing. *EMBO Rep* **12**: 267–275
- Kan R, Sun X, Kolas NK, Avdievich E, Kneitz B, Edelmann W, Cohen PE (2008) Comparative analysis of meiotic progression in female mice bearing mutations in genes of the DNA mismatch repair pathway. *Biol Reprod* **78**: 462–471
- Klein F, Mahr P, Galova M, Buonomo SB, Michaelis C, Nairz K, Nasmyth K (1999) A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* **98**: 91–103
- Kolas NK, Marcon E, Crackower MA, Höög C, Penninger JM, Spyropoulos B, Moens PB (2005) Mutant meiotic chromosome core components in mice can cause apparent sexual dimorphic endpoints at prophase or X-Y defective male-specific sterility. *Chromosoma* **114**: 92–102
- Kudo NR, Anger M, Peters AH, Stemmann O, Theussl HC, Helmhart W, Kudo H, Heyting C, Nasmyth K (2009) Role of cleavage by separase of the Rec8 kleisin subunit of cohesin during mammalian meiosis I. *J Cell Sci* **122**: 2686–2698
- 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 (2006) Resolution of chiasmata in oocytes requires separase-mediated proteolysis. *Cell* **126**: 135–146
- Lee J, Hirano T (2011) RAD21L, a novel cohesin subunit implicated in linking homologous chromosomes in mammalian meiosis. *J Cell Biol* **192**: 263–276
- Li XC, Schimenti JC (2007) Mouse pachytene checkpoint 2 (trip13) is required for completing meiotic recombination but not synapsis. *PLoS Genet* **3**: e130
- Lister L, Kouznetsova A, Hyslop L, Kalleas D, Pace S, Barel J, Nathan A, Floros V, Adelfalk C, Watanabe Y, Jessberger R, Kirkwood TB, Höög C, Herbert M (2010) Age-related meiotic segregation errors in mammalian oocytes are preceded by depletion of cohesin and Sgo2. *Curr Biol* **20**: 1511–1521
- Llano E, Gómez R, Gutiérrez-Caballero C, Herrán Y, Sánchez-Martín M, Vázquez-Quiñones L, Hernández T, de Alava E, Cuadrado A, Barbero JL, Suja JA, Pendás AM (2008) Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Genes Dev* **22**: 2400–2413
- Losada A, Hirano M, Hirano T (2002) Cohesin release is required for sister chromatid resolution, but not for condensin-mediated compaction, at the onset of mitosis. *Genes Dev* **16**: 3004–3016
- Mahadevaiah SK, Bourc'his D, de Rooij DG, Bestor TH, Turner JM, Burgoyne PS (2008) Extensive meiotic asynapsis in mice antagonizes meiotic silencing of unsynapsed chromatin and consequently disrupts meiotic sex chromosome inactivation. *J Cell Biol* **182**: 263–276
- Meirow D, Dor J, Kaufman B, Shrim A, Rabinovici J, Schiff E, Raanani H, Levron J, Fridman E (2007) Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury. *Hum Reprod* **22**: 1626–1633
- Mimitou EP, Symington LS (2009) DNA end resection: many nucleases make light work. *DNA Repair* **8**: 983–995
- Moens PB, Marcon E, Shore N, Kochakpour N, Spyropoulos B (2007) Initiation and resolution of interhomolog connections: crossover and non-crossover sites along mouse synaptonemal complexes. *J Cell Sci* **120**: 1017–1027
- Musacchio A, Salmon ED (2007) The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 379–393
- Nagaoka SI, Hodges CA, Albertini DF, Hunt PA (2011) Oocyte-specific differences in cell-cycle control create an innate susceptibility to meiotic errors. *Curr Biol* **26**: 651–657
- Offenberger HH, Schalk JA, Meuwissen RL, van Aalderen M, Kester HA, Dietrich AJ, Heyting C (1998) SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Res* **26**: 2572–2579
- Parisi S, McKay MJ, Molnar M, Thompson MA, van der Spek PJ, van Druenen-Schoenmaker E, Kanaar R, Lehmann E, Hoeijmakers JHJ, Kohli J (1999) Rec8p, a meiotic recombination and sister chromatid cohesion phosphoprotein of the Rad21p family conserved from fission yeast to humans. *Mol Cell Biol* **19**: 3515–3528
- Parra MT, Gómez R, Viera A, Llano E, Pendás AM, Rufas JS, Suja JA (2009) Sequential assembly of centromeric proteins in male mouse meiosis. *PLoS Genet* **5**: e1000417
- Parra MT, Gómez R, Viera A, Page J, Calvente A, Wordeman L, Rufas JS, Suja JA (2006) A perikinetochoric ring defined by MCAK and Aurora-B as a novel centromere domain. *PLoS Genet* **2**: e84
- Parra MT, Viera A, Gómez R, Page J, Benavente R, Santos JL, Rufas JS, Suja JA (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, Perez-Hidalgo L, Moens PB, Reini K, Lakin N, Syväoja JE, San-Segundo PA, Freire R (2004) TopBP1 and ATR colocalization at meiotic chromosomes: role of TopBP1/Cut5 in the meiotic recombination checkpoint. *Mol Biol Cell* **15**: 1568–1579
- Peters H (1969) The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta Endocrinol (Copenh)* **62**: 98–116
- Prieto I, Suja JA, Pezzi N, Kremer L, Martínez-A C, Rufas JS, Barbero JL (2001) Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat Cell Biol* **3**: 761–766
- Revenkova E, Eijpe M, Heyting C, Hodges CA, Hunt PA, Liebe B, Scherthan H, Jessberger R (2004) Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat Cell Biol* **6**: 555–562
- Revenkova E, Herrmann K, Adelfalk C, Jessberger R (2010) Oocyte cohesin expression restricted to pre-dictyate stages provides full fertility and prevents aneuploidy. *Curr Biol* **20**: 1529–1533
- Royo H, Polikiewicz G, Mahadevaiah SK, Prosser H, Mitchell M, Bradley A, de Rooij DG, Burgoyne PS, Turner JM (2010) Evidence that meiotic sex chromosome inactivation is essential for male fertility. *Curr Biol* **20**: 2117–2123
- Russell LD (1990) *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. 1st edn. Cache River Press, Quick Publishing: St Louis, MO

- Santucci-Darmanin S, Walpita D, Lespinasse F, Desnuelle C, Ashley T, Paquis-Flucklinger V (2000) MSH4 acts in conjunction with MLH1 during mammalian meiosis. *FASEB J* **11**: 1539–1547
- Scherthan H (2001) A bouquet makes ends meet. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 621–627
- Severson AF, Ling L, van Zuylen V, Meyer BJ (2009) 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* **23**: 1763–1778
- Shelling AN (2010) Premature ovarian failure. *Reproduction* **140**: 633–641
- Sonoda E, Matsusaka T, Morrison C, Vagnarelli P, Hoshi O, Ushiki T, Nojima K, Fukagawa T, Waizenegger IC, Peters JM, Earnshaw WC, Takeda S (2001) Scc1/Rad21/Mcd1 is required for sister chromatid cohesion and kinetochore function in vertebrate cells. *Dev Cell* **6**: 759–770
- Suja JA, Barbero JL (2009) Cohesin complexes and sister chromatid cohesion in mammalian meiosis. *Genome Dyn* **5**: 94–116
- Sumara I, Vorlaufer E, Stukenberg PT, Kelm O, Redemann N, Nigg EA, Peters JM (2002) The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol Cell* **9**: 515–525
- Tachibana-Konwalski K, Godwin J, van der Weyden L, Champion L, Kudo NR, Adams DJ, Nasmyth K (2010) Rec8-containing cohesin maintains bivalents without turnover during the growing phase of mouse oocytes. *Genes Dev* **24**: 2505–2516
- Viera A, Rufas JS, Martínez I, Barbero JL, Ortega S, Suja JA (2009) CDK2 is required for proper homologous pairing, recombination and sex-body formation during male mouse meiosis. *J Cell Sci* **122**: 2149–2159
- Wiltshire T, Park C, Caldwell KA, Handel MA (1995) Induced premature G2/M-phase transition in pachytene spermatocytes includes events unique to meiosis. *Dev Biol* **169**: 557–567
- Xu H, Balakrishnan K, Malaterre J, Beasley M, Yan Y, Essers J, Appeldoorn E, Tomaszewski JM, Vazquez M, Verschoor S, Lavin MF, Bertonecello I, Ramsay RG, McKay MJ (2010) Rad21-cohesin haploinsufficiency impedes DNA repair and enhances gastrointestinal radiosensitivity in mice. *PLoS One* **5**: e12112
- Xu H, Beasley MD, Warren WD, van der Horst GT, McKay MJ (2005) Absence of mouse REC8 cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis. *Dev Cell* **8**: 949–961
- Yang F, De La Fuente R, Leu NA, Baumann C, McLaughlin KJ, Wang PJ (2006) Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis. *J Cell Biol* **173**: 497–507
- Yoshida K, Kondoh G, Matsuda Y, Habu T, Nishimune Y, Morita T (1998) The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol Cell* **1**: 707–718
- Yuan L, Liu JG, Hoja MR, Wilbertz J, Nordqvist K, Höög C (2002) Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science* **296**: 1115–1118
- Yuan L, Liu JG, Zhao J, Brundell E, Daneholt B, Hoog C (2000) The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell* **5**: 73–83

