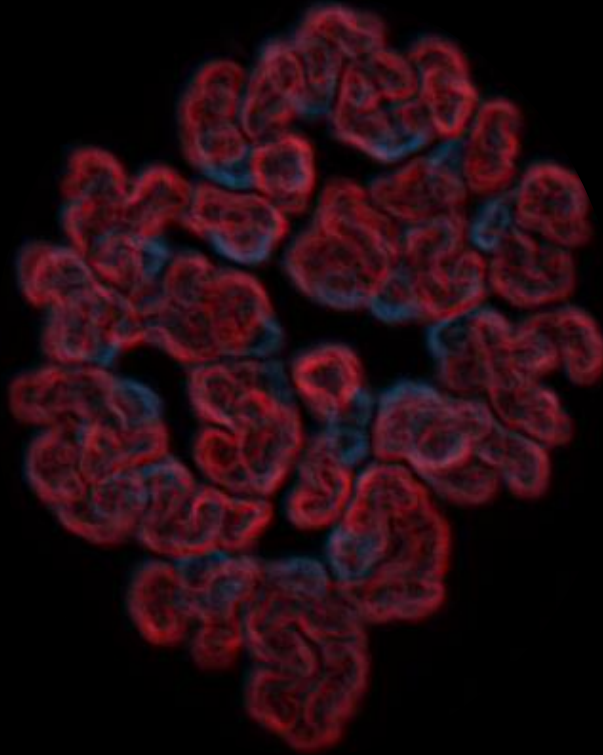


Universidad de Salamanca
Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer

Análisis funcional de una variante de SYCE1
causante de Fallo Ovárico Prematuro y de la histona
H1FOO en fertilidad



Tesis Doctoral
Fernando Sánchez Sáez
Salamanca, 2023



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Análisis funcional de una variante de SYCE1 causante de Fallo Ovárico Prematuro y de la histona H1FOO en fertilidad

Tesis Doctoral

Fernando Sánchez Sáez

Director: Dr. Alberto Martín Pendás

Codirectora: Dra. Elena Llano Cuadra

Universidad de Salamanca

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer

Salamanca, 2023



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

El Dr. Alberto Martín Pendás, Investigador principal del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC) y la Dra. Elena Llano Cuadra, Profesora Titular del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca,

Certifican que **Fernando Sánchez Sáez** ha realizado bajo su dirección el trabajo de tesis doctoral titulado:

Análisis funcional de una variante de SYCE1 causante de Fallo Ovárico Prematuro y de la histona H1FOO en fertilidad

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 el programa “Biociencias: Biología y Clínica del Cáncer y Medicina Traslacional” de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste firman el presente certificado en Salamanca a 8 de Mayo de 2023

Dr. Alberto Martín Pendás

Dra. Elena Llano Cuadra

Agradecimientos

Desde que era pequeño, siempre he escuchado a mi madre decir que la vida se hace mejor acompañado. Y llegado este momento, en el que es inevitable parar y mirar hacia atrás para recordar el camino, me doy cuenta de que durante esta etapa he contado con la mejor compañía posible.

En primer lugar, gracias, Alberto y Elena por haberme permitido formar parte de vuestro equipo y vuestra familia científica. Ha sido un verdadero placer aprender a hacer ciencia bajo vuestra supervisión, y lo que es aún más importante, haberlo hecho en un ambiente abierto, plural y respetuoso. Recuerdo una de las primeras cenas en vuestra casa en la que dijisteis que, si de algo os sentíais orgullosos, era de la calidad humana del grupo que habíais formado. Creo que puedo decir que teníais toda la razón del mundo, y eso es gracias a vosotros, por haber sabido rodearos de gente increíble y además haber impreso en ellos parte de vuestro carácter.

Alberto, muchísimas gracias por haberme ayudado a comprender cómo funciona a fondo la meiosis y por haber puesto tanto esfuerzo en potenciar mi lado crítico y riguroso. Todas esas horas de despacho y todos los retos que me has ido proponiendo durante estos años me hacen salir de aquí siendo una persona mucho más preparada para afrontar los problemas (no solo científicos, también de la vida), y no puedo estar más agradecido por ello. La relación con un jefe muchas veces no es tan pacífica como a la gente le podría gustar, pero contigo todo han sido facilidades desde el primer momento, y siento de corazón que hemos formado un equipo buenísimo basado en la sinceridad y en la confianza mutua. Espero que sientas que mereció la pena apostar por mi cuando lo hiciste, yo a ti te volvería a elegir una y mil veces más.

Elena, mil gracias por haber sido siempre la primera mano amiga a la que he podido recurrir cada vez que he necesitado ayuda, y también por haberme dado la oportunidad de dar mis primeros pasos en Docencia. Tu increíble saber hacer en la poyata y tus consejos me han facilitado las cosas a diario, y más especialmente cuando me enfrentaba a protocolos nuevos con los que no sabía ni por dónde empezar. Gracias también a Marcela por tus notas motivadoras (y a veces amenazantes) repartidas por laboratorio, por ayudarme a memorizar por fin el código de aminoácidos y por las cenas de Halloween juntos (cuidado con esa noche, desde ahora siempre habrá un Chucky deambulando por Salamanca dispuesto a asustarte).

Laura, todo este trabajo habría sido imposible sin tu esfuerzo y tu ayuda. Gracias por haberme hecho tan fácil mis inicios en el laboratorio, no he podido tener mejor mentora. Has sido el mejor espejo en el que poder mirarme, porque tu capacidad de trabajo siempre me ha parecido digna de admirar. No eres consciente de lo que te hemos echado de menos por aquí estos últimos años.

Nati, mi Natufas, te voy a decir lo que siento por ti en clave: si yo soy HSF2BP, tú eres mi BRME1... Gracias por protegerme y estabilizarme siempre que lo he necesitado, no se qué habría sido de mi si no hubieras estado a mi lado. Espero haber estado a la altura de lo que se espera de un buen "padre de ratones", desde luego que, viniendo después de ti, no me lo has puesto nada fácil. Y aunque nuestro carácter haga saltar en ocasiones la paz por los aires por culpa de inspectores, cenas impuntuales y tesis ajenas, se que siempre que surja un momento de estrés, me bastará decir "calle, calle, calle" para tenerte al otro lado dispuesta a sacarme las castañas del fuego.

La tesis me ha regalado una hermana mayor que no sabía que necesitaba. Yaz (*aka* "Lupita", "Amorowat", "Mimu" y no sigo con el resto de motes porque no quiero que los agradecimientos ocupen 20 páginas), imposible agradecerte todo lo que has hecho por mi estos años en tan solo un par de líneas. Que te hayas ido apropiando poco a poco de mi personalidad me parece un precio justo a pagar a cambio de todos los buenos momentos que hemos compartido (y de los no tan buenos que hemos hecho mucho más llevaderos). Y sobre todo gracias por haberme enseñado una de las lecciones más importantes que he aprendido en la vida: con esfuerzo y coraje, todos somos capaces de reconstruirnos y superar cualquier adversidad, por difícil que parezca.

Mi Queli, a la vida le pido que me vuelva a poner al lado una compañera de trabajo con la que encajar tan bien como lo he hecho contigo, hasta el punto de entender frases enteras sin hablar, solo necesitando mirarnos a los ojos. Me siento increíblemente afortunado de haber encontrado a alguien con quien formar un tándem tan perfecto. Y es que es un gusto compartir tu tiempo no solo laboral, sino de ocio, con una persona que funciona a tu mismo ritmo y tiene una forma de ver la vida tan parecida. Gracias por ponerlo todo tan fácil. Aprovecho también para pedirte perdón por todo el *bullying* que te he hecho (ya se que no tienes 52 años, que son 10 menos) y para pedirte la custodia compartida de Oncese, creo que después de todo lo que hemos vivido, me la he ganado.

Gracias a Andrea, nuestra última incorporación de larga duración, por tu ayuda durante esta etapa y por habernos endulzado el paladar tantas veces. Espero que el tiempo que hemos compartido te ayude a enfrentar los problemas científicos de la mejor manera posible. Cuidame mucho el cortijo, estoy seguro de que queda en buenas manos.

Palomilla, tenerte con nosotros fue un verdadero regalo. No hay forma de agradecerte todo lo que nos ayudaste y lo bien que nos vino tu templanza. Nos demostraste que era cierto aquello de que “el que la sigue, la consigue”, y me alegra haber visto que has ido logrando todo lo que te has propuesto tanto dentro como ya fuera del laboratorio.

La mia bellissima Robertina, mi italiana favorita, no podrás decir que no hemos pasado buenos ratos... Gracias no solo por tu ayuda en el laboratorio, sino por las tardes desgañitándonos mientras cantábamos canciones en italiano, por tu cara después de cada susto, por nuestras peleas en la nieve y por haber sido lo suficientemente valiente como para enfrentarte a “La Monja”.

Linda, entre vacuna y vacuna, lo llenaste todo de alegría, y es que durante los meses que estuviste por aquí, lo vimos todo de otro color. Gracias por tu dedicación, por tener la mente tan abierta, y por tu talento en la cocina: me atrevo a decir que tu lasaña es la mejor de toda Francia.

Mil gracias también a Irene, te aseguro que aprendimos más de ti que tú de nosotros. Tu ayuda nos ha sacado de más de un apuro y fue un verdadero gusto haberte conocido.

No pienses que me iba a olvidar de ti, mi pequeño Dani Jr. Contra todo pronóstico, nos convertimos en los mejores compañeros de batalla, y es que en el fondo no somos tan diferentes... Ha sido un placer tenerte de rival de pádel y también de “esclavo”, siempre dispuesto a cumplir mis órdenes por surrealistas que fueran (presentaciones absurdas de *PowerPoint* incluidas). Se que tienes un futuro brillante por delante, y estaré siempre orgulloso de haberte podido acompañar en tus inicios.

Y de improvviso llegó el terremoto canario para convertirse en mi niña consentida: gracias, Sheila por todo lo que hemos compartido y vivido durante este último año. No sabes lo agradecido que me siento de haber encontrado, aunque haya sido ya al final de este camino, a mi alma gemela. Tu tenacidad, tu constancia y tu compañerismo han sido el soplo de aire fresco que necesitaba. Que tiemblen los futuros doctorandos del CIC, porque estoy seguro de que algún día serás la dueña de todo esto (y a ver quién te aguanta para entonces...). Eres un diamante en bruto y puedes con todo lo que te propongas, espero que nunca nadie te vuelva a hacer sentir lo contrario.

Y, ¡voilà! Cuando ya pensaba que no llegaría nadie más a robarme un trocito de corazón por el laboratorio, apareció otra *monster like me*, el juguetito que siempre había querido. Ana, espero que nos queden muchos años más de montar dramas juntos por lo que pase en el lugar más remoto de Europa. Y ya que seguramente seas la única capaz de entender las cursivas de este párrafo, te diré en secreto que, cuando menos te lo esperes, te *alcohol you* al *telemoveis* acabado en el número 22 para terminar *dancing alone* toda la *nochentera* en un *arcade*. Gracias por pegarte a mi como un *tattoo* y por haber sido mi *calma tras la tormenta*, no cambies nunca.

Gracias también al resto de compañeros que han ido pasando por el laboratorio 9: M^a Begoña, Adrián, Chari, Manon y mi *piccola nonna* Caterina, vuestra ayuda ha sido verdaderamente valiosa.

Isa y Marina, durante mis primeros años en el laboratorio, había un día a la semana que era especial: aquel en el que os tocaban PCR's aquí arriba (desde que os "independizasteis", comprendo aquello del "síndrome del nido vacío"...). Todo nuestro trabajo sería imposible sin vosotras. Gracias por afrontar las hojas de animalario interminables, los ratones pedidos a deshoras, las PCR's kilométricas y por darnos la tranquilidad de que los animales están bien cuidados en vuestras manos.

Un agradecimiento enorme al Servicio de Transgénesis. Manu, Lucía y Patricia, si hay alguien que tiene ganas de que acabe la Tesis, ¡estoy seguro de que esos sois vosotros! Gracias por la disponibilidad que habéis tenido siempre para todo lo que os he pedido (y eso que no han sido pocas cosas): os daba igual microinyectar, electroporar, pasarme ovarios o gónadas microscópicas, todo lo hacíais con una eficiencia y rapidez encomiable.

Por el CIC y Salamanca ha pasado gente que lo ha hecho todo mucho más fácil y ameno. Ana Casado, compañera de TikToks, payasetería y noches de karaoke, gracias por ser capaz de sacar mi lado romántico (no esperaba menos de mi novia de guardería). Ha sido increíble haber podido compartir esta aventura contigo desde el primer día. Gracias también a Aurora, a tu lado todo son siempre risas. También a Paula García, mi novata favorita, me siento afortunado de haberme reencontrado aquí contigo, está claro que lo que la RSA une, no lo separa nadie. Gracias a Sergio, el Vicepresidente del Congreso Internacional del *Trash*, no se si fue cosa de Margarita Salas o si simplemente el destino nos tenía reservado esta etapa juntos, desde luego que aquel curso de la UIMP ha traído cola... Gracias por haberme acompañado en mis momentos más duros y por ser una fuente incansable de memes. Carlitos, me cuesta asimilar que hay alguien más gracioso que yo, pero es que lo tuyo es de otro planeta. Ahora, eso sí, la mejor ciudad amurallada de España sigue sin ser Ciudad Rodrigo, te pongas como te pongas. Gracias también a Eva y Marian L14, Pablito y Cristina L17, Myriam y Eva L12, Guille y Javi L13, Milena y María L7, Raúl L4, José Luis L18, Natalia Varela, Dani Yayi, Lucero y Estefi.

Gracias a todos los Servicios del CIC que nos permiten desarrollar nuestro trabajo: Patología, Microscopía, Animalario, Genómica, Proteómica, Informática, Administración, Cocina, Mantenimiento, Limpieza, Almacén y Seguridad. En especial al servicio de Conserjería: Silvia y Vanesa, no hay mejor manera de empezar y acabar cada día que con vuestra sonrisa saludando desde el otro lado del cristal.

Gracias a los animales de experimentación que entregan su vida para contribuir al avance de la Ciencia, ojalá pronto llegue el día en el que encontremos otra manera. Muchas gracias también a los colaboradores del laboratorio que nos han provisto con reactivos, protocolos y ayuda científica, así como a las instituciones que financian nuestro trabajo. También a los compañeros y amigos que he podido conocer en los congresos en los que he participado, siempre es grato compartir ideas y conocer diferentes formas de afrontar los problemas científicos.

Una parte importante de mis agradecimientos va para vosotras, Ana Fátima e Irene. Sois la prueba de que las amistades de verdad sí duran para siempre, sin importar la distancia que nos separe o el tiempo que hayamos pasado sin vernos. Hacéis que volver a Ávila se sienta verdaderamente como volver a casa, porque allí disfrutamos de uno de los mayores placeres del mundo: la típica vuelta por "la Tropa" poniéndonos al día de nuestra vida (y de la de los demás, porque seamos honestos: nos encanta rajar). Gracias también por esas escapadas recarga-pilas en las que cada vez conseguimos desquiciarnos a Irene en menos tiempo. Ojalá sigamos celebrando muchos más logros juntos.

La carrera puso en mi camino gente maravillosa que vino para quedarse. César, da igual León, Barcelona o Salamanca: parece que la vida nos quiere cerca. Gracias por ser el mejor compañero de aventuras, de música, de memes y de rutas turísticas por Nottingham en las que el guía acabo siendo yo. Estoy seguro de que aún nos quedan mil temporadas de Biotec RSA por compartir. Ah, y Lupita no tenía ni idea, yo te

prefiero a ti. Mi pequeña Sara, cuando adivinamos el cumpleaños del otro sin ninguna pista el mismo día que nos conocimos, supimos que nuestro vínculo iba para largo, y así ha sido. Gracias por ser la mejor anfitriona bilbaína, por las llamadas telefónicas que duran horas y convalidan consultas de psicólogo y por ver en mi cosas que ni yo soy capaz de observar. Gracias a mi PringAna Muñiz, aunque al final resultó que de pringada tenías poco: ser la primera doctora de la promoción es algo reservado para la mente más brillante. Contigo descubrí cada rincón de Liverpool y entendí que me faltaban unas clases de inglés, ojalá no olvides tú el castellano y te pueda tener mucho más cerca lo antes posible. Gracias a mis PWGs Elisa y María, no sabéis la falta que me han hecho durante esta etapa nuestras tardes de sofá viendo telebasura, cantando canciones en idiomas inventados y las cenas de San Valentín comiendo pizza congelada con forma de corazón. Gracias también a Elena, porque juntos hemos aprendido que el aprecio mutuo puede con todo y que lo que el CIC te quita... el CIC te lo devuelve.

Quiero agradecer también a mis compañeros del máster, porque ellos son en parte culpables de que me atreviera a embarcarme en esta aventura (imposible olvidar esas noches de Fallas que cambiarían mi vida para siempre). En especial a ti, Irene, porque eres uno de los seres más puros y reales que he podido conocer. Contigo al lado desaparecen los problemas, y eso es algo que pocas personas consiguen. Nos queda mucho planeta por recorrer de la mano, estoy seguro.

Gracias a mi familia, por haber sido un apoyo fundamental durante toda mi vida. En especial a mis abuelos: Fabriciano y Rogelia, con quienes me hubiese gustado poder compartir un logro tan importante como este, y Agripino y Mercedes, mis mayores referentes y los pilares de mi forma de entender la vida.

Gracias a mi hermana, Mercedes, porque durante toda la vida nos hemos protegido, hemos lidiado juntos con todo lo que se nos ha puesto por delante y hemos disfrutado de los éxitos del otro. Espero que estés tan orgullosa de mi como yo lo estoy de ti.

Y, por último, a mis padres: José y Josefa. No puedo evitar sentir los ojos vidriosos cada vez que pienso en la suerte que he tenido. Tanto Mercedes como yo hemos sido vuestro proyecto de vida, y se lo importante que es para vosotros vernos cumplir nuestros objetivos. Porque son más vuestros que nuestros. Gracias por el apoyo incondicional, por sacrificar vuestro propio bienestar a cambio del nuestro, por los *tuppers* que me han hecho sentir cada día que comía a vuestro lado, aunque no estuviésemos en la misma mesa, y por todas las lecciones que me habéis transmitido desde pequeñito. Ojalá el día de mañana pueda entregar de vuelta una mínima parte de todo lo que me habéis dado. Aunque quizá os lo diga menos de lo que debería: os quiero muchísimo.



La presente tesis ha sido financiada por:

- Ayudas para la contratación predoctoral de personal investigador, cofinanciadas por el Fondo Social Europeo (EDU/556/2019) de la Junta de Castilla y León (Orden de 29 de Octubre de 2018).

ÍNDICE

RESUMEN	15
ABREVIATURAS	19
INTRODUCCIÓN.....	21
1. Infertilidad humana	23
1.1. Bases genéticas de la infertilidad.....	24
2. Gametogénesis.....	27
2.1. Especificación de las PGCs	27
2.2. Oogénesis	29
2.3. Espermatogénesis.....	31
3. Meiosis	33
3.1. Profase I.....	34
3.1.1. El complejo sinaptonémico.....	35
3.1.2. La recombinación meiótica.....	38
3.2. Transición metafase-anafase.....	41
3.3. Segunda división meiótica	43
4. Organización de la cromatina	43
4.1. Regulación de la cromatina durante el desarrollo temprano.....	44
4.2. La histona específica de oocitos H1FOO	45
OBJETIVOS	49
MATERIALES Y MÉTODOS	53
1. Modelos murinos	55
1.1. Bienestar animal	55
1.2. Generación de ratones modificados genéticamente mediante CRISPR/Cas9	55
1.2.1. Diseño de sgRNAs	55
1.2.2. Obtención de sgRNAs, Cas9 y ssODNs	56
1.2.3. Microinyección del sistema CRISPR/Cas9 en cigotos.....	56
1.2.4. Caracterización de los fundadores y establecimiento final de las líneas.....	57
1.3. Análisis de fertilidad.....	57
2. Técnicas de Biología Molecular	57
2.1. Extracción de DNA genómico	57
2.1.1. Extracción por lisis alcalina	57
2.1.2. Extracción con fenol/cloroformo.....	58

2.2. Genotipado por PCR	58
2.3. Generación de vectores de expresión.....	58
2.3.1. Extracción de RNA.....	58
2.3.2. Transcripción reversa-PCR (RT-PCR)	59
2.3.3. Preparación de insertos y <i>cloning</i> en vectores de expresión	59
2.3.4. Transformación de células competentes.....	60
2.3.5. Extracción de DNA plasmídico de un cultivo bacteriano por lisis alcalina.....	60
2.3.6. Análisis de restricción	60
2.3.7. Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina acoplado a purificación por columna de afinidad	61
2.4. PCR cuantitativa	61
2.5. Análisis de proteínas	62
2.5.1. Extracción de proteínas de testículo de ratón	62
2.5.2. Inmunoprecipitación de proteínas sobrexpresadas	62
2.5.3. <i>Western blot</i>	63
3. Técnicas citológicas	64
3.1. Análisis histopatológico	64
3.2. Esparcido de espermatozoides (<i>spreading</i>)	64
3.3. Aplastado de túbulos seminíferos (<i>squashing</i>).....	64
3.4. Esparcido de oocitos (<i>spreading</i>)	65
3.5. Colección de oocitos sin fertilizar en metafase II	65
3.6. Inmunofluorescencia	65
3.7. Adquisición y análisis de imágenes	68
4. Cultivos celulares.....	68
4.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo	68
4.2. Aislamiento de MEFs.....	68
4.3. Transfección de líneas celulares.....	69
4.4. Transducción retroviral de MEFs y generación de iPSCs	69
5. Análisis estadístico	70
6. Anexo metodológico.....	70
6.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes.....	70
6.2. Dicroísmo circular.....	71
6.3. Cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz multiángulo	71
6.4. Cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de rayos X de ángulo pequeño	71
6.5. <i>Yeast two-hybrid</i>	72
RESULTADOS.....	73
1. Caracterización <i>in vivo</i> de la mutación c.613C>T de SYCE1 asociada a POF	75
1.1. Generación del modelo murino mutante <i>Syce1</i> ^{POF/POF}	75

1.2. Los ratones <i>Syce1</i> ^{POF/POF} presentan defectos en el ensamblaje del SC y en la reparación de DSBs .	79
1.3. El producto proteico <i>SYCE1</i> _{POF} interactúa con <i>SIX6OS1</i> , pero no con <i>SYCE3</i>	88
1.4. La mutación c.613C>T no altera el núcleo de la estructura de <i>SYCE1</i>	90
1.5. <i>SYCE1</i> , a través de su core, genera un complejo 1:1 con <i>SIX6OS1</i> _N	91
1.6. <i>SYCE1</i> _{POF} interrumpe un segundo dominio de interacción con <i>SIX6OS1</i>	93
1.7. <i>SIX6OS1</i> _{Δ10-21} retiene la unión a <i>SYCE1</i> en sistemas heterólogos	93
1.8. La delección Δ10-21 de <i>SIX6OS1</i> provoca infertilidad en ratón	94
2. La histona específica de oocitos H1FOO no es esencial para la gametogénesis	101
2.1. Generación del modelo murino mutante <i>H1foo</i> ^{-/-}	101
2.2. Los ratones <i>H1foo</i> ^{-/-} son fértiles	105
2.3. La ausencia de <i>H1FOO</i> no altera la sinapsis, la generación de DSBs ni la dinámica telomérica ...	106
2.4. La pérdida de <i>H1FOO</i> no altera la reprogramación de MEFs	109
DISCUSIÓN	111
1. Caracterización in vivo de la mutación c.613C>T de <i>SYCE1</i> asociada a POF	113
1.1. La variante <i>SYCE1</i> _{POF} causa infertilidad a consecuencia de un ensamblaje incorrecto del SC	113
1.2. <i>SYCE1</i> interactúa con <i>SIX6OS1</i> a través de dos interfaces	116
1.3. La delección Δ10-21 de <i>SIX6OS1</i> provoca infertilidad debido a un ensamblaje defectivo del SC ...	119
2. La histona específica de oocitos H1FOO no es esencial para la gametogénesis	121
2.1. La ausencia de <i>H1foo</i> no afecta a la gametogénesis en ratón	121
2.2. Los MEFs <i>H1foo</i> ^{-/-} mantienen intacta su capacidad de reprogramación	123
3. Relevancia del estudio	124
CONCLUSIONES	129
REFERENCIAS	133
PUBLICACIONES	163

RESUMEN



RESUMEN

La gametogénesis es un complejo y dinámico programa de diferenciación celular que, a través de una división reduccional (meiosis), genera células reproductivas haploides o gametos. La extrema complejidad de los mecanismos que regulan esta función dificulta su completo entendimiento desde el punto de vista molecular. En la presente Tesis Doctoral, hemos llevado a cabo un análisis funcional de diversas proteínas que se encuentran implicadas en el control de la gametogénesis: dos constituyentes del elemento central del complejo sinaptonémico (SYCE1 y SIX6OS1) y una histona específica de oocitos (H1FOO).

La meiosis o división reduccional que tiene lugar durante la gametogénesis depende del correcto ensamblaje del complejo sinaptonémico, un andamio proteico que media la sinapsis y la recombinación meiótica entre los cromosomas homólogos. En mamíferos, el complejo sinaptonémico se compone de ocho proteínas diferentes, entre las que se encuentra SYCE1. En la secuencia del gen *SYCE1* se han descrito varias mutaciones causantes de infertilidades humanas, como la mutación c.613C>T en pacientes afectadas por Fallo Ovárico Prematuro (POF, *Premature Ovarian Failure*). Mediante la caracterización del correspondiente modelo murino humanizado, hemos demostrado que la variante SYCE1-c.613C>T provoca una alteración del ensamblaje del complejo sinaptonémico y de la maquinaria de recombinación meiótica. Mediante la combinación de estudios genéticos, celulares y bioquímicos, hemos demostrado que SYCE1 establece dos interfaces de interacción con SIX6OS1. El dominio N-terminal de SIX6OS1 interrumpe la estructura homodimérica de SYCE1 para formar con él un complejo 1:1, mientras que la segunda zona de interacción se dispone entre la región C-terminal de SYCE1 y los residuos 22-262 de SIX6OS1. Cada una de estas regiones se ven alteradas como consecuencia de las distintas mutaciones descritas en la secuencia de *SYCE1* que causan Azoospermia No Obstructiva y POF, respectivamente. Además, hemos abordado también la caracterización funcional de la primera interfaz de interacción entre ambas proteínas, generando un modelo murino que porta una delección de 12 aminoácidos dentro del dominio N-terminal de SIX6OS1. Los ratones mutantes homocigotos resultantes son infértiles a causa de un ensamblaje defectivo del complejo sinaptonémico y la acumulación de roturas de doble hebra en el DNA sin reparar. Por tanto, ambos dominios de interacción entre SYCE1 y SIX6OS1 son esenciales para la correcta sinapsis entre cromosomas homólogos, y su irrupción explica por qué las mutaciones clínicas detectadas en *SYCE1* causan infertilidad en humanos.

Otro proceso estrechamente asociado con la gametogénesis y con el desarrollo embrionario temprano es la remodelación de la estructura de la cromatina. En la regulación de este proceso, las histonas, en especial las pertenecientes a la familia H1, juegan un papel de vital importancia. Dentro de esta familia, H1FOO es una histona con expresión restringida a oocitos y cigotos cuya función *in vivo* no había sido explorada. Para estudiar su función, hemos generado un modelo murino nulo para *H1foo*, demostrando que tanto los machos como las hembras son fértiles. Los ratones mutantes no presentan fenotipo somático y evidencian una correcta progresión meiótica, así como una sinapsis efectiva entre cromosomas homólogos. Pese a la importancia de muchos componentes del oocito para la adecuada ejecución del programa de reprogramación, la deficiencia de H1FOO no perjudica la capacidad de reprogramación de MEFs a iPSCs. En conclusión, en este trabajo presentamos la primera evidencia *in vivo* de la dispensabilidad de H1FOO para la fertilidad y la reprogramación en mamíferos.

ABREVIATURAS

AEs: <i>Axial Elements</i>	H1FOO: <i>H1 histone family, member O, oocyte-specific</i>
AMH: <i>Anti-Müllerian Hormone</i>	HEK: <i>Human Embryonic Kidney</i>
AP: <i>Alkaline Phosphatase</i>	HRP: <i>Horseradish peroxidase</i>
ATM: <i>Ataxia-Telangiectasia Mutated</i>	ICSI: <i>Intracytoplasmic Sperm Injection</i>
a.u.: <i>Arbitrary Units</i>	IgGs: <i>Inmunoglobulinas G</i>
BMP: <i>Bone Morphogenetic Proteins</i>	IF: <i>Inmunofluorescencia</i>
bp: <i>Base pair</i>	IP: <i>Inmunoprecipitación</i>
BSA: <i>Bovine Serum Albumin</i>	iPSCs: <i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>
BTB: <i>Blood-Testis Barrier</i>	IPTG: <i>Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido</i>
CD: <i>Circular Dichroism</i>	KI: <i>Knock-in</i>
cDNA: <i>DNA complementario</i>	KO: <i>Knockout</i>
CE: <i>Central Element</i>	LEs: <i>Lateral Elements</i>
CNVs: <i>Copy Number Variations</i>	LH: <i>Luteinizing Hormone</i>
CO: <i>Crossover</i>	MBP: <i>Maltose-Binding Protein</i>
CORFs: <i>Candidate Oocyte Reprogramming Factors</i>	MEFs: <i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i>
CRISPR: <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>	MRE: <i>Mean Residue Ellipticity</i>
crRNA: <i>CRISPR RNA</i>	mRNA: <i>RNA mensajero</i>
Ct: <i>Cycle threshold</i>	MSCI: <i>Meiotic Sex Chromosome Inactivation</i>
DAPI: <i>4',6 -diamidino-2-phenylindole</i>	NCO: <i>Non-crossover</i>
dHJ: <i>double Holliday Junctions</i>	NHEJ: <i>Non-Homologous End Joining</i>
DMEM: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	NMD: <i>Nonsense-Mediated mRNA Decay</i>
DMSO: <i>Dimetilsulfóxido</i>	NOA: <i>Non-Obstructive Azoospermia</i>
DNA: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>	n.s.: <i>No significativo</i>
dNTPs: <i>Desoxinucleótidos trifosfato</i>	OA: <i>Obstructive Azoospermia</i>
dpc: <i>Días post-coitum</i>	ORF: <i>Open Reading Frame</i>
dpp: <i>Días post-partum</i>	PAM: <i>Protospacer Adjacent Motif</i>
DSBs: <i>Double Strand Breaks</i>	PAR: <i>Pseudoautosomal Region</i>
DTT: <i>Ditiotreitol</i>	PCOS: <i>Polycystic Ovary Syndrome</i>
EJC: <i>Exon Junction Complex</i>	PCR: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
FBS: <i>Fetal Bovine Serum</i>	PFA: <i>Paraformaldehído</i>
FITC: <i>Fluorescein isothiocyanate</i>	PGCs: <i>Primordial Germ Cells</i>
FSH: <i>Follicle-Stimulating Hormone</i>	POF: <i>Premature Ovarian Failure</i>
GFP: <i>Green Fluorescent Protein</i>	POI: <i>Primary Ovarian Insufficiency</i>
GV: <i>Germinal Vesicle</i>	PSG: <i>Penicillin-Streptomycin-Glutamine</i>
	Rg: <i>Radio de giro</i>
	RNs: <i>Recombination Nodules</i>

RNA: *Ribonucleic Acid*

rpm: *Revoluciones por minuto*

RT: *Room Temperature*

SAC: *Spindle Assembly Checkpoint*

SC: *Synaptonemal Complex*

SCNT: *Somatic Cell Nuclear Transfer*

scRNA-seq: *single-cell RNA sequencing*

SDSA: *Synthesis-Dependent Strand Annealing*

SEC-MALS: *Size Exclusion Chromatography with Multiangle Light Scattering*

SEC-SAXS: *Size Exclusion Chromatography with Small-Angle X-Ray Scattering*

sgRNA: *single guide RNA*

siRNA: *small interfering RNA*

SNBs: *Nuclear Basic Proteins*

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

SRY: *Sex-determining region Y*

SSCs: *Spermatogonial Stem Cells*

ssDNA: *single-stranded DNA*

ssODN: *single-stranded Oligodeoxynucleotide*

TEV: *Tobacco Etch Virus*

TFs: *Transversal Filaments*

Tm: *Temperatura de melting*

TPs: *Transition Proteins*

tracrRNA: *trans-activating crRNA*

TRITC: *Rodamina*

UPR: *Unfolded Protein Response*

WB: *Western blot*

WT: *Wild-Type*

Y2H: *Yeast two-hybrid*

INTRODUCCIÓN



1. Infertilidad humana

La **reproducción** es una compleja función biológica que depende de la acción coordinada de los sistemas reproductores masculino y femenino. Se estima que esta función se ve comprometida en hasta una de cada siete parejas, por lo que cerca de **200 millones de individuos** en todo el planeta pueden llegar a verse afectados (Boivin et al., 2007; vander Borght & Wyns, 2018). La Organización Mundial de la Salud y el Comité Internacional para la Monitorización de Técnicas de Reproductivas Avanzadas definen la infertilidad como una enfermedad del sistema reproductivo masculino o femenino consistente en la imposibilidad de conseguir un embarazo después de 12 meses o más de relaciones sexuales regulares sin protección (Zegers-Hochschild et al., 2017). La **infertilidad**, considerada actualmente como un importante problema de salud pública, puede ser clasificada como primaria o secundaria. Los individuos que presentan infertilidad primaria son aquellos que nunca han conseguido llevar a cabo un embarazo, mientras que los afectados por infertilidad secundaria son los que, habiendo conseguido previamente al menos un embarazo, no logran uno nuevo.

La infertilidad puede ser debida a factores masculinos, femeninos, una combinación de ambos o puede ser idiopática (de causa desconocida). Entre los **factores** que pueden afectar a la fertilidad en **ambos sexos**, se encuentran **desórdenes hormonales** como el hipogonadismo hipogonadotrópico (por el cual los órganos sexuales son incapaces de producir hormonas sexuales) o la hiperprolactinemia (trastorno caracterizado por el exceso de prolactina en sangre) (Hart, 2016). También se han descrito en ambos sexos **desórdenes** en la **función ciliar** (Inaba & Mizuno, 2016; Lyons et al., 2006). Por último, la presencia de infecciones, enfermedades sistémicas (diabetes, síndrome metabólico, enfermedades autoinmunes) y factores relacionados con el estilo de vida (como el tabaquismo o la dieta) también pueden afectar la fertilidad humana, independientemente del sexo del individuo afectado.

La **infertilidad** debida exclusivamente a factores **femeninos** puede ser clasificada, de acuerdo con su causa etiológica, en los siguientes grupos (Aflatoonian et al., 2011):

- **Disfunciones ovulatorias**, que suponen un cese de la ovulación (amenorrea) como consecuencia de desórdenes del eje hipotálamo-hipofisario, de una disfunción tiroidea, de hiperprolactinemia o de desórdenes ováricos. El **Fallo Ovárico Prematuro** (POF, *Premature Ovarian Failure*), también conocido como Insuficiencia Ovárica Primaria (POI, *Primary Ovarian Insufficiency*), es uno de los desórdenes ováricos más prevalentes en mujeres. Esta disfunción, que afecta al 1% de las mujeres menores de 40 años, se caracteriza por un cese de los ciclos menstruales durante al menos cuatro meses. Además, las pacientes presentan altos niveles de hormona foliculoestimulante (FSH, *Follicle-Stimulating Hormone*) en sangre. Estos valores son superiores a 40 UI/L y se alcanzan de manera fisiológica durante la menopausia (Pastore et al., 2018). Las causas subyacentes al POF pueden ser genéticas, ambientales, infecciosas, metabólicas, asociadas a condiciones autoinmunes o idiopáticas. Pese al agotamiento prematuro de la reserva folicular, en torno a un 5-10% de las mujeres afectadas por POF con un diagnóstico precoz pueden llegar a concebir con ayuda de técnicas de reproducción asistida (Nelson, 2009). Otro de los desórdenes ováricos más destacados es el Síndrome de Ovario Poliquístico (PCOS), caracterizado por una ovulación infrecuente o ausente en asociación con hiperandrogenismo y morfología ovárica aberrante (Fauser, 2004).

- **Alteraciones en las trompas de Falopio**, como son las obstrucciones tubáricas, infecciones o anomalías congénitas que dificultan el proceso de implantación del embrión.

- **Anomalías uterinas** entre las que destacan las malformaciones congénitas, los miomas y los pólipos uterinos.

A su vez, los casos de **infertilidad masculina** pueden ser clasificados en tres grandes grupos atendiendo a su etiología:

- **Insuficiencias testiculares**, que suponen una incapacidad (congénita, adquirida o idiopática) para producir un número adecuado de espermatozoides. Mientras que la **oligospermia** implica una reducción parcial en la concentración de espermatozoides, la afección más extrema es la **azoospermia no obstructiva** (NOA, *Non-Obstructive Azoospermia*), que se define como la ausencia total de espermatozoides en el eyaculado.

- **Obstrucción del aparato reproductor** que impide una correcta liberación del semen, lo que se conoce como **azoospermia obstructiva** (OA, *Obstructive Azoospermia*).

- Por último, en el tercer grupo se engloban todas aquellas **deficiencias en la función o en la calidad del espermatozoide** (Jungwirth et al., 2012). Entre ellas, se han descrito diversas alteraciones como son la **astenozoospermia** (descrita como una disminución de su velocidad) y la **teratozoospermia** (que supone un incremento en el porcentaje de espermatozoides con morfología aberrante).

Las implicaciones sociales y emocionales derivadas de las diferentes condiciones de infertilidad suponen un grave perjuicio para el bienestar de los individuos, especialmente en regiones que presentan una latente desigualdad por razón de género o un excesivo control sobre la natalidad. Por ello, la contribución al estudio de las bases genéticas que regulan dicha función que se lleva a cabo en la presente Tesis Doctoral es de vital interés para nuestro avance como especie y sociedad.

1.1. Bases genéticas de la infertilidad

Hasta el **50%** de los casos de **infertilidad** descritos en el anterior apartado son debidos a una **causa genética** directa que afecta principalmente a la homeostasis hormonal o al correcto desarrollo de la formación de gametos (Zorrilla & Yatsenko, 2013). Por ello, entender las bases genéticas de la infertilidad es esencial para tratar adecuadamente a una pareja estéril, especialmente para evaluar con criterio objetivo la técnica de reproducción asistida que mejor se puede ajustar en cada caso. Esto ha provocado que, durante las últimas décadas, los esfuerzos de la comunidad científica se hayan enfocado en descifrar el panel de genes que regulan la fertilidad, principalmente mediante la generación de modelos animales modificados genéticamente que permitan condicionar la dirección a seguir en el campo de la Genética Reproductiva (Schimenti & Handel, 2018).

Para abordar las distintas condiciones de **infertilidad femenina**, es necesario conocer en detalle la dinámica de maduración y liberación de oocitos que definen la vida reproductiva de las mujeres. Pese a que la esperanza de vida se ha visto significativamente incrementada en el transcurso del último siglo, la edad a la que las mujeres alcanzan la menopausia se ha mantenido relativamente estable durante este tiempo. De este modo, recientemente se han identificado cerca de 300 variaciones génicas que influyen en la duración de su vida fértil, lo que podría ayudar a predecir qué mujeres podrían llegar sufrir menopausia prematura (Ruth et al., 2021). Entre estos genes, destacan los codificantes para las quinasas CHK1 y CHK2, implicadas en respuesta al daño al DNA.

En mamíferos, se han relacionado con la patogénesis del POF más de 100 genes cuyas **mutaciones puntuales** son especialmente frecuentes en presentaciones no sindrómicas de la enfermedad (França & Mendonca, 2022). Estos **genes** se encuentran implicados en **diversas vías** y procesos celulares, entre los que destacan:

- **Desarrollo ovárico.** Multitud de genes expresados tanto en las células germinales femeninas como en las células somáticas de soporte desempeñan un papel crítico en desórdenes reproductivos. Destacan las variantes encontradas en pacientes infértiles en genes como los factores de transcripción *NOBOX*, *FOXL2*, *NR5A1*, *FOXO3* o *FIGLA* (Lourenço et al., 2009; Qin et al., 2007; Uda et al., 2004; B. Wang et al., 2010; H. Zhao et al., 2008). También se han descrito mutaciones en genes de la familia de las proteínas de la zona pelúcida del oocito, la cual funciona como barrera estructural para los espermatozoides en el momento de la fertilización (Z. Zhou et al., 2019).

- **Meiosis y reparación del DNA.** Mediante secuenciación del exoma completo, se han relacionado con la patogénesis del POF variantes en diversos genes como *BRCA2* (*Breast Cancer gene 2*), *FANCM* (*Fanconi Anemia, Complementation group M*), la helicasa *HELQ*, las recombinasas *DMC1* y *RAD51B* o la subunidad del complejo de cohesinas *STAG3* (Caburet et al., 2021; Franca et al., 2022; He et al., 2018; Jaillard et al., 2020; Llano et al., 2014). También se han identificado mutaciones en genes implicados en la sinapsis de los cromosomas homólogos establecida al inicio de la meiosis, como son *SIX6OS1* y *SYCE1* (L. De Vries et al., 2014; Fan et al., 2021).

- **Rutas metabólicas,** como las reguladoras de la función mitocondrial, la homeostasis del sistema inmune, o las que controlan las modificaciones postranscripcionales y postraduccionales. Dentro de este grupo, encontramos variantes patogénicas en genes como *EIF4ENIF1* (codificante para una proteína encargada de la importación nuclear del factor de iniciación de traducción eIF4E), *KHDRBS1* (que codifica una proteína de unión al RNA), el gen de la proteína ribosomal MRPS22 y el que codifica una subunidad de la RNA polimerasa II *POLR2C* (Carlosama et al., 2018; Chen et al., 2018; Kasipillai et al., 2013; Moriwaki et al., 2017). Estas mutaciones puntuales descritas en dichos genes (que no están directamente implicados en gametogénesis) pueden desencadenar casos de POF.

- **Señalización hormonal.** Diversos genes como los codificantes para los receptores FSHR y LHCGR de las hormonas gonadotrópicas FSH y la Hormona Luteinizante (LH, *Luteinizing Hormone*), respectivamente, están involucrados en la ovulación al regular la producción de estrógenos y la maduración del folículo ovárico. Las mutaciones en estos genes pueden desencadenar fallo ovárico y ausencia de ovulación (Arnhold et al., 2009; Doherty et al., 2002). Recientemente se ha descrito que la ausencia gen *FMR1* (*Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1*), cuyas mutaciones son una de las principales alteraciones monogénicas causantes de discapacidad intelectual, provoca también infertilidad como consecuencia de una desregulación del eje hipotálamo-hipofisario (Villa et al., 2023).

Esta compleja heterogeneidad genética a la que contribuyen no solo genes meióticos, sino también otros que no ejercen su función principal durante la gametogénesis, ha complicado el estudio en profundidad de esta condición. Por ello, actualmente se desconoce la causa genética subyacente para la mayoría de pacientes con POF.