Meiotic cohesin complexes are essential for the formation of the axial element in mice

Elena Llano,^{1,2} Yurema Herrán,¹ Ignacio García-Tuñón,¹ Cristina Gutiérrez-Caballero,¹ Enrique de Álava,¹ José Luis Barbero,⁴ John Schimenti,⁵ Dirk G. de Rooij,⁶ Manuel Sánchez-Martín,³ and Alberto M. Pendás¹

¹Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, ²Departamento de Fisiología, and ³Departamento de Medicina, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

⁴Departamento de Proliferación Celular y Desarrollo, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28040 Madrid, Spain

⁵Center for Vertebrate Genomics, Cornell University, Ithaca, NY 14850

⁶Center for Reproductive Medicine, Academic Medical Center, University of Amsterdam, 1105 AZ Amsterdam, Netherlands

Cohesin is a conserved multisubunit protein complex that participates in chromosome segregation, DNA damage repair, chromatin regulation, and synaptonemal complex (SC) formation. Yeast, but not mice, depleted of the cohesin subunit Rec8 are defective in the formation of the axial elements (AEs) of the SC, suggesting that, in mammals, this function is not conserved. In this paper, we show that spermatocytes from mice lacking

the two meiosis-specific cohesin subunits RAD21L and REC8 were unable to initiate RAD51- but not DMC1-mediated double-strand break repair, were not able to assemble their AEs, and arrested as early as the leptotene stage of prophase I, demonstrating that cohesin plays an essential role in AE assembly that is conserved from yeast to mammals.

Introduction

In mammalian spermatogenesis, a subset of spermatogonia undergoes a terminal round of DNA replication and then enters meiosis. Meiosis is a specialized process in which two successive rounds of chromosome segregation and cell divisions occur without intervening DNA replication. This reduces the number of each chromosome from four copies in the meocyte to one copy in haploid gametes. At the initiation of the prophase I, a proteinaceous structure called the axial element (AE) begins to form along replicated sister chromatids. Subsequently, the AEs of homologues become juxtaposed by transverse element proteins (e.g., SYCP1, beginning in zygonema), and the paired axes joined by transverse elements form the tripartite synaptonemal complexes (SCs) that connect all homologues at pachynema (Yang and Wang, 2009). This dynamic protein complex provides the structural framework in which homologous chromosomes undergo close juxtaposition and repair of double-strand breaks (DSBs) by recombination. Subsequently, but before the first meiotic division, homologues desynapse but retain stable connections

formed by resolution of certain recombination events as crossovers (visible as chiasmata). In most organisms, chiasmata are required to enable proper orientation of homologues on the meiosis I spindle before the first meiotic division. Sister chromatid cohesion distal to crossovers maintains chiasmata at their initial positions until anaphase I.

During meiosis, sister chromatid cohesion is lost in two consecutive steps. Loss of chromosome arm cohesion in anaphase I releases the linkage between homologues, allowing them to segregate to opposite poles (Page and Hawley, 2003). However, maintenance of centromeric cohesion by the action of Shugoshin-like-2 in mammals ensures the generation of tension by the proper attachment of sister chromatids to the meiosis II spindle, enabling their proper segregation to opposite poles (Llano et al., 2008; Gutiérrez-Caballero et al., 2012).

During the mitotic cell cycle, sister chromatid cohesion is mediated by the multisubunit cohesin complex between S phase and anaphase (Gruber et al., 2003; Unal et al., 2007; Haering et al., 2008; Zhang et al., 2008). Structurally, the mitotic cohesin complex comprises four core proteins: SMC1 α , SMC3, RAD21, and a HEAT repeat domain protein (STAG1

E. Llano and Y. Herrán contributed equally to this paper.

Correspondence to Alberto M. Pendás: amp@usal.es; or Elena Llano: ellano@usal.es

Abbreviations used in this paper: AE, axial element; dKO, double knockout; DSB, double-strand break; LE, lateral element; RPA, replication protein A; SC, synaptonemal complex.

© 2012 Llano et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

and STAG2; Watanabe, 2005; Hirano, 2006). SMC1 α and SMC3 are members of the structural maintenance of a chromosome family of ATPases, which heterodimerize in an anti-parallel orientation. The α -kleisin subunit RAD21 closes the ring cohesin complex and is the substrate of the protease separase (Uhlmann et al., 2000). There are meiosis-specific mammalian paralogues of RAD21, SMC1 α , and STAG1-2, namely, REC8 and RAD21L, SMC1 β , and STAG3, respectively (Parisi et al., 1999; Prieto et al., 2001; Gruber et al., 2003; Gutiérrez-Caballero et al., 2011), which lead to a variety of meiosis-specific cohesin complexes (Ishiguro et al., 2011; Gutiérrez-Caballero et al., 2011). Interestingly, yeast Rec8 is necessary for stepwise release of sister chromatid cohesion in meiosis, and this role is widely conserved across eukaryotes (Klein et al., 1999; Golubovskaya et al., 2006; Severson et al., 2009). Furthermore, the analysis of yeast mutants of Rec8 revealed additional functions in AE assembly, pairing of homologues, synapsis, and recombination (Klein et al., 1999; Watanabe and Nurse, 1999).

In mammals, cohesins colocalize and interact with the structural AE components SYCP3 and SYCP2 (Suja and Barbero, 2009). However, there is disagreement as to whether the mammalian cohesin complex is an integral part of the AE itself (Eijpe et al., 2003) or constitutes a different structure of the chromosomal core (Pelttari et al., 2001). Mouse spermatocytes lacking SMC1 β , REC8, or RAD21L are able to assemble AEs but undergo meiotic arrest at the zygotene or early pachytene stages, with partially synapsed chromosomes (Bannister et al., 2004; Revenkova et al., 2004; Herrán et al., 2011). REC8 is also dispensable for AE and SC assembly in many higher eukaryotes, suggesting that cohesin may not be universally required for AE assembly (Bhatt et al., 1999; Bannister et al., 2004). However, *Caenorhabditis elegans* depleted of the three meiosis-specific kleisins (Rec8, COH-3, and COH-4) are unable to form AEs, similar to yeast bearing *rec8 Δ* or *smc3 Δ* alleles (Klein et al., 1999; Severson et al., 2009). These results suggest that this AE assembly function might be obscured in other higher eukaryotes, such as mammals, owing to the involvement of multiple kleisins (Gutiérrez-Caballero et al., 2011; Ishiguro et al., 2011; Lee and Hirano, 2011).

To better understand the role that cohesins play in AE and SC assembly in mammals, we performed a genetic depletion of the two meiosis-specific kleisins REC8 and RAD21L in mice (Bannister et al., 2004; Herrán et al., 2011). Our results reveal that either of these kleisins is each sufficient for association of the AE proteins SYCP3 and SYCP2 with chromosomes and that AE formation fails only in mice lacking both kleisins. This failure to assemble AEs leads to accumulation of cells with leptotene-like morphology, which is, to the best of our knowledge, the earliest arrest of mouse spermatogenesis ever reported. This evidence indicates that meiotic cohesin complexes are essential structural components of the AE from yeast to mammals. In addition, we show that meiotic cohesins function downstream of the SPO11-mediated DSB formation and upstream of RAD51- but not DMC1-mediated DSB repair.

Results and discussion

Mice lacking RAD21L and REC8 develop normally but are infertile

Mice lacking either of two meiosis-specific cohesin subunits, REC8 or RAD21L, show similar defects in meiosis. To test for possible overlap in the functions of these two kleisin proteins, we generated kleisin double-knockout (dKO) mice. *Rad21l^{-/-}Rec8^{-/-}*, henceforth dKO-kls animals, were obtained from crosses of double heterozygotes (*Rec8^{+/-}* and *Rad21l^{+/-}*) in the expected Mendelian ratios and analyzed. dKO-kls mice developed normally and displayed no overt defects besides infertility. As expected from the phenotypes of the single *Rec8* and *Rad21l* mutants, all the dKO-kls mice ($n = 11$) were infertile (unpublished data; Bannister et al., 2004; Herrán et al., 2011). The testes from dKO-kls mice were reduced in size, weighing 30 ± 3 mg at 6–8 wk of age compared with 103 ± 8 mg in wild-type males (Fig. 1 A and Table S1). Furthermore, histological examination of testes from 6–8-wk-old dKO-kls males revealed seminiferous tubules that were always devoid of postmeiotic cell types, despite the presence of spermatogonia, and Sertoli and Leydig cells (Fig. 1 B and not depicted). Similar defects were also observed in the *Rec8*-deficient and *Rad21L*-deficient mice (Fig. 1, A and B; Bannister et al., 2004; Herrán et al., 2011).