Las **alteraciones cromosómicas** (incluyendo cambios estructurales diversos tales como las deleciones, duplicaciones o translocaciones) constituyen también una importante causa de infertilidad, especialmente en mujeres que cursan con POF sindrómico. En lo relativo a estas

alteraciones cromosómicas, el POF es una de las manifestaciones más frecuentes en pacientes con síndrome de Turner, caracterizado por la pérdida completa o parcial de un cromosoma X (Gravholt et al., 2019).

De manera similar, la **infertilidad masculina** tiene un importante componente genético. En los últimos años, se han detectado en pacientes infértiles mutaciones en genes implicados en un amplio rango de procesos celulares. Estos genes pueden ser clasificados dentro de los siguientes grupos:

- **Meiosis y reparación del DNA:** Al igual que ocurre en la patogénesis del POF en mujeres, diversas mutaciones en multitud de genes meióticos provocan infertilidad también en hombres. Entre estos genes se encuentra el codificante para la proteína TEX11, necesaria para el procesamiento de los intermediarios de recombinación meióticos, y en cuya secuencia se han identificado mutaciones en varios pacientes afectados por NOA (Sudhakar et al., 2021). También se han descrito mutaciones en el gen de la Aurora Quinasa C (*AURKC*) (Hamza et al., 2020) y en otros genes como *SYCE1*, *STAG3* y *FANCM* (Maor-Sagie et al., 2015; Van Der Bijl et al., 2019; Yin et al., 2019), los cuales están también implicados en infertilidad femenina.

- **Señalización hormonal:** Destaca el receptor de andrógenos, necesario para la progresión meiótica de los espermatozoides (Larose et al., 2020). En su secuencia se han encontrado multitud de mutaciones que provocan infertilidad en humano a consecuencia de una insensibilidad a los andrógenos (Ferlin et al., 2006).

- **Estructuración del flagelo de los espermatozoides:** Las mutaciones en la dineína *DNAH1* que forma parte del flagelo de los espermatozoides provoca alteraciones morfológicas en dichas estructuras que conducen a infertilidad masculina (Ben Khelifa et al., 2014).

- **Genes pleiotrópicos** cuyas mutaciones tienen múltiples efectos fenotípicos, siendo la infertilidad uno de ellos. En este grupo destaca el gen responsable de la fibrosis quística *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), localizado en el cromosoma 7. La fibrosis quística es una enfermedad muy prevalente en la población europea que sigue un patrón de herencia autosómico recesivo. Pese a que la principal manifestación clínica de la enfermedad es la acumulación de mucosidad en las vías aéreas, presenta otras comorbilidades frecuentes asociadas a la disfunción epitelial como son alteraciones en la función pancreática, cirrosis biliar, fallos en las glándulas sudoríparas e infertilidad (Ahmad et al., 2013; Elborn, 2016). De este modo, el gen *CFTR* se encuentra mutado en hasta el 90% de pacientes con ausencia bilateral congénita de conductos deferentes (Georgiou et al., 2006). Otros genes pleiotrópicos cuyas mutaciones pueden dar lugar a infertilidad en hombre son los codificantes para diversos factores de transcripción (como *HSF2*, *SOHLH1* y *NR5A1*), proteínas de unión a RNA (*NANOS1*), glicosiltransferasas (*GALNTL5*) o GTPasas (*SEPT12*) (Bashamboo et al., 2010; Choi et al., 2010; Kuo et al., 2012; Kusz-Zamelczyk et al., 2013; Mou et al., 2013; Takasaki et al., 2014).

Aparte de las mutaciones genéticas, las **alteraciones cromosómicas** son una de las principales causas genéticas de infertilidad masculina, suponiendo estas en torno al 6% del total de los casos (Zorrilla & Yatsenko, 2013). De entre ellas, la más frecuente es el síndrome de Klinefelter (cariotipo 47, XXY). Los afectados presentan hipogonadismo hipergonadotrópico, evidenciado por unos valores generalmente bajos de testosterona, altos niveles de FSH y LH y niveles indetectables de inhibina B en sangre. La prevalencia es cercana a 1 de cada 1000 individuos y supone un bloqueo de la espermatogénesis en estadio de espermatozoides primario (Hawksworth et al., 2018; Vander Borgh & Wyns, 2018). Alguna célula puede superar el bloqueo y generar espermatozoides maduros, lo que convierte a estos pacientes en aptos para

fecundación *in vitro* por microinyección intracitoplasmática (ICSI, *Intracytoplasmic Sperm Injection*) (O'Flynn O'Brien et al., 2010). La otra aberración cromosómica que presenta mayor incidencia es la existencia de microdeleciones en la región AZF del brazo largo del cromosoma Y (Yq). Esta región abarca un gran número de genes necesarios para la espermatogénesis, y se subdivide en los dominios AZFa, AZFb y AZFc. Las microdeleciones que tienen lugar en las regiones AZFa y AZFb se asocian con azoospermia, mientras que las que aparecen en el dominio AZFc (las más comunes) se relacionan más específicamente con oligospermia severa (Asadi et al., 2017).

La información genética contenida en los espermatozoides se encuentra sometida a una compleja dinámica de empaquetamiento para permitir su transmisión al embrión. Esta reestructuración de la cromatina está sujeta a una importante **regulación epigenética**. La “epigenética” engloba todos aquellos cambios heredables que afectan a la expresión génica y la función celular y que no están codificados en la secuencia de DNA. Estos cambios son el resultado de modificaciones químicas y estructurales en la cromatina y otras proteínas que interactúan con el DNA. Las principales modificaciones epigenéticas que ocurren en una célula son la metilación del DNA, la modificación de histonas, la remodelación de la cromatina y la regulación de la actividad de proteínas de unión al DNA. De este modo, los defectos epigenéticos que tienen lugar en la transición histonas-protaminas acontecida en la etapa final de la espermatogénesis pueden también provocar también alteraciones en la función fértil (Bao & Bedford, 2016).

2. Gametogénesis

La **gametogénesis** se define como un complejo y dinámico programa de eventos que, haciendo uso de una división reduccional (meiosis), resulta en la generación de células haploides especializadas denominadas gametos (óvulo y espermatozoide). Finalmente, estos se fusionan dando lugar a un cigoto totipotente destinado a convertirse en un organismo compuesto por células diploides (Larose et al., 2019). Por ello, estudiar en detalle los mecanismos que regulan la formación y especificación de las células germinales es esencial para entender el funcionamiento de la función reproductiva humana, así como los mecanismos de infertilidad y evolutivos .

Los gametos presentan características únicas desde el punto de vista genético, epigenético y morfológico, y derivan de unas células progenitoras denominadas **células germinales primordiales** (PGCs, *Primordial Germ Cells*). Los estudios *in vitro* de diferenciación de PGCs suponen un modelo de interés para el estudio de la gametogénesis. Sin embargo, debido a razones técnicas y éticas, el estudio *in vivo* de la especificación de las PGCs humanas se basa en la extrapolación de los datos obtenidos en ratón (D. L. Kumar & Defalco, 2017). Las PGCs tienen la capacidad de dar lugar tanto a espermatogonias como oogonias (las células germinales indiferenciadas masculinas y femeninas, respectivamente) y pueden ser identificadas gracias a su actividad fosfatasa alcalina (AP, *Alkaline Phosphatase*) durante la gastrulación (MacGregor et al., 1995). Recientemente, a partir de células madre embrionarias de ratón se han generado *in vitro* células similares a las PGCs murinas (PGCs-like). Estas células han sido posteriormente diferenciadas para dar lugar a espermatozoides y oocitos funcionales (Cui et al., 2023; Yao et al., 2022; Q. Zhou et al., 2016).

2.1. Especificación de las PGCs

Las PGCs emergen desde el epiblasto como un clúster de unas 20 células durante la embriogénesis, en torno a 7 días *post-coitum* (dpc) en ratón y 18 dpc en humano. El inicio de su **proliferación** se produce como respuesta a las señales de los morfógenos BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*) que proceden del ectodermo extraembrionario (factores BMP4 y BMP8)

y del endodermo visceral (BMP2) (Coucovanis & Martin, 1999; Dudley et al., 2007) (Figura 1). Posteriormente, las PGCs **migran** hasta alcanzar las crestas genitales (en torno a los 10,5 dpc en ratón y 28 dpc en humano). Este proceso requiere un adecuado balance entre señales de atracción y repulsión mediadas por señalización proteica y lipídica. En el ratón, los principales reguladores de la migración de las PGCs son el factor de transcripción SOX17, la quimiocina SDF1, su receptor CXCR4, el receptor tirosina quinasa KIT y la integrina β 1 (Richardson & Lehmann, 2010). Durante este periodo las PGCs llegan a alcanzar un número cercano a 500 células en la gónada fetal murina y unas 1000 células en la humana. Las PGCs que no llevan a cabo una correcta migración mueren por apoptosis mediada por la proteína pro-apoptótica BAX (Cook et al., 2009).

En este estadio del desarrollo, la gónada permanece morfológica y molecularmente indistinguible entre machos y hembras, hasta el momento en el que las células somáticas de soporte permiten la diferenciación sexual de las mismas hacia el linaje ovárico o testicular. La morfogénesis de los testículos se inicia a 11,5 dpc en ratón y en torno a los 45 dpc en humano. En ese momento, el **factor de determinación sexual SRY** (*Sex-determining region Y*), codificado por el cromosoma Y, comienza a expresarse en el centro de las crestas genitales de los **individuos XY** durante un breve periodo de tiempo: en torno a 2 días en ratón y 10 días en humano (Hacker et al., 1995; Mamsen et al., 2017). Este factor fue identificado a principios de los años 90, cuando se detectaron mutaciones en su secuencia en hembras XY con disgenesia gonadal (Berta et al., 1990). La expresión transitoria de SRY promueve la expresión de SOX9, permitiendo que las células somáticas de soporte se diferencien a células de Sertoli, las cuales proliferan en respuesta al factor de crecimiento FGF9 (Willerton et al., 2004). Esto provoca que se establezcan las condiciones moleculares y estructurales adecuadas para que las PGCs se diferencien a gonocitos o preespermatogonias. Las células de Sertoli comienzan en ese momento a agregarse en torno a clústeres de células germinales formando los cordones testiculares (Combes et al., 2009), rodeados por un intersticio en el que aparecen las células de Leydig. En torno a los 12,5 dpc en ratón y 52 dpc en humano, SOX9 induce la producción de la hormona antimülleriana (AMH, *Anti-Müllerian Hormone*), que desencadena la regresión del conducto de Müller (precursor del útero, oviducto y parte de la vagina) (Gonen et al., 2017; Ming et al., 2022). Al mismo tiempo, la testosterona secretada por las células de Leydig induce el desarrollo del conducto de Wolff (que dará lugar al epidídimo, conducto deferente y vesículas seminales).

En las **gónadas XX**, ante la ausencia de expresión del factor SRY, a 11,5 dpc (en ratón) o 45 dpc (en humano) se inicia la expresión de los ligandos de la vía de señalización Wnt (WNT4 y RSPO1), el factor de transcripción FOXL2 y β -catenina. Este hecho suprime la formación de la vasculatura testicular y da lugar a la generación de una estructura que agrupa las PGCs femeninas y células somáticas de soporte, permitiendo la diferenciación de las PGCs en oogonias (Larose et al., 2019). Esta diferenciación, en contra de lo que se creyó durante mucho tiempo (Adams & McLaren, 2002), y siguiendo una teoría apoyada por la ausencia de un cambio histológico drástico, no es un proceso ejecutado por puro defecto de expresión del factor SRY, sino que está estrictamente regulado desde un punto de vista molecular (Nicol Humphrey H-C Yao & H-C Yao, 2014). Por tanto, se ha propuesto que la determinación sexual del embrión se organiza gracias a un balance constante entre la regulación génica femenina (WNT4, RSPO1, FOXL2, β -catenina) y la masculina (SRY, FGF9, SOX9) (Chassot et al., 2008).

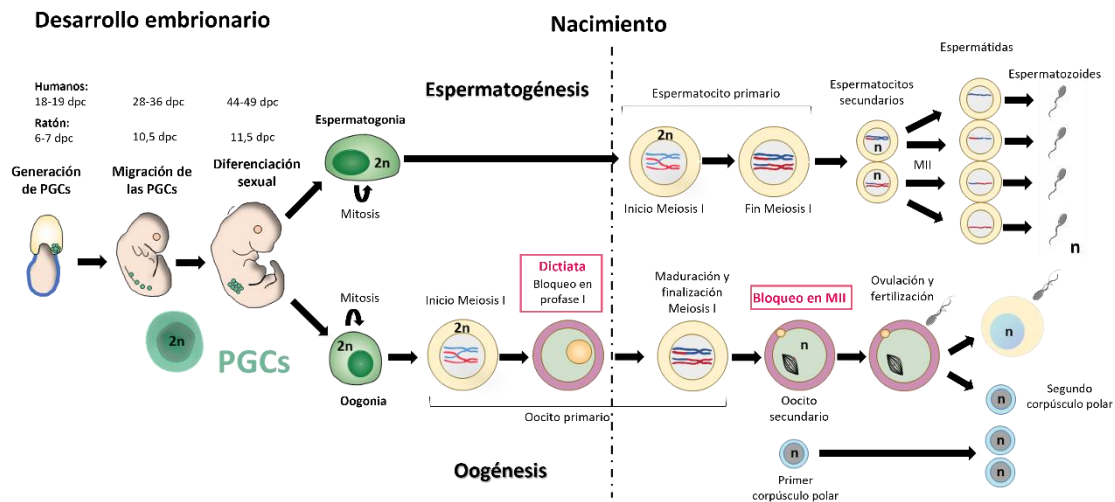


Figura 1. Esquema representativo del dimorfismo sexual existente en la gametogénesis humana y murina, desde la especificación de las PGCs hasta la obtención de los gametos tanto masculinos (parte superior del panel) como femeninos (parte inferior). MII: Metafase II meiótica. Adaptado de (Mcmurray, 2010).

2.2. Oogénesis

Las células germinales, tras su determinación sexual, inician el programa de división meiótica (conocido como oogénesis en hembras y espermatogénesis en machos). La **oogénesis** comienza en la etapa embrionaria y supone la generación de oocitos a partir de oogonias. En la etapa postnatal, este proceso de diferenciación se relaciona temporal y espacialmente con la **folliculogénesis**, un proceso que implica el crecimiento y maduración de unas estructuras anatómicas denominadas “folículos ováricos” que presentan en su interior los oocitos en desarrollo. Antes de que comience la división meiótica (en torno a los 13,5 dpc en ratón y 20 semanas de gestación en humanos) se alcanza en el ovario el número máximo de oogonias (12000 en ratón y 6-7 millones en humanos) tras un periodo de gran actividad mitótica (Kawashima & Kawamura, 2017; Sun et al., 2017). En este momento, comienza una reducción de la población celular que permite la eliminación de los oocitos que portan anomalías cromosómicas o defectos mitocondriales (Krakauer & Mira, 1999). Los oocitos primarios continuarán muriendo incluso después del nacimiento: de los millones de oocitos existentes al nacer, solo unos 400 maduran a lo largo de la vida fértil de una mujer (Huber & Fieder, 2018). El principal regulador de la entrada en meiosis y finalización del programa pluripotente es el **ácido retinoico**, el cual es producido en hembras por las células somáticas del ovario fetal y por el mesonefros. La adquisición de la capacidad de respuesta de las células germinales al ácido retinoico es consecuencia de la expresión previa de la proteína de unión a RNA DAZL (Anderson et al., 2008; Lin et al., 2008). El ácido retinoico induce en ese momento la expresión de *STRA8* (*Stimulated by Retinoic Acid 8*) (Koubova et al., 2006), esencial para el inicio de la meiosis, y de *REC8*, requerido para la progresión meiótica (H. Xu et al., 2005). *STRA8* desencadena, además, la expresión de múltiples genes imprescindibles para los primeros acontecimientos clave de la meiosis (la formación del complejo sinaptonémico y la recombinación, ver secciones 3.1.1. y 3.1.2. de la Introducción) como son *SYCP3* o *DMC1* (Bullejos & Koopman, 2004; Menke et al., 2003).

Al final de la primera profase meiótica, los oocitos permanecen bloqueados en un estado quiescente denominado **dictiata** o **vesícula germinal** (GV, *Germinal Vesicle*). En ese momento, los oocitos se encuentran rodeados por células somáticas de soporte para formar los folículos primordiales (Figura 2), los cuales representan la totalidad de la reserva ovárica disponible para la vida reproductiva femenina (Larose et al., 2019). La regulación del estado quiescente de los

folículos primordiales es ejercida por factores de freno como la hormona AMH (Durlinger et al., 2002). En el mantenimiento de la reserva ovárica intervienen otros también genes como el codificante para el factor de transcripción FOXL2, que además es necesario para el posterior desarrollo de los folículos (Adhikari & Liu, 2009; Uda et al., 2004).

El desarrollo folicular puede ser clasificado en **tres fases** dependiendo de su estado de desarrollo y de su **dependencia** a hormonas **gonadotropinas** (Orisaka et al., 2021).

Durante la **primera fase de la foliculogénesis**, se activan los folículos primordiales en una manera independiente de las gonadotropinas FSH y LH. Esta activación tiene lugar progresivamente desde su formación y durante toda la vida sexual. Durante esta etapa tiene lugar un aumento del tamaño del oocito y del número de células de la granulosa que lo rodean. Esas estructuras pasan a denominarse folículos primarios, y se reconocen por la presencia de una única capa de células de la granulosa con morfología cuboidal dispuesta en torno al oocito primario (Lintern-Moore & Moore, 1979). El mantenimiento de la alta capacidad proliferativa de las células de la granulosa dará lugar a la conformación del folículo secundario, dotado de una capa celular externa adicional denominada “teca” (Figura 2). Las células de la granulosa comienzan en este estadio a expresar receptores para la hormona FSH (requerida durante la siguiente fase de desarrollo).

La **segunda etapa de la foliculogénesis** supone una progresión estructural de los folículos secundarios como respuesta a la hormona FSH. De este modo, las células de la granulosa del folículo secundario en desarrollo liberan un fluido folicular que da lugar a la formación de una estructura denominada “antro” (Figura 2). Este hecho da lugar a una nueva estructura conocida como “folículo terciario” (Orisaka et al., 2021).

La **tercera fase del desarrollo folicular** es, al igual que la segunda, dependiente de gonadotropinas. El número de folículos capaces de progresar en la maduración es dependiente de la especie (siendo aproximadamente uno en cada ciclo en humanos y entre dos y doce en ratón), y el proceso de selección se encuentra regulado por los niveles de FSH circulante. Como respuesta a un incremento en la concentración de esta hormona, un folículo terciario (o varios, según la especie) es seleccionado, convirtiéndose en el folículo dominante o “folículo de Graaf”. Su crecimiento reduce de nuevo los niveles de FSH disponibles, ocasionando la regresión del resto de folículos terciarios (Zelevnik, 2004). Como respuesta a un pico de LH, que encuentra sus receptores en las células de la teca, el oocito contenido en el folículo de Graaf **reinicia la división meiótica**. La terminación asimétrica de la primera división meiótica ocasiona la liberación del primer corpúsculo polar. Esa alta concentración momentánea de hormona LH provoca la **ovulación** del oocito, que queda **bloqueado en metafase II** hasta la fertilización. Es en ese momento cuando se cataliza la finalización de la segunda división meiótica y la liberación del segundo corpúsculo polar (Bolcun-Filas & Handel, 2018). Tras la expulsión del oocito al oviducto, las células de la granulosa y de la teca que quedan en el ovario sufren una importante rediferenciación celular para dar lugar a una nueva estructura glandular: el cuerpo lúteo, que degenerará en cuerpo *albicans* en caso de no producirse la fecundación (Figura 2).

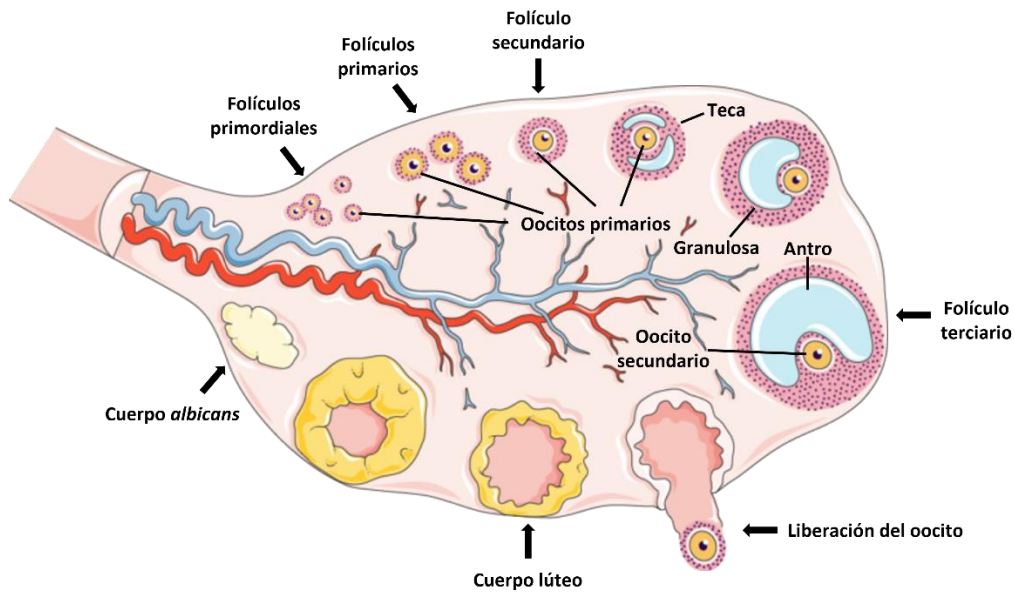


Figura 2. Representación esquemática del proceso de foliculogénesis en el ovario de mamíferos. Figura generada con ayuda de la herramienta *Servier Medical Art*.

Los oocitos maduros son producidos en un número limitado a lo largo de la vida reproductiva de las hembras. La caída drástica en la cantidad y calidad de los oocitos generados en las mujeres a partir de los 30 años de edad se relaciona con un incremento en la tasa de infertilidad y en defectos congénitos del feto.

2.3. Espermatogénesis

La **espermatogénesis** es un complejo proceso celular de diferenciación que comprende la generación de espermatozoides a partir de espermatogonias. Atendiendo a los eventos citológicos que tienen lugar, la espermatogénesis se puede dividir en tres principales etapas: la **proliferación y maduración de las espermatogonias**, la **espermatocitogénesis** y la **espermiogénesis**. A diferencia de la oogénesis, este proceso se lleva a cabo de manera íntegra en la etapa postnatal. En los fetos masculinos, la morfogénesis testicular iniciada en torno a los 11,5 dpc procede a partir de la generación de los cordones testiculares que agrupan los gonocitos en división activa. Dichos gonocitos inician un bloqueo en fase G0 en torno a los 12,5 dpc en ratón y las 9-25 semanas de gestación en humano, manteniéndose quiescentes hasta después del nacimiento (Sharma et al., 2019; Western et al., 2008). Este bloqueo de los gonocitos está mediado por la inhibición de la expresión de STRA8 a consecuencia de la degradación del ácido retinoico llevada a cabo por CYP26B1. Esta proteína de la familia del citocromo P450 es expresada por las células somáticas de los cordones testiculares (Abu-Abed et al., 2002; Bowles et al., 2006). La expresión de CYP26B1 se mantiene hasta los 13,5 dpc en ratón, a partir de entonces, la inhibición de la progresión del ciclo celular es regulada por la proteína de unión a RNA NANOS2 (A. Suzuki & Saga, 2008) A partir de ese momento, NANOS2 no solo actúa como regulador del ciclo, sino que también se encuentra implicado en la expresión de multitud de genes necesarios para la determinación de los caracteres sexuales masculinos (Saba et al., 2014).

Tras el nacimiento, en torno a los 3 días *post-partum* (dpp) en ratón y 10 semanas en humano, los gonocitos que se encontraban poblando la región central de los cordones testiculares reinician la actividad proliferativa bloqueada en la etapa embrionaria y migran a la membrana basal de los túbulos seminíferos. En este momento se desarrollarán también las uniones estrechas entre células de Sertoli, que generan la barrera hematotesticular (BTB, *Blood-*

Testis Barrier) (Nagano & Suzuki, 1976). Durante esta migración, los gonocitos que alcanzan la membrana basal de los túbulos seminíferos darán lugar a una nueva población celular con capacidad de autorenovación denominada **células madre espermatogoniales** (SSCs, *Spermatogonial Stem Cells*). Las SSCs se caracterizan por expresar el factor de transcripción neurogenina 3 (NGN3) y su unidad básica en mamíferos son las espermatogonias de tipo A individualizadas (*A_{single}*, As) (Yoshida et al., 2006). La división de las As por mitosis con citocinesis incompleta da lugar sucesivamente a parejas (*A_{paired}*, Apr) y cadenas de cuatro, ocho y dieciséis células (*A_{aligned}*, Aal) (De Rooij, 2017). Estas agrupaciones celulares dan lugar a espermatogonias de tipo A1 que comienzan a perder capacidad auto-renovadora y que no expresan NGN3 (Yoshida et al., 2004). Dichas células, a su vez, sufren **seis divisiones** sucesivas generando espermatogonias A2, A3, A4, espermatogonias intermedias (In), espermatogonias de tipo B y, finalmente, espermatocitos en estadio de preleptoteno en los que, tras el reinicio del ciclo, tiene lugar una intensa replicación del DNA (Endo et al., 2019; Hogarth & Griswold, 2010). La activación del programa meiótico en este momento es consecuencia de la contribución positiva y sinérgica de multitud de factores (STRA8, su interactor MEIOSIN, DAZL y BMP), así como de la caída en la expresión de NANOS2 acontecida a partir del estadio de espermatogonia de tipo Apr (Ishiguro et al., 2020; H. Suzuki et al., 2009; Q. Zhou et al., 2008).

La **espermatocitogénesis**, entendida como el proceso de transformación de espermatogonias en espermátidas, ocurre entre dos células de Sertoli unidas estrechamente, dentro del epitelio del túbulo seminífero. Las células de Sertoli son el soporte epitelial que regula la espermatogénesis, ya que producen esteroides, nutrientes, moléculas de señalización, e intervienen en la fagocitosis de las células germinales apoptóticas (Jégoua, 1993; O'Donnell et al., 2022; Penberthy et al., 2018). Las espermatogonias se colocan en la zona basal de los túbulos y la espermatocitogénesis progresa concéntricamente hasta la generación de los espermatozoides en el dominio luminal (B. E. Smith & Braun, 2012) (Figura 3). En el tejido intersticial del túbulo seminífero se ubican las células de Leydig, encargadas de la producción de testosterona, esencial para la regulación de la meiosis (Grande et al., 2022). Finalizadas las dos divisiones meióticas, se generan espermátidas redondas, las cuales sufren una serie de cambios morfológicos y citológicos durante la **espermioagénesis**. Desde el punto de vista morfológico, las espermátidas adquieren una cabeza característica, una pieza intermedia y una cola. Citológicamente, sufren una remodelación de la cromatina, desarrollan el acrosoma y pierden casi todo su contenido citoplasmático (Jan et al., 2012). Uno de los cambios más importantes que sufre la estructuración de la cromatina en este punto es el reemplazamiento de las histonas por protaminas. Primeramente, las histonas se someten a modificaciones cruciales para su descarga como son una hiperacetilación y fosforilación, lo que permite la incorporación de las proteínas de transición. Estas proteínas, a continuación, se descargarán para ser reemplazadas por protaminas (Gaucher et al., 2010). Finalmente, millones de espermatozoides son liberados cada día de manera constante durante toda la vida reproductiva de los machos al lumen del túbulo seminífero en un proceso conocido como **espermiación**.

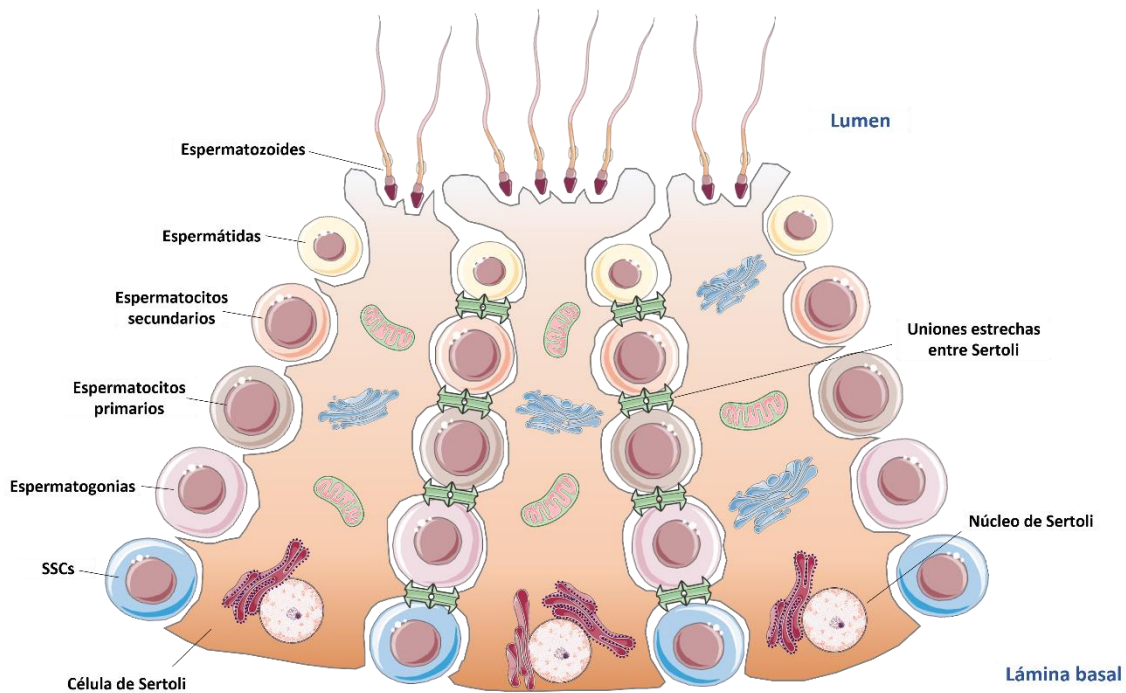


Figura 3. Representación esquemática del epitelio germinal del túbulo seminífero. Figura generada con ayuda de la herramienta *Servier Medical Art*.

La espermatogénesis progresa de una manera regulada estrictamente en el espacio y en el tiempo, lo que se conoce como “**ola de espermatogénesis**”. La duración del ciclo celular completo de diferenciación meiótica es de unos 35 días en ratón y 74 días en humano y se inicia cíclicamente cada 8,6 y 16 días, respectivamente (Komeya et al., 2018). En ratón, la profase meiótica masculina comienza a los 7 dpp. Las primeras espermátidas redondas y alargadas se observan a 17 y 27 dpp, respectivamente y, finalmente, la primera liberación de los espermatozoides a la luz tubular ocurre a los 34 dpp. En humanos, la producción de los primeros espermatozoides funcionales no se alcanza hasta el inicio de la madurez sexual, en torno a los 12 años (Geyer, 2017). La primera ola de espermatogénesis se caracteriza por presentar una menor eficiencia en la generación de espermatozoides, mayor tasa de apoptosis y por ser más rápida que las que tienen lugar en los individuos adultos (Kluin et al., 1982). En función del estadio de los diferentes tipos celulares que se ubican en un área concreto del epitelio seminífero en corte histológico, la espermatogénesis se puede subdividir en diferentes asociaciones celulares denominadas estadios, existiendo un total de 12 diferentes en ratón (Griswold, 2016). En humano, tradicionalmente se ha considerado la existencia de 6 estadios diferentes, pese a que un análisis minucioso del acrosoma ha permitido proponer un total de 12, de manera similar a los establecidos para la espermatogénesis murina (Muciaccia et al., 2013).

3. Meiosis

La **meiosis** es un tipo de división celular especializada característica de los organismos con reproducción sexual que implica la reducción del genoma a la mitad dando lugar a células haploides (n) a partir de células diploides ($2n$). Este mecanismo es la base molecular sobre la que se sustenta la gametogénesis. Para garantizar la reducción de la ploidía, la célula sufre una ronda de replicación del DNA seguida de dos rondas de segregación. Durante la primera división meiótica, se produce la segregación al azar de los cromosomas homólogos paternos y maternos. La segunda división meiótica implica la segregación de las cromátidas hermanas, obteniéndose

así las células haploides altamente especializadas denominadas gametos. Esta división reduccional es imprescindible para que, tras la fertilización, se restaure la ploidía ($2n$) en el cigoto que dará lugar a un nuevo individuo, permitiendo la estabilidad del genoma entre generaciones (Handel & Schimenti, 2010). La segunda división meiótica mantiene multitud de semejanzas con la mitosis. De hecho, se cree que la meiosis evolutivamente deriva de la mitosis, difiriendo de ella en una complejidad adicional asociada al desarrollo de mecanismos propios como son la sinapsis de los cromosomas homólogos, la recombinación entre cromátidas no hermanas, el mantenimiento de la unión entre las cromátidas hermanas durante la primera división y la ausencia de replicación previa a la segunda división (Wilkins & Holliday, 2009).

3.1. Profase I

La **profase** es la primera etapa de la meiosis, y abarca la generación programada de **roturas de doble hebra** (DSBs, *Double Strand Breaks*), su reparación por **recombinación** homóloga y la **sinapsis** de los cromosomas homólogos para formar los bivalentes. Al final de la profase se generan los quiasmas, unas uniones físicas entre cromosomas homólogos que permiten su correcta segregación y evitan la formación de gametos aneuploides.

Para la correcta sinapsis entre cromosomas homólogos, es imprescindible el establecimiento durante la primera profase meiótica de un entramado multiproteico denominado **complejo sinaptonémico** (SC, *Synaptonemal Complex*). El grado de ensamblaje del SC determina los subestadios en los que se divide la profase de la primera división meiótica. En el **leptoteno**, la cromatina se comienza a condensar en torno a los ejes cromosómicos en formación y tiene lugar el inicio de la recombinación con la generación de las DSBs. Estas roturas de doble hebra son imprescindibles para la alineación longitudinal de los cromosomas homólogos, y su futura reparación garantiza la generación de diversidad génica y la correcta segregación de los cromosomas homólogos. Durante el **zigoteno**, los cromosomas homólogos comienzan a sinapsar gracias a la formación de una estructura de tipo cremallera conocida como SC y tiene lugar la reparación de las DSBs. El estado de sinapsis total y finalización del proceso de recombinación ocurre durante el **paquiteno**. Por último, durante el **diploteno**, los cromosomas homólogos desinapsan y se visibilizan los quiasmas, de los cuales depende el correcto posicionamiento y subsecuente segregación de los cromosomas homólogos en la primera división meiótica (Zickler & Kleckner, 1999). El alcance temporal de cada subestadio de la primera profase meiótica en ratón se recoge en la **Tabla 1** (referenciado en días de desarrollo embrionario en lo que respecta a la oogénesis y postnatal en lo relativo a la primera ola de espermatogénesis).

	Preleptoteno	Leptoteno	Zigoteno	Paquiteno	Diploteno
Oogénesis	14,5 dpc	15,0 dpc	15,5 dpc	16,0 dpc	16,5 dpc
Espermatogénesis	7 dpp	8 dpp	10 dpp	13 dpp	18 dpp

Tabla 1. Distribución temporal del comienzo de cada subestadio de la profase I meiótica en oogénesis y en la primera ola de espermatogénesis de ratón (Abby et al., 2016; Ghafari et al., 2007). Los oocitos quedan bloqueados en estadio de dictiata a 18,5 dpc.

La meiosis femenina de los mamíferos se caracteriza por una circunstancia particular: sufre **dos bloqueos** durante la maduración de los oocitos. El primero de ellos, el bloqueo en dictiata, ocurre al final de la profase de la primera división y se prolonga hasta que los oocitos son reclutados para ovular en la etapa postnatal. El segundo bloqueo se alcanza más adelante, cuando el oocito maduro queda parado en estadio de **metafase II** en el momento de la ovulación.

Finalmente, la meiosis femenina será completada exclusivamente como consecuencia de una eventual fertilización.

Durante toda la profase I, las **cromátidas hermanas** se mantienen unidas por la acción del **complejo de cohesinas** específico de meiosis (compuesto por SMC1 β , SMC3, RAD21L, REC8 y STAG3). Las cohesinas meióticas no solo median la cohesión entre las cromátidas hermanas, sino que también son cruciales para otros eventos cromosómicos que tienen lugar durante la meiosis, como el ensamblaje del SC, la reparación de las DSBs y la recombinación meiótica (Ishiguro, 2019).

3.1.1. El complejo sinaptonémico

Este complejo proporciona un marco estructural esencial para el establecimiento de la **sinapsis** entre los cromosomas homólogos, la reparación de las DSBs y el subsecuente desarrollo de los quiasmas. El SC es una macroestructura proteica tripartita con forma de cremallera que consiste en dos **elementos laterales** (LEs, *Lateral Elements*) conectados por los **filamentos transversales** (TFs, *Transversal Filaments*), los cuales permiten el establecimiento del **elemento central** (CE, *Central Element*) del complejo (Page & Hawley, 2004) (Figura 4). Esta estructura fue descrita por primera vez en 1956 (Fawcett, 1956; Moses, 1956) y se encuentra altamente conservada en los organismos con reproducción sexual (Zickler & Kleckner, 1998).

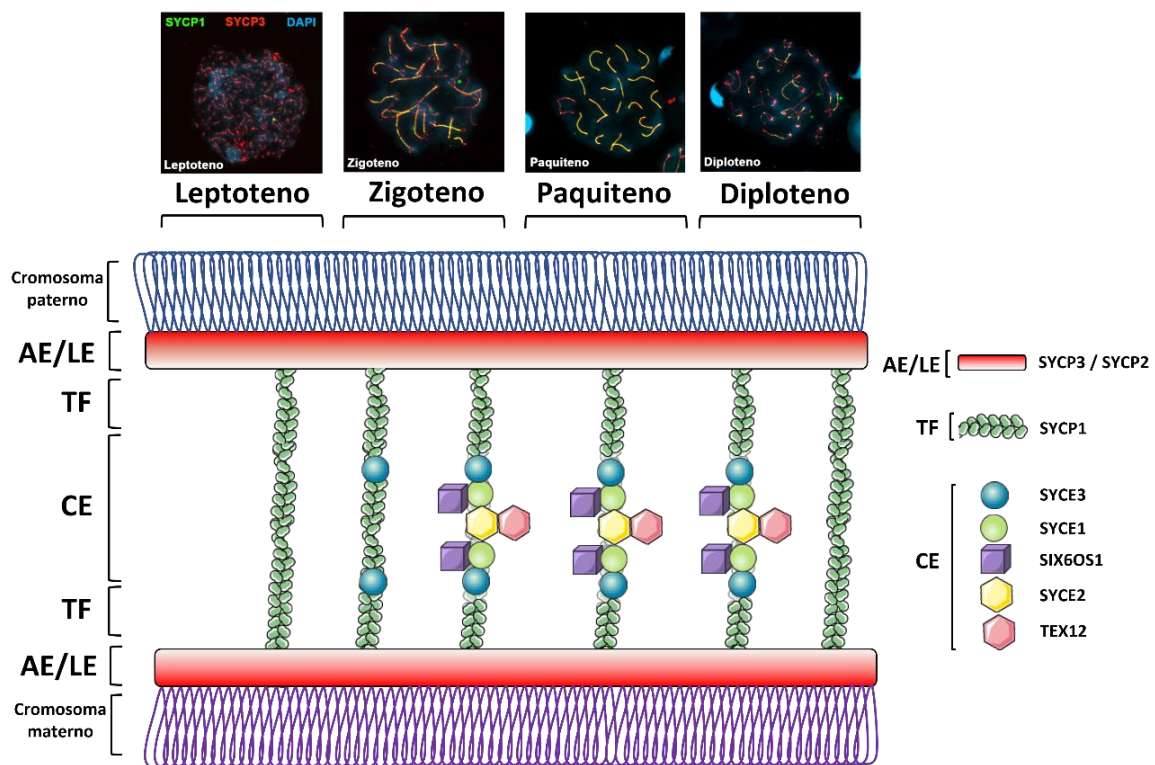


Figura 4. Representación esquemática de la dinámica de la estructura tripartita del SC durante la profase I. Los dos LEs se acoplan a cada uno de los cromosomas homólogos, permitiendo su sinapsis mediante los TFs de SYCP1 y el ensamblado del CE. Figura generada con ayuda de la herramienta *Servier Medical Art*. En la parte superior del panel se muestran imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de esparcidos de espermatocitos de ratón teñidos con SYCP1 (verde), SYCP3 (rojo) y DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, azul) durante los distintos subestadios de la profase I.

Al comienzo de la profase I, en el estadio de **leptoteno**, los cromosomas comienzan a condensarse, organizando su cromatina en lazos que se anclan a los denominados “**elementos axiales**” (AEs, *Axial Elements*). En mamíferos, estas estructuras están compuestas por las proteínas **SYCP3** (Lammers et al., 1994) y **SYCP2** (Offenberg et al., 1998), y su ensamblaje es dependiente de la presencia de las cohesinas específicas de meiosis REC8 y RAD21L (Llano et al., 2012). En este punto, cada cromosoma inicia la búsqueda de su homólogo en un proceso conocido como “emparejamiento”. Para ello, es esencial el paso por el estado transitorio de *bouquet*, en el cual los telómeros de todos los cromosomas quedan anclados en una región muy concreta del dominio nuclear, permitiendo que los cromosomas se concentren en un espacio próximo entre ellos, giren y dejen expuesta la región del elemento axial (Scherthan, 2001). Para la formación de esta estructura, es esencial la asociación de la proteína de la membrana nuclear interna SUN1 con los telómeros de los cromosomas (Ding et al., 2007). Además, durante el leptoteno, las proteínas de la familia **HORMAD** (HORMAD1 y -2 en mamíferos) se asocian a las regiones sin sinapsar de los ejes cromosómicos para promover la búsqueda del homólogo (Roig et al., 2010; Wojtasz et al., 2009). Durante el **zigoteno**, los homólogos empiezan a sinapsar gracias a la interacción de la región N-terminal de los homodímeros de **SYCP1** que componen los **TFs** (Meuwissen et al., 1992) con los cinco componentes del **CE**: **SYCE1/2/3**, **TEX12** y **SIX6OS1** (Costa et al., 2005; Hamer et al., 2006; Schramm et al., 2011; Gómez-H et al., 2016). Los elementos del CE se han podido clasificar en dos grupos diferentes: los considerados como “factores de iniciación sináptica” (SYCE3, SYCE1 y SIX6OS1) y los “factores de elongación” (SYCE2 y TEX12). Estructuralmente, SYCE3 forma dímeros que experimentan un autoensamblaje potencialmente ilimitado y constituye el adaptador molecular entre SYCP1 y el CE en formación (Crichton et al., 2023; Dunne & Davies, 2019a). Por su lado, SYCE1 se organiza formando dímeros antiparalelos (Dunne & Davies, 2019b) y se dispone en asociación con SIX6OS1 (Gómez-H et al., 2016). La interacción entre SYCE1 y SIX6OS1 se ha demostrado por ensayos de doble híbrido (Y2H, *Yeast two-hybrid*) y de coimmunoprecipitación, y consiguientemente ambas proteínas presentan un alto grado de colocalización espacial (Gómez-H et al., 2016). En conjunto, los tres factores de iniciación sináptica podrían actuar como soportes estructurales entre las moléculas de SYCP1 (en todas las orientaciones: transversal, longitudinal y vertical) para estabilizar la red tridimensional que genera (Dunne et al., 2018). En la parte más interna del CE, los factores de elongación sináptica SYCE2 y TEX12 aparecen formando un octámero fibrilar compuesto por 4 subunidades de cada una de las proteínas, proporcionando el soporte estructural para el crecimiento continuo de la red de SYCP1 a lo largo de todo el eje de los cromosomas (Davies et al., 2012). A medida que avanza la sinapsis, la eliminación de las proteínas **HORMAD** de los ejes cromosómicos es llevada a cabo por la ATPasa TRIP13 (Roig et al., 2010). El estado de sinapsis completa tiene lugar finalmente en **paquiteno**, momento en el que los AEs pasan a denominarse LEs. Por último, el SC se desensambla durante el **diploteno** y los cromosomas alcanzan el grado más alto de condensación antes de avanzar a metafase I.

En los espermatoцитos, los **cromosomas sexuales** presentan una dinámica de sinapsis diferente a la de los cromosomas autosómicos. Mientras que los dos cromosomas X de las hembras sinapsan y recombinan a lo largo de la totalidad de sus ejes, en machos, la sinapsis entre los cromosomas X e Y en los espermatoцитos queda restringida a un pequeño dominio denominado “**región pseudoautosómica**” (PAR, *Pseudoautosomal Region*) (Simmler et al., 1985). En esta región se establecen lazos de cromatina inusualmente cortos para alargar el tamaño del eje cromosómico y potencialmente promover la generación de DSBs (Kauppi et al., 2011). La formación de un quiasma en una región de tan reducido tamaño es esencial para la correcta segregación de los cromosomas sexuales. Mediante análisis de expresión de RNA (Monesi, 1965),

se demostró que los cromosomas X e Y están transcripcionalmente silenciados durante la profase I, lo que se conoce como inactivación meiótica de los cromosomas sexuales (MSCI, *Meiotic Sex Chromosome Inactivation*) (J. M. A. Turner, 2015). Esto contrasta con un incremento paulatino de la actividad transcripcional de los cromosomas autosómicos durante el paquiteno, que se recupera tras los niveles de transcripción global excepcionalmente bajos que se alcanzan durante el zigoteno (J. M. A. Turner et al., 2004). Las mutaciones que impiden el correcto MSCI (como ocurre en el mutante nulo de *H2afx*) desencadenan una condición de infertilidad como consecuencia de una apoptosis exacerbada de espermatoцитos en estadio de paquiteno (Fernandez-Capetillo et al., 2003).

Las **mutaciones** en las secuencias codificantes para diversas **proteínas del SC** se han relacionado con varias condiciones de **infertilidad** (F. Zhang et al., 2022). En concreto, los mutantes nulos murinos de las proteínas del LE muestran dimorfismo sexual: mientras que los machos son infértiles, las hembras son subfértiles (Yang et al., 2006; Yuan et al., 2002). Además, se han descrito mutaciones en heterocigosis en *SYCP3* con efecto dominante negativo en la región codificante para su dominio C-terminal en pacientes infértiles (Geisinger & Benavente, 2016). De manera similar, tres mutaciones diferentes en heterocigosis en la secuencia de *SYCP2* están relacionadas con casos de azoospermia en humanos (Schilit et al., 2020). Esto sugiere una estrecha asociación entre las mutaciones del LE del SC y la infertilidad en machos.

Las alteraciones en las secuencias de las proteínas del CE **SIX6OS1** y **SYCE1** también se han relacionado con diferentes fallos en la progresión meiótica que provocan infertilidad. Dada su importancia en el ensamblaje del SC, la ausencia total de **SIX6OS1** en ratón provoca azoospermia y fallo ovárico (Gómez-H et al., 2016). Además, mediante secuenciación del exoma completo en individuos infértiles de diferentes poblaciones, se han identificado tres mutaciones en homocigosis en la secuencia de *SIX6OS1* (Fan et al., 2021). La primera de estas mutaciones se encontró en dos hombres de una misma familia diagnosticados con NOA y una mujer cursando con POF, e implica un cambio de en el marco de lectura de *SIX6OS1* (c.204_205del [p.His68Glnfs*2]). Las otras dos mutaciones se detectaron en dos hombres (sin relación familiar entre ellos) que presentaban bloqueo meiótico: una de ellas es en una mutación sin sentido (c.958G>T [p.Glu320*]) y la otra afecta al patrón de *splicing* (c.1180-3C>G). Aunque todas estas mutaciones generaban una proteína truncada, mantenían la capacidad de unirse a SYCE1. Sin embargo, no eran capaces de formar los *polycomplex* característicos de su interacción *in vitro* (Fan et al., 2021; Gómez-H et al., 2016). Recientemente, se han identificado tres nuevas variantes patogénica en la secuencia de *SIX6OS1*. Una de ellas (c.7G>A[p.Asp3Asn]), detectada en homocigosis en dos pacientes diagnosticados de NOA, ha sido sometida a un estudio *in silico* (Ali et al., 2022). Se ha predicho que esta mutación podría provocar un cambio en la carga de SIX6OS1 al SC que implicaría la pérdida de las interacciones con otras moléculas o residuos esenciales para su actividad. Las otras dos variantes de *SIX6OS1* (c.135_136del [p.Lys45Asnfs*5] y c.508C>T [p.Arg170*]) se presentaron en homocigosis en pacientes de NOA y POF, respectivamente (Hou et al., 2022).

De manera similar, los ratones mutantes carentes de **SYCE1** son infértiles como consecuencia de un ensamblaje incompleto del SC y una incapacidad para reparar las DSBs (Bolcun-Filas et al., 2009; Costa et al., 2005). El análisis genético de familias a las que pertenecen miembros que cursan con NOA y POF ha permitido detectar diferentes mutaciones en *SYCE1* que, siguiendo una herencia autosómica recesiva, podrían ser las responsables del bloqueo meiótico observado en los pacientes (L. De Vries et al., 2014; Maor-Sagie et al., 2015; Pashaei et al., 2020). De este modo, la secuenciación del genoma de dos hermanas diagnosticadas con **POF** y sus

familiares evidenció que éstas portaban en homocigosis una mutación sin sentido en la posición nucleotídica 721 de *SYCE1* (c.721C>T, también referida como **c.613C>T**) (L. De Vries et al., 2014). Dicha mutación genera un codón de **STOP prematuro** a la altura de la glutamina 241, lo que daría lugar a una proteína truncada de 240 aminoácidos (en contraste con la forma canónica silvestre, de 351 aminoácidos de longitud). Por otro lado, en dos hombres afectados por **NOA** se detectaron sendas mutaciones en *SYCE1* (**c.197-2A>G** y **c.375-2A>G**) que podrían resultar respectivamente en un producto truncado comprendiendo exclusivamente los primeros 65 aminoácidos y una deleción interna desde el aminoácido 126 al 155 (Maor-Sagie et al., 2015; Pashaei et al., 2020). Durante el último año, se han descrito nuevas mutaciones en la secuencia de *SYCE1*, como variaciones en el número de copias (CNVs, *Copy Number Variations*) en dos pacientes con un diagnóstico de NOA (Y. Huang et al., 2022). Uno de los pacientes presentaba una deleción en homocigosis (seq[GRCh37] del(10)(10q26.3)chr10:g.135340247_135379115del) y el otro, presentaba dos mutaciones en heterocigosis: una deleción (seq[GRCh37] del(10)(10q26.3)chr10:g.135111754_135427143del) y una mutación puntual (c.689_690del [p.Phe230fs]). Esta última variante, en concreto, ha sido detectada en homocigosis en otros dos pacientes afectados por NOA (Feng et al., 2022; Tang et al., 2022). Además, la variante c.689_690del también ha sido identificada en heterocigosis en una mujer afectada por POF, la cual presentaba el cambio c.475G>A [p.Glu159Lys] en el otro alelo de *SYCE1* (Hou et al., 2022). En dicho estudio identifican también la variante de *SYCE1* c.271 + 2T>C [p. Ala66_Leu91delinsVal] en homocigosis en un paciente de NOA. La secuenciación del exoma completo de los pacientes infértiles ha permitido detectar, además, la variante c.373A>G [p.Arg125Gly] e incluso la deleción del marco de lectura completo de *SYCE1* (c.1_1113del [p.1del371aa]) (Ghieh et al., 2022; Krausz et al., 2020).

3.1.2. La recombinación meiótica

La **recombinación** es el mecanismo por el cual se generan uniones físicas entre cromosomas homólogos, permitiendo su segregación aleatoria al final de la primera división meiótica. Esto permite la generación no mutagénica de nuevas combinaciones alélicas y, por tanto, de diversidad genética en una población. La recombinación resulta en la generación de dos tipos de productos finales: *crossovers* (COs) y *non-crossovers* (NCOs) (**Figura 5**). Las diferencias entre ambos radican en las características moleculares implicadas en la resolución de los intermediarios de recombinación, así como en la longitud del fragmento intercambiado. La resolución por CO implica un intercambio recíproco de grandes segmentos de material genético y ocasiona el establecimiento de una unión física entre las cromátidas no hermanas de cada pareja de cromosomas homólogos conocida como quiasma. Esta estructura es esencial para la correcta segregación de los homólogos, así como para evitar la generación de gametos aneuploides. Por otro lado, la resolución por NCO es unidireccional e implica un intercambio de pequeños fragmentos de DNA.

La sinapsis de los cromosomas homólogos y la recombinación meiótica son dos eventos interdependientes que se entrecruzan en el espacio y en el tiempo. Pese a que descifrar esta dinámica molecular es un proceso complejo, se ha descrito que la generación de DSBs (y su subsecuente reparación mediante los mecanismos de recombinación) es anterior temporalmente al inicio de la sinapsis de los cromosomas homólogos. Sin embargo, la sinapsis y el correcto ensamblaje del SC son necesarios para la maduración de los sitios de recombinación en COs (de Vries et al., 2005).

Determinación de *hotspots*

La recombinación meiótica comienza con la generación programada de DSBs. El número de DSBs generados difiere entre especies e incluso entre individuos, pero hay regiones en el genoma (conocidas como *hotspots*) en las que la densidad de DSBs es significativamente mayor. La **localización** de los *hotspots* viene determinada por la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3), ejecutada por la metiltransferasa **PRDM9** (Baudat et al., 2010). En la proximidad de los sitios de unión al DNA de PRDM9, la recombinación se inicia con la localización de **HORMAD1** en los ejes cromosómicos aún sin sinapsar, el cual recluta el **complejo de pre-recombinación** compuesto por **IHO1** (*Interactor of HORMAD 1*), **REC114** y **MEI4** (R. Kumar et al., 2018) (**Figura 5**).

Formación de DSBs

El reclutamiento del complejo de pre-recombinación a los ejes cromosómicos durante el leptoteno permite la generación programada de **DSBs** (entre 200 y 250 por núcleo) por la acción de la transesterasa **SPO11** y del complejo topoisomerasa **TOPOVIBL** (Robert et al., 2016; Romanienko & Camerini-Otero, 2000). En las especies humana y murina, se han descrito dos isoformas de SPO11 (SPO11 α y SPO11 β), siendo la segunda la responsable de introducir la mayoría de las DSBs durante el leptoteno (Bellani et al., 2010). La generación de DSBs está sometida a una estricta regulación numérica, puesto que cualquier reducción en la densidad de las roturas se asocia con un defecto en la capacidad sináptica de los homólogos, desencadenando un bloqueo en profase y, por tanto, infertilidad (Kauppi et al., 2013). Como respuesta a la presencia de DSBs, la quinasa **ATM** (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*) fosforila la histona H2AX en la serina 139 (dando lugar a la forma fosforilada γ -H2AX) (Burma et al., 2001). Esta fosforilación como respuesta al daño al DNA desencadena el mecanismo de reparación de las DSBs (**Figura 5**). Además, H2AX sufre otras modificaciones postraduccionales (como la ubiquitinación de la lisina 119 o la fosforilación de la tirosina 142) que hacen de esta histona uno de los principales reguladores de la respuesta al daño al DNA y de la recombinación meiótica (Xie et al., 2010).

Procesamiento de los extremos

Las roturas generadas son procesadas por la acción de múltiples proteínas de recombinación que se ensamblan formando los **nódulos de recombinación** (RNs, *Recombination Nodules*). Estos nódulos se localizan en el contexto del SC y se detectan como *foci* discretos a lo largo de los ejes. La reparación de las DSBs comienza con la liberación de los complejos de SPO11 gracias a la actividad endonucleasa del **complejo MRN** (MRE11-RAD50-NBS1) (Neale et al., 2005; Qiu & Huang, 2021), el cual es reclutado a los sitios de daño al DNA por la acción de γ -H2AX (Kinner et al., 2008). Esto desencadena una **resección 5' \rightarrow 3'** (ejecutada por **EXO1** y regulada por **ATM**) que genera los **extremos 3'** de DNA de cadena simple (**ssDNA**, *single-stranded DNA*), cuyo tamaño ronda los 1000 pares de bases (bp, *base pairs*) (Yamada et al., 2020). Los extremos generados quedan **protegidos** por el acoplamiento del complejo de unión a ssDNA denominado **RPA**. Este posee una estructura heterotrimérica compuesta por tres subunidades de 70, 30 y 14 kDa, y adicionalmente, evita la formación de estructuras secundarias (Wold, 2003). Las proteínas de unión al ssDNA **MEIOB** y **SPATA22** forman parte de este RN temprano al interactuar colaborativamente con RPA (Y. Xu et al., 2017) (**Figura 5**).

Invasión del cromosoma homólogo

Seguidamente, las **recombinasas DMC1** y **RAD51** (también dotadas de capacidad de unión al ssDNA) **reemplazan a RPA** e inician la invasión de la hebra al cromosoma homólogo (que servirá

como molde para la reparación de la rotura) dando lugar a una estructura conocida como *D-loop* (Bishop, 1994). El posicionamiento de cada una de las recombinasas está minuciosamente regulado: mientras que DMC1 se coloca cerca del sitio de rotura (y se cree que en mamíferos es el verdadero encargado de la invasión del homólogo), RAD51 adquiere una disposición más distal (Hinch et al., 2020). En lo relativo al patrón de expresión, mientras que DMC1 es una recombinasa específica de células meióticas, RAD51 se encarga también de la reparación por recombinación homóloga de las DSBs generadas en células somáticas (Brown & Bishop, 2015; J. Xu et al., 2021). El **reclutamiento de las recombinasas** a los sitios de DSBs está **mediado** por el **complejo BRCA2-HSF2BP-BRME1** (Felipe-Medina et al., 2020; J. Zhang et al., 2019). Dicho reclutamiento es consecuencia de la interacción entre BRCA2 y su cofactor DSS1, el cual, a su vez, se acopla a RPA reduciendo su afinidad por el ssDNA y permitiendo su reemplazo por DMC1 y RAD51 (Takemoto et al., 2020; W. Zhao et al., 2015) (**Figura 5**). Las DSBs meióticas han sido mapeadas a lo largo del genoma tanto en humano como en ratón por secuenciación de los fragmentos ssDNA unidos a DMC1 (Brick et al., 2012; Pratto et al., 2014).

Procesamiento de los intermediarios de recombinación

A medida que progresa la sinapsis entre los cromosomas homólogos durante el zigoteno, las **recombinasas** son **reemplazadas** por los componentes de los **RNs intermedios**. Entre ellos, destacan la helicasa **BLM**, la proteína de expresión en testículo **TEX11** (*Testis Expressed 11*), la proteína de la superfamilia de las ciclinas **CNTD1** (*Cyclin N-Terminal Domain Containing 1*), la E3 SUMO-protein ligasa **RNF212**, la E3 Ubiquitina-ligasa **HEI10** y el complejo de reparación **MutSy** (formado por **MSH4** y **MSH5**). Todas estas proteínas trabajan de manera cooperativa para permitir la resolución efectiva de los productos de recombinación generados (Baudat et al., 2013).

Durante el procesamiento de los RNs intermedios es de especial interés el balance que se establece entre mecanismos de ubiquitinación (mediados por HEI10) y sumoilación (ejecutados por RNF212) en el contexto del SC. Se ha propuesto que ambas proteínas se encargan de regular la renovación de las proteínas de los RNs, estabilizándolos y promoviendo la maduración hacia COs (mediante la acción de RNF212) o desestabilizándolos, favoreciendo la generación de NCOs (por la intervención de HEI10) (Prasada Rao et al., 2017; Qiao et al., 2013).

Resolución

Mecánicamente, la resolución de los intermediarios puede ocurrir mediante la captura del segundo extremo del DSB (aquel que no invadió el homólogo) generando dobles uniones de Holliday (dHJ, *double Holliday Junctions*). Éstas se pueden resolver como CO (por la acción de la exonucleasa EXO1 y las proteínas *mismatch repair* MLH1 y MLH3) o como NCO. Alternativamente, existe una vía de reparación que genera exclusivamente NCOs, e implica un desplazamiento de la hebra invasora (después de sintetizar el DNA necesario a partir del homólogo) para anillar de nuevo con el segundo extremo de ssDNA de su propio homólogo. Este proceso por el que se reparan hasta el 90% de las roturas se conoce como “anillamiento de hebra dependiente de síntesis” (SDSA, *Synthesis-Dependent Strand Annealing*) (**Figura 5**) y es ejecutado por el complejo BTR (BLM-TOP3-RMI1) (Séguéla-Arnaud et al., 2017; Sung & Klein, 2006).

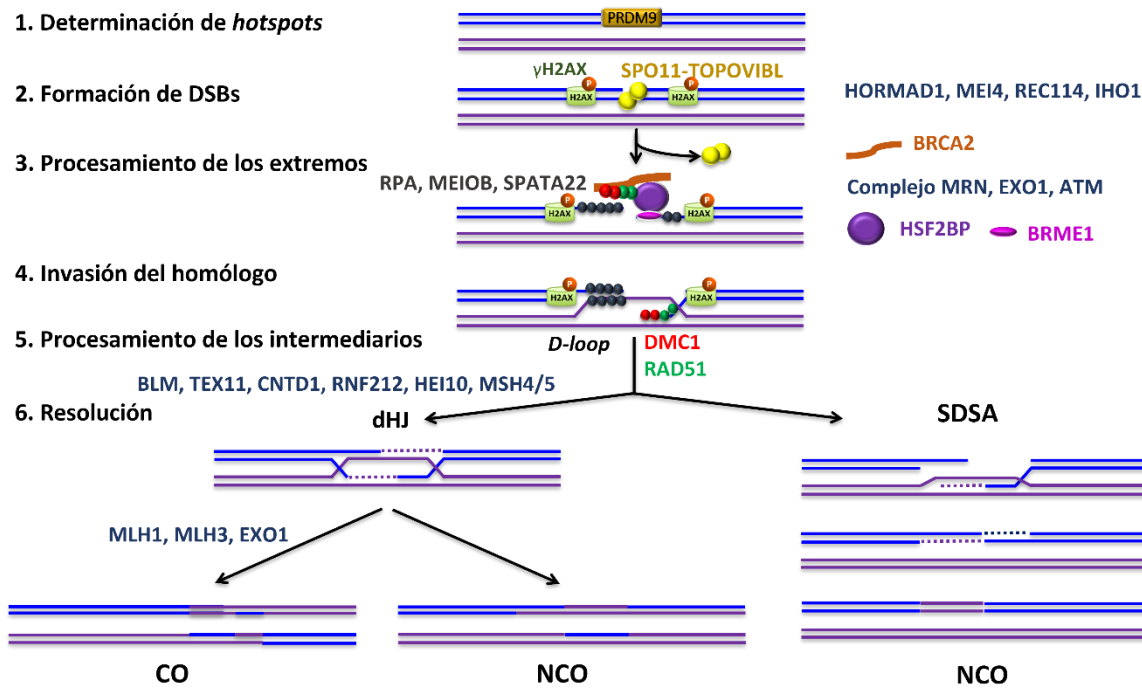


Figura 5. Representación esquemática de las vías de reparación de las DSBs meióticas y procesamiento de los intermediarios de recombinación generados. Las principales proteínas que intervienen en el proceso aparecen indicadas en su momento particular de actuación.

La gran mayoría de las roturas generadas se reparan generando **NCOs**. Sin embargo, al menos un DSB por cada par cromosómico (aproximadamente el 10% de las roturas generadas) madurará formando un **CO** (Lange et al., 2016). La regulación del número de COs generados a lo largo del genoma está controlada por multitud de genes. Entre ellos, destacan diversos genes meióticos (como *PRDM9*, *SIX6OS1* y *RAD21L*) en los que se han detectado polimorfismos de nucleótido único (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*) al secuenciarse el exoma completo de 2261 individuos islandeses (Kong et al., 2013).

La región PAR de los cromosomas sexuales masculinos, al igual que ocurre con la sinapsis, sufre una dinámica de formación y resolución de DSBs diferente a la de los pares autosómicos (Soriano et al., 1987). De manera global, en promedio se forma un DSB cada 10 megabases a lo largo del genoma (Y. Li et al., 2021). Por tanto, si la PAR (cuyo tamaño es de unos 0,7 megabases en ratón) se comportara como un fragmento autosómico, serían frecuentes los fallos en recombinación del X-Y, cuya ausencia de quiasma sería un grave impedimento para la correcta progresión de la meiosis (Perry et al., 2001). Para hacer frente a esta frecuencia de DSBs hasta 20 veces mayor en comparación con la existente en los autosomas, al comienzo de la meiosis, una serie de factores promotores de DSBs (*REC114*, *MEI4*, *MEI1*, *IHO1* y *ANKRD31*) se acumulan en la PAR (Acquaviva et al., 2020). Las DSBs se forman en dicha región del par sexual durante el zigoteno medio-tardío, mostrando un retraso temporal con respecto a las roturas generadas en los autosomas, que alcanzan su pico numérico al principio del zigoteno (Kauppi et al., 2012).

3.2. Transición metafase-anafase

Al final del diploteno, el SC queda completamente desensamblado y los meiocitos transicionan por el estadio de diacinesis para alcanzar la **metafase I** meiótica. Esto implica también la **descarga** de los **elementos axiales** y la posterior **eliminación de las cohesinas** que mantienen unidas las **cromátidas hermanas**, quedando al final de la primera división meiótica solo aquellas localizadas en los centrómeros (Bolcun-Filas & Handel, 2018; Burgoyne et al., 2009). La

salida de la profase meiótica presenta dimorfismo sexual en mamíferos. Mientras que la superación del bloqueo en dictiata de los oocitos quedó descrito en la sección 2.2. de la Introducción, la desinapsis de los espermatocitos es dependiente de diversos factores, como la proteína de choque térmico HSP70-2 o las quinasas Aurora B y C (Dix et al., 1997; Wellard et al., 2020). También interviene en esta transición SKP1, un componente del complejo E3 ubiquitina ligasa SCF (*SKP1-Cullin-F-box*) que permite la descarga de las proteínas HORMAD de los ejes cromosómicos (Guan et al., 2020).

En la primera metafase meiótica, los bivalentes se encuentran alineados en la placa metafásica y los cinetocoros hermanos de cada homólogo orientados hacia el mismo polo, adoptando una configuración sintélica. De este modo, un homólogo de cada pareja es transmitido al azar a cada meiocito secundario. Para salvaguardar este proceso, durante la transición metafase I - anafase I se activa el **punto de control del ensamblaje del huso** (SAC, *Spindle Assembly Checkpoint*), que evalúa la correcta orientación y tensión de los cromosomas (Musacchio & Salmon, 2007). Dado que estas propiedades estructurales son dependientes de la formación previa de quiasmas, la pérdida de proteínas cruciales para su generación (como MLH1 y MLH3) se ha relacionado con la incapacidad para superar el SAC y con un bloqueo en metafase I en ratón. De este modo se garantiza la eliminación de los meiocitos que presenten algún defecto cromosómico (Eaker et al., 2002; Lipkin et al., 2002).

Alcanzada la **anafase I**, se produce la **eliminación** mediada por **Separasa** de las **cohesinas** de los **brazos cromosómicos** por una escisión proteolítica de la subunidad α -kleisina del complejo (REC8 o RAD21L). Las cohesinas centroméricas quedan protegidas por la **shugoshina** (del japonés “espíritu guardián”) SGO2, evitando la separación prematura de las cromátidas hermanas durante la primera división (Llano et al., 2008; Tóth et al., 2000; Watanabe et al., 2005). La ausencia de esta proteína en ratón provoca infertilidad debido a una separación prematura de las cromátidas hermanas durante anafase I, desencadenando la formación de gametos aneuploides (Llano, Gómez, Gutiérrez-Caballero, et al., 2008). El mecanismo de protección ejecutado por las shugoshinas se fundamenta en la formación de un complejo con la fosfatasa PP2A, que defosforila las cohesinas y previene su corte por Separasa durante la primera división meiótica (Z. Xu et al., 2009).

La activación de la proteasa Separasa está temporal y espacialmente regulada a través de un **doble mecanismo inhibitorio** mediado por **Securina** y el complejo **CDK1/Ciclina B1** (Hellmuth et al., 2015; Stemmann et al., 2001). De este modo, cuando los requerimientos del SAC han sido satisfechos, se activa el complejo APC/C (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) con actividad E3 ubiquitina ligasa. Este complejo ubiquitina a los dos inhibidores de Separasa, provocando su degradación por el proteasoma y permitiendo la activación de Separasa (Herbert et al., 2003). En células mitóticas, se ha demostrado que la shugoshina SGO2 puede asociarse con la proteína del SAC MAD2 constituyendo un mecanismo adicional de bloqueo de Separasa en ausencia de Securina (Hellmuth et al., 2020). El complejo de cohesinas, a parte de su función canónica como reguladora de la cohesión de las cromátidas hermanas y separación de los cromosomas homólogos, también está implicado en la reparación de DSBs. De este modo, se ha demostrado que Separasa interviene en la liberación de las cohesinas durante la respuesta al daño al DNA en células somáticas, aunque el posible mantenimiento de esta función en meiocitos aún no ha sido descrito (Hellmuth et al., 2018).

3.3. Segunda división meiótica

Una particularidad de la meiosis es la ausencia de una fase S de replicación de DNA entre las dos divisiones reduccionales. Esto es debido a la activación de la quinasa CDK1 al final de la meiosis I, que bloquea el ensamblaje de los complejos pre-replicativos (Phizicky et al., 2018).

Durante el final de la segunda división meiótica tiene lugar la **separación de las cromátidas hermanas**, para lo cual se requiere la **descarga de las cohesinas centroméricas**. De este modo, se generan **gametos haploides** que portan una copia de cada par de cromátidas. De manera similar a lo que ocurre con los quiasmas entre los cromosomas homólogos durante la metafase I, la cohesión centromérica es ahora requerida para la bi-orientación y tensión entre cromátidas hermanas (configuración anfitélica), satisfaciéndose así los requerimientos del segundo SAC durante la metafase II (Malmanche et al., 2006). La tensión ejercida sobre los centrómeros provoca una redistribución de SGO2 que deja accesibles los complejos de cohesinas centroméricos a la acción de Separasa. De este modo, la segunda ola de activación de Separasa escinde REC8 liberando los complejos de cohesinas ubicadas en los centrómeros y permitiendo la segregación de las cromátidas hermanas (Lee et al., 2003).

La desregulación de todo este complejo entramado de procesos que ocurren durante las divisiones meióticas da lugar al desarrollo de anomalías cromosómicas (como aneuploidías o reordenamientos cromosómicos) que pueden desencadenar finalmente en muerte fetal, anomalías congénitas e infertilidad (Petronczki et al., 2003).

4. Organización de la cromatina

El DNA se encuentra asociado a RNA y proteínas en el núcleo de las células eucariotas dando lugar a una estructura denominada "**cromatina**". La forma más simple de asociación son los **nucleosomas**, unas estructuras caracterizadas por el enrollamiento de fragmentos de unos 147 bp de DNA en torno a un *core* octamérico (de unos 5,5 nm de alto y 11 nm de diámetro) compuesto por una pareja de cada una de las cuatro **histonas** centrales (H2A, H2B, H3 y H4) (**Figura 6**) (Cutter & Hayes, 2015).

En eucariotas se ha descrito una quinta clase de histonas denominada "**H1**". Estas histonas actúan como un *linker* o puente de unión al asociarse a los fragmentos de DNA (de unos 80 bp) que quedan sin enrollar entre dos *cores* contiguos, promoviendo así un nivel superior de organización de la cromatina (Hergeth & Schneider, 2015). La familia de histonas H1s es la más heterogénea que se conoce, pues en mamíferos la constituyen **once variantes** diferentes. **Siete** de ellas son H1s **somáticas** (H1⁰, H1a, H1b, H1c, H1d, H1e y H1x) y **cuatro** específicas de la **línea germinal**: H1t, H1T2 y H1LS1 (expresadas exclusivamente en la línea germinal masculina) y H1FOO, cuya expresión queda restringida al oocito (Fyodorov et al., 2018; Pan & Fan, 2016; Prendergast & Reinberg, 2021). Dado su patrón de expresión, diversos grupos de investigación han estudiado en detalle la **implicación en fertilidad** de las histonas de la familia **H1** específicas de la línea germinal. De este modo, la histona H1t (que decora la cromatina desde el estadio de *mid*-paquiteno hasta el de espermatida alargada) no es esencial para la espermatogénesis en ratón ni para la transición de histonas a protaminas (Drabent et al., 2000). Por otro lado, la histona H1T2 se localiza en el ápice nuclear de las espermatidas redondas y alargadas y es esencial para la espermiogénesis, ya que los mutantes murinos carentes de H1T2 son infértiles como consecuencia de una elongación aberrante de sus espermatidas (H. Tanaka et al., 2005). H1LS1, por su parte, se expresa en el núcleo de espermatidas elongadas y la disrupción de su homólogo (*Mst77F*) en *Drosophila melanogaster* provoca infertilidad debido a una producción de

espermatozoides aberrantes (Jayaramaiah Raja & Renkawitz-Pohl, 2005). Sin embargo, el papel de H1LS1 en la espermatogénesis de mamíferos no se conoce aún en profundidad. De manera similar, el análisis *in vivo* de la implicación de la única histona de la familia H1 con un patrón de expresión restringido al oocito (H1FOO) no había sido llevado a cabo al inicio de esta Tesis Doctoral.

De forma general, las histonas H1 presentan un dominio central globular altamente conservado que se encuentra flanqueado por regiones variables en los extremos tanto N- como C-terminal (Doenecke et al., 1997). Además de su papel estructural, las histonas de la familia H1 participan en la regulación de la expresión génica. Sin embargo, la ya mencionada complejidad de esta familia, así como las modificaciones postraduccionales que sufren sus componentes, dificulta el estudio del rol que desempeñan en la formación de la heterocromatina, la regulación transcripcional y la embriogénesis.

Durante años, diversos estudios **epigenéticos** han tratado de descifrar la compleja dinámica de asociación de las histonas al DNA, así como la multitud de modificaciones que sufren a lo largo del ciclo celular. Los patrones de expresión génica de una célula vienen marcados por una intercomunicación entre el epigenoma, las vías de señalización intracelular y la acción de factores de transcripción. En concreto, los cambios epigenéticos son fundamentales para la regulación de la expresión génica durante el desarrollo embrionario, la diferenciación celular y la respuesta a señales ambientales (O'Neill, 2015; B. M. Turner, 2009; H. Wu & Yi, 2006) t. Por ello, estas modificaciones se han relacionado con el origen y progresión de diversas enfermedades humanas, incluyendo el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y más recientemente, la infertilidad. Además, dichas modificaciones epigenéticas son de especial interés en el estudio de la Genética Humana, dado que posiblemente actúan transgeneracionalmente (Burton & Greer, 2022). En la línea de esta teoría, la edición de los patrones de metilación de las islas CpG (reguladoras de la expresión génica) en células embrionarias murinas ha demostrado provocar alteraciones fenotípicas que se transmiten a lo largo de múltiples generaciones (Y. Takahashi et al., 2023). Por todo ello, desgranar los mecanismos de acción de los elementos que regulan la organización de la cromatina es de vital importancia para poder hacer frente a aquellas enfermedades en las que se ven involucradas.

4.1. Regulación de la cromatina durante el desarrollo temprano

Tras la fertilización, y con el fin de dar lugar a un genoma embrionario totipotente, la cromatina procedente de los núcleos materno y paterno se fusiona. El **DNA del espermia** en mamíferos alcanza al final de la espermiogénesis el **mayor nivel de compactación** descrito en eucariotas. Al contrario de lo que ocurre en las células somáticas, el DNA de los espermatozoides no adquiere la estructura solenoide caracterizada por la organización en nucleosomas (Okada, 2022; Ward & Coffey, 1991). La condensación de la cromatina de este tipo celular genera una **estructura toroidal** como consecuencia de la incorporación de **proteínas nucleares básicas** (SNBs, *Nuclear Basic Proteins*) que incluyen variantes propias de varias subunidades de histonas, proteínas de transición (TPs, *Transition Proteins*) y protaminas (Lewis, Abbott, et al., 2003; Lewis, Song, et al., 2003).

Esta **transición** histonas-protaminas es esencial para la correcta formación de los espermatozoides y ocurre en mamíferos en **dos etapas** (M. Zhao et al., 2004). En primer lugar, en el estadio de espermátidas alargadas, las histonas se remplazan por proteínas de transición TP1 y TP2, que evitan la generación de defectos secundarios en los espermátidas y la pérdida eventual de la integridad genómica (Andrabi, 2007). Finalmente, las TPs son desplazadas permitiendo la carga definitiva de las protaminas en los espermatozoides (Lewis, Song, et al., 2003).

Una vez ocurre la **fertilización**, la cromatina del pronúcleo masculino sufre un complejo proceso de descondensación acoplado a un **reemplazo de las protaminas** propias por las **histonas** centrales **maternas** y la histona *linker* materna **H1FOO**. Se ha hipotetizado que este recambio facilita la reprogramación nuclear durante el desarrollo embrionario temprano (Becker et al., 2005; Gao et al., 2004).

Más allá de la fertilización, durante el **desarrollo temprano**, las **PGCs** de las que derivan los futuros gametos del individuo en crecimiento presentan un alto grado de **dinamismo epigenético**. Tras la fertilización, la dioxigenasa TET3 desmetila el genoma paterno en el oocito fertilizado, por lo que en el momento del establecimiento del epiblasto murino (en torno a los 4 dpc) el DNA de las células de su masa interna se encuentra globalmente desmetilado (F. Guo et al., 2014; Z. D. Smith et al., 2012). Esta hipometilación finaliza a causa de una rápida metilación *de novo* que se prolonga hasta los 5,5 dpc. En torno a los 6,5 dpc en ratón (18 dpc en humano), las PGCs emergen desde el epiblasto, y su genoma sufre dos olas de reprogramación epigenética que implicará un borrado de las marcas de metilación (Larose et al., 2019). La primera de ellas ocurre concretamente a los 8 dpc, pero el borrado de marcas epigenéticas durante esta fase es incompleto (Hargan-Calvopina et al., 2016). Esta desmetilación es consecuencia de la represión de las metiltransferasas DNMT3A y DNMT3B (Kagiyada et al., 2013). La segunda ola de desmetilación del DNA se produce en el momento de la migración y especificación sexual de las PGCs (entre los 10,5 dpc y los 12,5 dpc) y es dependiente de TET1 y TET2 (Vincent et al., 2013). La metilación en machos se reestablece en el estadio de preespermatogonia a 14,5 dpc. Sin embargo, en hembras este hecho no ocurre hasta la etapa postnatal, coincidiendo en el tiempo con el desarrollo folicular (Stewart et al., 2016). De todos modos, los mecanismos moleculares que gobiernan este traspaso de información garantizando la transmisión de la información entre generaciones es aún un enigma biológico que requiere ser estudiado en mayor profundidad.

4.2. La histona específica de oocitos H1FOO

La histona **H1FOO** (*H1 histone family, member O, oocyte-specific*) es el único miembro de la familia que presenta un patrón de expresión restringido a los **oocitos**. En el núcleo celular, H1FOO se dispone en asociación al DNA que conecta cada unidad del nucleosoma confiriendo un mayor grado de compactación (**Figura 6**). Para la correcta asociación de H1FOO a la cromatina del núcleo es esencial tanto su dominio N-terminal, el cual presenta múltiples sitios potenciales de fosforilación, así como su dominio C-terminal, caracterizado por presentar un gran número de aminoácidos ácidos (M. Tanaka et al., 2001). H1FOO se expresa en los oocitos de manera constitutiva durante todo el ciclo celular y es independiente de la replicación del DNA (Izzo et al., 2008). Evolutivamente, H1FOO es el homólogo mamífero de las histonas B4 de *Xenopus laevis* y cs-H1 del erizo de mar (M. Tanaka et al., 2001). Ambas histonas se caracterizan por expresarse de manera exclusiva en los oocitos y embriones en estadio temprano de desarrollo, por presentarse en bajo número de copias y por estar dotadas de intrones (**Hyeseong & Wolffe, 1994; Mandl et al., 1997**). Estas características evidencian las funciones similares conservadas entre dichos homólogos durante la ovogénesis y el desarrollo temprano, así como su origen evolutivo común.

De manera similar a sus homólogos en rana y erizo de mar, la secuencia nucleotídica codificante para H1FOO en mamíferos presenta **5 exones**, al contrario de lo que ocurre con la mayoría de las histonas (que son codificadas por un único exón). H1FOO alcanza altos niveles de expresión no solo en el oocito, sino también durante el comienzo del **desarrollo embrionario** (M. Tanaka et al., 2005). Más concretamente, su expresión se detecta desde oocito en estado de vesícula germinal hasta el embrión en estadio de dos células (M. Tanaka et al., 2003). La expresión

de H1FOO finalmente disminuye hasta alcanzar niveles basales en la transición al estadio de embrión de dos células, siendo entonces esta histona reemplaza por las H1s somáticas para satisfacer los requerimientos del programa transcripcional del embrión. Por último, la ausencia total de H1FOO se alcanza en el estado de blastocisto (Funaya et al., 2018). Este patrón de expresión tan regulado temporal y espacialmente es consecuencia de un complejo programa molecular que incluye la metilación de regiones de DNA localizadas aguas arriba del gen de *H1foo* (Maeda et al., 2008). Además, esta histona podría ejercer alguna función durante la gametogénesis masculina, dado que *H1foo* se transcribe basalmente durante la espermatogénesis, y que las moléculas de H1FOO maternas se ensamblan en el genoma paterno tras la fertilización, **desplazando** de su genoma las **SNBs** propias (de Macedo et al., 2021; Mizusawa et al., 2010).

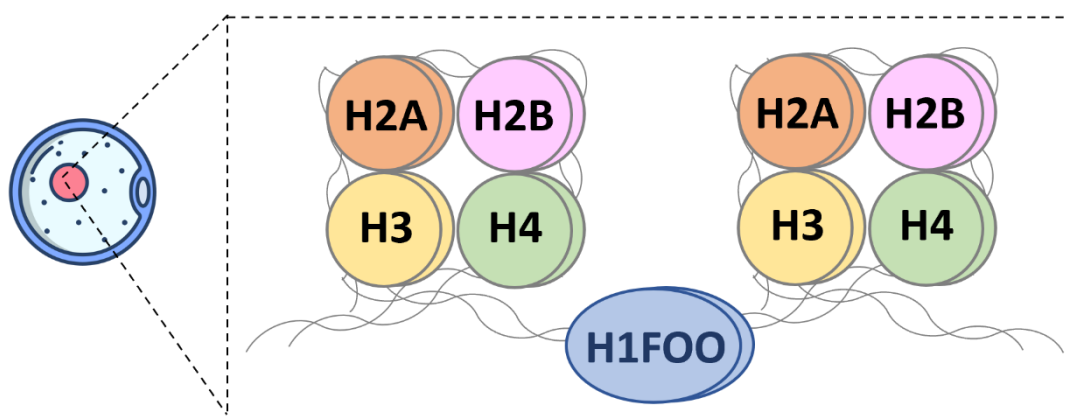


Figura 6. Representación esquemática de la estructura de la fibra de cromatina en oocitos, en la que H1FOO se acopla al DNA internucleosómico que queda libre entre cada octámero de histonas (compuesto por dos unidades de cada una de las histonas centrales H2A, H2B, H3 y H4).

Funcionalmente, H1FOO parece desempeñar un papel en la regulación de la gametogénesis, y en la regulación de la disposición de la fibra de cromatina en los primeros estadios del desarrollo embrionario (Funaya et al., 2018). De este modo, la **inhibición** de la expresión de *H1foo* en ratón mediante oligonucleótidos antisentido morfolino (microinyectados en oocitos murinos en estadio de vesícula germinal) provoca un **fallo** en la **extrusión** del **primer cuerpo polar** y un **bloqueo** en **metafase I *in vitro*** (Furuya et al., 2007). De manera similar, la **maduración** de **oocitos** bovinos *in vitro* también se ve comprometida como consecuencia de la inhibición de H1FOO mediada por siRNAs (*small interfering RNA*) (Yun et al., 2015). Otros estudios han demostrado que el **knockdown** mediante siRNA de H1FOO en embriones murinos en estadio de una célula provoca un estado **menos laxo** de la **cromatina** y un incremento en la deposición de las variantes histónicas H3.1 y H3.2 en la región periférica del pronúcleo (Funaya et al., 2018). Todo ello evidencia que H1FOO podría ser uno de los principales reguladores del característico estado laxo de la cromatina en el embrión en estadio de una célula.

Los oocitos tienen la capacidad de dar lugar a células embrionarias desdiferenciadas pese a ser propiamente células diferenciadas (Clarke et al., 1998; Miyamoto, 2019). Esta transición de un estadio diferenciado a una situación de totipotencia implica una intensa reprogramación celular que se encuentra mediada, en parte, por cambios en la composición y configuración de la cromatina. La capacidad de los oocitos para regular la estructura de cromatina y estimular la reprogramación celular reside en la acción de diversos factores que alcanzan altos niveles de expresión en oocitos en estadio de metafase II (como las chaperonas de histonas ASF1A y ASF1B, el factor de transcripción ARID2, o la propia histona H1FOO) (Awe & Byrne, 2013). Las histonas tienen un papel destacado en la regulación de las modificaciones epigenéticas que ocurren

durante dicha reprogramación celular, ya que pueden promover o inhibir la transcripción génica al alterar la estructura de la cromatina (Gomes et al., 2017). En este sentido, la histona B4 de *Xenopus* (el homólogo de la H1FOO murina) ha demostrado ser esencial para esta **reprogramación transcripcional**, probablemente al hacer accesible la cromatina somática a la maquinaria del oocito y permitir de este modo la carga de grandes cantidades de RNA polimerasa II (Jullien et al., 2014). De la misma forma, durante la reprogramación de las células somática a partir de la expresión ectópica de los factores de reprogramación de **Yamanaka** (OCT4, SOX2, KLF4 y MYC) (K. Takahashi & Yamanaka, 2006), tiene lugar **también** una importante **remodelación de la cromatina** que permite la dediferenciación celular *in vitro* (Papp & Plath, 2013). Aunque la dinámica de expresión e incorporación a la cromatina de las H1s somáticas durante los mecanismos de reprogramación celular ha sido previamente descrita (Terme et al., 2011), la posible implicación de H1FOO en este proceso aún necesita ser estudiada en detalle. Por todo ello, el posible papel que desempeña H1FOO en la maduración de los oocitos y en la regulación de la cromatina (tanto durante el desarrollo temprano como durante la reprogramación) está sometido actualmente a un intenso debate en el campo de la Biología Molecular (Funaya et al., 2022; Furuya et al., 2007; Li et al., 2022; Yun et al., 2015).