Meiotic kleisins are essential for the formation of AEs in spermatocytes

We staged and examined spermatocyte spreads by immunolocalization of SYCP3. In the absence of RAD21L and REC8, AE assembly and synapsis between homologues were disrupted very early (Fig. 1, C and D). dKO-kls spermatocytes arrested at a leptotene-like stage (100% of cells) were characterized by the punctate aggregates of SYCP3. In contrast, thin threads were observed in late leptotene spermatocytes from wild-type and single mutant mice (Fig. 1, C and D). SYCP2, another axial protein, colocalized with SYCP3 in these aggregates (Fig. 1 D). Antibodies against SYCP1 were used to determine whether transverse components of the SC assembled in dKO-kls mutant spermatocytes. The aggregates of AE proteins did not show reactivity with SYCP1 antibodies, indicating an absence of transverse filament assembly ($n = 120$; Fig. 1 D). In agreement with previous studies, spermatocytes of *Rad21l* and *Rec8* single mutant mice arrested at a zygotene-like stage, displaying several fragmented AEs and some partially synapsed lateral elements (LEs) that never progressed to the expected 19 fully synapsed autosomal bivalent chromosomes observed in wild-type pachynema (unpublished data; Bannister et al., 2004; Herrán et al., 2011).

Tubule section in wild-type mice can be categorized in stages running from I to XII according to the spectrum of germ cell types that are present (Russell et al., 1990). Following these criteria, dKO-kls, *Rad21l*, and *Rec8* mutant mice appeared to be arrested at stage IV of the seminiferous epithelium cycle (Fig. 1 B; Herrán et al., 2011). In wild-type tubules, stage IV typically corresponds to midpachynema. At this stage, mutant spermatocytes that fail to complete recombination and/or chromosome synapsis will usually undergo apoptosis (de Rooij and de Boer, 2003). As examples, MSH5-, DMC1-, or SPO11-deficient spermatocytes

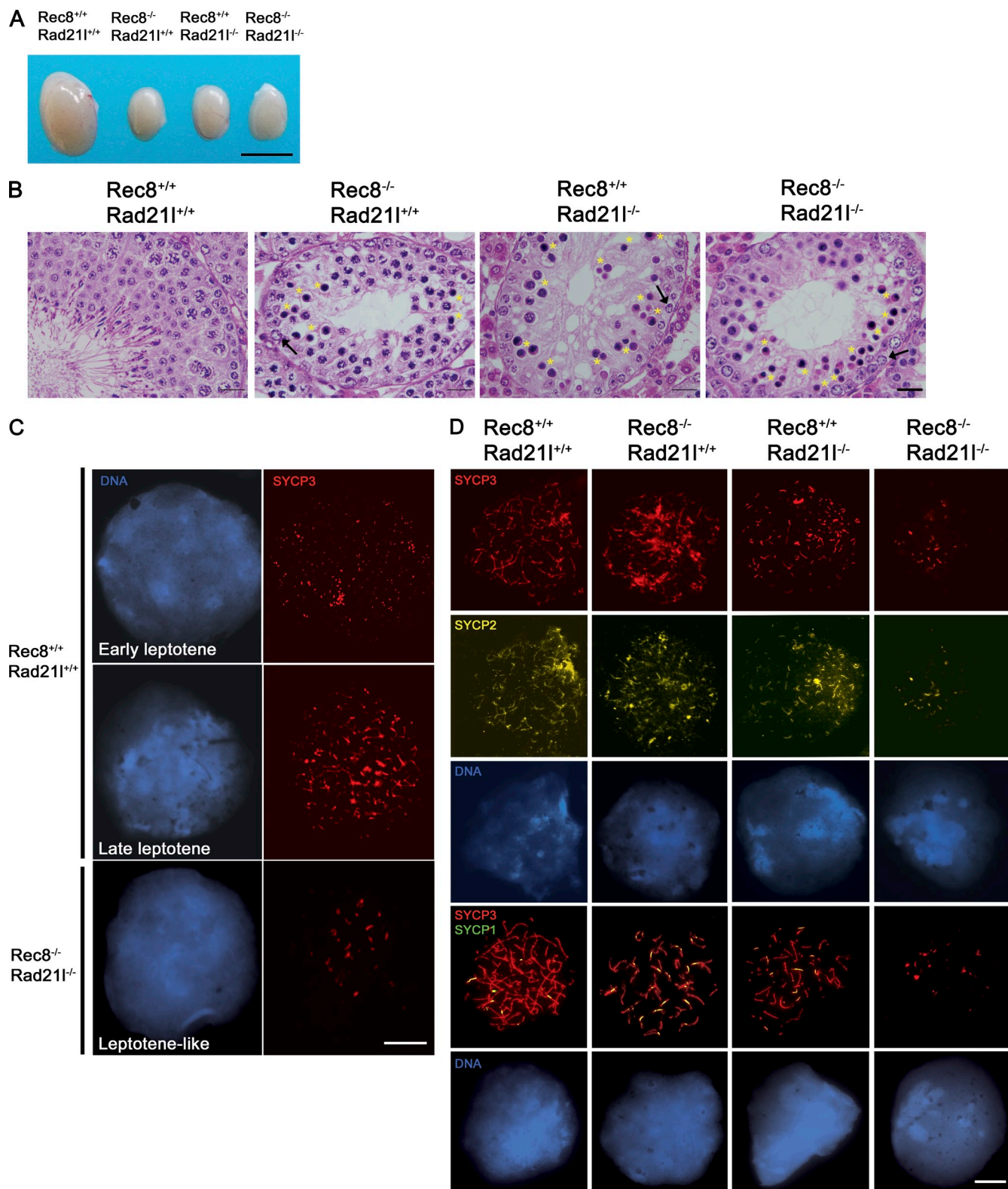


Figure 1. Absence of RAD21L and REC8 arrest mouse spermatogenesis in early prophase I. (A) dKO-kl mice show a 70% reduction in testes size compared with wild type. Similar reductions are observed in $Rad21^{-/-}$ and $Rec8^{-/-}$ males. (B) Mutation of both $Rad21$ and $Rec8$ elicits an arrest of spermatogenesis at stage IV characterized by intermediate spermatogonia (arrows) in a representative section of a seminiferous tubule. Massive apoptosis of spermatocytes (condensed nuclei indicated by asterisks) and absence of mature spermatozoa/spermatids are observed in the dKO-kl tubules. A similar arrest is observed in seminiferous tubules from singly mutant $Rad21$ and $Rec8$ mice. (C) Immunolabeling for SYCP3 in spermatocytes from a wild-type mouse at early and late leptotene and spermatocytes arrested at a leptotene-like stage from a dKO-kl mouse. (D) dKO-kl spermatocytes arrested at the leptotene-like stage show absence of chromosomal synapsis. Double immunolabeling for SYCP3 and SYCP2 or SYCP3/SYCP1 shows SYCP3/SYCP2 aggregates without synapsis as indicated by the lack of SYCP1 labeling in double mutant spermatocytes. Spermatocytes from $Rad21^{-/-}$ (zygotene-like arrest), $Rec8^{-/-}$ (zygotene-like arrest), and wild-type (zygotene stage) mice show AEs and synapsed LEs with stretches of SYCP1. Bars: (A) 5 mm; (B) 25 μ m; (C and D) 100 μ m.