OBJETIVOS



OBJETIVOS

La gametogénesis es un proceso biológico estrictamente regulado en el cual una célula diploide lleva a cabo una división reduccional para dar lugar a células haploides denominadas gametos. Cualquier alteración que comprometa la correcta homeostasis de este proceso puede provocar infertilidad en el individuo o dar lugar a la generación de gametos que portan anomalías cromosómicas. En la actualidad, muchas parejas se enfrentan a un diagnóstico idiopático de infertilidad, por lo que conocer las causas genéticas y moleculares implicadas en el control de la gametogénesis es esencial para la mejora de su calidad de vida.

Para contribuir a descifrar los mecanismos genéticos que gobiernan la regulación de la gametogénesis en mamíferos, abordamos profundizar en el mecanismo molecular que provoca POF en pacientes que presentan una mutación en la secuencia del gen *SYCE1*. Además, llevamos a cabo una caracterización funcional del gen *H1FOO*, codificante para una histona específica de oocitos, mediante la generación y el análisis de un modelo murino.

Los objetivos específicos de la presente Tesis Doctoral son:

1. **Caracterización *in vivo* y validación de la mutación c.613C>T en *SYCE1* asociada a POF como responsable del fenotipo de infertilidad en humanos, haciendo uso del ratón como modelo animal.**
 - a) Disección del mecanismo molecular de acción de la variante *SYCE1*_{POF}.
 - b) Análisis de las interacciones multivalentes establecidas entre *SYCE1* y *SIX6OS1*.
 - c) Caracterización *in vivo* de la mutación $\Delta 10-21$ de *SIX6OS1*.

2. **Análisis funcional de la histona específica de oocitos *H1FOO* en mamíferos y su implicación en la gametogénesis y la pluripotencia.**

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Modelos murinos

1.1. Bienestar animal

Los ratones fueron establecidos en una instalación libre de patógenos específicos (*specific-pathogen free*, SPF) con control de temperatura, utilizando jaulas con ventilación individual, dieta estándar y un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas de acuerdo con las regulaciones establecidas por la Unión Europea en el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca (USAL). Los protocolos llevados a cabo en el trabajo para los que se ha requerido la utilización de ratones han sido aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la USAL. Siguiendo el “Principio de las tres Rs: reemplazar, reducir y refinar”, se han enfocado todos los esfuerzos a reducir el número de animales empleados, así como a minimizar su sufrimiento y mejorar su bienestar.

1.2. Generación de ratones modificados genéticamente mediante CRISPR/Cas9

La tecnología de edición genómica CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)/Cas9 revolucionó el campo de la Biología Molecular al permitir una modificación dirigida y altamente eficiente del genoma de una gran variedad de especies eucariotas (Cong et al., 2013). Esta tecnología se basa en dos componentes principales: por un lado, una endonucleasa (Cas9) se encarga de generar roturas dirigidas en el DNA (*deoxyribonucleic acid*). El otro componente son las guías RNA (sgRNAs, *single guide RNAs*), cuyo objetivo es dirigir a la nucleasa de manera específica a su diana en el genoma. Una vez generadas, estas roturas pueden repararse mediante reparación de extremos no homólogos (NHEJ). Este mecanismo, con alta tendencia a cometer errores, puede generar inserciones o deleciones inespecíficas que dan lugar a alelos mutantes. De manera alternativa, se puede añadir al sistema un DNA de hebra simple molde (ssODN, *single-stranded oligodeoxynucleotide*) para la reparación, generándose de este modo inserciones, deleciones o mutaciones puntuales controladas. Este molde contiene las mutaciones a introducir flanqueadas por brazos de homología colindantes a la zona diana para favorecer la reparación por recombinación homóloga, un mecanismo de reparación de alta fidelidad (H. Yang et al., 2014). Los modelos murinos mutantes *Syce1*^{POF/POF}, *Six6os1*^{Δ10-21/Δ10-21} y *H1foo*^{-/-} empleados en esta tesis han sido generados utilizando esta tecnología.

1.2.1. Diseño de sgRNAs

Los sgRNAs están constituidos por dos componentes imprescindibles: los crRNAs (CRISPR RNAs) y el tracrRNA (*trans-activating crRNA*). Los crRNAs son los responsables de la especificidad y el tracrRNA interviene en el procesamiento de los crRNAs. De este modo, el tracrRNA actúa como un andamiaje que permite la unión de los crRNAs a la Cas9 y de este complejo a su vez al DNA, produciendo el corte dirigido (H. Wang et al., 2016). Por tanto, para la generación de cada modelo, se diseñaron crRNA específicos dirigidos a la zona del genoma a mutar, mientras que la secuencia del tracrRNA fue la misma para todos los modelos.

El diseño de los crRNAs se llevó a cabo haciendo uso del servidor de IDT (https://eu.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM), y sus secuencias se encuentran recogidas en la **Tabla 2**.

Modelo	Identidad del crRNA	Secuencia (5'-3')
<i>Syce1</i> ^{POF/POF}	sgRNA1	TGACTTCTTTCCACACTATC
<i>Six6os1</i> ^{Δ10-21/Δ10-21}	sgRNA2	ATCTGTTTGTGAGTTTGGAC
	sgRNA3	TACTTATGTCTTGCTCATAAC
<i>H1foo</i> ^{-/-}	sgRNA4	GCAGGCCTTGACCGGGGCAG
	sgRNA5	AAGGCTGAAGAGCTGCCAGG

Tabla 2. Identidad y secuencia de los crRNAs empleados para la generación de los modelos murinos indicados por edición genómica haciendo uso de la tecnología CRISPR/Cas9.

1.2.2. Obtención de sgRNAs, Cas9 y ssODNs

Una vez diseñados, los crRNAs, junto al resto de componentes del sistema CRISPR/Cas9 (tracrRNA, ssODNs y la nucleasa Cas9), fueron fabricados por síntesis química por la compañía IDT. Los crRNAs y el tracrRNA se sintetizan por separado y posteriormente, fueron anillados por complementariedad antes de ser utilizados. Para ello, cantidades equimolares de ambas moléculas se hirvieron 5 minutos a 95°C para, a continuación, someterlas a una rampa descendiente de temperatura durante unos 90 minutos hasta alcanzar la temperatura ambiente. Los ssODNs utilizados para la generación de los distintos modelos se encuentran recogidos en la **Tabla 3**.

Modelo	Secuencia del ssODN (5'-3')
<i>Syce1</i> ^{POF/POF}	GGGACTCTTCTCCGAAGCCATGAGGCAGCTGCAGCAATGTAAGATGCAGGGTGGG GCAGGAGGAGGAAATGTCTAGCACTGACTTCTTTCCAC CCCCAGG TAGATGTTCA AGGATGAGAACAAGAAAGCTGAGGAGTTCCTAGAGGCTGCAGCTCAGCAGCACGAG CAGCTGCAGCAGAGGTGCCACCAGCTACAGC
<i>Six6os1</i> ^{Δ10-21/Δ10-21}	GTTCTTACTTTATGTATGCTCTTTTATATATGGCTTCTGAAAGTTTTATTATTTATTTAC ACAGTGTCCAAGATGAATGATAATCTGTTTGTGAGTTTG CAAGACATAAGTATTA AG AAGATACGATTCAAAGAATTAATAGTAAGTAGTTTTGCATGAAATAAATATTTTAGTC TTTTGGTTTTATCTTATATAGCA
<i>H1foo</i> ^{-/-}	GACAGTGGTCTGTGTAAGGCTTGCAGCCTAGCAGCTAGTGATGTCACTGGTTCTCAG TGTGTGTGTGCTCTGCCACCAAAGCAGGCCTTGACCGGGGCGGGGTGTGTCTCT CTCTGTATGGGAGGTCAGAAGAAATCAAGGGGGTTTTGCACTAAGGAGTCTGGGCT CATCTAGAGCAGTGAGTAGCTATGAGAG

Tabla 3. Lista de ssODNs utilizados para la generación de los modelos murinos indicados. Para el ssODN del mutante *Syce1*^{POF/POF}, se resalta en negro la mutación del motivo adyacente de protoespaciador o secuencia PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) (CTATCAG>CCCCAG). Este cambio implica la introducción de la secuencia del extremo 3' del intrón humano para evitar un nuevo corte de la Cas9 tras la integración del molde en el genoma. En rojo, se resalta el cambio C>T que genera el codón de STOP prematuro (p.Gln243*). Para los mutantes *Six6os1*^{Δ10-21/Δ10-21} y *H1foo*^{-/-}, se resalta en azul el dominio ssODN 5' y, en verde, el dominio ssODN3'.

1.2.3. Microinyección del sistema CRISPR/Cas9 en cigotos

La microinyección de las mezclas de componentes del sistema CRISPR/Cas9 se realizó preparando cada reactivo a las siguientes concentraciones: 30 ng/μL de Cas9, 20 ng/μL de cada sgRNA anillado y 10 ng/μL del ssODN. Esta mezcla fue microinyectada en cigotos B6/CBA F2 (híbridos entre cepas C57BL/6J y CBA/J) siguiendo el protocolo descrito en (Singh et al., 2015) por parte de la Unidad de Transgénesis de la Universidad de Salamanca.

1.2.4. Caracterización de los fundadores y establecimiento final de las líneas

Los ratones fundadores portadores de la edición deseada se identificaron mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) haciendo uso de oligonucleótidos flanqueando la región editada y empleando como molde DNA genómico extraído de biopsias de cola (ver secciones 2.1.1. y 2.2.). Los oligonucleótidos empleados se encuentran recogidos en la **Tabla 4**. Los productos de PCR se secuenciaron directamente mediante secuenciación Sanger o se subclonaron en el plásmido pBlueScript (Stratagene) para ser secuenciados posteriormente. Los fundadores seleccionados se cruzaron con ratones silvestres (WT, *Wild-Type*) C57BL/6J para eliminar los *off-targets* no deseados. Posteriormente, los descendientes heterocigotos fueron secuenciados de nuevo y cruzados para generar los homocigotos editados. El genotipado se llevó a cabo mediante análisis directo en geles de agarosa (para los mutantes *Six6os1*^{Δ10-21/Δ10-21} y *H1foo*^{-/-}) y por secuenciación Sanger en el caso del mutante puntual *Syce1*^{POF/POF}.

Modelo	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Alelo	Tamaño del amplicón (bp)
<i>Syce1</i> ^{POF/POF}	F1	CTGTAGAGAACTGATGAAAGT	WT y KI	398
	R1	CAAGAAAATATGAAGAGACATAC		
<i>Six6os1</i> ^{Δ10-21/Δ10-21}	F2	CACTTACATTTTCCTTTTAAGAATGC	WT	413
	R2	CCCCTCTCATACATACAAGTTGC	Δ	285
<i>H1foo</i> ^{-/-}	F3	ATGGAGAAAGGGCAGAAGAGG	WT	272
	R3	CACTTCTACGGAGGGAAACC		
	F4	TGGTCTCAGTGTGTGTGTGC	KO	268
	R4	GCTGCCTGAACTTCTGGTCT		

Tabla 4. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para el genotipado de los modelos murinos desarrollados y tamaño de los amplicones en pares de bases generados para cada alelo. KI: *Knock-in*; KO: *Knockout*.

1.3. Análisis de fertilidad

La capacidad reproductiva de los ratones mutantes fue evaluada mediante un análisis de fertilidad. Para ello, se establecieron cruces de ratones adultos (en torno a 8 semanas de edad) mutantes, y el tamaño (en número de crías) y la frecuencia de las camadas se registró, comparando estos valores con los de las camadas nacidas a partir de un cruce de ratones heterocigotos. La presencia de tapón copulador en la vagina de las hembras se evaluó cada mañana para confirmar el apareamiento la noche anterior.

2. Técnicas de Biología Molecular

2.1. Extracción de DNA genómico

2.1.1. Extracción por lisis alcalina

Para el genotipado de los animales, se tomaron fragmentos de cola de unos 2 mm de longitud de ratones con una edad comprendida entre 14 y 21 dpp y se incubaron en presencia de 600 μL de NaOH 50 mM durante 30 minutos a 95°C. A continuación, los fragmentos se disgregaron haciendo uso de un vórtex y se neutralizó la lisis añadiendo 50 μL de Tris-HCl 1 M pH 8,8. Este DNA genómico se utilizó como molde para genotipado de ratones por PCR de manera rutinaria.

2.1.2. Extracción con fenol/cloroformo

Este método de extracción permite obtener una mayor pureza de DNA eliminando un alto porcentaje de proteínas y polisacáridos. Para llevarlo a cabo se incubaron los fragmentos de cola de ratón en 500 μL de *buffer* de lisis (0,1 M Tris-HCl pH 7,4; 0,1 M EDTA; 0,5% SDS) suplementado con 0,6 mg/mL de Proteinasa K (Roche) a 55°C durante 12-20 horas. Al DNA solubilizado se le añadieron 200 μL de fenol y 200 μL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión y se centrifugó 5 min a 13000 revoluciones por minuto (rpm). La fase acuosa superior que contiene el DNA se recogió y el DNA se precipitó añadiendo 200 μL de acetato amónico 7,5 M y 700 μL de isopropanol (0,4 y 1,4 volúmenes, respectivamente). A continuación, el DNA se lavó con 500 μL de etanol 70%. Una vez retirado el etanol, se dejó evaporar completamente y el DNA se resuspendió en TE 1x.

2.2. Genotipado por PCR

El genotipado de los ratones se llevó a cabo mediante amplificación por PCR. Los oligonucleótidos se diseñaron flanqueando la región editada del gen de interés. La puesta a punto de las condiciones de reacción se llevó a cabo en base al protocolo de la casa comercial de la Taq DNA polimerasa (NZYTM Taq II DNA *Polymerase*, NZYTech). Como molde se utilizó 1,5 μL de DNA (equivalente a menos de 0,1 μg) extraído mediante lisis alcalina de biopsias de cola. La mezcla de amplificación contenía 0,4 μM de cada oligonucleótido, 200 μM de dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato), *buffer* polimerasa 1X y 0,75 unidades de Taq polimerasa en un volumen final de 25 μL . La reacción se llevó a cabo en un termociclador Veriti (Thermo Fisher Scientific). El programa de la PCR varió en función del tamaño del amplicón y de los oligonucleótidos empleados (ver **Tabla 4**). Los pasos comunes para todas las líneas murinas incluyeron una primera desnaturalización de 2 minutos a 94°C. A continuación, se sucedieron 35 repeticiones de un set de 3 pasos diferentes: una desnaturalización de 20 segundos a 94°C, un anillamiento de 20 segundos a una temperatura cercana a los 60°C (variable para cada pareja de oligonucleótidos) y una elongación a 72°C por un tiempo de 1 minuto por cada 1000 pb a amplificar. Finalmente, la mezcla se sometió a una última elongación de 5 minutos a 72°C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa y se secuenciaron en los casos que fue necesario (para caracterizar los ratones fundadores y para mantener la línea *Syce1*^{POF/POF}).

2.3. Generación de vectores de expresión

Con el fin de obtener proteínas fusionadas a diferentes epítomos (Flag, *Green Fluorescent Protein* (GFP), HA (Hemaglutinina) o Myc) que permitan el estudio de estas en diferentes experimentos de Biología Molecular, se clonaron los DNAs complementarios (cDNAs) completos (o editados) de las proteínas de interés en diferentes vectores de expresión eucariota.

2.3.1. Extracción de RNA

Para obtener RNA (*ribonucleic acid*) a partir de testículo de ratón, se colocaron 100 mg del tejido en un tubo Eppendorf de 2 mL con 750 μL de GIT (tiocianato de guanidinio 4M, citrato de sodio 25 mM, sodio lauril sarcosinato 0,5% (w/v) y β -mercaptoetanol 0,1 M). El tejido fue disgregado con ayuda de un homogeneizador Polytron (IKA T10 Basic, Ultra-Turrax). A continuación, se añadieron consecutivamente 0,1 volúmenes de acetato de sodio 2 M pH 4,0, un volumen de fenol equilibrado con agua y 0,4 volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), mezclando la solución vigorosamente con ayuda de un vórtex. La mezcla se incubó 15 minutos a temperatura ambiente (RT, *Room Temperature*) y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos

a 4°C. La fase acuosa superior conteniendo el RNA se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó añadiendo 1 volumen de isopropanol, centrifugando de nuevo 15 minutos a 13000 rpm y 4°C. El pellet de RNA generado se lavó dos veces con etanol 70% y se dejó secar al aire. Finalmente, el RNA se resuspendió en H₂O Milli-Q y se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm empleando un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) o un fluorímetro Qubit (Thermo Fisher Scientific).

2.3.2. Transcripción reversa-PCR (RT-PCR)

El cDNA (DNA complementario) total de testículo se obtuvo mediante retrotranscripción a partir de 5 µg de RNA total usando el cebador oligo(dT) y el kit comercial SuperScript® IV *Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Life Technologies). A continuación, 2 µL de este cDNA total fueron empleados para amplificar mediante PCR las regiones codificantes de los distintos genes de interés haciendo uso de oligonucleótidos específicos. Los amplicones se generaron haciendo uso de las polimerasas Phusion High-Fidelity (Thermo Fisher Scientific) o Expand Long *Polymerase* (Roche), dependiendo del tamaño del amplicón del tamaño. La mezcla de PCR, además del cDNA molde, incluía 0,4 mM de cada oligonucleótido, dNTPs 200 µM, 1X *buffer* polimerasa y la polimerasa correspondiente (0,8U Phusion o 3,5U Expand Long). El programa de PCR empleado con la polimerasa Phusion High-Fidelity fue idéntico al de la polimerasa NZYtaq II DNA utilizada para el genotipado de los ratones (ver sección 2.2.), mientras que la temperatura de elongación requerida por la polimerasa Expand Long se redujo a 68°C, manteniendo el resto de las condiciones sin cambios. Los productos de PCR generados (recogidos en la **Tabla 5**) se analizaron por electroforesis en gel de agarosa.

ORF	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Tamaño (bp)
Six6os1	F5	AGTGTCCAAGATGAATGATAATCTG	Alelo WT: 1754
	R5	GTTCAAAAATAATAACTCAAAAAAAC	Alelo Δ10-21: 1688
Syce1	F6	GAGCAGTATGGCCACCAGACC	Alelo WT: 1007
	R6	GAGGAGGGTATTAGGTCCTGC	Alelo POF: 1007

Tabla 5. Genes amplificados para su *cloning* en vectores de expresión, oligonucleótidos empleados y tamaño de los amplicones obtenidos. ORF: *Open Reading Frame*.

A parte de los ORF amplificados siguiendo este método, para los experimentos que requerían el empleo de plásmidos codificantes para SYCE3 se utilizó el plásmido pCMV-Myc-SYCE3, cedido amablemente por el laboratorio del Dr. Yuequan Shen (Universidad de Nankai).

2.3.3. Preparación de insertos y *cloning* en vectores de expresión

Los cDNAs amplificados con la polimerasa Phusion High-Fidelity presentan extremos romos, fueron purificados haciendo uso de columnas (NZYGelpure, MB011, NZYTech) y se fosforilaron posteriormente con la T4 polinucleótido quinasa (Takara) durante 1 hora a 37°C. Los amplicones generados por la polimerasa Expand Long presentan extremos flanqueantes, por lo que fueron sometidos posteriormente a un paso de reparación por acción de la T4 DNA polimerasa (Takara) durante 45 minutos a 37°C. Tanto la polinucleótido quinasa como la polimerasa se inactivaron por un choque de 15 minutos a 70°C. Por último, estos insertos se clonaron en los siguientes vectores de expresión en mamíferos: pcDNA3, pcDNA3 2xFlag, pcDNA3 2xHA, pEGFP c1 y pcDNA3.1 Myc-His(-). La reacción de ligación fue llevada a cabo durante 3 horas a RT por acción de la enzima T4 DNA ligasa (Takara), y el producto de ligación se transformó en

células *Escherichia coli* DH5 α competentes. El mantenimiento del marco de lectura entre el *tag* del plásmido y el inserto se verificó mediante secuenciación Sanger.

2.3.4. Transformación de células competentes

La propagación tanto de los plásmidos obtenidos como producto de la ligación (apartado 2.3.3.) como de los plásmidos puros ya establecidos se realizó transformando células competentes *E. coli* DH5 α . Para ello, se descongeló un vial de células competentes en hielo y se añadieron 4 μ L de la ligación. Para transformar plásmido puro, se añadió 1 μ L del plásmido de interés a 30 μ L de bacterias competentes. El vial se incubó durante 30 minutos en hielo, tras lo cual se ejecutó un choque térmico de 33 segundos en un baño a 42°C, devolviendo las bacterias a hielo durante un minuto tras la permeabilización de sus membranas. Tras ello, si se transformó un producto de ligación, las bacterias se recuperaron 1 hora (si el plásmido codifica para una resistencia a Ampicilina) o 3 horas (si la resistencia es a Kanamicina) en 1 mL de medio LB líquido sin suplemento de antibiótico a 37°C en agitación, para permitir así la expresión del gen de resistencia al antibiótico correspondiente. Si el producto transformado fue un plásmido puro codificante para una resistencia a Kanamicina, el tiempo de recuperación se redujo a 1 hora, mientras que el paso de recuperación es innecesario para la transformación de plásmidos puros con resistencia a Ampicilina. Por último, las bacterias se sembraron en una placa de LB agar suplementado con el antibiótico de selección correspondiente y se incubaron a 37°C durante al menos 15 horas.

2.3.5. Extracción de DNA plasmídico de un cultivo bacteriano por lisis alcalina

Las colonias de *E. coli* generadas en la placa de LB se inocularon en 1,5 mL de LB líquido suplementado con el antibiótico de selección y se incubaron a 37°C en agitación durante toda la noche. El cultivo se centrifugó 2 minutos a 13000 rpm y el pellet de bacterias obtenido se resuspendió en 200 μ L de *buffer* P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM y RNAsa 100 μ g/mL). A continuación, las bacterias se lisaron añadiendo 200 μ L de *buffer* P2 (NaOH 0,2 M y SDS 1%), mezclando por inversión e incubando a RT durante 5 minutos. Transcurridos los 5 minutos, se añadieron 200 μ L de *buffer* P3 (acetato de potasio 3M y ácido acético glacial 11,5%) para neutralizar la lisis y precipitar el DNA bacteriano y las proteínas. Tras centrifugar 10 minutos a 13000 rpm, se recogió el sobrenadante (conteniendo el DNA plasmídico) y se precipitó añadiendo 0,7 volúmenes de isopropanol, mezclando vigorosamente y centrifugando nuevamente 10 minutos a 13000 rpm. El pellet de DNA se lavó con etanol al 70%, centrifugando 5 minutos a 13000 rpm y una vez el pellet quedó totalmente seco, se resuspendió en TE 1X.

2.3.6. Análisis de restricción

Con el fin de identificar las colonias que contenían el plásmido de interés, se llevó a cabo un análisis por digestión enzimática del DNA plasmídico. Para ello, se digirió 1 μ L de DNA con 0,2 μ L de cada una de las enzimas de restricción necesarias, así como el *buffer* más compatible con la o las enzimas diluido a 1X hasta un volumen final de 10 μ L. Esta mezcla se incubó durante 1 hora a la temperatura óptima de reacción de cada enzima (generalmente, 37°C). Finalmente, los fragmentos de restricción obtenidos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. El clonaje en pauta de los plásmidos que generaban un patrón de restricción adecuado fue validado mediante secuenciación Sanger.

2.3.7. Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina acoplado a purificación por columna de afinidad

Una vez validado el clonaje mediante secuenciación, se generó DNA plasmídico de alto grado de pureza haciendo uso de una columna de intercambio aniónico. Para ello, previamente se sembró un cultivo de una colonia de *E. coli* transformada con el plásmido de interés (siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.3.4.) en 200 mL de medio LB suplementado con el antibiótico para el cual codifique resistencia el plásmido transformado, y se incubó a 37°C en agitación hasta obtener un cultivo saturado. Este se centrifugó a 7000 rpm durante 15 minutos y el pellet obtenido se resuspendió en 10 mL de *buffer* P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM y RNAsa 100 µg/mL). Las células se lisaron con 10 mL de *buffer* P2 (NaOH 0,2 M y SDS 1%), agitando tras su adición e incubando 5 minutos a RT. Tras ello, la lisis se neutralizó con 10 mL de *buffer* P3 (acetato de potasio 3M y ácido acético glacial 11,5%) y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos, quedando el DNA plasmídico en el sobrenadante. Por otro lado, se equilibró una columna (NZYTech Plasmid Midi Column) con 30 mL de *buffer* E4 (NaCl 600 mM, ácido sódico 100 mM, Tritón X-100 0,15% y ácido acético hasta pH 5). Posteriormente, se hizo pasar por la columna el sobrenadante del lisado celular (previamente filtrado a través de una jeringa con lana de vidrio). A continuación, se lavó la columna con 60 mL de *buffer* E5 (NaCl 800 mM y ácido sódico 100 mM, ajustando con ácido acético hasta pH 5). El DNA se eluyó con 15 mL de *buffer* E6 (NaCl 1,5 M, ácido sódico 100 mM y ácido acético hasta pH 5) y se precipitó con 0,7 volúmenes de isopropanol. Esta mezcla se centrifugó a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C y el pellet se lavó con etanol al 70%, centrifugando 10 minutos a 14000 rpm. El pellet de DNA se dejó secar al aire libre y finalmente se resuspendió en un volumen variable de TE 1X hasta alcanzar una concentración de 1 µg/µL, midiendo la absorbancia en el espectrofotómetro NanoDrop.

2.4. PCR cuantitativa

Para analizar la expresión cuantitativa de los mRNAs (RNAs mensajeros) de interés, se extrajo RNA de testículos de ratones WT y mutantes (como se describe en la sección 2.3.1.). Posteriormente, se sintetizaron las mismas cantidades de cDNA por retrotranscripción (protocolo recogido en la sección 2.3.2) y se llevó a cabo una PCR cuantitativa (qPCR) empleando el cóctel FastStart™ Universal SYBR® Green Master Mix (ROX) (Roche). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación se encuentran recogidos en la **Tabla 6**. Todos los programas de qPCR comenzaron por un paso de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos consistentes de un choque a 95°C durante 15 segundos y una incubación a 62°C durante 1 minuto. Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo iCycler (Bio-Rad).

ORF	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Tamaño (bp)
<i>β-Actin</i>	F7	GGCACCACACCTTCTACAATG	352
	R7	GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC	
<i>Six6os1</i>	F8	GCTGAATGTGGAGATAAAGAG	153
	R8	AGGAGTTTCAGGAGTTTGAGG	
<i>Syce1</i>	F9	GGACATGGTGAAAAAGTTGCAG	154
	R9	CAGTTCCTTCTGCAGGTTGTC	

Tabla 6. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la qPCR y tamaño del amplicón generado.

2.5. Análisis de proteínas

2.5.1. Extracción de proteínas de testículo de ratón

Para poder analizar la expresión endógena de las proteínas de interés para este trabajo, se llevó a cabo una extracción del proteoma de testículo de ratón. Para ello, los testículos se extirparon de la cavidad abdominal de los ratones eutanasiados y se les despojó de la túnica albugínea. Cada testículo se homogeneizó con 1 mL de *buffer* de lisis RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, NP40 1%, desoxicolato de sodio 0,5%, SDS 0,1%) suplementado con inhibidores de proteasas (cOmplete™ EDTA-free, Roche) con ayuda de un homogeneizador Polytron (IKA T10 Basic, Ultra-Turrax). Las muestras se incubaron 15 minutos en hielo para permitir la extracción proteica y, a continuación, se centrifugaron a 13000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Finalmente, la concentración proteica del sobrenadante fue determinada mediante un ensayo Bradford con ayuda del kit DC Protein Assay (Bio-Rad). Las proteínas extraídas siguiendo este método fueron analizadas directamente por *Western blot* (WB).

2.5.2. Inmunoprecipitación de proteínas sobreexpresadas

Esta aproximación permite validar la interacción *in vitro* directa entre dos o más proteínas candidatas haciendo uso de un sistema heterólogo. Dichas proteínas, unidas a un epítipo (Flag, GFP, HA o Myc) que permite su fácil reconocimiento, son expresadas conjuntamente en células HEK 293T (*Human Embryonic Kidney*) transfecando de manera transitoria plásmidos codificantes para dichas proteínas (protocolo indicado en sección 4.3.). 48 horas tras la transfección, se extrajo la proteína total de las células en 1 mL de *buffer* Debananda (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM y Tritón X-100 1%) suplementado con inhibidores de proteasas (cOmplete™ EDTA-free, Roche) con ayuda de un homogeneizador Polytron (IKA T10 Basic, Ultra-Turrax). Las muestras se incubaron en hielo para permitir la extracción proteica y, a continuación, se centrifugaron 15 minutos a 13000 rpm y 4°C. La concentración proteica del sobrenadante, al igual que en el caso de extracción de proteína endógena (sección 2.5.1.), se cuantificó mediante ensayo Bradford con el kit DC Protein Assay (Bio-Rad).

Posteriormente, se bloqueó 1 mg de proteína con bolas de Sefarosa unidas a proteína G (Gammabind™ G Sepharose™, GE Healthcare) durante 1 hora en rotación a 4°C. A continuación, el extracto bloqueado se incubó con el anticuerpo correspondiente durante al menos 2 horas en rotación a 4°C. Los anticuerpos empleados para inmunoprecipitación (IP) se encuentran recogidos en la **Tabla 8** junto a los utilizados en el resto de las técnicas que los requerían en el transcurso de esta Tesis. Como control negativo los extractos proteicos se incubaron con IgGs (Inmunoglobulinas G, 3 µg/mg de proteína) producidas en la misma especie que los anticuerpos específicos utilizados. Los inmunocomplejos (formados por el anticuerpo y las proteínas de interés) se capturaron incubando en rotación con bolas de Sefarosa unidas a proteína G durante toda la noche a en rotación a 4°C. Al día siguiente, estos se lavaron con *buffer* Debananda cinco veces, centrifugando 1 minuto a 10000 g y 4°C entre cada lavado. Las proteínas fueron eluidas de los inmunocomplejos resuspendiendo las bolas en 20 µL de *buffer* Laemmli 2X (Tris-HCl 100 mM pH 7, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, β-mercaptoetanol 200 mM y glicerol 20%) e hirviéndolas 5 minutos a 100°C. Las muestras se cargaron posteriormente en geles de poli(acrilamida) (porcentajes variables entre el 8% y el 14%, dependiendo del peso molecular de la proteína de interés) y se detectaron mediante WB con los anticuerpos primarios (**Tabla 8**) y secundarios (**Tabla 7**) correspondientes.

2.5.3. Western blot

Los extractos proteicos se resolvieron en geles desnaturizantes siguiendo el protocolo descrito en (Laemmli, 1970). Así, las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida que fueron corridos en *buffer* SDS-Page 1X (Tris-HCl 250 mM, glicina 200 mM, SDS 0,05%) a 200 V. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μ m (GE Healthcare Amersham) en *buffer* de transferencia húmeda (Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM y metanol 20%) a 65 V durante 1 hora. Una vez transferidas las proteínas, las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5% en TBS-Tween 20 (TBST, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%) durante 1 hora en agitación a RT. A continuación, las membranas se incubaron rotando con el anticuerpo primario diluido en leche al 5% en TBST durante 1 hora a RT. Todos los anticuerpos primarios utilizados y sus diluciones se encuentran recogidos en la **Tabla 8**. Tras la incubación, las membranas se sometieron a 3 lavados de 5 minutos con TBST en agitación y se incubaron en rotación si el anticuerpo secundario estaba conjugado con peroxidasa o en agitación en oscuridad si estaba conjugado con fluorocromo. En ambos casos, los anticuerpos secundarios (recogidos en la **Tabla 7**) se diluyeron en leche al 2,5% en TBST. Por último, las membranas se lavaron tres veces más durante 5 minutos con TBST y fueron reveladas. Para anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa, la señal quimioluminiscente fue detectada incubando las membranas con el sustrato Immobilon Western HRP (Millipore) durante 5 minutos y se expusieron películas fotográficas durante diferentes tiempos (desde 10 segundos hasta 8 minutos, dependiendo de la intensidad de la señal). Para los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos, el revelado se llevó a cabo haciendo uso del sistema Odyssey Infrared Imaging.

Anticuerpo	Referencia	Especie (<i>Host</i>)	Dilución	Casa comercial
α -goat HRP	A27014	<i>Rabbit</i>	1:10000	Thermo Scientific
	705-035-147	<i>Donkey</i>	1:5000	Jackson Immunoresearch
α -mouse HRP	NA931	<i>Sheep</i>	1:10000	GE Healthcare
	715-035-150	<i>Donkey</i>	1:5000	Jackson Immunoresearch
α -rabbit HRP	7074	<i>Goat</i>	1:3000	Cell Signaling
	711-035-152	<i>Donkey</i>	1:5000	Jackson Immunoresearch
α -mouse Dylight™ 680	35518	<i>Goat</i>	1:10000	Thermo Scientific
α -rabbit Dylight™ 680	35571	<i>Goat</i>	1:10000	Thermo Scientific

Tabla 7. Anticuerpos secundarios utilizados para el revelado de membranas por WB. HRP: *Horseradish peroxidase*.

Cuando fue necesaria una reincubación de las membranas con nuevos anticuerpos, la primera pareja de anticuerpos primario y secundario se eliminó incubando la membrana en *buffer* de *stripping* (glicina 0,2 M, SDS 1%, Tween 20 0,01%, pH 2,2) dos veces durante 10 minutos en agitación a RT. A continuación, la membrana se lavó dos veces y se bloqueó con leche diluída al 5% en TBST. Por otro lado, las membranas también podían ser reincubadas sin eliminar los anticuerpos, inactivando la señal de la peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario mediante un exceso de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Para ello, las membranas se incubaron en agitación con H₂O₂ al 15% en PBS 15 minutos, se lavaron dos veces con TBST durante 5 minutos, se bloquearon y reincubaron siguiendo las indicaciones previamente descritas en esta sección.

3. Técnicas citológicas

3.1. Análisis histopatológico

Tras ser sacrificados, el análisis histológico de los ovarios de ratón se llevó a cabo tomando los órganos de interés y fijándolos durante 24 horas en formol al 10%. A continuación, los tejidos se incluyeron en bloques de parafina y se cortaron en secciones del grosor deseado según la aplicación, siendo generalmente de 5 μm . Las secciones se tiñeron posteriormente con hematoxilina-eosina. La inclusión, el corte y la tinción de las muestras fueron llevadas a cabo por el Servicio de Patología Molecular Comparada del Centro de Investigación del Cáncer (CSIC/USAL). Las muestras fueron analizadas usando un microscopio OLYMPUS BX51 y las imágenes se tomaron con la cámara digital OLYMPUS DP70.

3.2. Esparcido de espermatoцитos (*spreading*)

El estudio de los espermatoцитos de ratón se llevó a cabo fijando las células sobre portaobjetos utilizando la técnica clásica *dry-down* descrita en (Peters et al., 1997) con pequeñas modificaciones. Esta técnica permite obtener preparaciones con células estalladas en las que se pierde el citoplasma, pero se consigue una visualización de alta calidad de los núcleos en dos dimensiones. Para este tipo de preparaciones, en primer lugar, se eliminó la túnica albugínea de los testículos y se colocaron en una placa Petri con 1 mL de PBS 1X. Los túbulos seminíferos se disgregaron con ayuda de dos bisturís y las células extraídas se recogieron con PBS 1X en un tubo de 15 mL (Falcon). Una vez obtenido un precipitado blanquecino, se consideró concluida la extracción y se añadió PBS 1X a la suspensión hasta alcanzar un volumen de 6 mL, centrifugando los tubos entonces 9 minutos a 1200 rpm. El pellet se lavó de nuevo con 6 mL de PBS 1X y tras repetir la centrifugación, las células se resuspendieron en un volumen de entre 80 μL y 500 μL de sacarosa 100 mM pH 8,4, generando un choque hipotónico de 5 minutos. Tras ello, se extendieron 400 μL de fijador de esparcidos (Paraformaldehído (PFA) 1%, Tritón X-100 0,15%, PBS 0,05%, tetraborato de sodio 2,5 mM, ajustando a pH 9,2) sobre portas limpios, se añadieron 20 μL de la suspensión celular en un lateral del portaobjetos y se distribuyó suavemente por toda la superficie aplicando movimiento en zigzag. Estas preparaciones se incubaron durante 2 horas y media en una cámara cerrada para permitir la correcta fijación de las células y, a continuación, se dejaron secar al aire. Para eliminar el fijador, las preparaciones se lavaron con Photo-Flo 0,08% (Kodak) y se secaron al aire nuevamente. La calidad de los esparcidos se analizó con un microscopio invertido de contraste de fases Nikon Eclipse TS100 y se conservaron a 4°C en PBS 1X suplementado con azida al 0,05% para prevenir el crecimiento bacteriano.

3.3. Aplastado de túbulos seminíferos (*squashing*)

Este método desarrollado por (Parra et al., 2002) nos permite obtener una monocapa de células extraídas de los túbulos seminíferos que mantienen su conformación tridimensional. Para obtener estas preparaciones, se eliminó la túnica albugínea de los testículos y los túbulos se fijaron durante 10 minutos en un fijador específico de *squash* (formaldehído 2% y Tritón X-100 0,1% en PBS 1X). Se tomó una pequeña fracción de los túbulos y se repartieron sobre un portaobjetos previamente tratado con poli-L-lisina (1 mg/mL, Sigma-Aldrich) y con una gota de fijador. Sobre ellos se colocó un cubreobjetos por encima del cual se pasó la punta de un lápiz presionando en dos direcciones para, posteriormente, ejercer presión con los dedos para obtener una monocapa de espermatoцитos. Estas preparaciones se introdujeron en nitrógeno líquido durante unos segundos e inmediatamente se eliminó el cubre con ayuda de un bisturí, introduciéndolos entonces en PBS 1X. Finalmente, las preparaciones se conservaron a 4°C en PBS 1X suplementado con azida al 0,05%.

3.4. Esparcido de oocitos (*spreading*)

Los oocitos se obtuvieron de hembras de entre 16,5 dpc y 17,5 dpc para la visualización de los cuatro estadios de la primera profase meiótica (leptoteno, zigoteno, paquiteno y diploteno). Para ello, las hembras preñadas fueron sacrificadas y se extrajeron los embriones del útero, colocándolos en PBS 1X. Posteriormente, se extrajeron los ovarios de los embriones de sexo femenino y se colocaron en un pocillo de una placa de 24 pocillos, con 200 μL de medio M2 (Sigma-Aldrich). Sobre este pocillo se añadieron 10 μL de colagenasa A/M2 (50 mg/mL) y se incubó 30 minutos a 37°C para favorecer la disgregación de los ovarios. A continuación, estos se transfirieron a 200 μL de *buffer* hipotónico (Tris-HCl 30 mM pH 8,2, sacarosa 50 mM, citrato de sodio 17 mM, EDTA 5 mM y ditiotreitól (DTT) 0,5 mM) y se incubaron 45 minutos a RT. Durante este periodo de tiempo, se prepararon los portaobjetos (6 por cada par de ovarios), dibujando un círculo con el pegamento Rubbercement® en el centro de los mismos. Tras el tratamiento hipotónico, los ovarios se transfirieron a 60 μL de sacarosa 100 mM pH 8,2 y se pipetearon vigorosamente con una pipeta p100 hasta obtener una suspensión unicelular, la cual fue validada en un microscopio. Tras ello, se colocaron 40 μL de fijador (PFA 1% (masa/volumen), borato de sodio 5 mM, Tritón X-100 0,15%, DTT 3 mM, ajustado a pH 9,2) en el interior del círculo de adhesivo, añadiendo 10 μL de la suspensión celular en el centro de la gota de fijador. La mezcla fue repartida por el portaobjetos aplicando movimientos en zigzag. Las preparaciones se incubaron en una cámara cerrada durante 2 horas y, posteriormente, se secaron al aire. Para eliminar el fijador, las preparaciones se lavaron con Photo-Flo al 0,08% (Kodak) y se secaron nuevamente al aire. La calidad de los esparcidos se analizó con un microscopio invertido de contraste de fases Nikon Eclipse TS100 y estos se conservaron a 4°C en PBS 1X suplementado con azida al 0,05% para evitar el crecimiento bacteriano.

3.5. Colección de oocitos sin fertilizar en metafase II

Para estudiar la expresión de proteínas en oocitos bloqueado en metafase II, se tomaron y se perforaron los ovarios de hembras de 53 días de edad sin estimular con agujas de calibre 30, permitiendo así la liberación de los oocitos. Estos oocitos primarios fueron cultivados en medio KSOM (Millipore) y cubiertos con una gota de aceite mineral durante 18 horas a 37°C, permitiendo su llegada a metafase II. Tras ello, la suspensión celular se fijó en un portaobjetos empleando el fijador de oocitos descrito en la sección 3.4., y se llevó a cabo la tinción por inmunofluorescencia como se describe a continuación.

3.6. Inmunofluorescencia

Las preparaciones celulares se incubaron con el anticuerpo primario (listado recogido en **Tabla 8**) diluido en PBS 1X durante 1 hora a RT en una cámara húmeda. Tras esto, se ejecutaron 3 lavados de 5 minutos en PBS 1X y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con un fluorocromo, diluyéndolo nuevamente en PBS 1X (**Tabla 9**). Finalmente, las preparaciones se lavaron 3 veces más durante 5 minutos en PBS 1X y se montaron con medio de montaje Vectashield® (Vector Laboratories) y DAPI (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para teñir el DNA. Con el fin de reducir la señal de fondo, especialmente en las inmunofluorescencias (IFs) de proteínas que forman *foci*, las preparaciones se bloquearon 30 minutos con *buffer* ADB 10% (Suero Fetal Bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*) 10%, Albúmina de Suero Bovino (BSA, *Bovine Serum Albumin*) 3%, y Tritón X-100 0,05% en PBS 1X) y los anticuerpos se diluyeron en este mismo *buffer* para las incubaciones. En este caso, los lavados se hicieron con PBST (PBS 1X con Tritón X-100 al 0,05%).

Proteína detectada	Referencia	Especie (Host)	Tipo	Dilución IF	Dilución WB	Dilución IP	Proveedor
ACA	15-235	Human	IgG	1:15	-	-	Antibodies Incorporated
β -Actin	Clon AC-15; A5441	Mouse	IgG	-	1:30000	-	Sigma-Aldrich
DMC1	R1	Rabbit	IgG	1:500	-	-	Proteogenix
	R2	Rabbit	IgG	1:500	-	-	Proteogenix
Flag	F1804	Mouse	IgG	1:300*	-	3 μ g	Sigma-Aldrich
	F7425	Rabbit	IgG	1:300*	1:3000	-	Sigma-Aldrich
GFP	CSB-MA000051 M0m	Mouse	IgG	1:300*	-	3 μ g	Cusabio
	sc-5385	Goat	IgG	-	1:3000	-	Santa Cruz Biotechnology
	A-11122	Rabbit	IgG	1:300*	1:3000	-	Life Technologies
H1FOO	-	Rabbit	Suero	1:20	-	-	Dr. J. D. Hennebold
γ -H2AX (ser139)	07-164	Rabbit	IgG	1:500	-	-	Millipore
IgGs	ChromPure 015-000-003	Mouse	IgG	-	-	3 μ g	Jackson Immuno Research
MLH1	51-1327GR	Mouse	IgG	1:20	-	-	Biosciences
Myc	Clon 9E10.2	Mouse	IgG	1:300*	-	3 μ g	ATCC
	06-549	Rabbit	IgG	-	1:3000	-	Millipore
RAD51	PC130	Rabbit	IgG	1:50	-	-	Calbiochem
SIX6OS1	R1	Rabbit	IgG	1:100	1:1000	-	Proteogenix
	R2	Rabbit	IgG	1:100	-	-	Proteogenix
SUN1	(M-300) sc-13075	Rabbit	IgG	1:25	-	-	Santa Cruz Biotechnology
SYCE1	17406-1-AP	Rabbit	IgG	1:50	1:1000	-	Proteintech
	-	Guinea pig	IgG	1:100	-	-	Dr. C. Höög
SYCE2	-	Guinea pig	IgG	1:100	-	-	Dr. C. Höög
SYCE3	-	Guinea pig	IgG	1:20	-	-	Dr. R. Benavente
SYCP1	Ab15090	Rabbit	IgG	1:200	-	-	Abcam
SYCP3	sc-74569	Mouse	IgG	1:1000	-	-	Santa Cruz Biotechnology
	K921	Rabbit	Suero	1:500	-	-	Dr. J. L. Barbero
TEX12	-	Rabbit	IgG	1:100	-	-	Dr. R. Benavente

Tabla 8. Anticuerpos primarios utilizados para los protocolos de IF, WB e IP (μg de anticuerpo por cada mg de proteína). El símbolo * indica la dilución aplicada en IFs de células de cultivo adherentes. El resto de diluciones indicadas en esa columna se aplican a IFs en esparcidos o aplastados de gametocitos.

Para las IFs de células de cultivo adherentes, estas se sembraron en placas de 3,5 cm de diámetro sobre un cubreobjetos tratado con gelatina al 0,5% (*Gelatin from cold wáter fish skin*, G7051, Sigma-Aldrich) para favorecer la adhesión celular y se transfectaron (metodología descrita en la sección 4.3.). 48 horas tras la transfección, las células se fijaron añadiendo en la placa 1 mL de PFA al 4% en PBS 1X tras retirar el medio. Tras ello, se incubaron durante 7 minutos a 4°C y se lavaron 3 veces con 2 mL de PBS 1X. Una vez fijadas, los cubreobjetos sobre los que crecieron las células se retiraron de las placas y se pegaron sobre portaobjetos, permeabilizando entonces las células 4 minutos con *buffer* KB (NaCl 0,1M, Tris-HCl 20 mM pH 7,5, BSA 0,1%) suplementado con Tritón X-100 al 0,2%. La permeabilización se inactivó con un lavado de 5 minutos en PBS 1X. A continuación, las células se bloquearon con FBS al 7% en PBS 1X durante 30 minutos a RT en una cámara húmeda. En la misma, las células se incubaron 1 hora a RT con el anticuerpo primario diluido en FBS al 7% en PBS 1X, el cual fue lavado 3 veces en PBS 1X durante 5 minutos. El anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo se diluyó de igual manera en FBS al 7% en PBS y se incubaron las preparaciones con él durante otra hora a RT en la cámara húmeda. Finalmente, se ejecutaron 3 nuevos lavados de 5 minutos en PBS 1X y las preparaciones se montaron con medio de montaje Vectashield® (Vector Laboratories) y DAPI (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sellándolas con esmalte de uñas.

Anticuerpo	Fluorocromo	Referencia	Especie (Host)	Dilución	Proveedor
<i>α-guinea pig</i>	FITC	706-095-148	<i>Donkey</i>	1:100	Jackson Immuno Research
<i>α-human</i>	TRITC	709-025-149	<i>Donkey</i>	1:100	Jackson Immuno Research
<i>α-mouse</i>	Alexa 555	A-32727	<i>Goat</i>	1:200	Thermo Fisher Scientific
	Alexa 488	A-11001	<i>Goat</i>	1:200	Thermo Fisher Scientific
	TRITC	515-025-003	<i>Sheep</i>	1:100	Jackson Immuno Research
	FITC	115-095-146	<i>Goat</i>	1:100	Jackson Immuno Research
<i>α-rabbit</i>	Alexa 555	A-31572	<i>Donkey</i>	1:200	Thermo Fisher Scientific
	Alexa 488	A-32731	<i>Goat</i>	1:200	Thermo Fisher Scientific
	TRITC	711-025-152	<i>Donkey</i>	1:100	Jackson Immuno Research
	Alexa 488	111-547-003	<i>Goat</i>	1:100	Jackson Immuno Research
	Alexa 488-Fab	111-547-003	<i>Goat</i>	1:100	Jackson Immuno Research

Tabla 9. Anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos utilizados en los protocolos de inmunofluorescencia. FITC: Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate*), TRITC: Rodamina.

3.7. Adquisición y análisis de imágenes

Las IFs se visualizaron a temperatura ambiente en un microscopio Leica DM6000b usando un objetivo de 63 aumentos. Las imágenes se adquirieron mediante una cámara digital (ORCA-ER C4742-80, Hamamatsu) y se procesaron con los *softwares* Leica LAS X Life Science, OPENLAB 4.0.3 y Adobe Photoshop CS6. Las preparaciones de los diferentes genotipos utilizadas para los análisis comparativos se procesaron paralelamente para evitar variaciones entre ellas que no sean debidas al propio genotipo de los ratones. Del mismo modo, las preparaciones no se congelaron para evitar diferencias en la señal de fondo y en la inmunoreactividad. Todas las imágenes fueron adquiridas a la misma exposición. La cuantificación del número de *foci* (considerando exclusivamente aquellos asociados a los ejes cromosómicos) se realizó con ayuda del programa Adobe Photoshop CS6. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia (sustrayendo previamente la señal de fondo) se llevó a cabo empleando el *software* ImageJ 1.52a (Wayne Rasband).

4. Cultivos celulares

4.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo

Durante el transcurso de esta Tesis Doctoral, se han llevado a cabo diversos experimentos *in vitro* en los cuales han sido empleadas varias líneas celulares, algunas de ellas ya establecidas y otros cultivos primarios de fibroblastos de ratón. Todas las líneas se sembraron en placas de cultivo (BD Falcon) y se cultivaron en incubadores con atmósfera húmeda a 37°C y CO₂ al 7%. El medio de cultivo utilizado fue DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) suplementado al 10% de FBS y 1% de PSG (*Penicillin-Streptomycin-Glutamine*, Gibco). Cuando las células alcanzaban una confluencia elevada o iban a ser sembradas, se tripsinizaron lavando previamente las placas con PBS 1X para eliminar los restos de FBS y tras ello se trataron con tripsina al 0,05% (Gibco) durante entre 2 y 5 minutos a 37°C. La tripsina se neutralizó añadiendo medio fresco con FBS, y se disgregaron mecánicamente las células con la pipeta. Finalmente, se contaron haciendo uso de una cámara de Neubauer y se sembró el número de células deseado en función del experimento a realizar. Las líneas celulares empleadas fueron:

- HEK 293T: derivada de la línea tumoral de riñón embrionario HEK 293 transformadas con el antígeno T del virus SV40.
- COS-7: derivada de riñón de mono verde africano y transformada con el antígeno T del virus SV40.
- Fibroblastos Embrionarios de Ratón (MEFs, *Mouse Embryonic Fibroblasts*) generados a partir de ratones *H1foo^{+/+}*, *H1foo^{+/-}* y *H1foo^{-/-}*.

Para conservar las células a largo plazo, estas se congelaron en medio de cultivo DMEM suplementado con FBS al 20% y DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich) al 10%, permitiendo un descenso lento y gradual de la temperatura hasta -70°C introduciendo los tubos en un recipiente de congelación MrFrosty™ (Thermo Fisher Scientific) con isopropanol. Finalmente, las células se transfirieron a tanques de nitrógeno líquido (a -180°C).

4.2. Aislamiento de MEFs

Los cultivos primario de MEFs, se generaron a partir de embriones de hembras preñadas a 13,5 dpc. El útero de las mismas se dispuso en una placa de Petri con PBS 1X y cortando su pared se extrajeron los embriones. Tras ello, la cabeza y las vísceras (tejido rojizo: corazón e hígado) se eliminaron, se tomó la cola para genotipar cada embrión (siguiendo el protocolo

descrito en la sección 2.1.1.) y el resto de los embriones se transfirieron a un tubo con 1 mL de tripsina al 0,25%, incubándolos a 4°C durante toda la noche. El día siguiente, los embriones se disgregaron por pipeteo y la solución celular se transfirió a una placa de 10 cm de diámetro con medio DMEM completo y se incubó a 37°C. Cuando los MEFs alcanzaban una confluencia del 100% en la placa (aproximadamente 24 horas después de ser sembrados), se lavaron dos veces con PBS 1X y se tripsinizaron, transfiriéndolos a una placa de 15 cm de diámetro. Una vez alcanzaron de nuevo una confluencia del 100%, los MEFs se congelaron en medio DMEM suplementado con FBS al 20% y DMSO al 10%, preparando 5 crioviales por embrión y considerándolos como “pase 0”.

4.3. Transfección de líneas celulares

Para permitir la expresión transitoria de un plásmido de interés en una línea celular, el día anterior a la transfección se sembraron de tal manera que las células alcanzaran una confluencia cercana al 70% al día siguiente. El número específico de células a sembrar varió, por tanto, dependiendo de la línea celular y el diámetro de la placa con el que se trabajaba (**Tabla 10**).

Línea celular	Placa de cultivo	Número de células	Cantidad de DNA transfectado
HEK 293T	p3,5	$0,5 \cdot 10^6$	1 μg
	p6	$1,2 \cdot 10^6$	3 μg
	p10	$4 \cdot 10^6$	10 μg
COS-7	p3,5	$0,15 \cdot 10^6$	1 μg

Tabla 10. Número de células sembradas el día previo a la transfección para conseguir una confluencia óptima y cantidad total de DNA transfectado en función del tipo celular y del diámetro de la placa.

Para la transfección, se diluyó la cantidad requerida de DNA a transfectar (indicada en la **Tabla 10**, dependiendo del diámetro de placa y línea empleada) en 100 μL (para las placas p3,5 y p6) o 250 μL (para las p10) de NaCl 150 mM (filtrado por filtro de 0,2 μm , Polyplus). En otro tubo, para cada condición se disolvieron (en el mismo volumen de NaCl 150 mM que el utilizado en la mezcla de DNA) el doble de microlitros de jetPEI® (Polyplus) que los microgramos de DNA a transfectar. Esta mezcla (conteniendo el jetPEI®) se añadió sobre los tubos que contenían el DNA (nunca en orden inverso) y los tubos se mezclaron vigorosamente con ayuda de un vórtex, dejándolos incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, la mezcla se añadió sobre las placas cuidadosamente por goteo y se repartió por la superficie mediante agitación suave, devolviendo las placas al incubador a 37°C. Pasadas 24 horas desde el momento de la transfección, se renovó el medio de cultivo y, al día siguiente, se extrajeron las proteínas con (siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.5.2.) o se llevó a cabo una IF sobre las células como se indica en la sección 3.6.

4.4. Transducción retroviral de MEFs y generación de iPSCs

Para la generación de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs, *Induced Pluripotent Stem Cells*), se infectaron MEFs con partículas retrovirales generadas previamente en células HEK 293T. Para ello, se sembraron $4 \cdot 10^6$ HEK 293T en placas p10 y se transfectaron con 6 μg de cada uno de los vectores (pMXs) portadores de las secuencias codificantes para tres de los factores de Yamanaka (KLF4, OCT4 y SOX2) (K. Takahashi & Yamanaka, 2006) junto a 5 μg del vector empaquetador pCL-Eco. Como control positivo, otra placa fue transfectada con 6 μg del plásmido pLIB. Al día siguiente, se plaquearon $2,6 \cdot 10^6$ MEFs (en pase 2 o 3) en placas de 6 cm de diámetro. El medio de las placas de cultivo en las que se encontraban creciendo las células HEK 293T se recogió 48, 60 y 72 horas tras la transfección, se centrifugó a 4000 rpm durante 8 minutos y el

sobrenadante se filtró con ayuda de un filtro de 0,45 μm , permitiendo de esta manera la recolección específica de las partículas virales en suspensión. Este medio se suplementó con polibreno (4-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se añadió a las placas en las que se habían sembrado los MEFs. Tras la tercera y última infección, los MEFs transducidos se crecieron en medio de iPSCs: DMEM, KSR 15% (Invitrogen), aminoácidos no esenciales (MEM NEE 100X, Gibco), PSG 1%, β -mercaptoetanol 50 mM, LIF 1000 unidades/mL (LIF) y puomicina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El medio fue renovado cada día, hasta que se observó la aparición de colonias de iPSCs (redondeadas, brillantes y con borde definido) en torno a 14 días después de la infección. Entonces, las colonias se tiñeron con el kit AP (Merck) para detectar actividad fosfatasa alcalina, marcador típico de iPSCs y se contaron manualmente el número de colonias para cada condición.

5. Análisis estadístico

Los resultados numéricos presentados en este trabajo se indican como media \pm desviación estándar. Con el fin de comparar datos entre diferentes condiciones, se ejecutaron análisis estadísticos de tipo Welch's *t*-test (*t*-test con varianzas desiguales) ya que los datos de las cuantificaciones no estaban excesivamente desviados (es decir, se aproximaban razonablemente a una distribución normal y, en la mayoría de los casos, los grupos presentaban varianzas desiguales). Se aplicó una prueba *two-sided* (dos colas) en todos los casos. Los asteriscos indican la significatividad estadística: ***: *p*-valor < 0,001; **: *p*-valor < 0,01; *: *p*-valor < 0,05; n.s.: *p*-valor \geq 0,05 (sin diferencias significativas). El análisis estadístico se llevó a cabo con ayuda del programa GraphPad Prism 7.

6. Anexo metodológico

Para el desarrollo de la presente tesis doctoral, más específicamente para el estudio de las interacciones multivalentes existentes entre las proteínas SYCE1 y SIX6OS1, componentes del SC, ha sido necesaria la colaboración con el grupo de investigación liderado por el Dr. Owen R. Davies (Universidad de Newcastle, Reino Unido). En su laboratorio se han llevado a cabo las técnicas que se describen a continuación.

6.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Las secuencias humanas codificantes para los distintos productos de SYCE1 se clonaron en los vectores pHAT4 y pMAT11 para su expresión en bacterias como proteínas de fusión junto a los *tags* His- y His-MBP (*Maltose-Binding Protein*) con sitios de corte TEV (*Tobacco Etch Virus*) para la escisión de las proteínas de fusión. Las secuencias humanas codificantes para las distintas regiones de SIX6OS1 se clonaron en el vector pRSF-Duet1 asociadas al *tag* MBP en su dominio N-terminal eliminable por escisión mediante sitios TEV, permitiendo así la coexpresión con SYCE1. Las proteínas se expresaron en la cepa BL21(DE3) de *E. coli* (Novagen) en presencia de medio 2XYT (*Yeast extract Tryptone*). La expresión de los constructos se indujo con la adición de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) incubando las células a 25°C durante 16 horas. Las células se lisaron por sonicación en Tris HCl 20 mM (pH 8,0) y KCl 500 mM, seguido de una centrifugación. El sobrenadante se pasó por una columna de cromatografía de afinidad de amilosa (New England Biolabs) y se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico HiTrap Q HP (GE Healthcare). Los *tags* His- y His-MBP/MBP se eliminaron por incubación con la proteasa TEV a 4°C durante 16 horas. Las proteínas escindidas se purificaron mediante cromatografía de intercambio aniónico HiTrap Q HP (GE Healthcare) seguida de cromatografía por exclusión de

tamaño (HiLoad 16/600 Superdex 200, GE Healthcare). Las proteínas y complejos purificados se concentraron haciendo uso de kits de filtro centrifugo Microsep Advance 3 kDa (PALL) y se almacenaron a -80°C . Las muestras proteicas se analizaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida teñida con Coomassie. Los pesos moleculares de las proteínas y los coeficientes de extinción se calcularon haciendo uso del servidor ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) y la concentración proteica se determinó mediante un espectrofotómetro Cary 60 UV (Agilent).

6.2. Dicroísmo circular

Los espectros obtenidos por dicroísmo circular (CD, *Circular Dichroism*) en el ultravioleta lejano se recogieron utilizando un espectropolarímetro (Institute for Cell and Molecular Biosciences, Universidad de Newcastle). Las exploraciones de longitud de onda se realizaron a 4°C desde 260 a 185 nm a intervalos de 0,2 nm utilizando una cubeta de cuarzo de 0,2 mm de longitud de paso (Hellma). Las muestras proteicas se midieron desde 0,2 mg/mL a 0,4 mg/mL en Na_2HPO_4 10 mM (pH 7,5) y NaF 150 mM. Se tomaron nueve medidas para cada muestra, se promediaron, se corrigieron con tampón y se convirtieron a valores de elipticidad media de los residuos (MRE, *Mean Residue Ellipticity*) ($[\theta]$) ($\cdot 1000 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ por residuo). Las deconvoluciones de los espectros se realizaron mediante el algoritmo Dichroweb CDSSTR (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk>). Las curvas de desnaturalización térmica se registraron a 222 nm a intervalos de $0,5^{\circ}\text{C}$ entre 5°C y 95°C manteniendo una rampa de temperatura de $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. Las proteínas se midieron a 0,1 mg/mL en Tris HCl 20 mM (pH 8,0), KCl 150 mM y ditiotreitól (DTT) 2mM, utilizando una cubeta de cuarzo de 1 mm de longitud de paso (Hellma). Los datos se graficaron como porcentaje sin plegar después de la conversión a MRE ($([\theta]_{222,x} - [\theta]_{222,5}) / ([\theta]_{222,95} - [\theta]_{222,5})$). La temperatura de *melting* (T_m) se determinó como aquella a la que las proteínas se encontraban sin plegar al 50%.

6.3. Cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz multiángulo

El análisis de las proteínas por cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz multiángulo (SEC-MALS, *Size Exclusion Chromatography with Multiangle Light Scattering*) se llevó a cabo a concentraciones de entre 5 mg/mL y 20 mg/mL en Tris HCl 20 mM (pH 8,0), KCl 150 mM y DTT 2 mM. Las muestras se cargaron en una columna Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) a razón de 0,5 mL/minuto mediante un sistema ÄKTA Pure (GE Healthcare). El eluido se introdujo en un detector DAWN HELEOS II MALS (Wyatt Technology), seguido de un refractómetro diferencial Optilab T-rEX (Wyatt Technology). Los datos de SEC-MALS se recopilaron y analizaron mediante el software ASTRA 6 (Wyatt Technology), utilizando la extrapolación en forma de gráfico de Zimm con un valor de $0,185 \text{ mL/g dn/dc}$ para determinar los pesos moleculares absolutos de las proteínas.

6.4. Cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de rayos X de ángulo pequeño

Los experimentos de cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SEC-SAXS, *Size Exclusion Chromatography with Small-Angle X-Ray Scattering*) se llevaron a cabo en la línea de haz B21 del sincrotrón Diamond Light Source (Oxfordshire, Reino Unido). Las muestras proteicas (en concentraciones de entre 6 mg/mL y 20 mg/mL en Tris HCl 20 mM pH 8,0 y KCl 150 mM) se cargaron en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) a razón de 0,5 mL/minuto utilizando un sistema

de cromatografía líquida de alto rendimiento Agilent 1200. El eluido se hizo pasar por la célula experimental y los datos SAXS se registraron a 12,4 keV en franjas de 3,0 segundos con una distancia del detector de 4,014 m. Se utilizó la interfaz ScÅtter 3.0 para restar y promediar las franjas y realizar el análisis de Guinier para el radio de giro (R_g) y el R_g transversal (R_c). Las distribuciones $P(r)$ se ajustaron con PRIMUS. El modelado *ab initio* se realizó con el programa DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) imponiendo la simetría P1. Se promediaron veinte *runs* independientes. Se utilizó el *software* PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 (Schrödinger, LLC) para generar imágenes de los modelos SAXS *ab initio*.

6.5. Yeast two-hybrid

Las secuencias humanas codificantes para SYCE1 y SIX6OS1 se clonaron en los vectores pGBKT7 y pGADT7 (Clontech). Los ensayos de Y2H se llevaron a cabo empleando el sistema Matchmaker Gold (Clontech) siguiendo las indicaciones del fabricante. La cepa de levaduras Y187 se transformó con los vectores pGBKT7, mientras que la cepa Y2HGold fue transformada con los vectores pGADT7. Las transformaciones se llevaron a cabo utilizando protocolos estandarizados requiriendo acetato de litio. El apareamiento de las diferentes cepas de levaduras se llevó a cabo en 0,5 mL de medio YPDA 2X a 30°C y 40 rpm. Tras 24 horas, los cultivos se centrifugaron y las células se resuspendieron en YPDA 0,5X. Entonces, las levaduras se plaquearon en medio SD/-Trp/-Leu para seleccionar las colonias en las que ha habido apareamiento y en medio SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His suplementado con X- α -Gal para detectar apareamiento mediante la activación de los genes reportero ADE1, HIS3 y MEL1. Las placas se incubaron durante 5 días a 30°C.

RESULTADOS



1. Caracterización *in vivo* de la mutación c.613C>T de *SYCE1* asociada a POF

La correcta progresión de la meiosis depende del ensamblaje del SC, el andamio proteico supramolecular que media la sinapsis entre los cromosomas homólogos durante la primera profase meiótica y promueve la formación de los COs. Las mutaciones en las proteínas del SC se asocian con infertilidad humana, aborto espontáneo recurrente y aneuploidías (Geisinger & Benavente, 2016; Handel & Schimenti, 2010). Aunque es poco probable que las mutaciones individuales causantes de infertilidad se generalicen dentro de una población, estas pueden encontrarse en familias, especialmente cuando son consanguíneas (Caburet et al., 2014). En la presente Tesis Doctoral, llevamos a cabo un análisis del mecanismo molecular responsable del POF en mujeres pertenecientes a una misma familia en las que se encontró por secuenciación una mutación en *SYCE1*, uno de los componentes del CE del SC.

1.1. Generación del modelo murino mutante *Syce1*^{POF/POF}

El gen *SYCE1* humano se localiza en el cromosoma 10 y se compone de 13 exones que codifican una proteína de 351 aminoácidos. *SYCE1* forma parte del CE del SC y presenta un núcleo o *core* estructural comprendido entre los aminoácidos 25 y 179 de su secuencia humana (Figura 7). Este *core* se dispone formando una α -hélice y es el responsable la homodimerización de *SYCE1* (Dunne & Davies, 2019b). En los últimos años, se han identificado tres mutaciones autosómicas recesivas en *SYCE1* en dos familias afectas de NOA y una afectada de POF (L. De Vries et al., 2014; Maor-Sagie et al., 2015; Pashaei et al., 2020). Las dos mutaciones identificadas en los hombres con NOA alteran el *splicing* de *SYCE1* y suponen la eliminación de parte de su núcleo estructural (Figura 7) (Dunne & Davies, 2019b). La disrupción de la conformación homodimérica característica de *SYCE1* a consecuencia de la alteración de su *core* estructural podría explicar el fenotipo infértil asociado a estas mutaciones. Por otro lado, dos hermanas diagnosticadas con POF portan en homocigosis la mutación c.613C>T (también referida como c.721C>T) en *SYCE1* (L. De Vries et al., 2014). El modelado *in silico* de la mutación genera un codón de STOP prematuro a la altura de la glutamina 241 (p.Gln241*), dando lugar a un producto truncado de *SYCE1* de solo 240 aminoácidos (en contraste con los 351 que lo componen en la forma canónica silvestre) (Figura 7). Sin embargo, dado que esta mutación no afecta al núcleo de *SYCE1*, el mecanismo molecular que se encuentra alterado y que por tanto es el responsable de la infertilidad en estas pacientes permanecía sin ser descrito al comienzo de esta Tesis Doctoral.

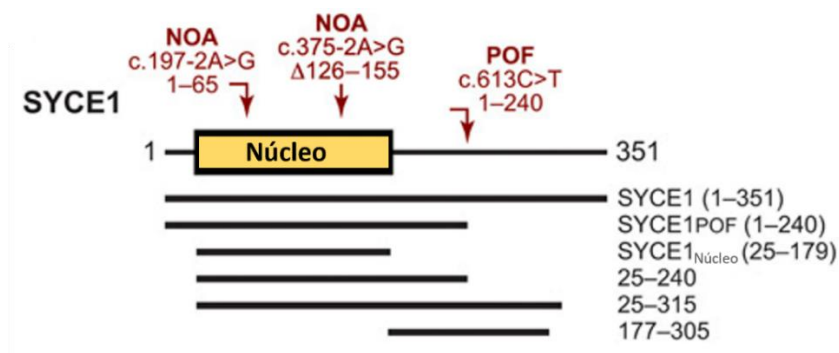


Figura 7. Representación esquemática de la secuencia codificante para *SYCE1* en humanos, indicando la localización y consecuencia biológica de las mutaciones descritas asociadas a infertilidad. Bajo la secuencia *full-length* de *SYCE1* se indican esquemáticamente los constructos desarrollados por el Dr. Owen Davies y su equipo que han sido empleados en este estudio.

Para determinar las consecuencias funcionales y estructurales de la mutación de *SYCE1* que provoca POF en humanos y así estudiar su impacto en la dinámica del SC y regulación meiótica *in vivo*, desarrollamos (empleando la tecnología CRISPR/Cas9) un modelo murino que mimetizase la mutación identificada en las pacientes de POF. Dicha mutación genera un codón de STOP prematuro a la altura del residuo 243 (p.Gln243*) de la secuencia murina de *Syce1*, estando dicha posición aminoacídica conservada en humano y ratón (**Figura 8**).

Q8N0S2 SYCE1_HUMAN	MAGRSLTSKA--EPTAGAVDRAEKAGGQDTSSQKIEDLMEMVQKLQKVGSLPEPRVEVLINR	59
Q9D495 SYCE1_MOUSE	MATRPQPLGMEPEGASADLLHGPEGARGQYGSTQKIEDLMDMVKLLQKVGSLPEPRVEVLINR	61
A0A2I3SHS9 A0A2I3SHS9_PANTR	MAGRSLTSKA--EATAGAMDRAEKAGGQDTSSQKIEDLMEMVQKLQKVGSLPEPRVEVLINR	59
Q32LK9 SYCE1_BOVIN	MAGRPGSS-N--AEAAGAVGPTDEARGQAESSQKIEDLMEMVQKLQKVGSLPEPRVEVLINR	58
F1SCT5 F1SCT5_PIG	MAGRPGPS-S--EESAGALGRAGEAGGQAQSSQKIEDLMEMVQKLQKAGSLEPKVEVLINR	58
F1PG50 F1PG50_CANLF	-----MEPAEKAGGQAQSSQKIEDLLEMVQKLQKAGSLEPRVEVLINR	43
F7BBC0 F7BBC0_ORNAN	ME-----KNQDDQSRSLGMRKAMEHTEYKVEAEDLVMLVEKQLKAGTLEPRIEDLI I K	54
G3W340 G3W340_SARHA	-----KMEEMISI	8
H3ALY1 H3ALY1_LATCH	FELARVPLGGKAAAVGGLLFHPSPGVRGNEESRLELEDLLKIVKELKQAGKTVPRIEELVK K	61
K7FPR7 K7FPR7_PELSI	-----GTLEPRMDDLVGGR	13
::: ::		
Q8N0S2 SYCE1_HUMAN	INEVQQAKKKANKDLGEARTICEALQKELDLSLHGKVKHLKEILSKKQETLRILRLHCQ E KE	120
Q9D495 SYCE1_MOUSE	INEVQQAKKKASEELGEAQTVDNQLKELDLLREKVRKLDILNRKQETLRIMQLHCQ E KE	122
A0A2I3SHS9 A0A2I3SHS9_PANTR	INEVQQAKKKANKDLGEAWTICEALQKELDLSCKRGPVA-----LPTETLRILRLHCQ E KE	114
Q32LK9 SYCE1_BOVIN	INEVQQAKKKASEELGDARTVWETLQKELDLSLGEKVRKLEILSKKQETLRVLRHCQ E KE	119
F1SCT5 F1SCT5_PIG	INEVQQAKKKASEELGEARTVWETLQKELDLSLGEKVRKLEILSKKQETLRILRLHCQ E KE	119
F1PG50 F1PG50_CANLF	INEVQQAKKKASEELGEARTVWELALQKEMDLSLGEKVRKLEILNKKQETLRILRLHCQ E KE	104
F7BBC0 F7BBC0_ORNAN	IKDLQRVRKNANEELLKTRAHSEALQRELDLNAEKALHEEILNQKQETLMMRLQCE E K Q	115
G3W340 G3W340_SARHA	ISLQQAQRCRTNEELQRNQLKMETLKEELDKNLEMIQLEETLNMKQGTLLLLQERRR E E E	69
H3ALY1 H3ALY1_LATCH	LKQLQQGKNAVDEELCEARKCREALQKELDLSAESFHLLEEIYNKKKETLQLLQFQYKE R	122
K7FPR7 K7FPR7_PELSI	LRKLQRAKQALSQELQDSQARSKELQEELEERCFFHPPSWEEICSQKQLLRQLRSQ E TE	74
: .:* : . . :.* : . * : . * : . * : . * : . * : . * : . * : . * : . :		
Q8N0S2 SYCE1_HUMAN	SEHRKH--TMLQECKERI SALNLQIEEEKNKQQLRLAFEEQLEDLMGQHKDLWDFHMP E	179
Q9D495 SYCE1_MOUSE	SEAQRKH--SMLQECKERI SFLNSQIDKEKAKLRKLRLDFFEEHLETLMSQHKDTLEFHKP E	181
A0A2I3SHS9 A0A2I3SHS9_PANTR	SEHRKH--TMLQECKERI SALNLQIEEEKNKQQLRLAFEEQLEDLMGQHKDLWDFHRP E	173
Q32LK9 SYCE1_BOVIN	NEAQRKQ--TMLQECKERI SALNSQIEEKNKQQLRLDFEEQLEDLMGQYKDLWDFHFKP E	178
F1SCT5 F1SCT5_PIG	SEAQRKQ--TMLQECKERI SALNSQIEEKNKQQLRLDFEEQLEDLMGQHKDLWDFHFKP E	178
F1PG50 F1PG50_CANLF	SEAQRKH--TMLQECKERI SALNSQIEEKNKQQLRLDFEEQLEDLMGQHKDLWDFHGP E	163
F7BBC0 F7BBC0_ORNAN	AEAQRQD--EVSQGGKQRIEELTSKIQEEKLKQRKQRMEDDQLEEMMEKHKSLWDFHTS E	174
G3W340 G3W340_SARHA	KKALRQQ--TTSMECLQNVATLNAKIQEELKRRKKLRKEFEQQLEELMQKHKELMEFHTP Q	128
H3ALY1 H3ALY1_LATCH	NEIKRQL--NHSEGCKQQRVEQITSQIQEELKRRKQRMFEMQLEELMEKHKSTWDFHNE	181
K7FPR7 K7FPR7_PELSI	AEGQRLGCSGLTQERKQHIEBELAKIQEELKQRKHRLEFEQLLGELMGEHQSL-----E	131
: * : . : . : . * : . * : . * : . * : . * : . * : . * : . * : . :		
Q8N0S2 SYCE1_HUMAN	RLAKEICALDSSKEQLLKEEKLVKATLEDVVKHQLCSLCGA----EGPSTLDEGLFLRSQEA	236
Q9D495 SYCE1_MOUSE	HLTKEMCVLDSKSKEQLLKEEKLKMKVKLEDVQRQLCALGGP----EGSSSLIEGLFLRSHEA	238
A0A2I3SHS9 A0A2I3SHS9_PANTR	RLAREICALDSSKEQLLKEEKLVKATLEDMKHQLCSLCGA----EGPSTLDEGLFLRSQEA	230
Q32LK9 SYCE1_BOVIN	RLALEISTLDSGKEQLLKEEKLVEAKLEDVKHRLCSQFGA----KGH-TINEGLFLRSPEA	234
F1SCT5 F1SCT5_PIG	QLALEIDALDLSNKEQLLKEEKLVEAKLEDVKHRLCSQFGA----KGCSTITEGLFLRSQEA	235
F1PG50 F1PG50_CANLF	QMAREIDTLDSSKEHLLKEEKLVEAKLEDVKHRLCSQFGA----DGCSTIAEGLFLRSQEA	220
F7BBC0 F7BBC0_ORNAN	SLAREISNIEDSKHLLNEEKVQKIEDIMKQLETLTSQ-----PGAADFSEGLFLRSEEA	230
G3W340 G3W340_SARHA	RLLEISNLMLTKEQLLEEEKAQVEKLDALQIADLPAMFTKEEMMDEGTESVFLHSKEA	189
H3ALY1 H3ALY1_LATCH	SLKKEICNIENAKQQLFSEEKMLQKQLQNLNLEKEINSLRH-----AGVAFNEEDVFLRSQEA	237
K7FPR7 K7FPR7_PELSI	KLAAEIHSMAESKEHLLSDRLIQASLAQVEKQLDLSLPQ-----ARAALSQERMFLKSQEA	185
: * : . : . * : . * : . * : . * : . * : . * : . * : . * : . * : . :		
Q8N0S2 SYCE1_HUMAN	AATVQLFQEHRKAEELAAAAQRHQQLQKQKQQQQK--RQLKKEELEKHKGMQVPAQAQS	295
Q9D495 SYCE1_MOUSE	AAAMQMFKDENKKAEEFLAAAAQQHEQLQQRCHQLQK--RQLKKEELEKHKGVQILAHSTQ	297
A0A2I3SHS9 A0A2I3SHS9_PANTR	AATVQLFQEHRKAEELAAAAQRHQQLQKQKQQQQK--RQLKKEELEKHKGMQVPAQAQS	289
Q32LK9 SYCE1_BOVIN	AAVVHLFEEENRKAQELLEAAAAQRQEQLQKQKQQQLQK--RQLKKEELEKLVQVLAQAQS	293
F1SCT5 F1SCT5_PIG	AAVVHLFEEENRKAQELLLGAAQRQEQLQKQKQQQLQK--RQLKKEELEKLVQVPAQSQSR	294
F1PG50 F1PG50_CANLF	AAVVHLFEEENRKAQGLLDAATHHEQLQKQKQQQLQK--RQLKKEELEKLVQVPAQAQS	279
F7BBC0 F7BBC0_ORNAN	IAAVHLFEEENEKATEFLEAASRHHLELQKQYQR-----	269
G3W340 G3W340_SARHA	AATMHLFEEENKAMEFLEAASQYEMVQKQSL-----	227
H3ALY1 H3ALY1_LATCH	AVTKQLFEEENQSVKSLQRASQRHFEQLQKCN-----	275
K7FPR7 K7FPR7_PELSI	STALQLFQENKSA TEHLEAASLRHSELQKQYKRQLFQENKSA TEHLE-----	239
.. :.* : . * : . * : . * : . * : . * : . * : . * : . * : . * : . * : . :		
Q8N0S2 SYCE1_HUMAN	TQEEAGPGDVASPKPLKGERPGAA---HQAGPDVLIQGEDTLHPDLSPRGFQEI KE L F	351
Q9D495 SYCE1_MOUSE	--NEEDSSWRMASPKFVEVHEETAQDQERPSRT-----	329
A0A2I3SHS9 A0A2I3SHS9_PANTR	TQEEAGPGDVASPKPLKGERPGAA---LQAGPDVLIQGEDTLHPDLSPRGFQEI KE L F	345
Q32LK9 SYCE1_BOVIN	KQEEAGLGEAANPKPLGVSEEEKDQEPSTK-----	323
F1SCT5 F1SCT5_PIG	KQEEGASPGEAANPKTLGVSEEEKDPELP I K Q G L M S S -----	330
F1PG50 F1PG50_CANLF	KQEEGAGPGEPANPKLLGV I Q E K D P E M P T K E G P M S -----	315
F7BBC0 F7BBC0_ORNAN	-----	
G3W340 G3W340_SARHA	-----	
H3ALY1 H3ALY1_LATCH	-----	
K7FPR7 K7FPR7_PELSI	-----	

Figura 8. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de SYCE1 en diferentes especies de vertebrados. Las especies analizadas, su identificación en la figura y su código UniProt son: *Homo sapiens* (HUMAN, Q8N0S2), *Mus musculus* (MOUSE, Q9D495), *Pan troglodytes* (PANTR, A0A2I3SHS9), *Bos taurus* (BOVIN, Q32LK9), *Sus scrofa* (PIG, F1SCT5), *Canis lupus familiaris* (CANLP, F1PG50), *Ornithorhynchus anatinus* (ORNAN, F7BBC0), *Sarcophilus harrisii* (SARHA, G3W340), *Latimeria chalumnae* (LATCH, H3ALY1) y *Pelodiscus sinensis* (PELSI, K7FPR7). Las secuencias de SYCE1 humana y murina presentan una identidad total del 65% (similitud del 78%), aunque la identidad y similitud de su núcleo estructural asciende al 74% y 87%, respectivamente. El residuo afectado en la mutación POF (c.613C>T) se encuentra conservado entre humano y ratón (p.Gln241* y p.Gln243*, respectivamente), y se indica en verde en la figura.

La humanización del locus murino codificante para SYCE1 da lugar a un codón de STOP prematuro sustituyendo la posición aminoacídica Gln243 de la secuencia murina (equivalente a la posición Gln241 de la secuencia humana), y simula la variante proteica truncada de SYCE1 que se genera en las pacientes con POF (Figura 9).

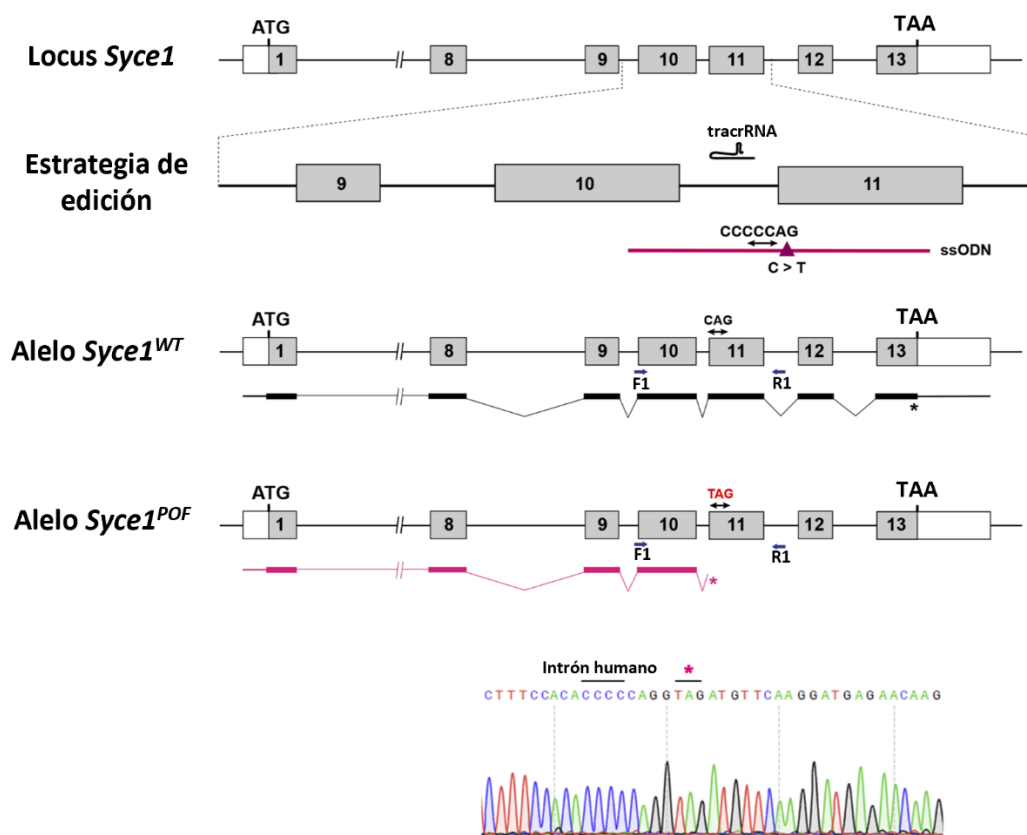


Figura 9. Generación del modelo murino *Syce1*^{POF/POF}. Representación esquemática del locus *Syce1* murino y la estrategia de edición genómica empleada. Se muestra el tracrRNA localizado en el intrón 10 y el ssODN dirigido a la región entre los exones 10 y 11 portando la mutación puntual (c.613C>T, p.Gln243*) a introducir, generando el codón de STOP justo al comienzo del exón 11. Además, el motivo PAM se sustituyó por la secuencia del extremo 3' del intrón humano para evitar un nuevo corte de la Cas9 tras la integración del molde en el genoma (ver Tabla 3 en la sección de "Materiales y Métodos"), la secuencia murina caCTATcag se mutó por la secuencia humana caCCCCcag). Las regiones codificantes (cajas grises) y no codificantes (cajas blancas) se representan en los diagramas alélicos. Las líneas finas (secuencias no codificantes) y gruesas (secuencias codificantes) ubicadas bajo los exones representan los transcritos esperados derivados de los alelos WT (negro) y mutante (rosa). El codón de STOP propio (*negro) y el prematuro generado en el transcrito editado (*rosa) se indican en el esquema. Los oligonucleótidos empleados para el genotipado de los animales (F1 y R1) se representan con flechas bajo los alelos. En la parte inferior del panel se dispone la secuencia nucleotídica obtenida por secuenciación Sanger a partir de la PCR de genotipado del ratón *Syce1*^{POF/POF}.

Para analizar la fertilidad de los mutantes generados, establecimos diversos cruces de ratones heterocigotos (designados *Syce1*^{+/*POF*}) con otros individuos heterocigotos y con homocigotos mutantes (*Syce1*^{*POF/POF*}) (Tabla 11). Ningún mutante *Syce1*^{*POF/POF*} fue capaz de reproducirse, lo que demuestra que tanto los machos como las hembras homocigotas mutantes son infértiles, replicando el patrón de herencia autosómico recesivo de la mutación asociada a POF en humanos (L. De Vries et al., 2014).