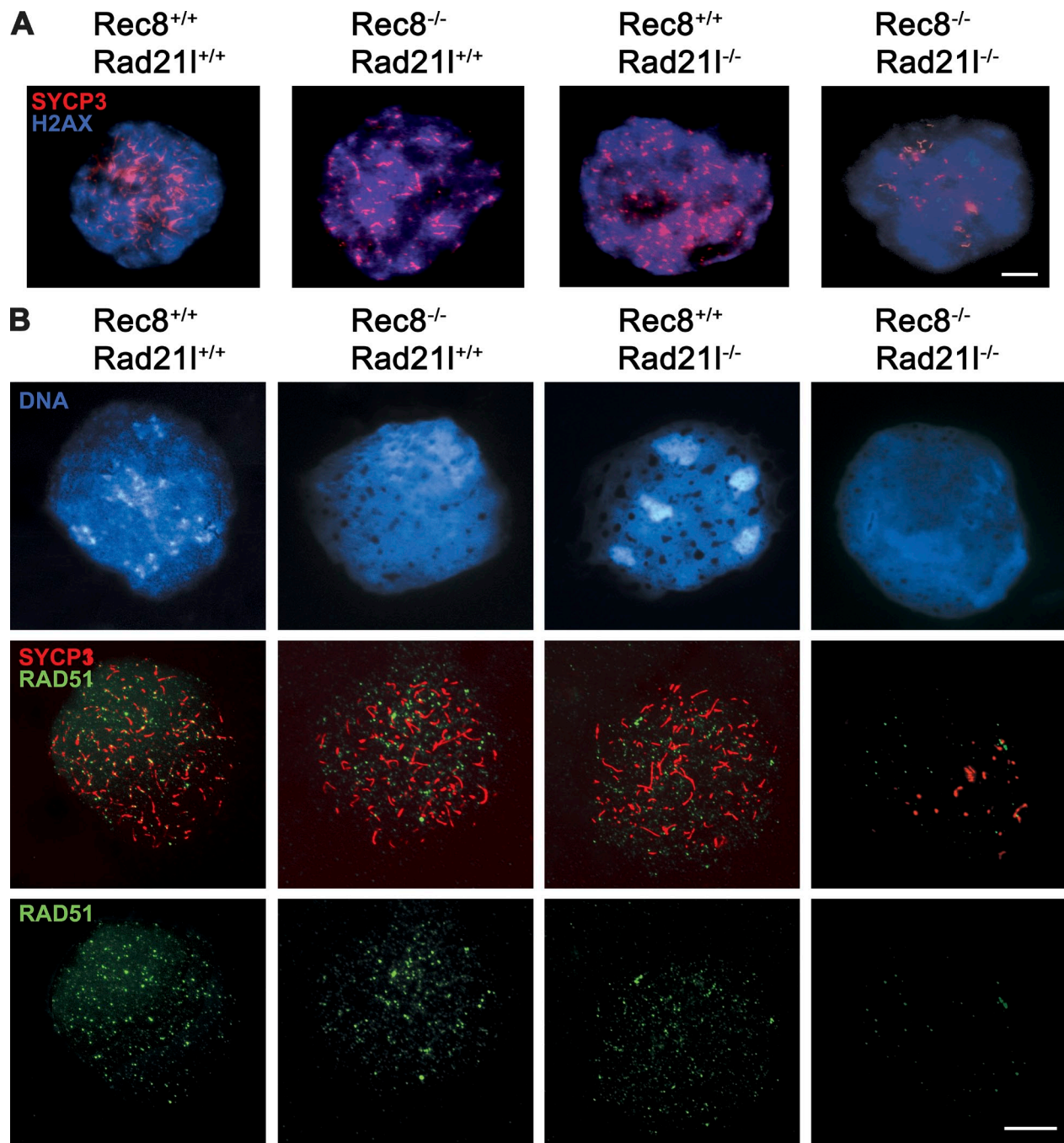


Figure 2. **Meiotic cohesins are dispensable for DSB formation but not for normal loading of RAD51.** (A) Double immunolabeling of SYCP3 and γ -H2AX. In wild-type spermatocytes, γ -H2AX labels the chromatin from leptotene to pachynema when the signal disappears from autosomal chromosomes and remains only on sex body chromatin (not depicted). In the single and dKO-kls mutants, γ -H2AX also labels leptotene chromatin. (B) Double immunolabeling of SYCP3 and RAD51. In wild-type spermatocytes and spermatocytes of single *Rad21l* or *Rec8* mutants, RAD51 localizes to AEs/LEs at leptotene. In *Rec8*^{-/-} *Rad21l*^{-/-} spermatocytes, there is an 8.5-fold reduction in the number of RAD51 foci. Bars, 100 μ m.

arrest at stage IV, but the terminal stage was described as zygonema, late zygonema, and midpachynema, respectively, based on the progression of synapsis (Yoshida et al., 1998; de Vries et al., 1999; Baudat et al., 2000). Interestingly, dKO-kls spermatocytes arrest at a stage best described as leptotene because they lack AEs yet remain viable up to stage IV. The absence of later stages indicates that these spermatocytes then undergo apoptosis, likely caused by activation of meiotic checkpoints. Thus, disruption of the meiotic cohesin complexes

leads to absence of AEs, which elicits spermatocyte death after an extended leptotene-like stage.

DSBs are formed but not repaired in dKO-kls male mice

We next sought to determine how recombination mechanisms are affected by the absence of RAD21L and REC8. Programmed DSBs that initiate meiotic recombination are normally generated by the nuclease SPO11 at the early leptotene stage (Keeney, 2001).

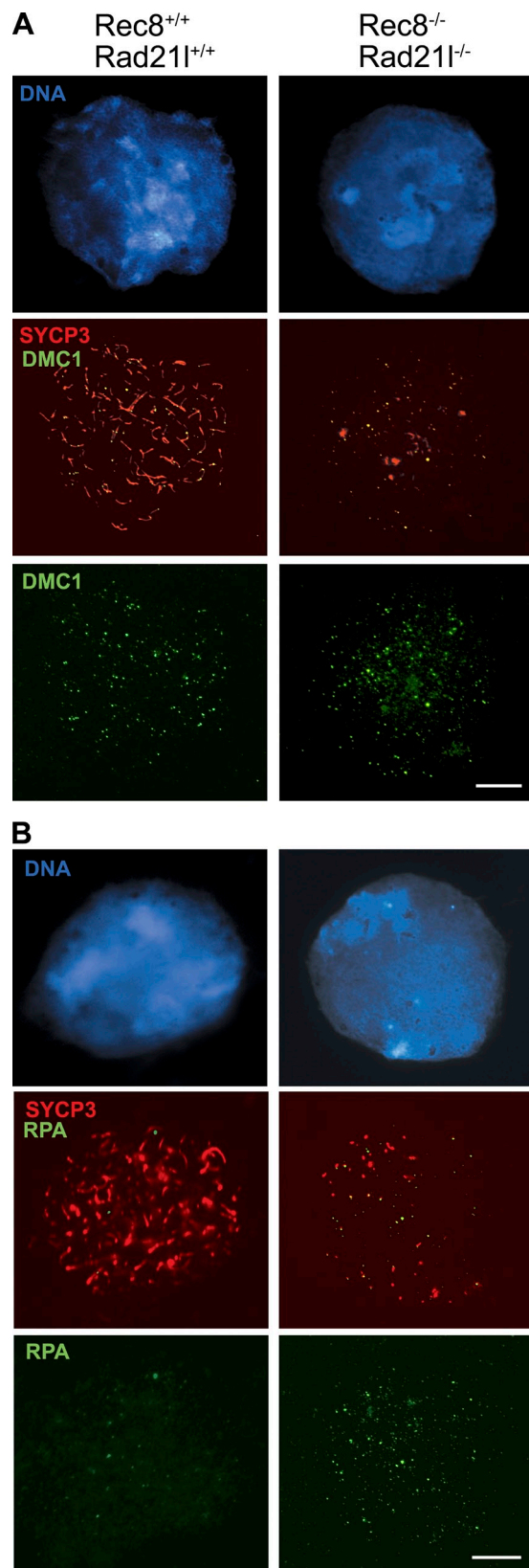


Figure 3. Normal loading of DMC1 and RPA accumulation at leptotene-arrested dKO-kl spermatocytes. Double immunolabeling of SYCP3 and DMC1 or RPA. (A) In wild-type and dKO-kl spermatocytes, DMC1 protein localizes to AEs/LEs at leptotene. (B) In dKO-kl spermatocytes, there is a threefold increase in the numbers of RPA foci at the leptotene-like arrest in comparison with wild-type spermatocytes. Bars, 100 μ m.

We analyzed break formation in mutant spermatocytes using antibodies against the γ -H2AX, a histone variant that is phosphorylated during early prophase I in response to SPO11-induced DSBs in an ATM-dependent manner (Mahadevaiah et al., 2001). As seen in Fig. 2 A, 100% of leptotene-like arrested spermatocytes from dKO-kl mice showed a positive staining that was similar to that observed in the wild-type mice (87 ± 30 vs. 92 ± 56 ; Table S1). This suggests that the formation of programmed DSBs is not markedly altered in dKO-kl mice. However, the presence of γ -H2AX staining in all the arrested spermatocytes from dKO-kl animals indicates that breaks are not repaired efficiently.

We further analyzed the recombination process to address why DSBs are not repaired in the double mutant spermatocytes. After DSBs are induced, the broken ends are resected, and the strand invasion enzymes RAD51 and DMC1 are recruited to the resulting single-strand DNA overhangs to promote homologue pairing and DNA repair (Symington and Gautier, 2011). In wild-type leptotene spermatocytes, RAD51 and DMC1 assemble on the AEs/LEs of bivalents and disappear toward pachynema, with the exception of the unsynapsed portions of the sex chromosome AEs (Tarsounas et al., 1999). As shown in Fig. 2 B, wild-type spermatocytes showed 70–150 RAD51 foci (111 ± 32). In contrast, the dKO-kl contained only a few RAD51 foci (14 ± 5 , $P < 0.05$; Table S1). Next, we monitored the loading of DMC1, a meiosis-specific paralogue of RAD51. In wild-type spermatocytes, both recombinases colocalize extensively such that most recombination-associated foci contain both proteins (Tarsounas et al., 1999). Intriguingly, immunofluorescence with a DMC1-specific antibody revealed no detectable difference in numbers of DMC1 foci between wild type and dKO-kl in leptotene (52 ± 20 vs. 54 ± 19 ; Table S1 and Fig. 3 A). The presence of an equivalent number of DMC1 foci in double mutant leptotene spermatocytes implies that the γ -H2AX labeling in the dKO-kl spermatocytes is very likely generated by the meiotic SPO11 nuclease.

Next, we determined the distribution of the replication protein A (RPA) in dKO-kl spermatocytes. RPA is a single-stranded DNA-binding protein that enhances the formation of RAD51 and DMC1 filaments in vitro. RPA is first detected in few foci at leptotene. The initial binding of RPA to single-strand DNA at the resected ends of DSBs is supposed to be too transient to be cytologically detected by immunofluorescence because RPA is rapidly displaced by RAD51/DMC1 (Yang et al., 2008). Subsequently, after RAD51/DMC1 loading, abundant RPA foci are detected in the synapsed regions of the LEs at zygonema (Krogh and Symington, 2004; Moens et al., 2007). Intriguingly, despite failure to proceed beyond leptotene, RPA foci were increased threefold in the dKO-kl spermatocytes relative to wild type (55 ± 19 vs. 18 ± 10 , $P < 0.05$; Table S1 and Fig. 3 B), which is very likely caused by the sharp reduction in the loading of RAD51 (Fig. 2 B; Roig et al., 2010). TRIP13 is the mammalian orthologue of the yeast Pch2 (pachytene checkpoint 2) gene, and its deletion leads to a block of spermatogenesis and oogenesis because of defects in DSB repair (Li and Schimenti, 2007; Roig et al., 2010). Interestingly, *Tripl3* mutant spermatocytes accumulate RPA foci in leptotene and also show

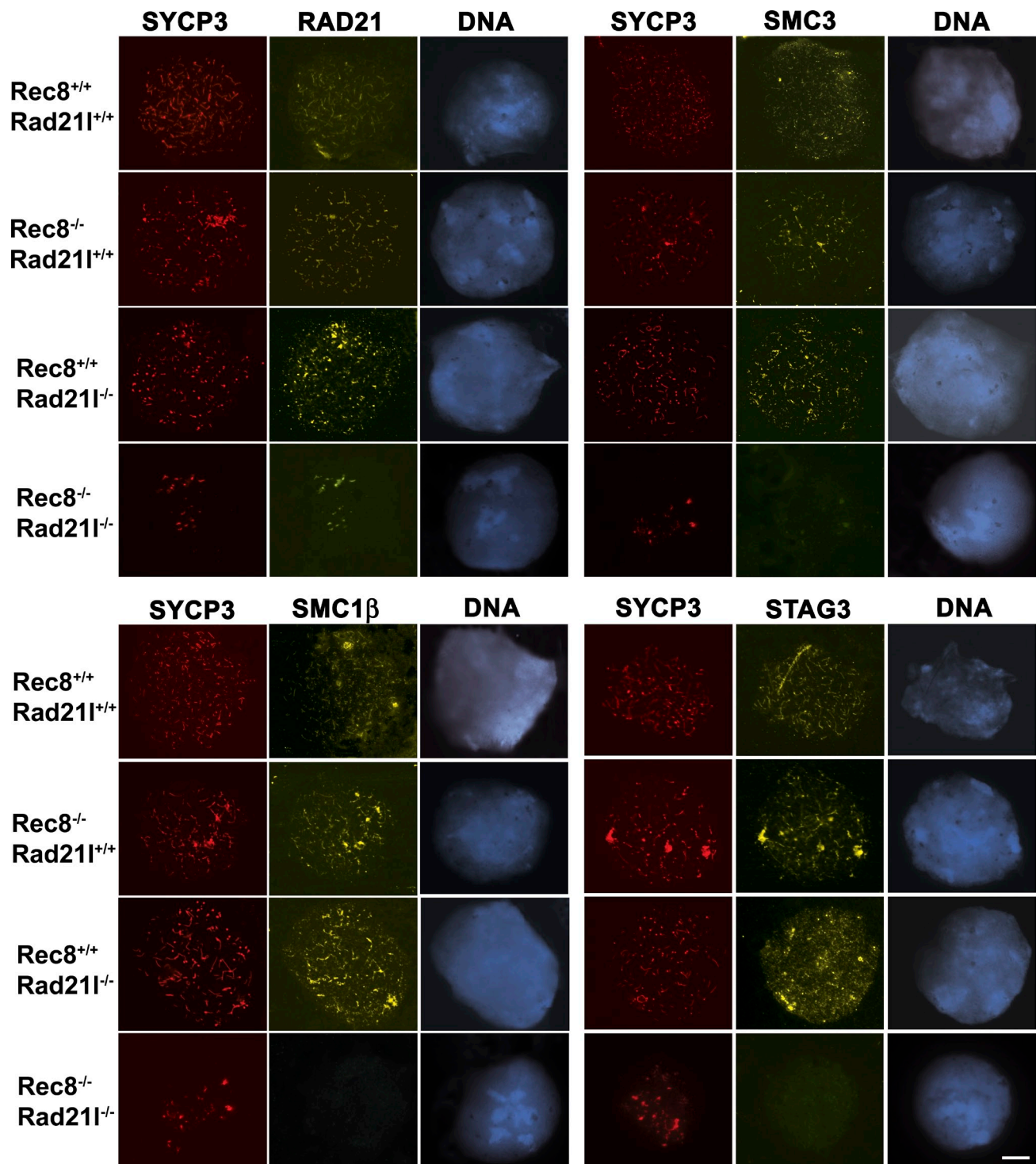


Figure 4. **Cohesin complexes in the absence of RAD21 and REC8.** Double immunofluorescence of SYCP3 and either RAD21, SMC3, SMC1 β , or STAG3. In wild-type leptotene spermatocytes, the cohesins RAD21, SMC3, SMC1 β , and STAG3 colocalize with SYCP3 along the AEs of the chromosomes. In *Rad21* and *Rec8* single mutant leptotene spermatocytes, RAD21, SMC3, SMC1 β , and STAG3 colocalize also with SYCP3 along the AEs/LEs of the chromosomes. In spermatocytes from dKO-kls, arrested at leptotema, SMC1 β and STAG3 are not detected by immunofluorescence, whereas immunolabeling for RAD21 and SMC3 renders robust and very faint fluorescence signals, respectively. Bar, 100 μ m.

a sharply reduced number of RAD51 foci and an accumulation of DMC1 foci at leptotema (Roig et al., 2010). Thus, the RAD51 and DMC1 homologous recombination pathways, although very similar biochemically (Kagawa and Kurumizaka, 2010),

can be genetically dissected. Collectively, our results indicate that meiotic cohesins are dispensable for the loading of DMC1 but are essential for normal loading of RAD51 (Xu et al., 2003; Sharan et al., 2004; Yang et al., 2008; Roig et al., 2010).

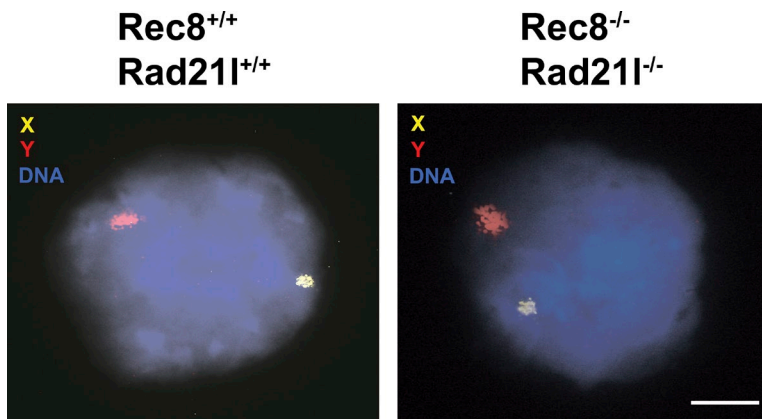


Figure 5. **dKO-kl spermatocytes are proficient for sister chromatid cohesion.** Hybridization of two DNA probes to the X and Y chromosomes renders a single dot signal for each probe in both wild-type and dKO-kl spermatocytes. Clear FISH signals for both probes can be observed in 63% of the 90 leptoneuma-like cells analyzed. Bar, 100 μ m.