Sexo	Genotipo	Nº de camadas	Nº crías / camada	Desviación estándar
Machos	<i>Syce1</i> ^{+/<i>POF</i>}	22	7,68	2,16
	<i>Syce1</i> ^{<i>POF/POF</i>}	0	(0)	(0)
Hembras	<i>Syce1</i> ^{+/<i>POF</i>}	22	7,68	2,16
	<i>Syce1</i> ^{<i>POF/POF</i>}	0	(0)	(0)

Tabla 11. Análisis de la frecuencia y tamaño de camadas obtenidas a partir del cruce de los individuos de los genotipos con individuos *Syce1*^{+/*POF*} del sexo opuesto durante 18 meses.

Con el fin de caracterizar el modelo murino de infertilidad generado, llevamos a cabo un análisis de la expresión de SYCE1 en los testículos de los ratones mutantes. Desde un punto de vista anatómico, los ratones *Syce1*^{*POF/POF*} presentan una reducción del 63% (n=3) del tamaño testicular con respecto a los ratones silvestres *Syce1*^{+/*+*} a los 2 meses de edad (Figura 10a). Mediante un análisis por RT-qPCR, pudimos detectar la presencia del transcrito de *Syce1* en los testículos de los ratones mutantes homocigotos, aunque a un nivel de expresión reducido en comparación con el producto WT (Figura 10b y Tabla 12). A su vez, analizamos mediante *Western blot* (WB) los extractos proteicos de testículo, lo que nos permitió detectar un producto proteico (referenciado como SYCE1_{POF}) del peso molecular esperado. De manera similar a lo observado en el análisis transcripcional, el producto proteico presenta unos niveles de expresión muy reducidos con respecto a la versión WT (Figura 10c). Este hecho contrasta con la dinámica de expresión de la versión mutante en un sistema heterólogo *in vitro*: la sobreexpresión del producto proteico codificado por *Syce1*_{POF} en células HEK 293T no mostró diferencias en términos de intensidad de expresión con respecto a la secuencia WT (Figura 10d).

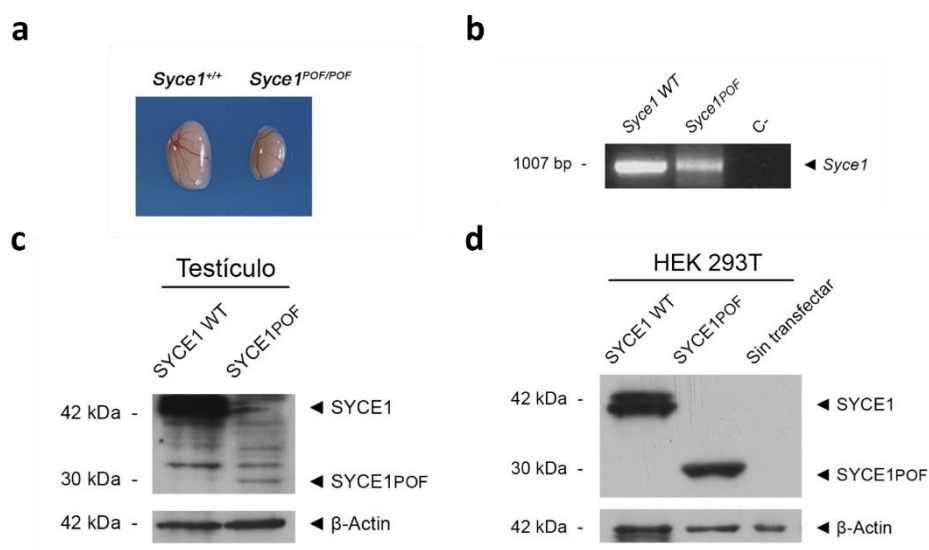


Figura 10. Análisis de la expresión de *Syce1* en testículos WT y mutantes. a) Testículos de ratones silvestres *Syce1*^{+/*+*} y mutantes *Syce1*^{*POF/POF*} mostrando la reducción del tamaño testicular. b) Amplificación mediante RT-qPCR del cDNA codificante para los transcritos *Syce1* WT y *Syce1*_{POF} utilizando como molde RNA de testículo de

ratón. El último carril (C-) es el control negativo del experimento (en el cual no se aporta cDNA para la amplificación). **c)** Análisis mediante WB de los extractos proteicos procedentes de ratones *Syce1^{+/+}* y *Syce1^{POF/POF}* a 13 dpp empleando un anticuerpo específico reconocedor de SYCE1. Se analizó la expresión de β -Actin como control de carga. **d)** Análisis mediante WB de los extractos proteicos generados a partir de células HEK 293T transfectadas con plásmidos codificantes para las secuencias proteicas murinas de SYCE1 WT y SYCE1_{POF}, empleando un anticuerpo específico reconocedor de SYCE1. Se analizó la expresión de β -Actin como control de carga.

Genotipo	<i>Syce1</i>					β -Actin					2 ^{-Ct} norm.	Ratio WT/POF
	Ct ₁	Ct ₂	Ct ₃	Ct _m	2 ^{-Ct}	Ct ₁	Ct ₂	Ct ₃	Ct _m	2 ^{-Ct}		
<i>Syce1^{+/+}</i>	25,09	25,58	24,60	25,09	2,80·10 ⁸	16,55	16,65	16,87	16,69	9,46·10 ⁶	2,96·10 ³	46,96
<i>Syce1^{POF/POF}</i>	29,27	29,20	30,00	29,49	1,33·10 ⁹	15,17	15,40	16,04	15,54	0,10·10 ⁵	6,30·10 ⁵	

Tabla 12. Análisis mediante qPCR de la expresión relativa de los transcritos *Syce1* y *Syce1_{POF}* en los testículos de ratones WT y mutantes homocigotos. La expresión de β -Actin se cuantificó para normalizar los valores de transcripción de *Syce1*. El RNA empleado como molde se extrajo de ratones *Syce1^{+/+}* de 13 dpp de edad y *Syce1^{POF/POF}* adultos de 3 meses de edad, de tal forma que presentasen un contenido celular comparable (mostrando espermatoцитos en zigoteno tardío como el tipo celular más avanzado en la división meiótica). Ct: Ciclo umbral (*cycle threshold*), Ctm: Ciclo umbral medio. 2^{-Ct} norm.: valor de 2^{-Ct} normalizado.

1.2. Los ratones *Syce1^{POF/POF}* presentan defectos en el ensamblaje del SC y en la reparación de DSBs

Dados los defectos en fertilidad observados en los ratones mutantes, nuestro siguiente objetivo fue caracterizar en detalle la progresión meiótica en los mismos. En primer lugar, procedimos a evaluar el mecanismo de infertilidad en las hembras *Syce1^{POF/POF}*, para lo que llevamos a cabo un análisis histológico de los ovarios tanto de hembras a 5 dpp como adultas (2 meses de edad). En ambos casos, los resultados mostraron una ausencia de folículos en los ovarios de las hembras mutantes (**Figura 11a**). A continuación, analizamos mediante inmunofluorescencia en esparcidos de oocitos la dinámica de ensamblaje del SC, evaluando inicialmente la distribución de las proteínas del SC SYCP3 y SYCP1. Al final del leptoteno, SYCP1 comienza a cargarse a los ejes cromosómicos de los oocitos silvestres, constituyendo el entramado molecular que permite el futuro ensamblaje del resto de componentes del SC. Por el contrario, los oocitos *Syce1^{POF/POF}* presentan una reducción en los niveles de SYCP1 en los ejes cromosómicos en comparación con los oocitos WT y sufren un bloqueo meiótico caracterizado por la ausencia de sinapsis entre cromosomas homólogos (**Figura 11b**). Además, esta señal residual de SYCP1 presenta un patrón de carga aberrante en los oocitos mutantes, apareciendo a lo largo de toda la longitud de los ejes cromosómicos (**Figura 11b**). Para evaluar la dinámica de ensamblaje del CE del SC en los mutantes POF, llevamos a cabo dobles inmunofluorescencias de SYCP3 y cada una de las proteínas que lo componen. En los ratones silvestres, SYCE3, SYCE1 y SIX6OS1 se localizan en las regiones sinapsadas entre los cromosomas homólogos a partir del estadio de zigoteno temprano, mientras que SYCE2 y TEX12 presentan un patrón de carga ligeramente posterior (Davies et al., 2012; Fraune et al., 2012). Los ejes de los oocitos mutantes presentan una reducción significativa en la carga de SYCE3 en el estadio del bloqueo en comparación con los niveles existentes en las paquinemas silvestres (**Figura 11c**).

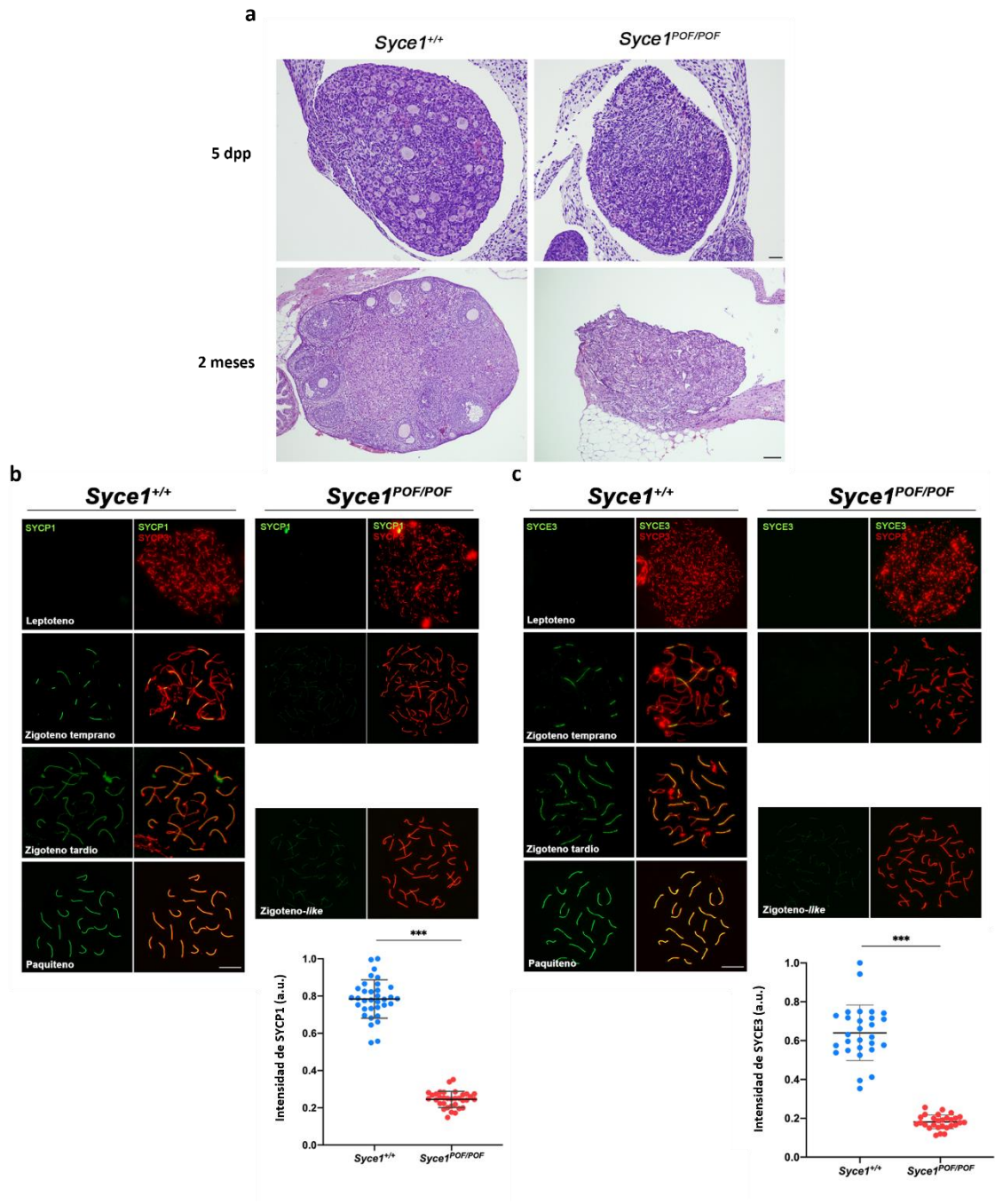


Figura 11. Los oocitos *Syce1*^{POF/POF} presentan un ensamblaje alterado del SC. **a)** Secciones histológicas de ovarios de ratonas *Syce1*^{+/+} y *Syce1*^{POF/POF} teñidas con hematoxilina-eosina, mostrando la inexistencia de folículos en desarrollo tanto a los 5 dpp (panel superior) como a los 2 meses de edad (panel inferior) en las hembras mutantes. Barras de escala, 20 μ m (panel superior) y 50 μ m (panel inferior). **b)** Doble inmunofluorescencia de SYCP3 (rojo) y SYCP1 (verde) en oocitos embrionarios (17,5 dpc) *Syce1*^{+/+} en leptoteno, zigoteno temprano, zigoteno tardío y paquiteno y en oocitos *Syce1*^{POF/POF} en leptoteno, zigoteno temprano y zigoteno-like. Los oocitos mutantes no alcanzan un estadio de sinapsis completa entre los cromosomas homólogos y presentan una reducción en la carga de SYCP1. **c)** Doble inmunofluorescencia de SYCP3 (rojo) SYCE3 (verde) en embrionarios (17,5 dpc) *Syce1*^{+/+} en leptoteno, zigoteno temprano, zigoteno tardío y paquiteno y en oocitos *Syce1*^{POF/POF} en leptoteno, zigoteno temprano y zigoteno-like. Las zigonemas mutantes muestran una reducción significativa en la señal de SYCE3 con respecto a las paquinemas WT. La cuantificación de los niveles de intensidad de fluorescencia de SYCP1 (**b**) y SYCE3 (**c**) se muestran en los gráficos ubicados bajo su correspondiente panel. Análisis Welch's *t* test: ***: p-valor < 0,001. Barras de escala (**b-c**), 10 μ m. a.u.: unidades arbitrarias (*arbitrary units*).

En lo que respecta al resto de proteínas del CE del SC, observamos una ausencia total de marcaje para SYCE1 (**Figura 12a**), SIX6OS1 (**Figura 12b**), SYCE2 (**Figura 12c**) y TEX12 (**Figura 12d**) a lo largo de toda la profase I meiótica en los oocitos *Syce1^{POF/POF}*. Dado que en el momento del bloqueo los meiocitos mutantes no cumplen todos los requerimientos moleculares que se satisfacen en el estadio de zigoteno en condiciones silvestres, hemos denominado a este estadio “*zigoteno-like*”, un bloqueo meiótico similar al observado en el KO murino de SYCE1 (Bolcun-Filas et al., 2009). Por tanto, mediante este análisis histológico y citológico, hemos podido determinar que los oocitos *Syce1^{POF/POF}* presentan un bloqueo meiótico en *zigoteno-like* con una sinapsis incompleta entre los cromosomas homólogos, recapitulando el fenotipo infértil del POF humano.

A continuación, y para determinar si la versión truncada SYCE1_{POF} afecta a la recombinación meiótica, analizamos en oocitos *Syce1^{POF/POF}* varias proteínas esenciales para la correcta progresión de este proceso. Las DSBs meióticas son generadas por la nucleasa SPO11 y su presencia puede ser trazada desde ese momento por la fosforilación de la serina 140 de la histona H2AX (γ -H2AX). La distribución de γ -H2AX, repartida de manera difusa por toda la cromatina desde el estadio de leptoteno, es similar en los oocitos WT y mutantes al inicio de la profase I. A medida que las DSBs son reparadas, la señal de γ -H2AX que decora los autosomas de los oocitos silvestres disminuye. En comparación con los cromosomas autosómicos de las paquinemas WT, los oocitos *Syce1^{POF/POF}* bloqueados en *zigoteno-like* muestran una acumulación de γ -H2AX repartida por toda la cromatina, lo que indica la persistencia de roturas en el DNA sin reparar (**Figura 13a**).

Mecánicamente, durante la reparación del DNA, las DSBs se procesan generando extremos de ssDNA que invaden el cromosoma homólogo (*strand invasion*) por la acción de las recombinasas RAD51 y DMC1 (Mahadevaiah et al., 2001). De este modo, durante el zigoteno se alcanza el número máximo de *foci* de ambas recombinasas sobre los ejes cromosómicos. A medida que avanza la profase meiótica (entre los estadios de zigoteno temprano y tardío), se observa una disminución del número de *foci*, lo cual se interpreta como una descarga de ambas recombinasas (Tarsounas et al., 1999). Mediante la tinción por IF de RAD51 y DMC1, detectamos una acumulación del número de *foci* tanto de RAD51 (**Figura 13b**) como de DMC1 (**Figura 13c**) en los oocitos mutantes en estadio de *zigoteno-like* en comparación con las paquinemas silvestres. El objetivo final de la recombinación meiótica es la formación de al menos un CO por bivalente, estableciéndose así las uniones físicas (quiasmas) entre los cromosomas homólogos que permiten su segregación al final de la primera división meiótica. Para analizar la generación de COs, visualizamos mediante IF la proteína *mismatch repair* MLH1, la cual marca los futuros COs. La ausencia de *foci* de MLH1 en los oocitos *Syce1^{POF/POF}* demuestra que las DSBs no llegan a madurar formando COs (**Figura 13d**).

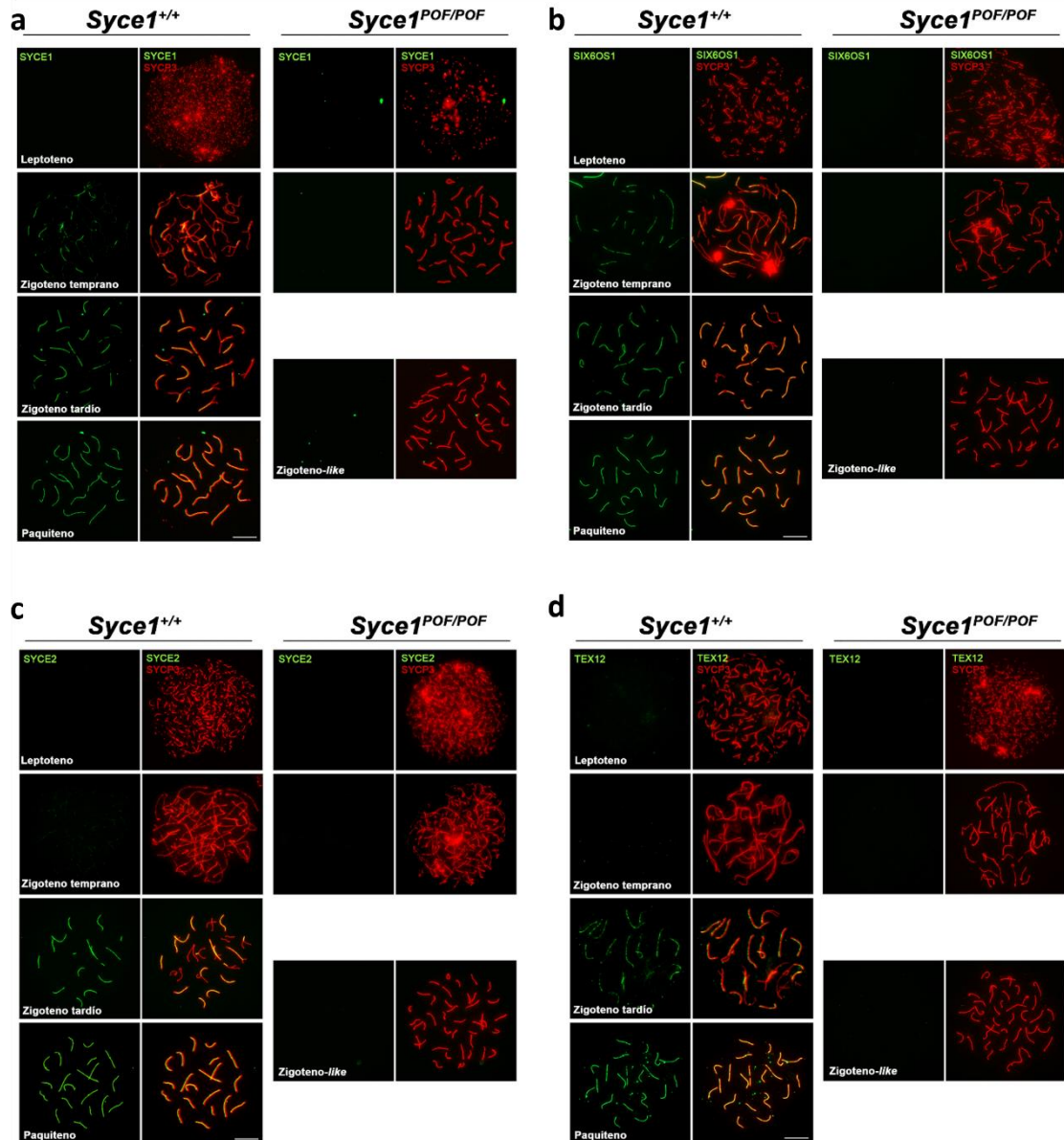


Figura 12. Los oocitos *Syce1*^{POF/POF} no completan el ensamblaje del CE del SC. **a-d)** Doble inmunofluorescencia de SYCP3 (rojo) y SYCE1 (**a**), SIX6OS1 (**b**), SYCE2 (**c**) y TEX12 (**d**) (verde) en oocitos embrionarios (17,5 dpc) *Syce1*^{+/+} en leptoteno, zigoteno temprano, zigoteno tardío y paquiteno y en oocitos *Syce1*^{POF/POF} en leptoteno, zigoteno temprano y zigoteno-like. Las zigonemas mutantes muestran una ausencia total de SYCE1, SIX6OS1, SYCE2 y TEX12.

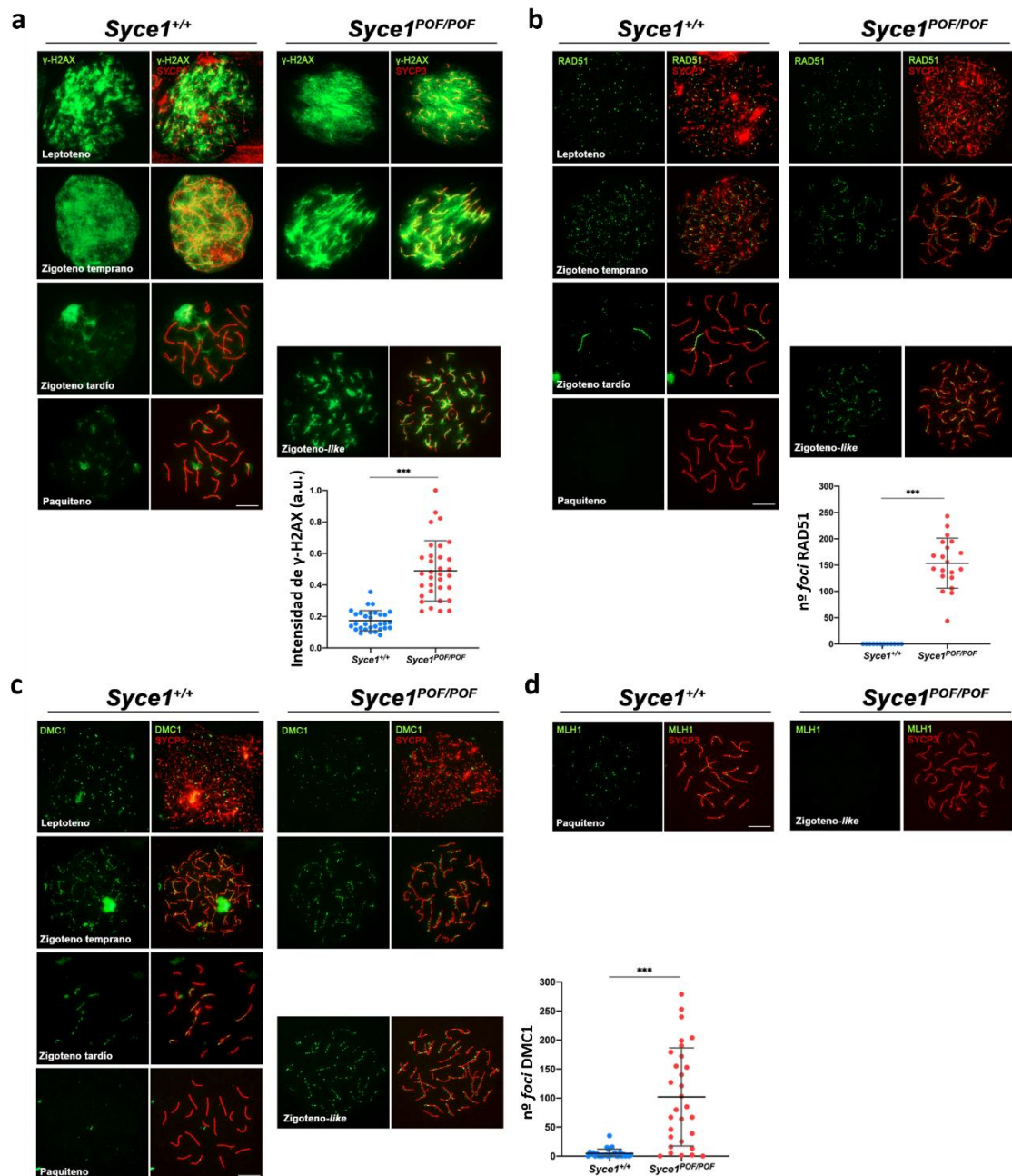


Figura 13. Los oocitos *Syce1*^{POF/POF} son capaces de generar DSBs, pero no de repararlos. **a-c)** Doble inmunofluorescencia de SYCP3 (rojo) y γ -H2AX (**a**), RAD51 (**b**) y DMC1 (**c**) (verde) en oocitos embrionarios (17,5 dpc) *Syce1*^{+/+} en leptoteno, zigoteno temprano, zigoteno tardío y paquiteno y en oocitos *Syce1*^{POF/POF} en leptoteno, zigoteno temprano y zigoteno-like. **a)** En el estadio de zigoteno-like, la señal de γ -H2AX se mantiene decorando todos los ejes cromosómicos en los oocitos mutantes, mientras que esta se ve extremadamente reducida en las paquinemas WT. **b-c)** Las zigonemas mutantes muestran una acumulación significativa en el número de *foci* de RAD51 (**b**) y DMC1 (**c**) con respecto a las paquinemas WT, indicando la persistencia de DSBs sin reparar. **d)** Doble inmunofluorescencia de SYCP3 (rojo) y MLH1 (verde) en oocitos embrionarios (17,5 dpc) *Syce1*^{+/+} en paquiteno y *Syce1*^{POF/POF} en zigoteno-like mostrando la ausencia de carga de MLH1 (y, en consecuencia, de COs) en las células mutantes. La cuantificación de los niveles de intensidad de fluorescencia de γ -H2AX (**a**) y del número de *foci* de RAD51 (**b**) y DMC1 (**c**) se muestran en los gráficos ubicados junto a cada panel correspondiente. Análisis Welch's *t* test: ***: p-valor < 0,001. Barras de escala, 10 μ m. a.u.: unidades arbitrarias (*arbitrary units*).

Una vez determinado el mecanismo molecular por el cual la variante $SYCE1^{POF}$ provoca infertilidad en hembras, procedimos a analizar la progresión meiótica en los espermatocitos mutantes. Para ello, llevamos a cabo en primer lugar un estudio del ensamblaje del SC mediante una doble IF de las proteínas SYCP3 y SYCP1. De manera similar a la dinámica observada en los oocitos, SYCP1 se visualiza en los ejes cromosómicos a partir del final del estadio de leptoteno en los espermatocitos silvestres. Sin embargo, SYCP1 presenta un patrón de carga aberrante en los espermatocitos $Syce1^{POF/POF}$, apareciendo exclusivamente durante el estadio de zigoteno-like y decorando toda la longitud los ejes cromosómicos (**Figura 14a**). Cuantitativamente, SYCP1 presenta una intensidad de carga cuantitativamente reducida en los espermatocitos mutantes en el momento del bloqueo en comparación con paquinemas WT (**Figura 14a**). Para evaluar la dinámica de ensamblaje del CE del SC en los mutantes POF, llevamos a cabo dobles inmunofluorescencias de SYCP3 y cada una de las proteínas que lo componen. En primer lugar, el factor iniciador de sinapsis SYCE3 se localiza en las regiones sinapsadas entre los cromosomas homólogos a partir del zigoteno temprano en los espermatocitos WT. Esta señal está completamente ausente en los espermatocitos $Syce1^{POF/POF}$ durante ese estadio de la profase I (**Figura 14b**). Alcanzado el bloqueo meiótico, los ejes de los espermatocitos mutantes presentan una carga de SYCE3 significativamente reducida en comparación con los niveles existentes en paquinemas silvestres (**Figura 14b**).

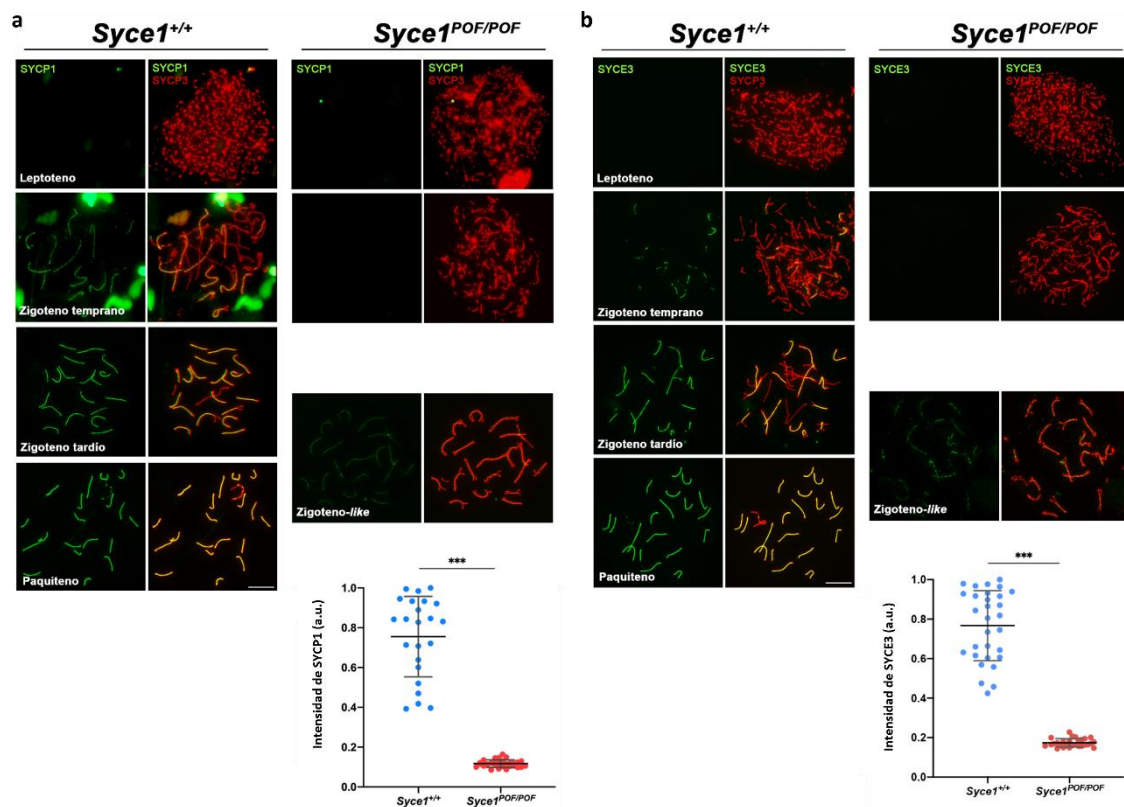


Figura 14. Los espermatocitos $Syce1^{POF/POF}$ presentan un ensamblaje alterado del SC. **a)** Doble inmunofluorescencia de SYCP3 (rojo) y SYCP1 (verde) en espermatocitos $Syce1^{+/+}$ en leptoteno, zigoteno temprano, zigoteno tardío y paquiteno y en espermatocitos $Syce1^{POF/POF}$ en leptoteno, zigoteno temprano y zigoteno-like. En el momento del bloqueo meiótico, los espermatocitos mutantes presentan una reducción en la carga de SYCP1 en comparación con las paquinemas silvestres. **b)** Doble inmunofluorescencia de SYCP3 (rojo) y la proteínas del CE SYCE3 (verde) en espermatocitos $Syce1^{+/+}$ en leptoteno, zigoteno temprano, zigoteno tardío y paquiteno y en espermatocitos $Syce1^{POF/POF}$ en leptoteno, zigoteno temprano y zigoteno-like. Las zigonemas mutantes muestran una reducción significativa en la señal de SYCE3 con respecto a las paquinemas. La cuantificación de los niveles de intensidad de fluorescencia de SYCP1 (**a**) y SYCE3 (**b**) se muestran en los gráficos

ubicados a la derecha de cada panel. Análisis Welch's *t* test: ***: *p*-valor < 0,001. Barras de escala, 10 μ m. a.u.: unidades arbitrarias (*arbitrary units*).

A continuación, llevamos a cabo una tinción mediante IF de las proteínas del resto de proteínas que componen el CE. De este modo, pudimos detectar una ausencia total de señal de SYCE1 (Figura 15a), SIX6OS1 (Figura 15b), SYCE2 (Figura 15c) y TEX12 (Figura 15d) en los espermatocitos mutantes durante toda la primera profase meiótica. En conjunto, a través de estos resultados pudimos determinar que los ejes cromosómicos de los espermatocitos *Syce1*^{POF/POF} no son capaces de sinapsar, lo que provoca un bloqueo meiótico en zigoteno-like.

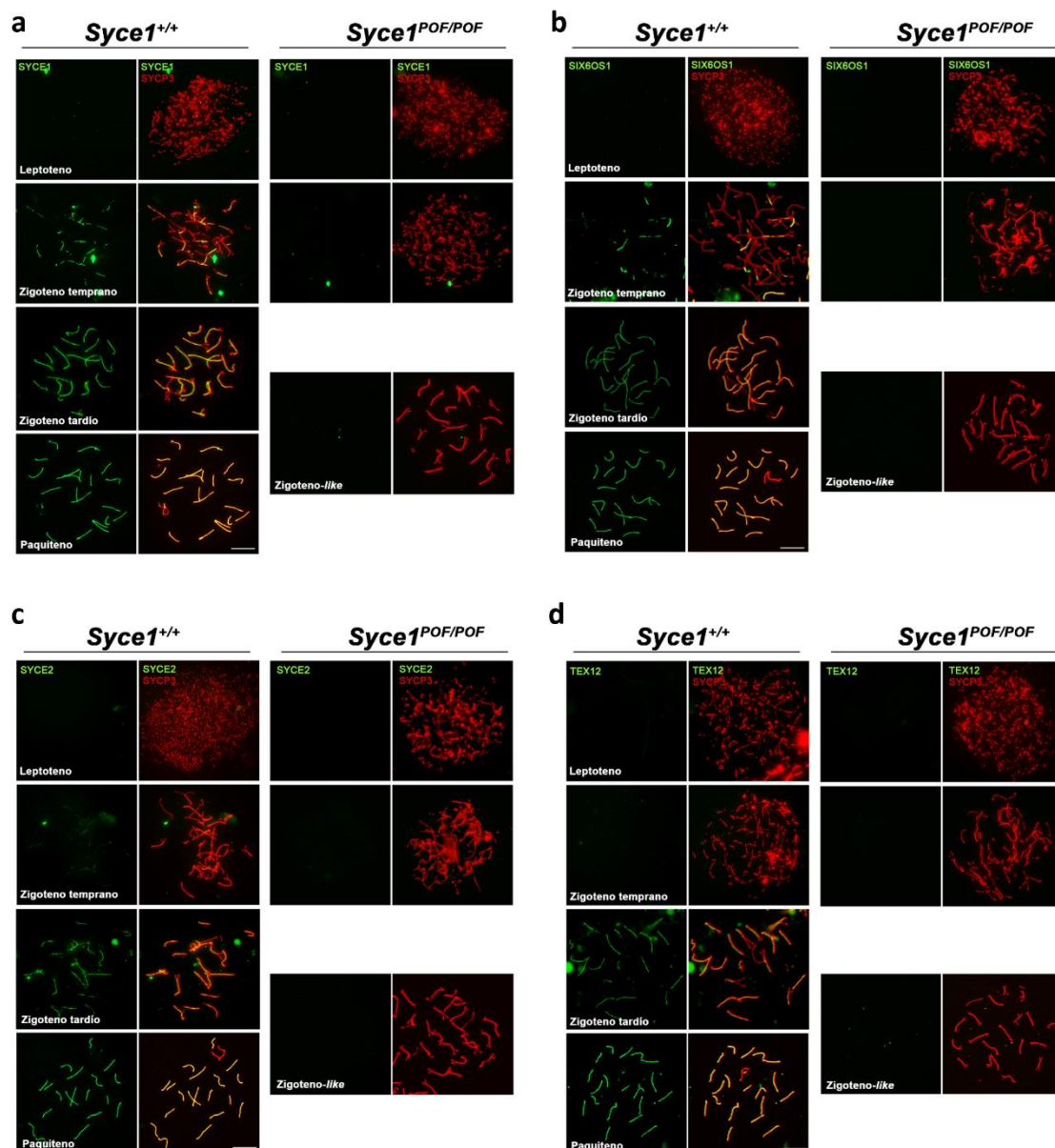


Figura 15. Los espermatocitos *Syce1*^{POF/POF} no completan el ensamblaje del CE del SC. Doble inmunofluorescencia de SYCP3 (rojo) y las proteínas del elemento central SYCE1 (a), SIX6OS1 (b), SYCE2 (c) y TEX12 (d) (verde) en espermatocitos *Syce1*^{+/+} en leptoteno, zigoteno temprano, zigoteno tardío y paquiteno y en espermatocitos *Syce1*^{POF/POF} en leptoteno, zigoteno temprano y zigoteno-like. Los espermatocitos mutantes no cargan ninguna de estas cuatro proteínas del CE del SC, lo que evidencia un ensamblaje defectivo del CE del SC como consecuencia de la variante POF de SYCE1.

A continuación, y para determinar si la versión truncada de SYCE1_{POF} afecta a la recombinación meiótica, analizamos en los espermatocitos *Syce1*^{POF/POF} mediante IF algunas de las proteínas que ejercen su función en la regulación de este proceso. En los espermatocitos silvestres, la distribución de γ -H2AX es similar a la presentada en oocitos durante los primeros estadios de la profase I, apareciendo repartida de manera difusa por toda la cromatina. Sin embargo, alcanzado el paquiteno en condiciones silvestres, la señal de γ -H2AX se concentra específicamente sobre el *sex body* generando un marcaje intenso en forma de nube. En comparación con los autosomas de las paquinemas silvestres, los espermatocitos *Syce1*^{POF/POF} bloqueados en zigoteno-*like* muestran una acumulación de γ -H2AX por toda la cromatina, lo que indica la persistencia de roturas en el DNA sin reparar (**Figura 16a**).

Dados los defectos en reparación del DNA observados en los espermatocitos mutantes, a continuación, analizamos el comportamiento de las recombinasas RAD51 y DMC1, proteínas encargadas de la invasión del cromosoma homólogo durante la recombinación meiótica. El análisis mediante IF mostró una acumulación del número de *foci* tanto de RAD51 (**Figura 16b**) como de DMC1 (**Figura 16c**) en los espermatocitos *Syce1*^{POF/POF} en estadio de zigoteno-*like* en comparación con las paquinemas silvestres. Por último, analizamos la formación de COs en los espermatocitos mutantes mediante la tinción por IF de MLH1. De acuerdo con el bloqueo meiótico presentado por estos mutantes, no observamos ningún *foci* de MLH1 sobre sus ejes cromosómicos (**Figura 16d**). Esto indica que, aunque las DSBs se generan apropiadamente, no se reparan de manera eficiente, por lo que finalmente no se establecen los COs entre los cromosomas homólogos.

En conjunto, nuestros resultados relativos al análisis *in vivo* de la mutación POF en la secuencia de *Syce1* demuestran que, tanto machos como hembras portadores de la mutación en homocigosis son infértiles como consecuencia de una sinapsis alterada y una alteración de la maquinaria de recombinación meiótica. Por ello, podemos concluir que la mutación POF de *SYCE1* *per se* es explicativa del fenotipo infértil en humanos.

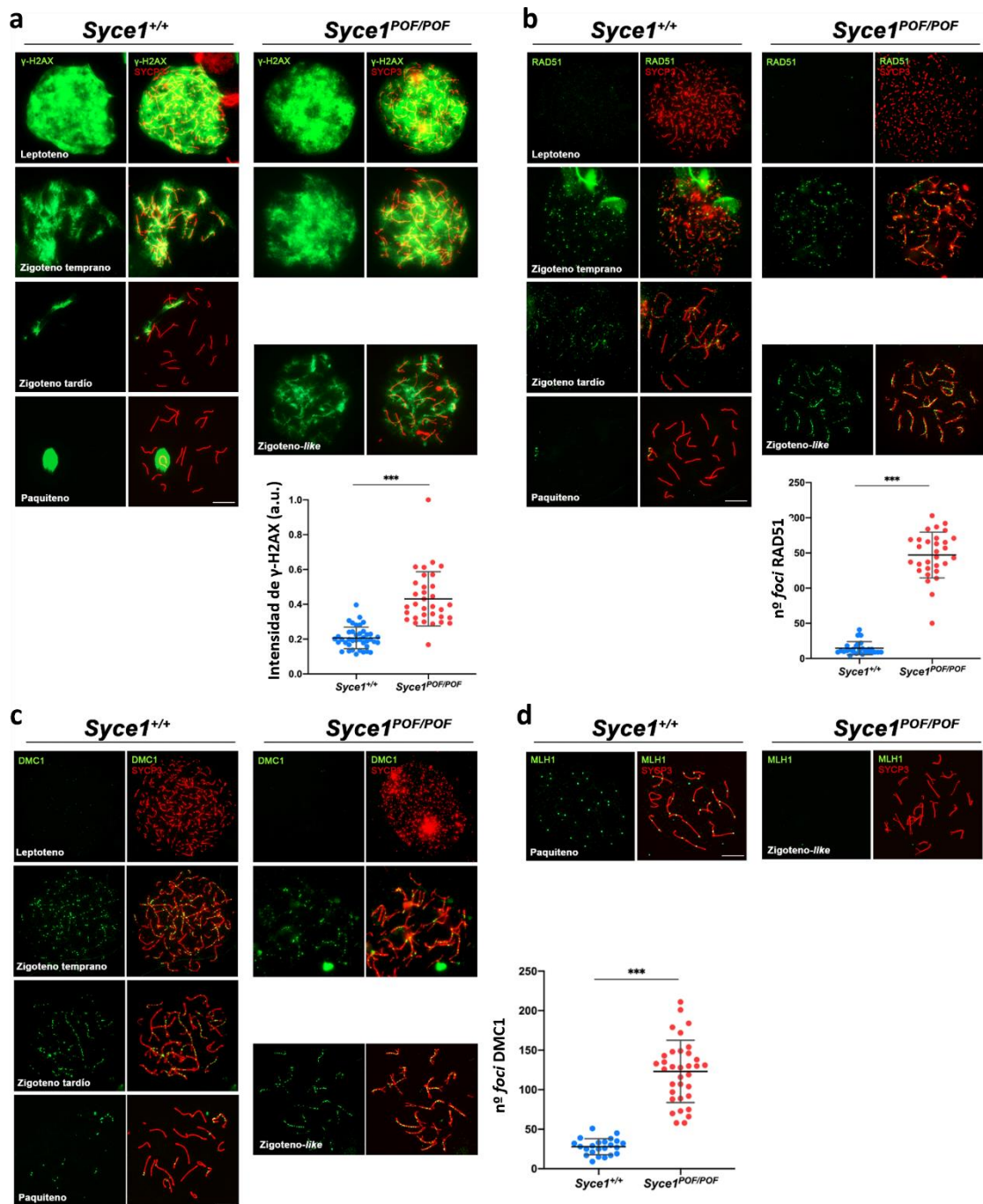


Figura 16. Los espermatocitos *Syce1*^{POF/POF} son capaces de generar DSBs, pero no de repararlos. **a-c)** Doble inmunofluorescencia de SYCP3 (rojo) y γ -H2AX (**a**), RAD51 (**b**) y DMC1 (**c**) (verde) en espermatocitos *Syce1*^{+/+} en leptoteno, zigoteno temprano, zigoteno tardío y paquiteno y en espermatocitos *Syce1*^{POF/POF} en leptoteno, zigoteno temprano y zigoteno-like. **a)** La señal de γ -H2AX se dispone decorando todos los ejes cromosómicos en los espermatocitos mutantes en el bloqueo meiótico, mientras que se localiza exclusivamente en torno al par de cromosomas sexuales (*sex body*) en las paquinemas WT. **b-c)** Los espermatocitos mutantes en estadio de zigoteno-like muestran una acumulación significativa en el número de *foci* de RAD51 (**b**) y DMC1 (**c**) con respecto a las paquinemas WT, indicando la persistencia de DSBs sin reparar. **d)** Doble inmunofluorescencia de SYCP3 (rojo) y MLH1 (verde) en espermatocitos de ratones *Syce1*^{+/+} en paquiteno y *Syce1*^{POF/POF} en zigoteno-like mostrando la ausencia de carga de MLH1 (y, en consecuencia, de generación de COs) en las células mutantes. La cuantificación de los niveles de intensidad de fluorescencia de γ -H2AX (**a**) y del número de *foci* de RAD51 (**b**) y DMC1 (**c**) se muestran en los gráficos ubicados junto a su respectivo panel. Análisis Welch's *t* test: ***: p-valor < 0,001. Barras de escala, 10 μ m. a.u.: unidades arbitrarias (*arbitrary units*).