Cohesin complexes in mutant spermatocytes

In the absence of SYCP3, the cohesin complex persists at a residual AE-like chromosomal core in mouse meiocytes (Pelttari et al., 2001; Kolas et al., 2004; Kouznetsova et al., 2005). We evaluated whether deficiency of both RAD21L and REC8 compromised the loading of other cohesin subunits by immunostaining for the cohesin subunits STAG3, SMC3, SMC1 β , and RAD21 (Fig. 4). Surprisingly, we observed robust staining only for RAD21, which colocalized with SYCP3 labeling, and much fainter staining of SMC3 (Fig. 4). We did not detect either STAG3 or SMC1 β (Fig. 4), suggesting that these cohesin subunits are complexed in vivo with REC8 and RAD21L kleisins. Collectively, these data suggest that the two α -kleisins, RAD21L and REC8, are not epistatic and sustain most, if not all, meiosis-specific cohesin complexes involved in AE formation and SC assembly. Our results are consistent with the observation that RAD21 is present on chromosome axes from leptoneuma to diploneuma in mouse spermatocytes (this paper; Herrán et al., 2011) but contrast with one study in which RAD21 was first detected in the pachytene stage (Ishiguro et al., 2011). Because we observed RAD21 immunolabeling in the *Rad21*^{-/-}, *Rec8*^{-/-}, and dKO-kl spermatocytes (Fig. 4), cross-reactivity of our antibody with RAD21L and/or REC8 is not likely the reason for these contrasting results, as previously claimed (Ishiguro et al., 2011). This early localization of RAD21 would suggest a direct role of this kleisin in establishing cohesion in premeiotic S phase.

Sister chromatid cohesion in the absence of meiotic kleisins

In addition to their role in AE formation and DNA looping (Revenkova and Jessberger, 2006; Novak et al., 2008), cohesin complexes must tether the two sister chromatids from S phase until the onset of anaphase, when separase is activated, cleaves the α -kleisin RAD21 subunit, and leads to opening of the cohesin ring (Hauf et al., 2001). Thus, a deficiency for two out of the three mammalian kleisins could partially affect chromosomal cohesion and/or replication of the premeiocyte/meiocyte. To test this possibility, we performed FACS analysis of whole cells from seminiferous tubules, which showed the existence of tetraploid compartment in dKO-kl testes (Fig. S1). Next, we performed FISH analysis (one probe from the X and one probe

from the Y chromosomes) in dKO-kl spermatocytes (Fig. 5). The results revealed a single signal for each chromosome probe (corresponding to two closed and tethered sister chromatids). Collectively, these results suggest that sister chromatid cohesion is properly established in the preceding S phase through the somatic α -kleisin RAD21 subunit complexed with the SMC3 and SMC1 α or SMC1 β subunits. This result implies that meiosis-specific cohesin complexes are dispensable for cohesion, by itself, and are specifically required for SC structure.

To our knowledge, deletion of both REC8 and RAD21L leads to the earliest arrest of mouse meiotic prophase reported to date, including the mutations for the individual cohesins REC8, SMC1 β , and RAD21L and the structural additional components SYCP3, SYCP1, and SYCP2 (Yuan et al., 2000; Bannister et al., 2004; Revenkova et al., 2004; de Vries et al., 2005; Yang et al., 2006; Herrán et al., 2011). Interestingly, it was reported very recently that SYCP1 and SYCP3 double deficiency does not abolish the loading of the meiotic cohesin complexes nor the presynaptic pairing and early homologous recombination in mouse meiocytes (Kouznetsova et al., 2011). Thus, the meiotic cohesin complexes are required to initiate AE/LE assembly in mammals (and not vice versa), which is a prerequisite for SC formation. Our findings provide evidence for a crucial role for meiotic cohesins (REC8- and RAD21L-containing cohesin complexes) in the very early assembly of the AEs of the mammalian SC, revealing that this process is conserved from yeast to mammals.

Materials and methods

Immunocytology and antibodies

Testes were detunicated and processed for spreading using the "dry-down" technique (Peters et al., 1997). The slides were rinsed three times for 5 min in PBS and incubated overnight at room temperature with primary antibodies diluted in PBS. The primary antibodies used for immunofluorescence were rabbit α SMC3 serum K987 (1:20), rabbit α SMC1 β serum K974 (1:20; Prieto et al., 2004), rabbit α STAG3 serum K403 (1:20; Prieto et al., 2001), rabbit α RAD21 IgG K854 (1:5; Prieto et al., 2002), rabbit α SYCP2 serum K1035 (1:20), mouse α SYCP3 IgG sc-74569 (1:100), rabbit α RAD51 sc-8349 (1:30), and PC130 (1:5; EMD; provided by J. Page, Universidad Autonoma de Madrid, Madrid, Spain), rabbit α DMC1 sc-22768 (1:20; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), rabbit α SYCP1 IgG ab15090 (1:200; Abcam), rabbit anti- γ -H2AX (ser139) IgG (#07-164; 1:200; Millipore), and rabbit α RPA IgG (1:300; provided by E. Marcon, Toronto University, Toronto, Canada). The secondary antibodies used were TRITC α -mouse 115-095-146/ α -rabbit 111-025-144 and FITC α -mouse 115-095-146/ α -rabbit 111-095-045 (Jackson ImmunoResearch Laboratories,

Inc.; all 1:100). Slides were visualized at room temperature using a microscope (Axioplan 2; Carl Zeiss) with 63× objectives with an aperture of 1.4 (Carl Zeiss). Images were taken with a digital camera (ORCA-ER; Hamamatsu Photonics) and processed with OPENLAB 4.0.3 (PerkinElmer) and Photoshop (Adobe).

Mice

The mutation at the *Rad21*^{-/-} locus is a null allele generated by gene targeting using an insertional targeting vector (Herrán et al., 2011). Mice were genotyped by genomic Southern blot analysis of tail genomic DNA digested with SpeI and hybridized with a 5' external probe. The probe (1 kb) was generated by PCR using the primers 5'-ACTAGTCTAAATAAAGGCTT-3' and 5'-GATTTAAGCATGAATGAAGTAAC-3'. The mutation at the *Rec8* locus is a null allele (premature stop codon at exon 6) isolated in a forward genetic screen for mouse infertility (Bannister et al., 2004). Mice were genotyped by direct sequencing of the PCR-amplified exon 6 from genomic DNA using the primers 5'-CCTTACATCCTGTCTC-3' and 5'-ACAGGAACACCACTAACTC-3'. dKO-cls mice were obtained by genetic crossing of double heterozygote mice (*Rec8*^{+/-} *Rad21*^{+/-}) and compared with single mutant and wild-type littermates. All animal experiments were reviewed and approved by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Spanish Research Council) and the Universidad de Salamanca National Committee on Bioethics.

FISH analysis

The mouse Y-specific probes were obtained by PCR using the following three sets of primers: 1S, 5'-TAGGATGGTAAGCCCAATGC-3'; 1AS, 5'-TTGGTTGTTAATTGTTGGG-3'; 2S, 5'-CATGCCCTTGGACTGAC-3'; 2AS, 5'-CTTTTTTTTCCCTCTGG-3'; 3S, 5'-TCCTCTGCAGAGAAGGGAC-3'; and 3AS, 5'-CCTCCGCTCCAATCCTATCA-3' (Navin et al., 1996). The X-specific DNA probe is a pericentromeric DNA fragment cloned in a plasmid (Disteche et al., 1985). Both probes were labeled by Nick translation with Dig-11-deoxy-UTP and Bio-16-deoxy-UTP and hybridized to spermatocyte spreads following standard procedures. In brief, slides were pre-treated with pepsin (0.005% in 0.01 N HCl for 5 min at 37°C), dehydrated, and RNase treated (0.1 mg/ml in PBS for 1 h at 37°C). After denaturation in 70% formamide during 3 min at 75°C, slides were dehydrated in ice-cold ethanol and hybridized overnight at 37°C to a denatured DNA probe. After washing (50% formamide and 2× SSC at 42°C), biotin- and digoxigenin-labeled probes were immunodetected using streptavidin-Cy3/goat biotinylated anti-streptavidin/streptavidin-Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) and mouse anti-digoxigenin-FITC/goat anti-mouse/rabbit anti-mouse-FITC (Roche), respectively (Pendás et al., 1994).

FACS analysis

Wild-type, *Rad21*^{-/-}, and dKO-cls testicular cell preparation and their DNA content measurement were performed as previously described (Malkov et al., 1998). In brief, testes were dissected in separation medium (4 mM L-glutamine, 1.5 mM sodium pyruvate, 10% fetal calf serum, and 75 mg/ml ampicillin in DMEM containing nonessential amino acids). After decapsulation, the tubules were then treated with collagenase for 5 min at 37°C. The sedimented seminiferous cords were washed in separation medium and treated with 2.5 μg/ml trypsin and 1 U/ml DNase I for 2 min at 37°C. Using a pair of scalpels, the tubules were disintegrated, and the resulting tissue suspension was passed through a 50-μm nylon mesh, washed twice by centrifugation, and counted. Cells were brought to a concentration of 2 × 10⁶ cells/ml in separation medium, diluted 1:1 with propidium iodide solution (10 mM Tris, pH 8, 1 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40, 0.7 mg/ml RNase A, and 0.05 mg/ml propidium iodide), and freshly analyzed by a cell-sorting instrument (FACSsort; BD).

Online supplemental material

Fig. S1 shows that the absence of RAD21L and REC8 does not impair DNA replication and does not provoke loss of chromatid cohesion in dKO-cls spermatocytes. Table S1 shows the number of early recombination-associated foci in spermatocytes and the weight of testis from wild-type and dKO-cls mice. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201201100/DC1>.

We wish to express our sincere thanks to E. Marcon and J. Page for providing antibodies (RPA and RAD51, respectively), I. Ramos-Fernández and Teresa Hernandez for excellent technical assistance, and C. López-Otín for his support. We specially appreciate the comments from an anonymous reviewer.

This work was supported by grant SAF2011-25252 and Junta de Castilla y León. C. Gutiérrez-Caballero and Y. Herrán are supported by Fondo de

Investigación Sanitaria and Formación de Personal Investigador fellowships, respectively. E. Llano is the recipient of a Ramón y Cajal Research contract.

Submitted: 18 January 2012

Accepted: 21 May 2012

References

- Bannister, L.A., L.G. Reinholdt, R.J. Munroe, and J.C. Schimenti. 2004. Positional cloning and characterization of mouse *mei8*, a disrupted allele of the meiotic cohesin *Rec8*. *Genesis*. 40:184–194. <http://dx.doi.org/10.1002/gene.20085>
- Baudat, F., K. Manova, J.P. Yuen, M. Jasin, and S. Keeney. 2000. Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Mol. Cell*. 6:989–998. [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00098-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00098-8)
- Bhatt, A.M., C. Lister, T. Page, P. Fransz, K. Findlay, G.H. Jones, H.G. Dickinson, and C. Dean. 1999. The DIF1 gene of *Arabidopsis* is required for meiotic chromosome segregation and belongs to the REC8/RAD21 cohesin gene family. *Plant J*. 19:463–472. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00548.x>
- de Rooij, D.G., and P. de Boer. 2003. Specific arrests of spermatogenesis in genetically modified and mutant mice. *Cytogenet. Genome Res*. 103:267–276. <http://dx.doi.org/10.1159/000076812>
- de Vries, F.A., E. de Boer, M. van den Bosch, W.M. Baarends, M. Ooms, L. Yuan, J.G. Liu, A.A. van Zeeland, C. Heyting, and A. Pastink. 2005. Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev*. 19:1376–1389. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.329705>
- de Vries, S.S., E.B. Baart, M. Dekker, A. Siezen, D.G. de Rooij, P. de Boer, and H. te Riele. 1999. Mouse MutS-like protein Msh5 is required for proper chromosome synapsis in male and female meiosis. *Genes Dev*. 13:523–531. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.13.5.523>
- Disteche, C.M., U. Tantravahi, S. Gandy, M. Eisenhard, D. Adler, and L.M. Kunkel. 1985. Isolation and characterization of two repetitive DNA fragments located near the centromere of the mouse X chromosome. *Cytogenet. Cell Genet*. 39:262–268. <http://dx.doi.org/10.1159/000132155>
- Eijje, M., H. Offenber, R. Jessberger, E. Revenkova, and C. Heyting. 2003. Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1β and SMC3. *J. Cell Biol*. 160:657–670. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200212080>
- Golubovskaya, I.N., O. Hamant, L. Timofejeva, C.J. Wang, D. Braun, R. Meeley, and W.Z. Cande. 2006. Alleles of *afd1* dissect REC8 functions during meiotic prophase I. *J. Cell Sci*. 119:3306–3315. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.03054>
- Gruber, S., C.H. Haering, and K. Nasmyth. 2003. Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell*. 112:765–777. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00162-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00162-4)
- Gutiérrez-Caballero, C., Y. Herrán, M. Sánchez-Martín, J.A. Suja, J.L. Barbero, E. Llano, and A.M. Pendás. 2011. Identification and molecular characterization of the mammalian α-kleisin RAD21L. *Cell Cycle*. 10:1477–1487. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.10.9.15515>
- Gutiérrez-Caballero, C., L.R. Cebollero, and A.M. Pendás. 2012. Shugoshins: from protectors of cohesion to versatile adaptors at the centromere. *Trends Genet*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2012.03.003>
- Haering, C.H., A.M. Farcas, P. Arumugam, J. Metson, and K. Nasmyth. 2008. The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. *Nature*. 454:297–301. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07098>
- Hauf, S., I.C. Waizenegger, and J.M. Peters. 2001. Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science*. 293:1320–1323. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1061376>
- Herrán, Y., C. Gutiérrez-Caballero, M. Sánchez-Martín, T. Hernández, A. Viera, J.L. Barbero, E. de Álava, D.G. de Rooij, J.A. Suja, E. Llano, and A.M. Pendás. 2011. The cohesin subunit RAD21L functions in meiotic synapsis and exhibits sexual dimorphism in fertility. *EMBO J*. 30:3091–3105. <http://dx.doi.org/10.1038/embj.2011.222>
- Hirano, T. 2006. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 7:311–322. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1909>
- Ishiguro, K., J. Kim, S. Fujiyama-Nakamura, S. Kato, and Y. Watanabe. 2011. A new meiosis-specific cohesin complex implicated in the cohesin code for homologous pairing. *EMBO Rep*. 12:267–275. <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2011.2>
- Kagawa, W., and H. Kurumizaka. 2010. From meiosis to postmeiotic events: uncovering the molecular roles of the meiosis-specific recombinase Dmc1. *FEBS J*. 277:590–598. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07503.x>