1.3. El producto proteico SYCE1_{POF} interacciona con SIX6OS1, pero no con SYCE3

Una vez caracterizadas las alteraciones meióticas que provoca la presencia de la variante POF en ratón, profundizamos en el mecanismo por el cual esta mutación produce los efectos descritos. Dado que el ratón mutante *Syce1*^{POF/POF} presenta un claro defecto estructural en el SC, nos preguntamos si dicha mutación podría alterar la interacción entre SYCE1 y el resto de componentes del CE del SC, más concretamente con los factores (Dunne & Davies, 2019b)ca SYCE3 y SIX6OS1 (Dunne & Davies, 2019b).

Con el fin de analizar la interacción *in vitro* entre SYCE1 y las proteínas SYCE3 y SIX6OS1, llevamos a cabo una sobreexpresión de dichas proteínas en células COS-7 y visualizamos su patrón de expresión mediante IF. Los resultados muestran que, desde un punto de vista citológico, la expresión individualizada de la secuencia murina codificante para SYCE1 en células COS-7 genera una señal citoplasmática de tipo *foci* (Figura 17a), mientras que la de SIX6OS1 da lugar a una señal continua dispersa por todo el núcleo y citoplasma (Figura 17b). Sin embargo, su coexpresión provoca un arrastre de SIX6OS1 al patrón de expresión propio de SYCE1, dando lugar a una señal punteada que colocaliza en el 95% de las células (Figura 17d). Para determinar el patrón de expresión de la variante patogénica SYCE1_{POF}, llevamos del mismo modo a cabo una sobreexpresión de dicho producto en células COS-7 y analizamos su localización mediante IF. La expresión individualizada de SYCE1_{POF} genera un patrón punteado semejante al de la versión WT, aunque con *foci* más brillantes y menos numerosos (Figura 17c). De manera similar a lo que ocurre con la variante WT, SIX6OS1 mantiene su colocalización y secuestro a la señal punteada de SYCE1_{POF} en un 89% de las células, lo que demuestra que el producto proteico mutante de SYCE1 mantiene la capacidad de interacción con SIX6OS1 *in vitro* (Figura 17d). Con el fin de corroborar esta afirmación, llevamos a cabo un ensayo de interacción por coimmunoprecipitación entre SIX6OS1 y los productos WT y POF de SYCE1. Para ello, hicimos uso de los extractos proteicos preparados a partir de células HEK 293T transfectadas con los plásmidos codificantes para cada uno de los productos. De este modo, pudimos verificar que la variante SYCE1_{POF} muestra una interacción positiva con SIX6OS1 de manera similar a la que establece con la versión WT de SYCE1 (Figura 17e).

En el contexto del SC, SYCE1 interactúa no solo con SIX6OS1, sino también con SYCE3. A fin de analizar la capacidad de interacción de SYCE3 con la variante POF de SYCE1, llevamos a cabo una sobreexpresión de SYCE3 en células COS-7 y determinamos su localización *in vitro* mediante IF. De este modo, detectamos un patrón de expresión nuclear cuando SYCE3 es expresado de manera individualizada (Figura 18a). Este patrón se ve alterado al ser coexpresado con el producto SYCE1 WT, de tal modo que SYCE3 es reclutado a la señal punteada repartida por el citoplasma propia de SYCE1 en el 95% de las células transfectadas, evidenciando la interacción entre ambas proteínas (Figura 18b). Sin embargo, sólo un 21% de las células que expresaban SYCE1_{POF} mostraban una colocalización de ambas proteínas del CE en los *foci* citoplasmáticos (Figura 18b), lo que sugiere que SYCE3 no es capaz de interactuar con la versión mutante de SYCE1. Para validar nuestra hipótesis, llevamos a cabo ensayos de coimmunoprecipitación entre cada pareja de proteínas en células HEK 293T. De este modo corroboramos que sólo SYCE1 WT (y no el producto mutante SYCE1_{POF}) es capaz de interactuar con SYCE3 *in vitro* (Figura 18c). En su conjunto, estos resultados demuestran que, mientras que el complejo SYCE1-SIX6OS1 se mantiene, la interacción entre SYCE1 y SYCE3 queda abolida por la mutación POF de SYCE1 *in vitro*. Estos resultados contribuyen a explicar el ensamblaje aberrante existente en los ratones portadores de la mutación en homocigosis y su consiguiente infertilidad.

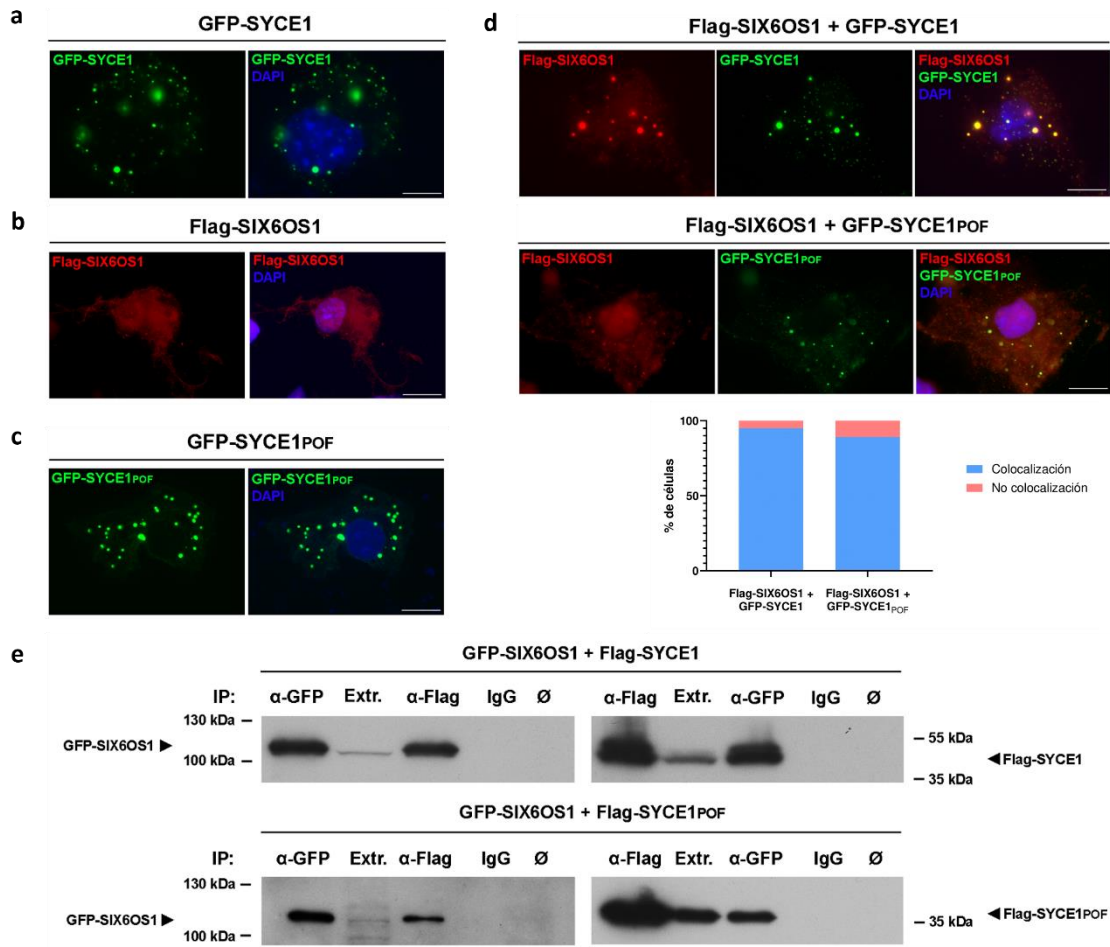


Figura 17. La mutación POF de SYCE1 no altera su capacidad para interactuar con SIX6OS1. **a-c)** Expresión individual de las secuencias proteicas murinas de SYCE1 (**a**), SIX6OS1 (**b**) y SYCE1_{POF} (**c**) en células COS-7. Las dos versiones de SYCE1 dan lugar a un patrón de expresión de tipo *foci* citoplasmáticos, mientras que SIX6OS1 se expresa de manera continua por todo el citoplasma. **d)** La proteína SIX6OS1 colocaliza tanto con SYCE1 como con SYCE1_{POF} siguiendo un patrón punteado al ser cotransfectadas en células COS-7. El porcentaje de células que colocalizan para cada combinación se muestra en el gráfico ubicado bajo las imágenes (n=100 células). Barras de escala (**a-d**), 20 μ m. **e)** Análisis mediante WB de la inmunoprecipitación con anticuerpos α -GFP, α -Flag e IgGs (como control negativo) de extractos proteicos de células HEK 293T transfectadas con los plásmidos indicados. SIX6OS1 forma un complejo coinmunoprecipitante tanto con SYCE1 como con SYCE1_{POF}, lo que sugiere que la mutación POF de SYCE1 por sí sola es insuficiente para suprimir la interacción entre ambas proteínas del CE. IP: Inmunoprecipitación; Extr.: Extracto proteico sin inmunoprecipitar; \emptyset : Extracto proteico obtenido a partir de células HEK 293T sin transfectar.

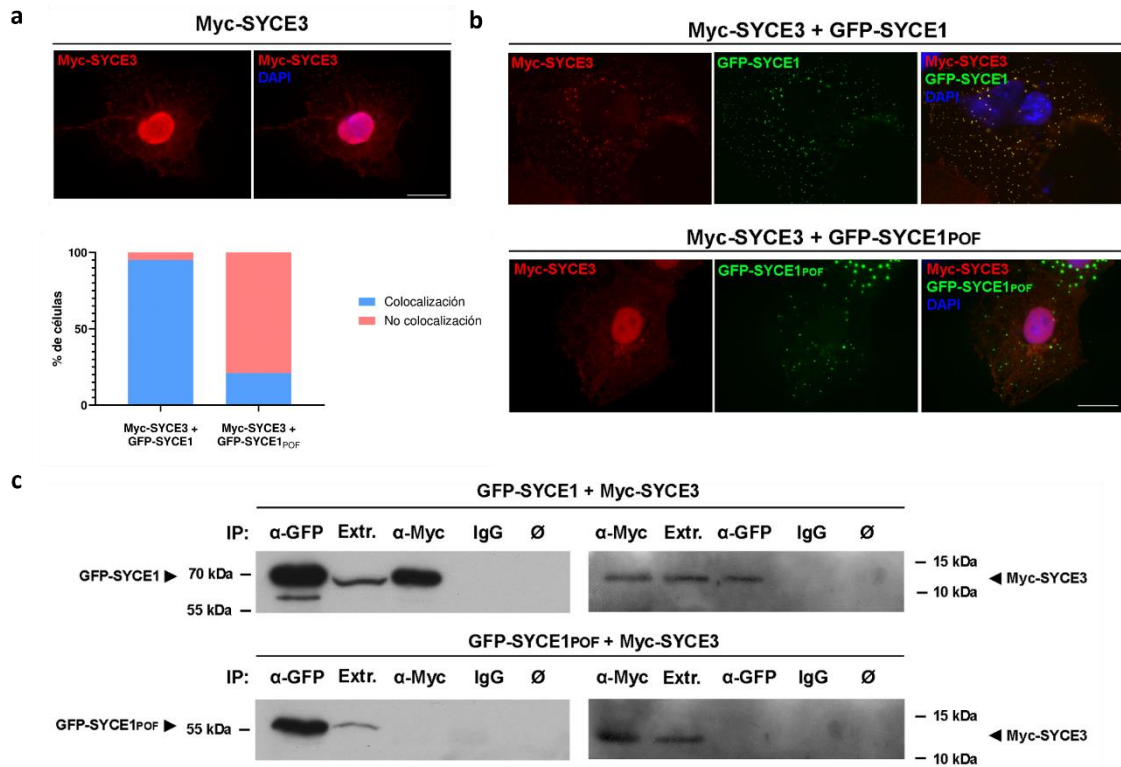


Figura 18. La mutación POF de SYCE1 elimina su capacidad de interactuar con SYCE3. **a)** La expresión individual de la secuencia proteica murina que codifica para SYCE3 en células COS-7 da lugar a un patrón de expresión nuclear. **b)** La proteína SYCE3 es arrastrada al patrón punteado característico de SYCE1 cuando son cotransfectadas en células COS-7, lo cual no ocurre cuando SYCE3 se coexpresa con SYCE1_{POF}. En esta condición, el 79% de las células transfectadas mantienen el patrón de expresión propio de SYCE3, lo que sugiere una ausencia de interacción con el producto mutante de SYCE1. El porcentaje de células que colocalizan para cada combinación se muestra en el gráfico ubicado bajo las imágenes (n=100 células). Barras de escala (**a-b**), 20 μm. **c)** Análisis mediante WB de la inmunoprecipitación con anticuerpos α-GFP, α-Myc e IgGs (como control negativo) de extractos proteicos de células HEK 293T transfectadas con los plásmidos indicados. SYCE3 forma un complejo coinmunoprecipitante con SYCE1, pero no con SYCE1_{POF}, lo que sugiere que el dominio C-terminal de SYCE1 (ausente en la versión mutante) es imprescindible para su interacción con SYCE3. IP: Inmunoprecipitación; Extr.: Extracto proteico sin inmunoprecipitar; ∅: Extracto proteico obtenido a partir de células HEK 293T sin transfectar.

1.4. La mutación c.613C>T no altera el núcleo de la estructura de SYCE1

Con el fin de profundizar en los mecanismos por los cuales la proteína truncada SYCE1_{POF} provoca alteraciones funcionales en la sinapsis de los elementos laterales en los gametocitos del ratón, estudiamos los cambios estructurales que ocasiona esta mutación a nivel proteico. Para ello, establecimos una colaboración con el grupo de investigación liderado por el Dr. Owen R. Davies (Universidad de Newcastle, Reino Unido), especializado en el análisis estructural de las proteínas implicadas en la división meiótica.

El propio grupo del Dr. Davies ya había demostrado previamente que SYCE1 presenta en su dominio N-terminal un núcleo o *core* (Figura 7) codificado por los aminoácidos 25-179 de su secuencia, formando así una α-hélice superenrollada (*coiled-coil*) antiparalela que media la homodimerización de SYCE1 (Dunne & Davies, 2019b). Dado que la mutación c.613C>T generaría un codón de STOP en la posición aminoacídica 241, cabría esperar que la estructura del *core* no se viera comprometida, y que por tanto el dímero antiparalelo se mantuviera también en el producto proteico truncado (SYCE1_{POF}) generado como consecuencia de esta mutación.

Para testar esta hipótesis, el grupo del Dr. Davies, generó las proteínas recombinantes SYCE1_{POF}, SYCE1 y SYCE1_{core} (ver Figura 1A y Figura S1A-B del artículo Sánchez-Sáez et al., 2020 en la sección de Publicaciones). Con respecto a SYCE1_{POF}, obtuvieron un material que contenía aproximadamente una misma cantidad tanto del producto proteico de interés como de un producto de degradación que presumiblemente abarca hasta el final del *core* de SYCE1. Para evaluar la estructura de SYCE1_{POF}, llevaron cabo una espectroscopía por dicroísmo circular (CD), lo que les permitió comprobar que SYCE1_{POF} retiene una proporción de su estructura de α -hélice, como era esperado dado el mantenimiento del *core* proteico (Figura S1C en Sánchez-Sáez et al., 2020). Mediante un análisis de la desnaturalización térmica, se calculó para cada producto proteico las temperaturas a las que alcanzan un 50% de desnaturalización (temperatura de *melting*, *T_m*). SYCE1_{POF} y SYCE1_{core} presentaban una *T_m* idéntica de 39°C (Figura S1D en Sánchez-Sáez et al., 2020), lo que demuestra una elevada homología estructural entre ambos productos. Para analizar la conformación que adoptan las diferentes moléculas de SYCE1, se evaluó a continuación el peso molecular de las especies mediante cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz multiángulo (SEC-MALS). Así, el equipo del Dr. Davies pudo confirmar que el producto SYCE1_{POF} y el producto de degradación son homodímeros de 48 kDa y 39 kDa, respectivamente (Figura 1D en Sánchez-Sáez et al., 2020). Tanto la versión *full-length* de SYCE1 como el producto SYCE1_{core} son también especies dimericas, de 86 y 36 kDa, respectivamente (Figura 1D en Sánchez-Sáez et al., 2020). Con todo ello, pudimos confirmar que SYCE1_{POF} retiene la estructura dimerica impuesta por su *core* proteico ubicado entre los aminoácidos 25 y 179 de su secuencia, por lo que los defectos derivados de la mutación en la formación del SC y progresión meiótica son resultado del papel estructural o funcional que desempeña su dominio C-terminal.

1.5. SYCE1, a través de su *core*, genera un complejo 1:1 con SIX6OS1_N

Dado que SYCE1_{POF} es capaz de retener la unión con SIX6OS1 (Figura 17), a continuación, decidimos comprobar si la responsabilidad de la interacción entre ambas proteínas recae en el *core* de SYCE1. Con el objetivo de caracterizar esta interacción, el equipo del Dr. Davies evaluó la capacidad de unión de SYCE1_{core} frente a una librería de constructos de SIX6OS1 mediante coexpresión bacteriana. De este modo, se identificó una interacción robusta de SYCE1_{core} con los primeros 67 aminoácidos de la secuencia de SIX6OS1, referida de aquí en adelante como SIX6OS1_N (Figura 19a y Figura 5A en Sánchez-Sáez et al., 2020). De este modo, se purificaron complejos SYCE1_{core}-SIX6OS1_N por cromatografía de afinidad, intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaño (Figura 5A-B en Sánchez-Sáez et al., 2020). Además, se purificaron complejos similares para SYCE1_{POF} y la secuencia completa de SYCE1 (Figura 1C y Figura S1B en Sánchez-Sáez et al., 2020). Esto confirma que SIX6OS1 es capaz de interactuar con todas las formas de SYCE1 que mantengan su *core* proteico.

A continuación, evaluamos la estructura de los complejos establecidos entre los distintos productos de SYCE1 y SIX6OS1_N mediante CD. Este análisis reveló la existencia de un contenido α -helicoidal similar tanto para los complejos SYCE1-SIX6OS1_N como para las formas aisladas de SYCE1 (Figura S1C en Sánchez-Sáez et al., 2020). Para apoyar este análisis estructural, se llevó a cabo un estudio de la desnaturalización térmica que reveló un incremento en las *T_m* de los complejos SYCE1-SIX6OS1_N en relación con sus formas aisladas (aumento de 39°C a 43°C para SYCE1_{core}, de 39°C a 41°C para SYCE1_{POF} y de 38°C a 40°C para SYCE1) (Figura S1D y Figura 5C en Sánchez-Sáez et al., 2020). Los distintos productos proteicos de SYCE1 demostraron mediante SEC-MALS formar complejos 1:1 con SIX6OS1_N, siendo sus pesos moleculares de 27 kDa (con SYCE1_{core}), 37 kDa (con SYCE1_{POF}) y 46 kDa (con la secuencia completa de SYCE1), respectivamente (Figura 5D y Figura S7C en Sánchez-Sáez et al., 2020). Por tanto, ante su unión a SIX6OS1_N,

SYCE1_{core} sufre un cambio conformacional, dejando de formar un homodímero antiparalelo para generar un complejo 1:1 con la región N-terminal de SIX6OS1 (Figura 19b).

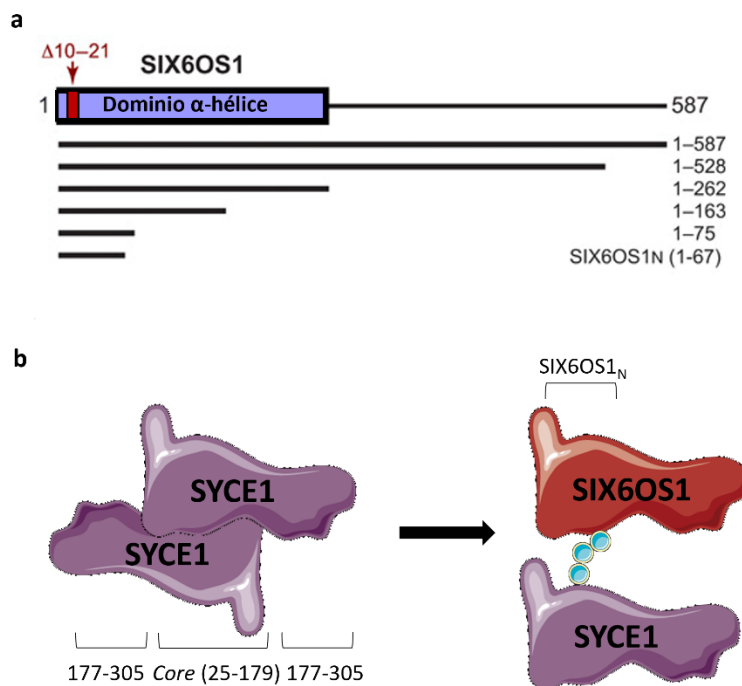


Figura 19. a) Representación esquemática de la secuencia codificante para SIX6OS1 en humanos. Se indica la localización de la delección de la región comprendida entre los aminoácidos 10-21 (referida como $\Delta 10-21$), objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, así como los distintos constructos empleados en este estudio por el Dr. Davies y su equipo. **b)** Representación esquemática del cambio conformacional que sufre SYCE1, pasando de formar un dímero antiparalelo consigo mismo para generar un complejo 1:1 a través de su core con la región N-terminal de SIX6OS1.

A continuación, y de nuevo en colaboración con el laboratorio del Dr. Davies, se llevó a cabo un análisis la conformación del complejo SYCE1_{core}-SIX6OS1_N mediante cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SEC-SAXS) (Figura S7D-F en Sánchez-Sáez et al., 2020). El análisis de la distribución de las distancias interatómicas dentro de una estructura proteica ($P(r)$) demostró que el complejo SYCE1_{core}-SIX6OS1_N mantiene la conformación estructural de SYCE1_{core}, pero la longitud molecular (D_{max}) del complejo se reduce de 186 Å a 138 Å (Figura 5F en Sánchez-Sáez et al., 2020). Además, el radio de su sección transversal se ve incrementado ligeramente de 9 Å a 11 Å (Figura S7F en Sánchez-Sáez et al., 2020), lo que sugiere la conversión de la hélice superenrollada de 2 unidades a una de 4. Por tanto, como se representa en el modelo *ab initio* (Figura 5G en Sánchez-Sáez et al., 2020), el complejo SYCE1_{core}-SIX6OS1_N forma una hélice más corta pero más ancha que el homodímero de SYCE1_{core}. En lo relativo a la distribución de las distancias interatómicas de SYCE1_{POF} en su interacción con SIX6OS1_N, obtuvimos una estructura elongada similar, pero de una mayor longitud molecular que alcanza los 180 Å (Figura 5F en Sánchez-Sáez et al., 2020). Estos resultados evidencian el mantenimiento de la estructura SYCE1_{core}-SIX6OS1_N en el producto POF de SYCE1. El incremento en la longitud molecular de la estructura se explica por los aminoácidos de la secuencia de SYCE1 abarcados desde el final del core hasta el codón de STOP prematuro. Por tanto, pudimos concluir que el core de SYCE1 media una interacción directa con SIX6OS1_N, lo que impone un cambio conformacional para generar un complejo 1:1 entre ambas proteínas. Este complejo adopta una conformación superenrollada más corta, pero más ancha que el homodímero antiparalelo en el que se dispone SYCE1.

1.6. SYCE1_{POF} interrumpe un segundo dominio de interacción con SIX6OS1

Una vez caracterizada la interacción SYCE1_{core}-SIX6OS1_N, decidimos analizar la posible existencia de otras interfaces de unión entre ambos componentes del SC. Mediante un ensayo de doble híbrido (Y2H), y en colaboración con el grupo del Dr. Davies, se testó la capacidad de unión entre diferentes regiones de SYCE1 y SIX6OS1 (Figura 6A en Sánchez-Sáez et al., 2020). Tras confirmar la unión positiva de SYCE1_{core} con la secuencia completa de SIX6OS1, se analizaron sucesivas reducciones del dominio C-terminal de SIX6OS1 hasta detectar la región más pequeña necesaria para su interacción con SYCE1, que resultó estar comprendida entre los aminoácidos 1 y 75 de SIX6OS1. Además, pudimos detectar la existencia de un segundo punto de interacción entre ambas proteínas, más concretamente entre el dominio C-terminal de SYCE1 (fuera de su *core*, entre los aminoácidos 177 y 305) y la secuencia completa de SIX6OS1.

Para determinar si SYCE1_{core} y SYCE1₁₇₇₋₃₀₅ se unen o no a la misma región de SIX6OS1, se generó una delección interna de SIX6OS1 comprendida entre los aminoácidos 10 y 21 (Δ 10-21). Esta delección altera la integridad del dominio N-terminal de SIX6OS1 y, por tanto, anula su capacidad de interactuar con SYCE1_{core} (Figura 6A en Sánchez-Sáez et al., 2020). Paralelamente, SIX6OS1₁₋₂₂ no mostró interacción positiva con ningún constructo de SYCE1, lo que demuestra que los aminoácidos 10-21 son necesarios, pero no suficientes, para garantizar su unión a SYCE1_{core} (Figura 6A en Sánchez-Sáez et al., 2020). Mientras que SIX6OS1 Δ 10-21 perdió su interacción en el ensayo de Y2H con SYCE1_{core}, sí mostró una unión robusta a SYCE1₁₇₇₋₃₀₅, lo que sugiere la existencia de un segundo sitio de interacción entre ambas proteínas mediada por el dominio C-terminal de SYCE1. Además, la delección Δ 10-21 bloqueó la capacidad de SIX6OS1₁₋₂₆₂ de interactuar con SYCE1_{core} y SYCE1_{POF}, pero mantuvo su unión a la secuencia completa de SYCE1 y a SYCE1₂₅₋₃₁₅ (Figura 6A en Sánchez-Sáez et al., 2020). Por tanto, a partir de este ensayo podemos concluir que SYCE1 presenta dos dominios de interacción con SIX6OS1, el primero de ellos establecido entre SYCE1_{core} y SIX6OS1_N (1-67), y el segundo entre SYCE1₁₇₇₋₃₀₅ y la región aminoacídica de SIX6OS1 comprendida entre sus aminoácidos 22 y 262 (**Figura 20a**). Esto implica que la primera interfaz de unión se ve comprometida por la delección Δ 10-21 de SIX6OS1, mientras que la segunda se pierde por la mutación POF de SYCE1 descrita previamente en la sección de resultados de esta Tesis Doctoral.

1.7. SIX6OS1 Δ 10-21 retiene la unión a SYCE1 en sistemas heterólogos

Los resultados estructurales, bioquímicos y de Y2H, demuestran que la delección Δ 10-21 de SIX6OS1 interrumpe la primera interfaz de interacción con SYCE1, pero que el complejo entre ambas proteínas se mantiene por la retención del segundo dominio de unión. Para determinar si estos resultados también alteran la colocalización de SIX6OS1 con SYCE1 en el sistema heterólogo de COS7 previamente empleado, transfectamos SIX6OS1 Δ 10-21 en células COS7 y analizamos mediante IF su localización. Los resultados muestran que SIX6OS1 Δ 10-21 presenta un patrón de expresión nuclear con una tenue señal en el citoplasma (**Figura 20b**), en contraste con la localización dispersa por todo el núcleo y citoplasma característica de la versión WT (**Figura 17b**). Al coexpresar el producto truncado de SIX6OS1 con SYCE1, detectamos que SIX6OS1 Δ 10-21 forma *foci* citoplasmáticos intensos que colocalizan (en el 98% de las células) con SYCE1 (**Figura 20c**). De este modo, SIX6OS1 Δ 10-21 pierde su patrón de expresión propio (nuclear) para ser arrastrado al patrón de SYCE1 (**Figura 20c**), de forma similar a lo que observamos previamente con SYCE1_{POF} y la versión silvestre de SIX6OS1 (**Figura 17d**). Todo ello sugiere que la variante SIX6OS1 Δ 10-21 mantiene la capacidad de interactuar con SYCE1 *in vitro*.

A continuación, verificamos esta interacción mediante un ensayo de coimmunoprecipitación. En apoyo a los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia,

SIX6OS1 Δ_{10-21} coimmunoprecipita con SYCE1 al ser ambos productos coexpresados en células HEK 293T (**Figura 20d**). Por tanto, el patrón de localización celular y el ensayo de inmunoprecipitación apoyan los resultados obtenidos en el ensayo de doble híbrido, demostrando que la segunda interfaz de interacción entre ambas proteínas del CE se mantiene pese a la delección Δ_{10-21} de SIX6OS1. Esta podría ser, además, la interacción que se mantiene ante la pérdida de los aminoácidos 126-155 esperada para la mutación c.375-2A>G en la secuencia de SYCE1 asociada a NOA (Pashaei et al., 2020).

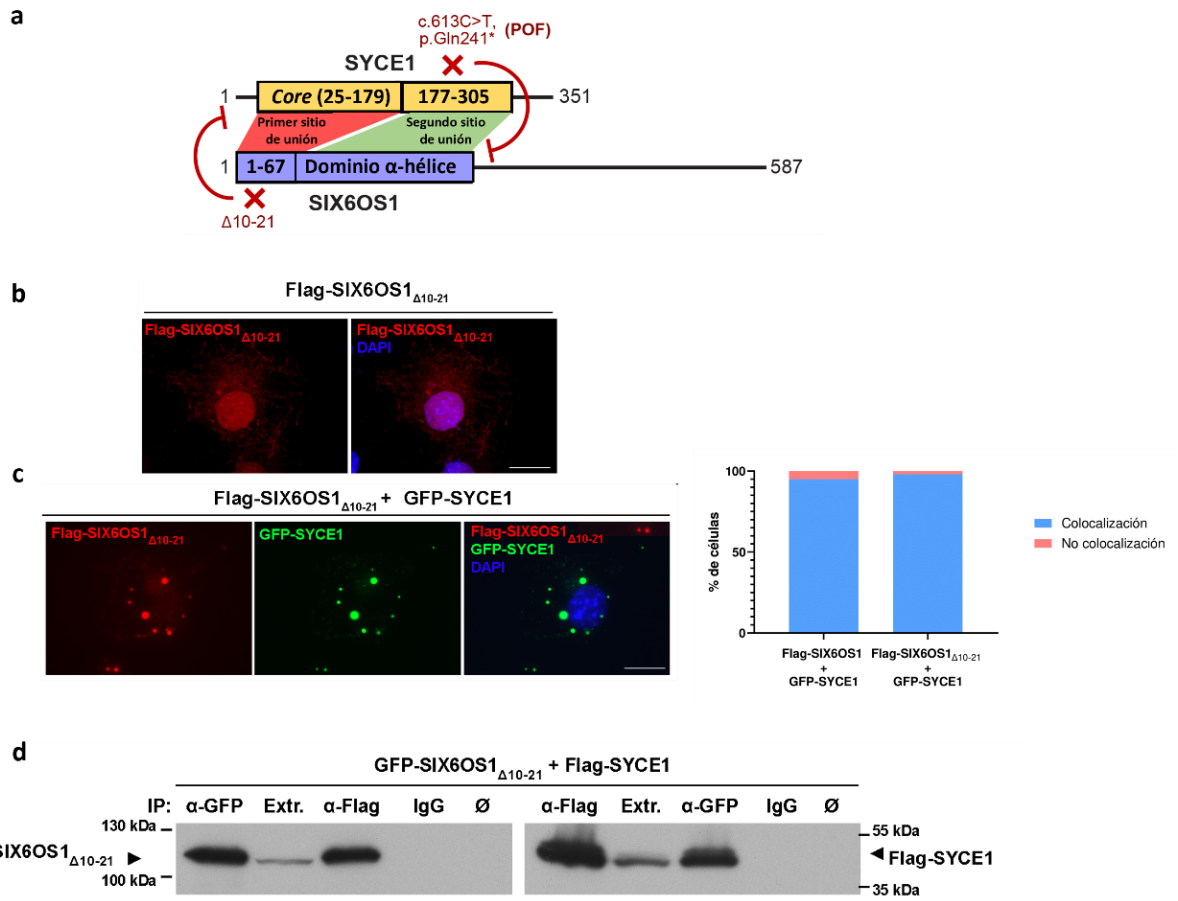


Figura 20. a) Representación esquemática de los dos dominios de interacción entre SYCE1 y SIX6OS1, viéndose el primero de ellos alterado por la delección Δ_{10-21} de SIX6OS1 y el segundo por la mutación POF de SYCE1. **b)** Expresión individual de la secuencia murina de SIX6OS1 Δ_{10-21} en células COS-7, dando lugar a un patrón de expresión nuclear junto a una tenue señal citoplasmática. **c)** Coexpresión de SIX6OS1 Δ_{10-21} y SYCE1 en células COS-7 mostrando un arrastre de SIX6OS1 Δ_{10-21} hacia el patrón punteado propio de SYCE1 en el 98% de las células (como se indica en el gráfico junto a la imagen, n=100 células). Este patrón de colocalización evidencia el mantenimiento de la interacción entre ambas proteínas pese a la delección Δ_{10-21} de SIX6OS1. Barras de escala (b-c), 20 μ m. **d)** Análisis mediante WB de la inmunoprecipitación con anticuerpos α -GFP, α -Flag e IgGs (como control negativo) de extractos proteicos de células HEK 293T transfectadas con los plásmidos indicados. SIX6OS1 Δ_{10-21} forma un complejo coimmunoprecipitante con SYCE1, demostrando que el segundo punto de interacción entre ambas proteínas se mantiene. IP: Inmunoprecipitación; Extr.: Extracto proteico sin inmunoprecipitar; \emptyset : Extracto proteico obtenido a partir de células HEK 293T sin transfectar.

1.8. La delección Δ_{10-21} de SIX6OS1 provoca infertilidad en ratón

Dado que la supresión del dominio de interacción entre SYCE1_{core} y SIX6OS1_N como consecuencia de la mutación POF en la secuencia de *Syce1* da lugar a un fenotipo severo de infertilidad en ratón, decidimos estudiar el significado biológico de la pérdida de la otra interfaz

de unión entre ambas proteínas. Para ello, generamos un modelo murino modificado genéticamente que portara una delección de la secuencia de SIX6OS1 comprendida entre los aminoácidos 10 y 21, respetando el marco de lectura (**Figura 21a-b**).

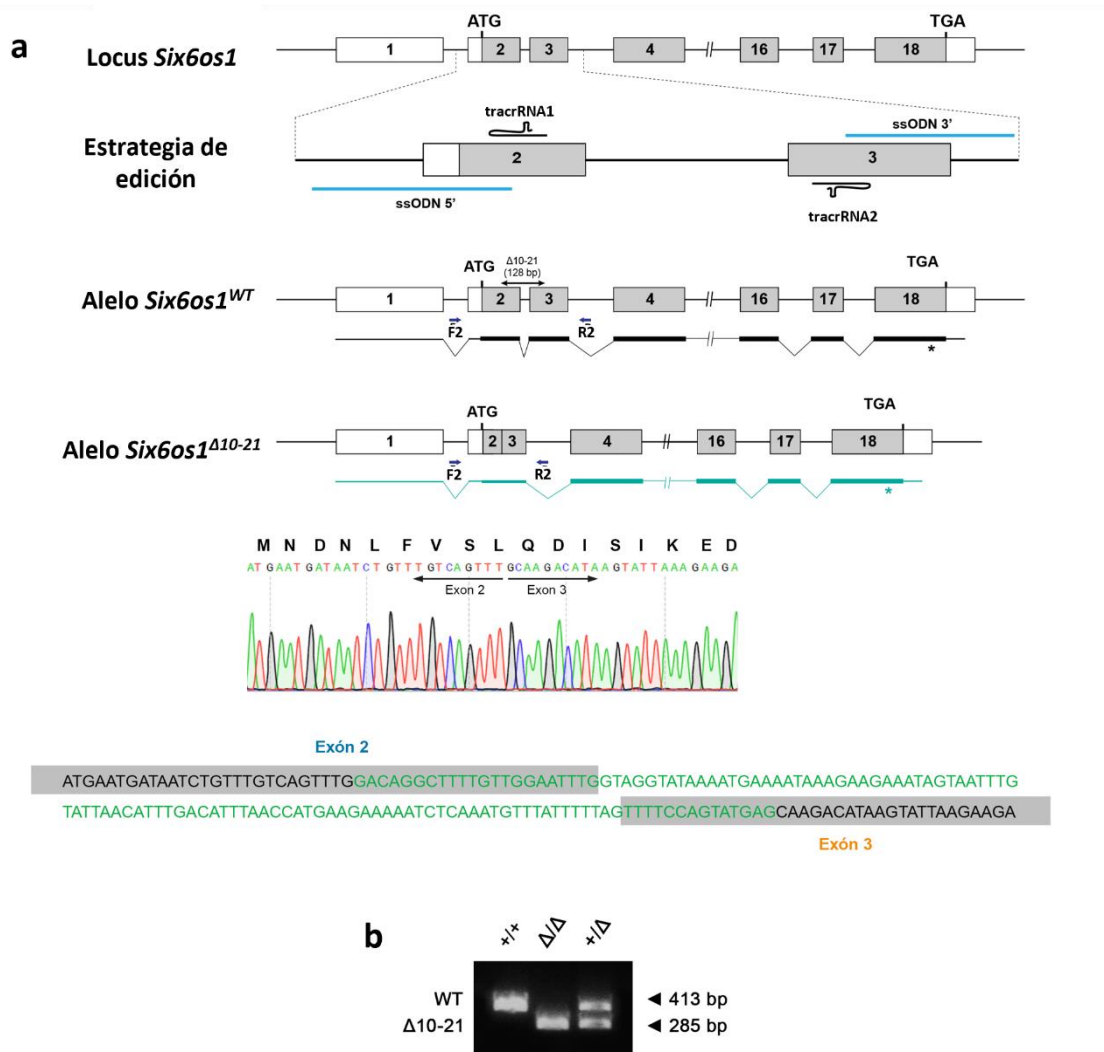


Figura 21. Generación del modelo murino *Six6os1*^{Δ10-21/Δ10-21}. **a)** Representación esquemática del locus *Six6os1* murino y la estrategia de edición genómica empleada. Se muestran los dos tracrRNAs localizados en los exones 2 y 3, respectivamente. El ssODN se compone de un dominio que presenta homología por la región ubicada aguas arriba del lugar del genoma a mutar (denominado ssODN 5') y otro aguas abajo (ssODN 3', ver Tabla 3 en la sección "Materiales y Métodos"). Las regiones codificantes (cajas grises) y no codificantes (cajas blancas) se representan en los diagramas alélicos. Las líneas finas (secuencias no codificantes) y gruesas (secuencias codificantes) ubicadas bajo los exones representan los transcritos esperados derivados de los alelos WT (negro) y mutante (azul). ATG: codón de inicio, TGA y *: codón de STOP. Los oligonucleótidos empleados para el genotipado de los animales (F2 y R2) se representan con flechas bajo los alelos. En la parte inferior del panel se dispone la secuencia nucleotídica generada a partir de la PCR de genotipado del ratón *Six6os1*^{Δ10-21/Δ10-21} obtenida por secuenciación Sanger, así como la secuencia de aminoácidos a la que da lugar su expresión. Bajo el cromatograma recoge la delección de 128 bp de DNA genómico (en verde) derivada de la amplificación por PCR de los mutantes homocigotos. Los exones 2 y 3 aparecen de nuevo sombreados en gris. **b)** Análisis mediante PCR del DNA genómico de tres hermanos de camada a partir de un cruce de ratones heterocigotos *Six6os1*^{WT/Δ10-21}. La amplificación mediante los oligonucleótidos F2 y R2 da lugar a fragmentos de 413 bp y 285 bp para los alelos WT y editado, respectivamente. Individuo WT: +/+; individuo mutante homocigoto: Δ/Δ; individuo heterocigoto: +/-.

Para caracterizar los mutantes generados, en primer lugar, realizamos una evaluación anatómica del aparato reproductor de los homocigotos mutantes (*Six6os1* ^{$\Delta 10-21/\Delta 10-21$} , referenciados como *Six6os1* ^{Δ/Δ} en los paneles por motivos de simplificación). En los machos mutantes observamos una reducción del tamaño testicular en comparación con los presentados por ratones WT (**Figura 22a**), así como una ausencia de espermatozoides en el epidídimo. Dadas las anomalías observadas en los ratones mutantes, a continuación, decidimos analizar en detalle la progresión meiótica de sus gametocitos. De este modo, en primer lugar, analizamos la dinámica de ensamblaje del SC en los espermatocitos mediante doble inmunofluorescencia de las proteínas SYCP3 y SYCP1. Los espermatocitos mutantes presentan un marcaje reducido de SYCP1 (**Figura 22b**), lo que evidencia la existencia de defectos en sinapsis y ensamblaje del SC. A continuación, llevamos a cabo dobles IFs de SYCP3 y la proteína del CE SYCE3. Los resultados obtenidos muestran una disminución en la señal de SYCE3 en los espermatocitos *Six6os1* ^{$\Delta 10-21/\Delta 10-21$} en comparación con los espermatocitos WT (**Figura 22c**).