- Keeney, S. 2001. Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 52:1–53. [http://dx.doi.org/10.1016/S0070-2153\(01\)52008-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0070-2153(01)52008-6)
- Klein, F., P. Mahr, M. Galova, S.B. Buonomo, C. Michaelis, K. Nairz, and K. Nasmyth. 1999. A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell.* 98:91–103. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80609-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80609-1)
- Kolas, N.K., L. Yuan, C. Hoog, H.H. Heng, E. Marcon, and P.B. Moens. 2004. Male mouse meiotic chromosome cores deficient in structural proteins SYCP3 and SYCP2 align by homology but fail to synapse and have possible impaired specificity of chromatin loop attachment. *Cytogenet. Genome Res.* 105:182–188. <http://dx.doi.org/10.1159/000078188>
- Kouznetsova, A., I. Novak, R. Jessberger, and C. Höög. 2005. SYCP2 and SYCP3 are required for cohesin core integrity at diplotene but not for centromere cohesion at the first meiotic division. *J. Cell Sci.* 118:2271–2278. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.02362>
- Kouznetsova, A., R. Benavente, A. Pastink, and C. Höög. 2011. Meiosis in mice without a synaptonemal complex. *PLoS ONE.* 6:e28255. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028255>
- Krogh, B.O., and L.S. Symington. 2004. Recombination proteins in yeast. *Annu. Rev. Genet.* 38:233–271. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.091500>
- Lee, J., and T. Hirano. 2011. RAD21L, a novel cohesin subunit implicated in linking homologous chromosomes in mammalian meiosis. *J. Cell Biol.* 192:263–276. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201008005>
- Li, X.C., and J.C. Schimenti. 2007. Mouse pachytene checkpoint 2 (trip13) is required for completing meiotic recombination but not synapsis. *PLoS Genet.* 3:e130. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.0030130>
- Llano, E., R. Gómez, C. Gutiérrez-Caballero, Y. Herrán, M. Sánchez-Martín, L. Vázquez-Quiñones, T. Hernández, E. de Alava, A. Cuadrado, J.L. Barbero, 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. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.475308>
- Mahadevaiah, S.K., J.M. Turner, F. Baudat, E.P. Rogakou, P. de Boer, J. Blanco-Rodríguez, M. Jasin, S. Keeney, W.M. Bonner, and P.S. Burgoyne. 2001. Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat. Genet.* 27:271–276. <http://dx.doi.org/10.1038/85830>
- Malkov, M., Y. Fisher, and J. Don. 1998. Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 59:84–92. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod59.1.84>
- Moens, P.B., E. Marcon, J.S. Shore, N. Kochakpour, and B. Spyropoulos. 2007. Initiation and resolution of interhomolog connections: crossover and non-crossover sites along mouse synaptonemal complexes. *J. Cell Sci.* 120:1017–1027. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.03394>
- Navin, A., R. Prekeris, N.A. Lisitsyn, M.M. Sonti, D.A. Grieco, S. Narayanswami, E.S. Lander, and E.M. Simpson. 1996. Mouse Y-specific repeats isolated by whole chromosome representational difference analysis. *Genomics.* 36:349–353. <http://dx.doi.org/10.1006/geno.1996.0473>
- Novak, I., H. Wang, E. Revenkova, R. Jessberger, H. Scherthan, and C. Höög. 2008. Cohesin Smc1 β determines meiotic chromatin axis loop organization. *J. Cell Biol.* 180:83–90. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200706136>
- Page, S.L., and R.S. Hawley. 2003. Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science.* 301:785–789. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1086605>
- Parisi, S., M.J. McKay, M. Molnar, M.A. Thompson, P.J. van der Spek, E. van Drunen-Schoenmaker, R. Kanaar, E. Lehmann, J.H.J. Hoeijmakers, and J. Kohlri. 1999. Rec8p, a meiotic recombination and sister chromatid cohesion phosphoprotein of the Rad21p family conserved from fission yeast to humans. *Mol. Cell. Biol.* 19:3515–3528.
- Pelttari, J., M.R. Hoja, L. Yuan, J.G. Liu, E. Brundell, P. Moens, S. Santucci-Darmanin, R. Jessberger, J.L. Barbero, C. Heyting, and C. Höög. 2001. A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells. *Mol. Cell. Biol.* 21:5667–5677. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.21.16.5667-5677.2001>
- Pendás, A.M., P. Moran, J.P. Freije, and E. Garcia-Vazquez. 1994. Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenet. Cell Genet.* 67:31–36. <http://dx.doi.org/10.1159/000133792>
- Peters, A.H., A.W. Plug, M.J. van Vugt, and P. de Boer. 1997. A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome Res.* 5:66–68. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1018445520117>
- Prieto, I., J.A. Suja, N. Pezzi, L. Kremer, C. Martínez-A, J.S. Rufas, and J.L. Barbero. 2001. Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat. Cell Biol.* 3:761–766. <http://dx.doi.org/10.1038/35087082>
- Prieto, I., N. Pezzi, J.M. Buesa, L. Kremer, I. Barthelemy, C. Carreiro, F. Roncal, A. Martinez, L. Gomez, R. Fernandez, et al. 2002. STAG2 and Rad21 mammalian mitotic cohesins are implicated in meiosis. *EMBO Rep.* 3:543–550. <http://dx.doi.org/10.1093/embo-reports/kvfl108>
- Prieto, I., C. Tease, N. Pezzi, J.M. Buesa, S. Ortega, L. Kremer, A. Martínez, C. Martínez-A, M.A. Hultén, and J.L. Barbero. 2004. Cohesin component dynamics during meiotic prophase I in mammalian oocytes. *Chromosome Res.* 12:197–213. <http://dx.doi.org/10.1023/B:CHRO.0000021945.83198.0e>
- Revenkova, E., and R. Jessberger. 2006. Shaping meiotic prophase chromosomes: cohesins and synaptonemal complex proteins. *Chromosoma.* 115:235–240. <http://dx.doi.org/10.1007/s00412-006-0060-x>
- Revenkova, E., M. Eijpe, C. Heyting, C.A. Hodges, P.A. Hunt, B. Liebe, H. Scherthan, and R. Jessberger. 2004. Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat. Cell Biol.* 6:555–562. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1135>
- Roig, I., J.A. Dowdle, A. Toth, D.G. de Rooij, M. Jasin, and S. Keeney. 2010. Mouse TRIP13/PCH2 is required for recombination and normal higher-order chromosome structure during meiosis. *PLoS Genet.* 6:e1001062. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1001062>
- Russell, L.D., H.P. Ren, I. Sinha Hikim, W. Schulze, and A.P. Sinha Hikim. 1990. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *Am. J. Anat.* 188:21–30. <http://dx.doi.org/10.1002/aja.1001880104>
- Severson, A.F., L. Ling, V. van Zuylen, and B.J. Meyer. 2009. 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.* 23:1763–1778. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1808809>
- Sharan, S.K., A. Pyle, V. Coppola, J. Babus, S. Swaminathan, J. Benedict, D. Swing, B.K. Martin, L. Tessarollo, J.P. Evans, et al. 2004. BRCA2 deficiency in mice leads to meiotic impairment and infertility. *Development.* 131:131–142. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.00888>
- Suja, J.A., and J.L. Barbero. 2009. Cohesin complexes and sister chromatid cohesion in mammalian meiosis. *Genome Dyn.* 5:94–116. <http://dx.doi.org/10.1159/000166622>
- Symington, L.S., and J. Gautier. 2011. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu. Rev. Genet.* 45:247–271. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132435>
- Tarounas, M., T. Morita, R.E. Pearlman, and P.B. Moens. 1999. RAD51 and DMC1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and synaptonemal complexes. *J. Cell Biol.* 147:207–220. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.147.2.207>
- Uhlmann, F., D. Wernic, M.A. Poupard, E.V. Koonin, and K. Nasmyth. 2000. Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell.* 103:375–386. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00130-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00130-6)
- Unal, E., J.M. Heidinger-Pauli, and D. Koshland. 2007. DNA double-strand breaks trigger genome-wide sister-chromatid cohesion through Eco1 (Ctf7). *Science.* 317:245–248. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1140637>
- Watanabe, Y. 2005. Sister chromatid cohesion along arms and at centromeres. *Trends Genet.* 21:405–412. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2005.05.009>
- Watanabe, Y., and P. Nurse. 1999. Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature.* 400:461–464. <http://dx.doi.org/10.1038/22774>
- Xu, X., O. Aprelikova, P. Moens, C.X. Deng, and P.A. Furth. 2003. Impaired meiotic DNA-damage repair and lack of crossing-over during spermatogenesis in BRCA1 full-length isoform deficient mice. *Development.* 130:2001–2012. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.00410>
- Yang, F., and P.J. Wang. 2009. The mammalian synaptonemal complex: a scaffold and beyond. *Genome Dyn.* 5:69–80. <http://dx.doi.org/10.1159/000166620>
- Yang, F., R. De La Fuente, N.A. Leu, C. Baumann, K.J. McLaughlin, and P.J. Wang. 2006. Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis. *J. Cell Biol.* 173:497–507. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200603063>
- Yang, F., S. Eckardt, N.A. Leu, K.J. McLaughlin, and P.J. Wang. 2008. Mouse TEX15 is essential for DNA double-strand break repair and chromosomal synapsis during male meiosis. *J. Cell Biol.* 180:673–679. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200709057>
- Yoshida, K., G. Kondoh, Y. Matsuda, T. Habu, Y. Nishimune, and T. Morita. 1998. The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol. Cell.* 1:707–718. [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80070-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80070-2)
- Yuan, L., J.G. Liu, J. Zhao, E. Brundell, B. Daneholt, and C. Höög. 2000. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol. Cell.* 5:73–83. [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80404-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80404-9)
- Zhang, N., S.G. Kuznetsov, S.K. Sharan, K. Li, P.H. Rao, and D. Pati. 2008. A handcuff model for the cohesin complex. *J. Cell Biol.* 183:1019–1031. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200801157>

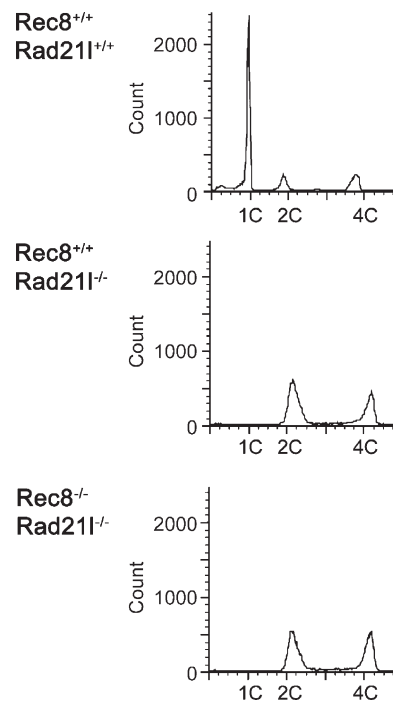
Llano et al., <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201201100/DC1>

Figure S1. **The absence of RAD21L and REC8 does not impair DNA replication.** DNA content of the cells from the seminiferous tubules in the dKO-kl. FACS analysis of cells from whole seminiferous tubules from wild-type, *Rad21^{-/-}*, and dKO-kl testes showing the presence of the tetraploid compartment in the three genotypes ($n = 2$). In addition, both *Rad21^{-/-}* and dKO-kl, but not wild type, lack the haploid compartment as a result of the prophase arrest at stage IV.

Table S1. **Number of early recombination-associated foci in spermatocytes and the weight of testis from wild-type and dKO-kl mice**

Genotype	Weight of testis	γ -H2AX fluorescence	No. of RAD51 foci in leptonea	No. of DMC1 foci in leptonea	No. of RPA foci in leptonea
	mg	arbitrary unit			
Wild type	103 \pm 8; $n = 8$	92.3 \pm 56.2; $n = 40$	110.7 \pm 31.8; $n = 35$	51.8 \pm 20.9; $n = 40$	18.3 \pm 9.7; $n = 36$
dKO-kl	30 \pm 3; $n = 8^a$	86.7 \pm 29.6; $n = 43$	13.7 \pm 5.4; $n = 35^a$	53.9 \pm 19.4; $n = 40$	55.5 \pm 18.7; $n = 38^a$

^aSignificantly different from wild type ($P < 0.05$).