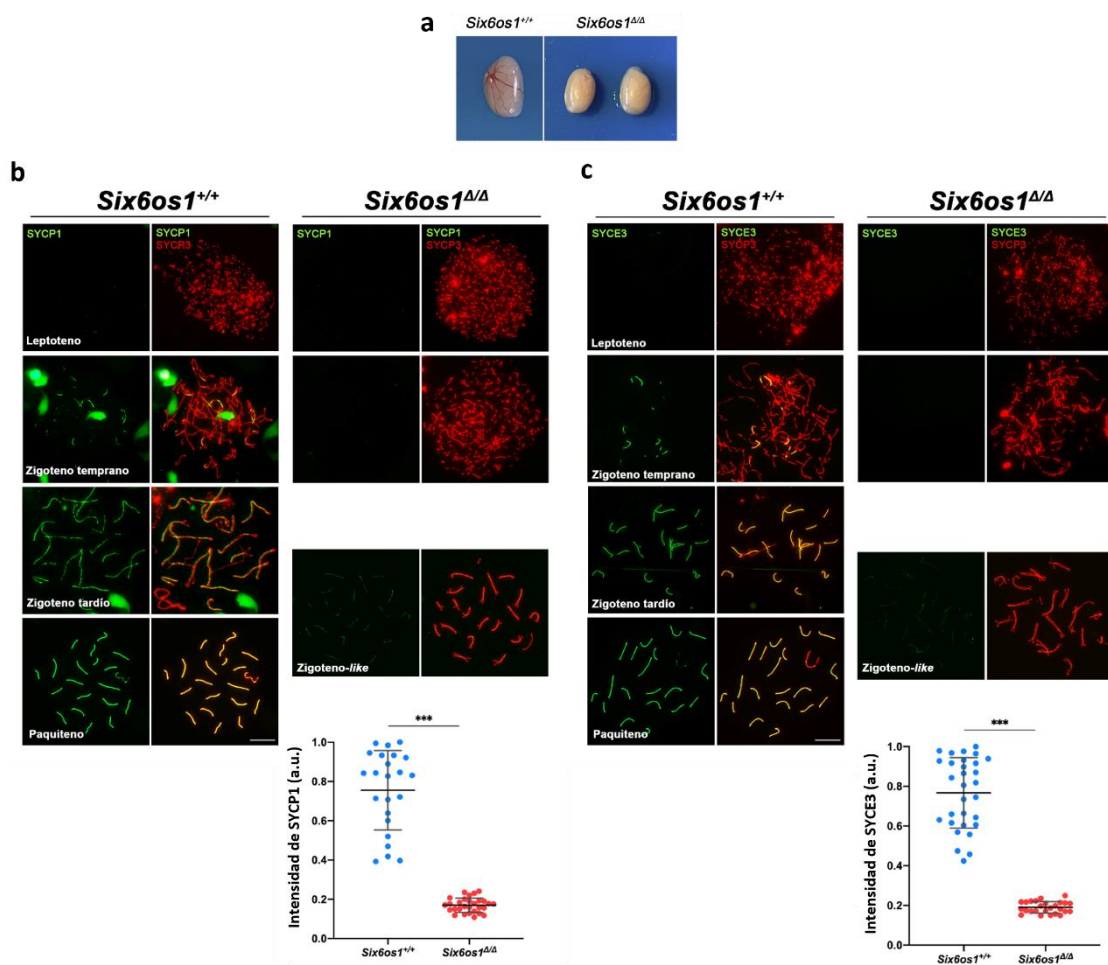


Figura 22. Los espermatocitos *Six6os1* ^{$\Delta 10-21/\Delta 10-21$} presentan un ensamblaje alterado del SC. **a)** Testículos de ratones silvestres *Six6os1*^{+/+} y mutantes *Six6os1* ^{$\Delta 10-21/\Delta 10-21$} (referenciados como *Six6os1* ^{Δ/Δ} en los paneles por motivos de simplificación), mostrando la reducción del tamaño testicular en los mutantes. **b-c)** Doble inmunofluorescencia de SYCP3 (rojo) y las proteínas del SC SYCP1 (**b**) y SYCE3 (**c**) (verde) en espermatocitos *Six6os1*^{+/+} en leptoteno, zigoteno temprano, zigoteno tardío y paquiteno y en espermatocitos *Six6os1* ^{$\Delta 10-21/\Delta 10-21$} en leptoteno, zigoteno temprano y zigoteno-like. Los espermatocitos mutantes presentan una reducción en la carga de SYCP1 (**b**) y SYCE3 (**c**) que evidencia una sinapsis incompleta entre los cromosomas homólogos. La cuantificación de los niveles de intensidad de fluorescencia de SYCP1 (**b**) y SYCE3 (**c**) se muestran en los gráficos ubicados bajo cada panel. Análisis Welch's *t* test: ***: *p*-valor < 0,001. Barras de escala, 10 μ m. a.u.: unidades arbitrarias (*arbitrary units*).

Para profundizar en el análisis del CE de los espermatoцитos mutantes, llevamos a cabo IFs de SYCP3 y el resto de proteínas que lo componen. De este modo, pudimos detectar en los espermatoцитos *Six6os1* ^{$\Delta 10-21/\Delta 10-21$} una señal residual de SYCE1 y SIX6OS1 en comparación con los espermatoцитos silvestres (**Figura 23a-b**). En lo relativo a los factores terminadores de sinapsis, la mutación $\Delta 10-21$ de SIX6OS1 provoca una ausencia total de carga de SYCE2 (**Figura 23c**) y TEX12 (**Figura 23d**) a los ejes cromosómicos de los espermatoцитos. Por todo ello, pudimos concluir que los ratones *Six6os1* ^{$\Delta 10-21/\Delta 10-21$} son infértiles a causa de un bloqueo de sus espermatoцитos en estadio de zigoteno-like, en el que se observa una sinapsis incompleta entre los cromosomas homólogos.

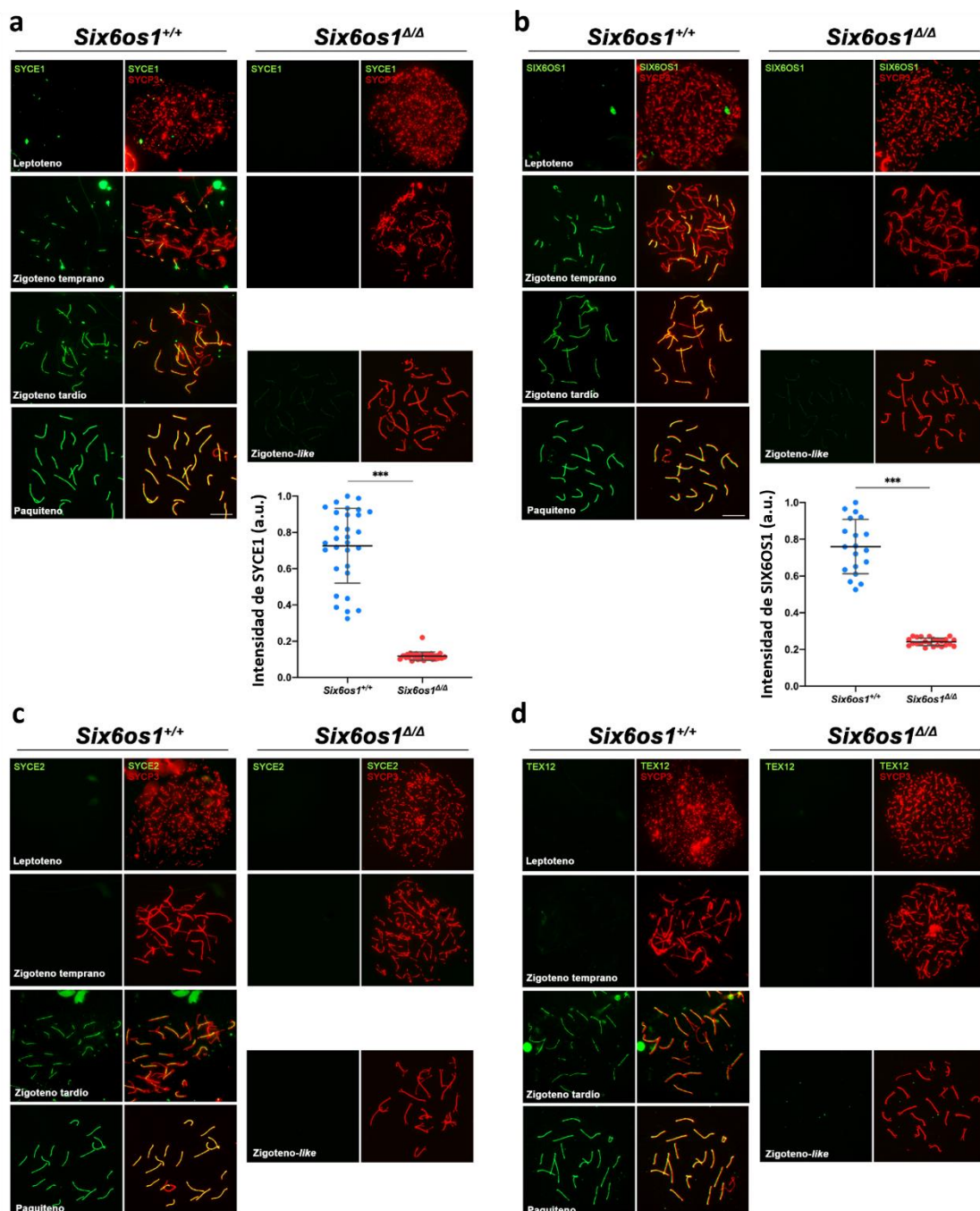


Figura 23. Los espermatoцитos *Six6os1* ^{$\Delta 10-21/\Delta 10-21$} no completan el ensamblaje del CE del SC. Doble inmunofluorescencia de SYCP3 (rojo) y las proteínas del elemento central SYCE1 (a), SIX6OS1 (b), SYCE2 (c) y

TEX12 (d) (verde) en espermatocitos *Six6os1^{+/+}* en leptoteno, zigoteno temprano, zigoteno tardío y paquiteno y en espermatocitos *Six6os1^{Δ10-21/Δ10-21}* en leptoteno, zigoteno temprano y zigoteno-like. Las zigonemas mutantes muestran una reducción significativa en la señal de SYCE1 y SIX6OS1 con respecto a las paquinemas WT y una ausencia total de SYCE2 y TEX12. La cuantificación de los niveles de intensidad de fluorescencia de SYCE1 (a) y SIX6OS1 (b) se muestran en los gráficos ubicados junto a su panel correspondiente. Análisis Welch's *t* test: ***: *p*-valor < 0,001. Barras de escala, 10 μm. a.u.: unidades arbitrarias (*arbitrary units*).

El marcaje mediante IF demuestra la existencia de unos niveles basales de expresión de SIX6OS1 en los espermatocitos mutantes (Figura 23b). Con el fin de evaluar su patrón de expresión, a continuación, analizamos mediante RT-qPCR su transcripción en los testículos de los ratones *Six6os1^{Δ10-21/Δ10-21}*. Los resultados muestran la presencia del transcrito *Six6os1^{Δ10-21}* con niveles de transcripción incluso superiores que el transcrito silvestre (Figura 24a y Tabla 13). Con el fin de determinar si los niveles de transcripción de la proteína mutante se correlacionan con los de expresión proteica, llevamos a cabo un análisis mediante WB de extractos proteicos de testículo. Los resultados obtenidos en el análisis mediante RT-qPCR contrastan con el análisis de la expresión proteica endógena de SIX6OS1 en testículo, la cual resulta ser significativamente menor en los testículos de los ratones mutantes en comparación con los WT (Figura 24b). Esta observación es consistente con la reducción de señal de SIX6OS1 detectada en los espermatocitos *Six6os1^{Δ10-21/Δ10-21}* mediante inmunofluorescencia (Figura 23b). Por último, analizamos la expresión de la variante SIX6OS1_{Δ10-21} sobrepresándola en un sistema heterólogo *in vitro*. Nuestros resultados evidenciaron que la sobrepresión del producto mutante en células HEK 293T no mostró diferencias en términos de intensidad de expresión con respecto a la secuencia WT (Figura 24c).

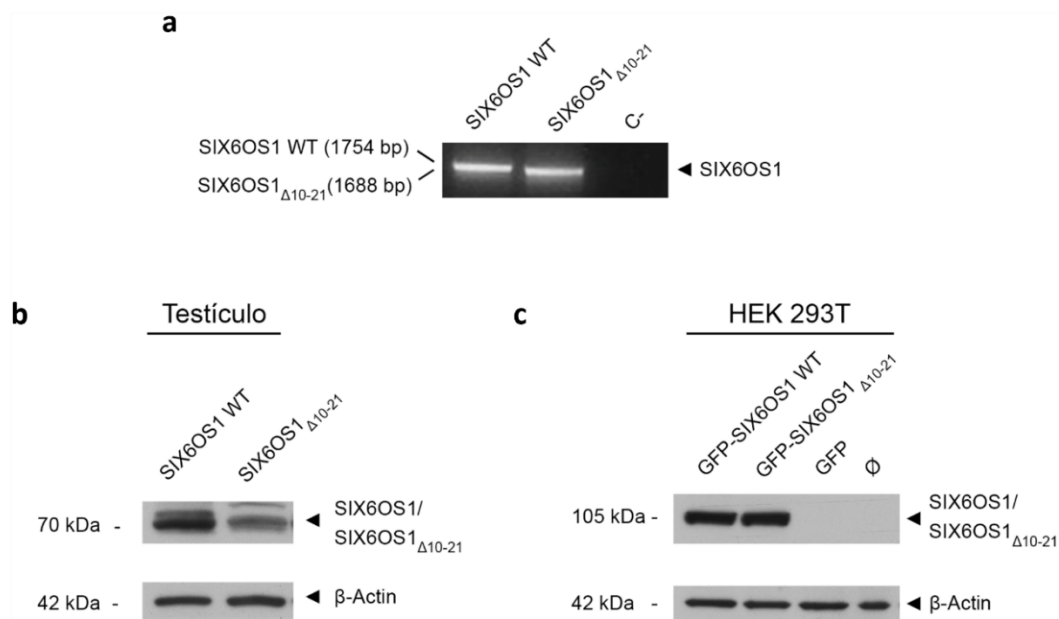


Figura 24. a) Amplificación mediante RT-qPCR Los espermatocitos del cDNA codificante para los transcritos *Six6os1* WT y *Six6os1^{Δ10-21}* utilizando como molde RNA de testículo de ratones de 13 dpp (*Six6os1^{+/+}*) y 3 meses (*Six6os1^{Δ10-21/Δ10-21}*) de edad. El último carril (C-) es el control negativo del experimento (en el cual no se aporta cDNA para la amplificación). ∅: Extracto proteico obtenido a partir de células HEK 293T sin transfectar. **b)** Análisis mediante WB de los extractos proteicos procedentes de ratones *Six6os1^{+/+}* y *Six6os1^{Δ10-21/Δ10-21}* empleando un anticuerpo específico reconocedor de SIX6OS1. Se analizó la expresión de β-Actin como control de carga. **c)** Análisis mediante WB de los extractos proteicos generados a partir de células HEK 293T transfectadas con plásmidos codificantes para las secuencias proteicas murinas de SIX6OS1 WT y SIX6OS1_{Δ10-21}, empleando un anticuerpo específico reconocedor de SIX6OS1. Se analizó la expresión de β-Actin como control de carga.

Genotipo	<i>Six6os1</i>				<i>β-Actin</i>				2 ^{-Ct} norm.	Ratio WT/Δ
	Ct ₁	Ct ₂	Ct _m	2 ^{-Ct}	Ct ₁	Ct ₂	Ct _m	2 ^{-Ct}		
<i>Six6os1</i> ^{+/+}	24,96	23,02	23,99	6,00·10 ⁻⁸	11,97	15,75	13,86	6,73·10 ⁻⁵	8,92·10 ⁻⁴	0,29
<i>Six6os1</i> ^{Δ/Δ}	21,28	22,08	21,68	2,98·10 ⁻⁷	13,09	13,58	13,34	9,68·10 ⁻⁵	3,08·10 ⁻³	

Tabla 13. Análisis mediante qPCR de la expresión relativa de los transcritos *Six6os1* y *Six6os1*_{Δ10-21} en los testículos de ratones WT (+/+) y mutantes homocigotos (Δ/Δ). La expresión de *β-Actin* se cuantificó para normalizar los valores de transcripción de *Six6os1*. El RNA empleado como molde se extrajo de ratones *Six6os1*^{+/+} de 13 dpp de edad y *Six6os1*^{Δ10-21/Δ10-21} adultos de 3 meses de edad, de tal forma que presentasen un contenido celular comparable, mostrando espermatocitos en zigoteno como el tipo celular más avanzado en la división meiótica. Ct: Ciclo umbral (*cycle threshold*), Ctm: Ciclo umbral medio. 2^{-Ct} norm.: valor de 2^{-Ct} normalizado.

Una vez determinados los defectos en la progresión de la sinapsis en los espermatocitos *Six6os1*^{Δ10-21/Δ10-21}, procedimos a evaluar las posibles alteraciones en la recombinación meiótica. Para ello, analizamos mediante IF el marcaje de la histona γ-H2AX en esparcidos de ratones *Six6os1*^{Δ10-21/Δ10-21}. Nuestros resultados demuestran que los espermatocitos de los ratones mutantes homocigotos presentan una retención de la señal de γ-H2AX en los ejes cromosómicos en el estadio del bloqueo meiótico (**Figura 25a**). Dado que esta acumulación de γ-H2AX podría implicar la existencia de problemas en la maquinaria de recombinación, a continuación, analizamos el estado de las recombinasas RAD51 y DMC1 en los espermatocitos mutantes mediante IF. De este modo, detectamos una acumulación en el número de *foci* tanto de RAD51 (**Figura 25b**) como de DMC1 (**Figura 25c**) en los espermatocitos *Six6os1*^{Δ10-21/Δ10-21} bloqueados en comparación con las paquinemas WT. Finalmente, analizamos la generación de COs mediante la tinción de MLH1 por IF, lo que nos permitió observar una ausencia de *foci* de MLH1 sobre los ejes de los espermatocitos mutantes durante el bloqueo en zigoteno-*like* (**Figura 25d**). Esto demuestra que, pese a que las DSBs sí son generados en los espermatocitos *Six6os1*^{Δ10-21/Δ10-21}, no llegan a ser reparadas adecuadamente, lo que impide la formación de COs. Por tanto, la mutación Δ10-21 de SIX6OS1 provoca infertilidad en ratón como consecuencia de la disrupción de su interacción con el *core* de SYCE1, ocasionando un ensamblaje del SC incompleto y una reparación de las DSBs defectiva. Este fenotipo es similar al desencadenado por la mutación POF de SYCE1 y por la disrupción de otros componentes estructurales del SC (Bolcun-Filas et al., 2007, 2009; Gómez-H et al., 2016; Hamer et al., 2008; Schramm et al., 2011).

En conjunto, nuestros resultados evidencian que el mantenimiento de la integridad de las secuencias de SYCE1 y SIX6OS1 es esencial para el correcto ensamblaje del SC. La mutación en homocigosis en la secuencia de SYCE1 detectada en las pacientes diagnosticadas con POF es la responsable de su condición infértil al comprometer una de las interfaces de unión entre SYCE1 y SIX6OS1. Por otro lado, la mutación Δ10-21 de SIX6OS1, también provoca infertilidad al alterar otro dominio de interacción entre ambas proteínas. Pese a que, en ambos casos, la unión entre SYCE1 y SIX6OS1 se mantiene a través del sitio de interacción que queda intacto, la pérdida de uno solo de los dominios es suficiente para comprometer el ensamblaje del SC y, consecuentemente, la fertilidad *in vivo*.

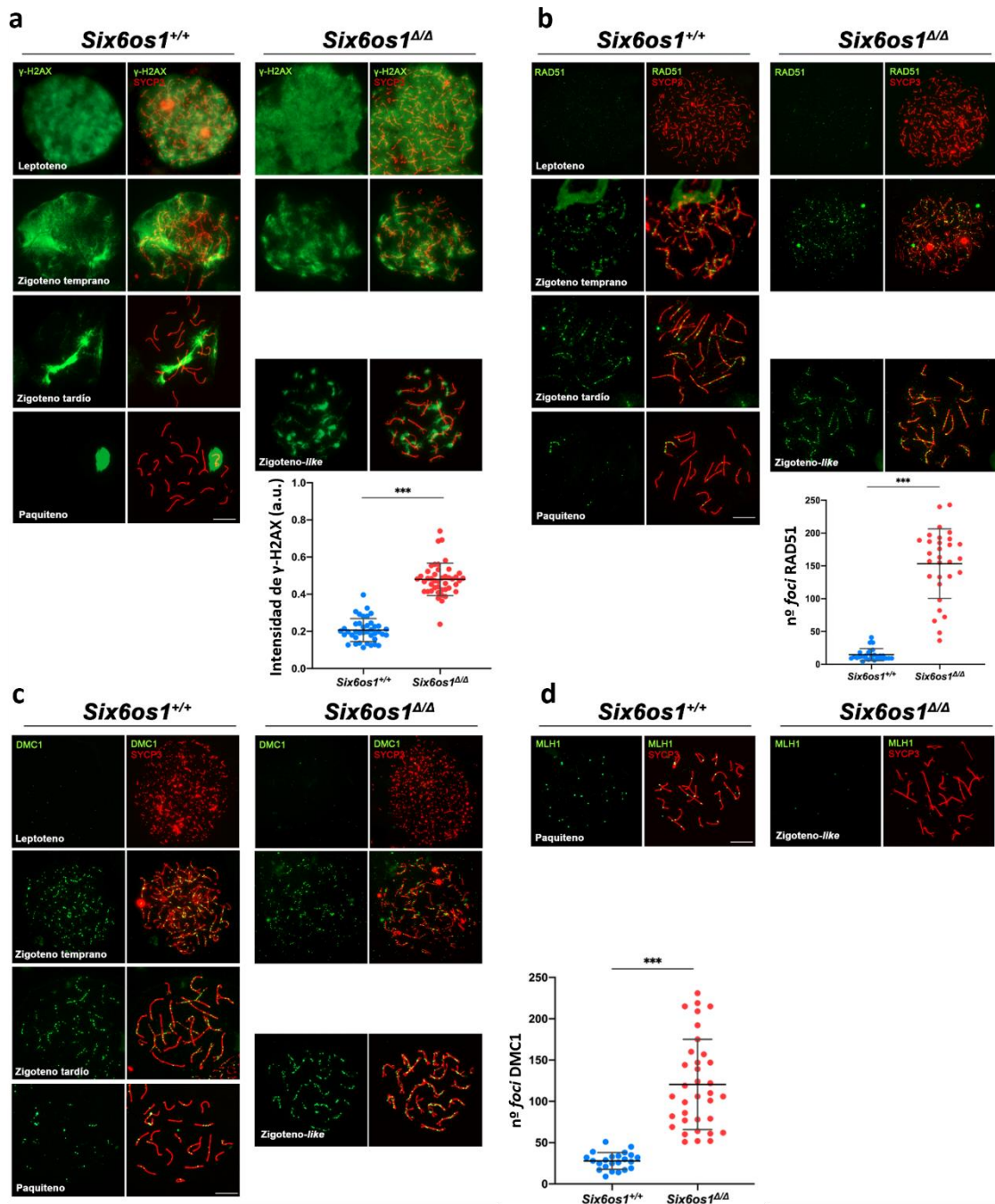


Figura 25. Los espermatocitos *Six6os1*^{Δ10-21/Δ10-21} son capaces de generar DSBs, pero no de repararlos. **a-c)** Doble inmunofluorescencia de SYCP3 (rojo) y γ -H2AX (**a**), RAD51 (**b**) y DMC1 (**c**) (verde) en espermatocitos *Six6os1*^{+/+} en leptoteno, zigoteno temprano, zigoteno tardío y paquiteno y en espermatocitos *Six6os1*^{Δ10-21/Δ10-21} en leptoteno, zigoteno temprano y zigoteno-like. **a)** La señal de γ -H2AX se dispone decorando todos los ejes cromosómicos en los espermatocitos mutantes en el bloqueo meiótico, mientras que se localiza exclusivamente en torno al par de cromosomas sexuales (*sex body*) en las paquinemas WT. **b-c)** Los espermatocitos mutantes en estadio de zigoteno-like muestran una acumulación significativa en el número de *foci* de RAD51 (**b**) y DMC1 (**c**) con respecto a las paquinemas WT, indicando la persistencia de DSBs sin reparar. **d)** Doble inmunofluorescencia de SYCP3 (rojo) y MLH1 (verde) en espermatocitos *Six6os1*^{+/+} en paquiteno y *Six6os1*^{Δ10-21/Δ10-21} en zigoteno-like mostrando la ausencia de carga de MLH1 (y, en consecuencia, la incapacidad de generar COs) en las células mutantes. La cuantificación de los niveles de intensidad de fluorescencia de γ -H2AX (**a**) y del número de *foci* de RAD51 (**b**) y DMC1 (**c**) se muestran en los gráficos ubicados junto a cada correspondiente panel. Análisis Welch's *t* test: ***: *p*-valor < 0,001. Barras de escala, 10 μ m. a.u.: unidades arbitrarias (*arbitrary units*).

2. La histona específica de oocitos H1FOO no es esencial para la gametogénesis

El DNA se empaqueta en el núcleo en subunidades estructurales denominadas nucleosomas. Estas estructuras están compuestas por 147 bp de DNA enrollados en torno a un octámero compuesto por dos copias de cada una de las histonas centrales: H2A, H2B, H3 y H4 (**Figura 6**). Las subunidades octaméricas quedan unidas entre ellas por fragmentos de DNA *linker*, a los que se asocia una quinta clase de histonas denominada H1. La histona H1FOO es un miembro de la familia de las histonas H1 cuya expresión proteica está restringida al oo(Fyodorov et al., 2018; Pan & Fan, 2016; Prendergast & Reinberg, 2021)& Fan, 2016; Prendergast & Reinberg, 2021).

Dada la complejidad de los mecanismos que tienen lugar durante la oogénesis, la fertilización y el desarrollo embrionario, resulta esencial profundizar en el estudio de las proteínas que intervienen en estos procesos. En particular, el conocimiento sobre la implicación de H1FOO en la infertilidad ha sido limitado debido a la falta de análisis *in vivo* de su función. Por lo tanto, en esta Tesis Doctoral, se presenta por primera vez un estudio *in vivo* sobre la función de H1FOO en la gametogénesis (Sánchez-Sáez et al., 2022), lo que permitirá una mejor comprensión de los mecanismos que intervienen en la fertilidad.

2.1. Generación del modelo murino mutante $H1foo^{-/-}$

Con el fin de estudiar el papel que desempeña la histona H1FOO durante la gametogénesis y el desarrollo embrionario, desarrollamos un mutante murino nulo de $H1foo$ para evaluar las consecuencias de su deficiencia en ratón. El gen $H1foo$ murino está codificado por cinco exones localizados en el cromosoma 6, con el codón de inicio (ATG) ubicado en el primer exón y el codón de STOP (TGA) en el quinto. Haciendo uso de la tecnología CRISPR/Cas9, decidimos una estrategia para crear una delección de los exones 2 y 3 del gen $H1foo$ murino. Esta edición potencialmente daría lugar a un alelo nulo como consecuencia de una pérdida del 70% de la secuencia codificante (**Figura 26a**). A partir de la microinyección llevada a cabo haciendo uso de los componentes del sistema CRISPR/Cas9 representados en la **Figura 26a**, seleccionamos un ratón fundador portador de la edición deseada el cual se cruzó con ratones WT C57BL/6J. Los descendientes heterocigotos se cruzaron entre sí para obtener los ratones mutantes homocigotos, que se identificaron mediante PCR (**Figura 26b**).

Para verificar que la mutación generada daba efectivamente lugar a un alelo nulo, analizamos la expresión de H1FOO en oocitos sin fertilizar bloqueados en metafase II, usando un anticuerpo que reconoce específicamente esta histona. Los resultados de la inmunolocalización de H1FOO demostraron su presencia decorando la cromatina de los oocitos WT (**Figura 26c**). Sin embargo, en los oocitos obtenidos a partir de ratonas $H1foo^{-/-}$ no se observó señal de H1FOO, lo que nos permitió validar nuestro modelo animal y la localización celular de la histona (**Figura 26c**).

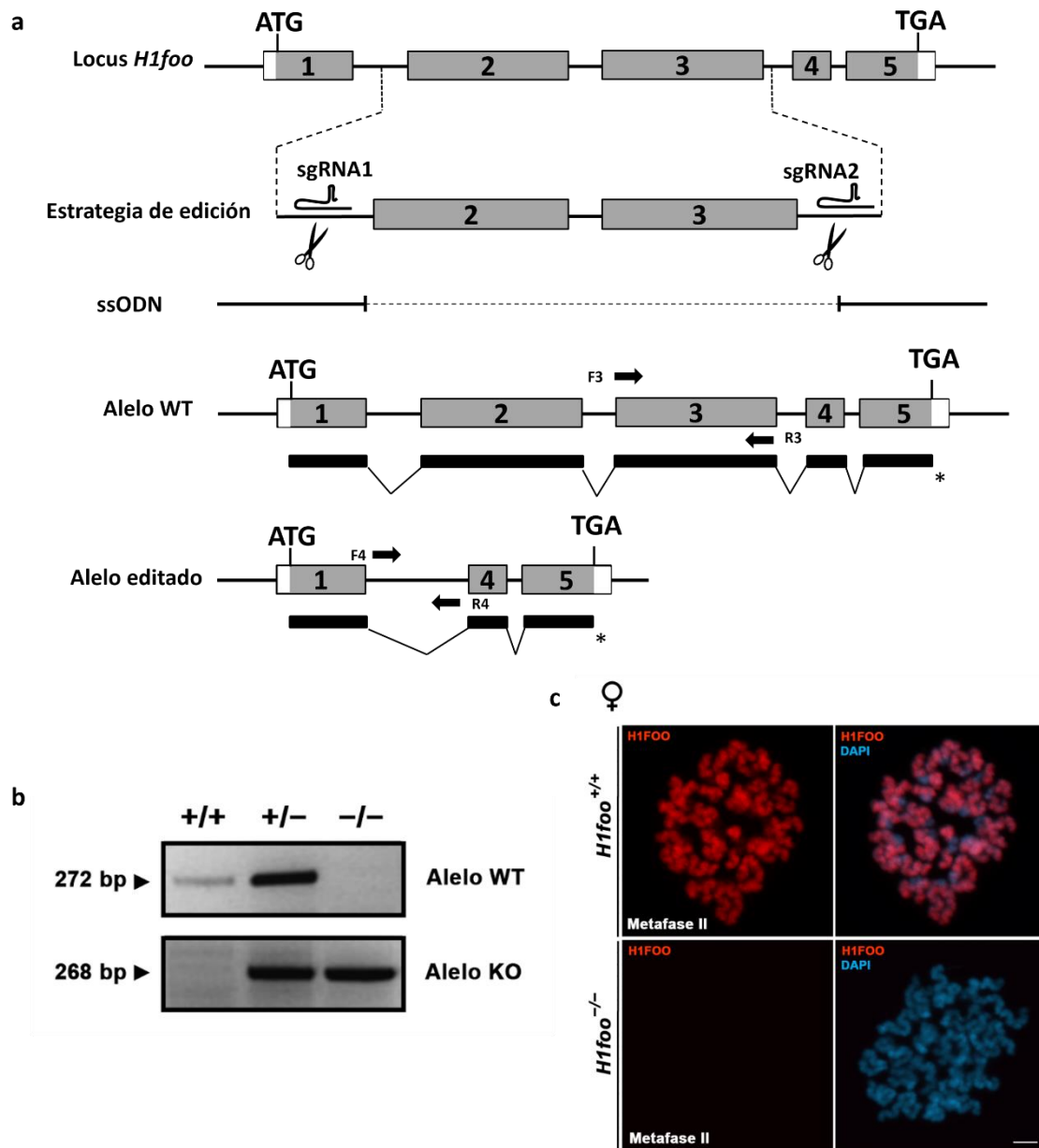


Figura 26. Generación del modelo murino $H1foo^{-/-}$. **a)** Representación esquemática del locus $H1foo$ murino y la estrategia de edición genómica empleada. Se muestran las dos sgRNAs flanqueando los exones 2 y 3, respectivamente. El ssODN se compone de un dominio que presenta homología por la región ubicada aguas arriba del exón 2 y otro aguas abajo del exón 3. Las regiones codificantes (cajas grises) y no codificantes (cajas blancas) se representan en los diagramas alélicos. Las líneas finas (secuencias no codificantes) y gruesas (secuencias codificantes) ubicadas bajo los exones representan los transcritos esperados derivados de los alelos WT y mutante. ATG: codón de inicio, TGA y *: codón de STOP. Los oligonucleótidos empleados para el genotipado de los animales se representan con flechas bajo los alelos (F3 y R3 para la amplificación del alelo WT, F4 y R4 para el alelo KO editado). **b)** Análisis mediante PCR del DNA genómico de tres hermanos de camada a partir de un cruce de ratones heterocigotos $H1foo^{+/-}$. La amplificación a partir de las parejas de oligonucleótidos F3-R3 y F4-R4 da lugar a fragmentos de 272 bp y 268 bp para los alelos WT y editado, respectivamente. Individuo WT: +/+; individuo heterocigoto: +/-; individuo mutante homocigoto: -/-. **c)** Inmunofluorescencia de H1FOO (rojo) en oocitos en cultivo bloqueados en metafase II de ratonas $H1foo^{+/+}$ y $H1foo^{-/-}$. La señal de H1FOO se localiza repartida por la cromatina (en azul, DAPI) de los oocitos WT, pero aparece completamente ausente en los de las ratonas $H1foo^{-/-}$. Barra de escala, 10 μ m.

Pese a que los niveles máximos de transcripción de *H1foo* se alcanzan en oocitos secundarios y en embriones en estadio de una sola célula tras la fertilización, existe una transcripción basal tanto en espermatocitos como en oocitos primarios (da Cruz et al., 2016). Por ello, tratamos de localizar esta histona mediante inmunofluorescencia en oocitos embrionarios obtenidos a 16,5 dpc. Sin embargo, observamos una ausencia total de marcaje de H1FOO durante toda la primera profase meiótica en hembras (Figura 27).

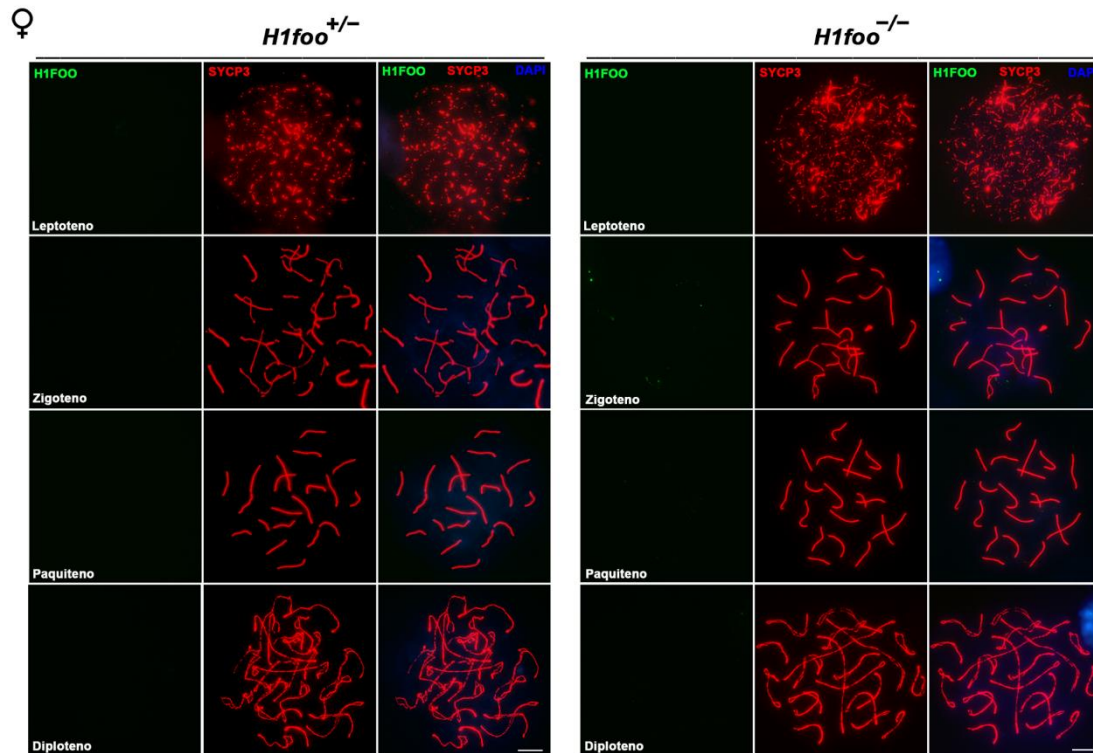


Figura 27. Doble inmunofluorescencia de H1FOO (verde) y SYCP3 (rojo) en esparcidos de oocitos de ratonas *H1foo*^{+/-} y *H1foo*^{-/-} a 16,5 dpc, mostrando una ausencia total de señal de H1FOO durante la primera profase meiótica tanto en oocitos heterocigotos como KO. Barras de escala, 10 μm.

Mediante secuenciación de RNA de células únicas (scRNA-seq, *single-cell RNA sequencing*), se ha descrito que H1FOO se expresa también en espermatocitos y espermatidas en humanos y en ratón (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000178804-H1-8/single+cell+type>; da Cruz et al., 2016). Considerando que, además, H1FOO se carga a la cromatina de los espermatozoides tras la fertilización, decidimos analizar si esta histona se encuentra involucrada en el progreso de la espermatogénesis. Para ello, llevamos a cabo un marcaje mediante IF de H1FOO en esparcidos de espermatocitos, analizando desde el estadio de espermatogonia hasta el de espermatozoide. De acuerdo con nuestros resultados, no observamos señal de H1FOO en ningún estadio meiótico durante la espermatogénesis (Figura 28).

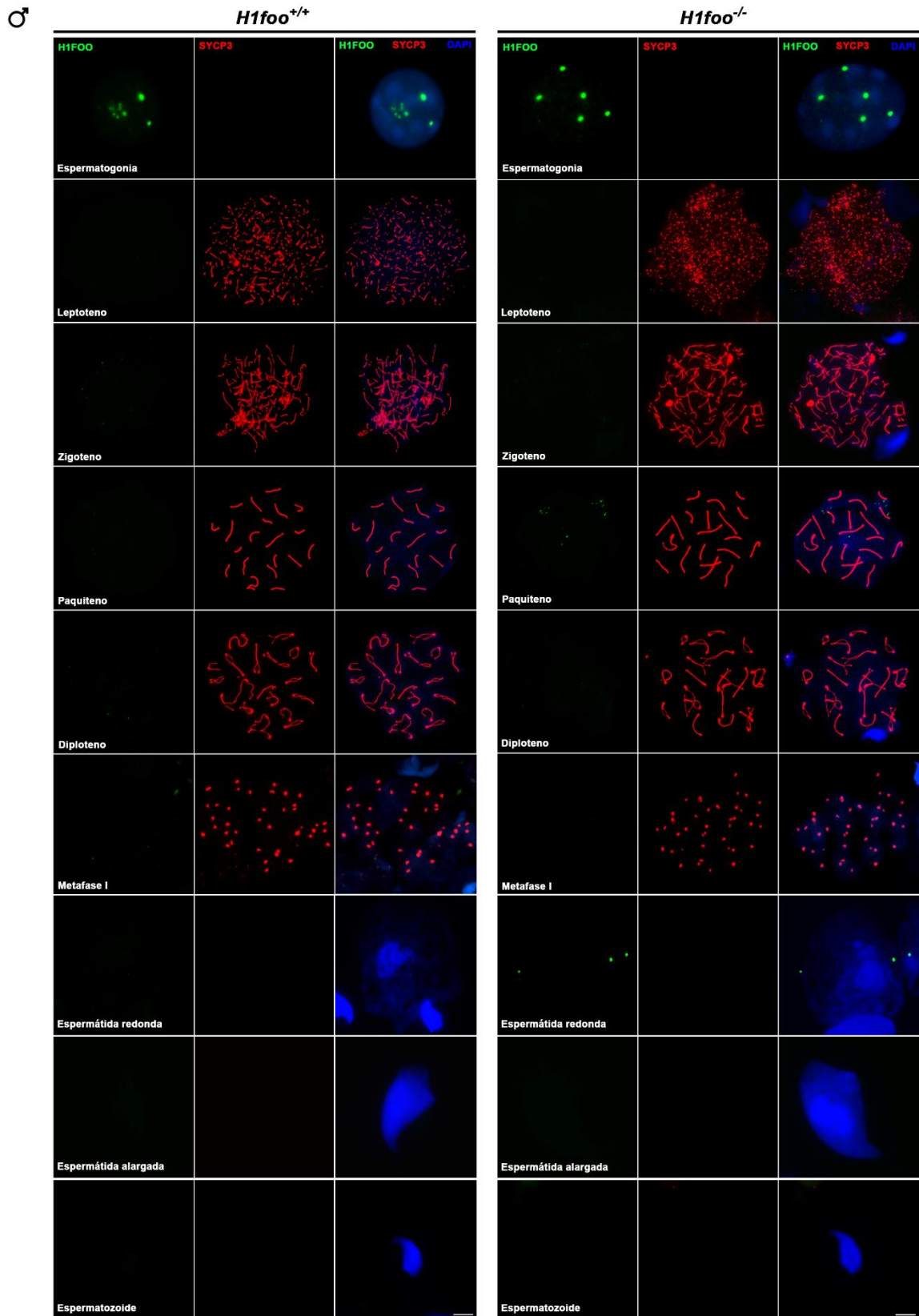


Figura 28. Doble inmunofluorescencia de H1FOO (verde) y SYCP3 (rojo) sobre esparcidos de espermatocitos de ratones *H1foo*^{+/+} y *H1foo*^{-/-}, mostrando la ausencia total de señal específica de H1FOO tanto en espermatogonias como en espermatocitos primarios (leptoteno-metafase I), espermátidas redondas y alargadas y espermatozoides en ambos genotipos. Barras de escala, 10 μ m.

2.2. Los ratones *H1foo*^{-/-} son fértiles

Para determinar el potencial efecto de la ausencia de H1FOO en la capacidad reproductiva de los ratones mutantes, llevamos a cabo un ensayo de fertilidad. Para ello, establecimos cruces entre parejas de heterocigotos (*H1foo*^{+/-}) por un lado y de mutantes homocigotos (*H1foo*^{-/-}) por otro. La presencia de tapón copulatorio en la vagina de las hembras se monitorizó cada mañana y se registró el número de crías por camada. Tanto los machos como las hembras deficientes en H1FOO resultaron ser fértiles, se desarrollaron con normalidad y no presentaron ningún fenotipo somático reseñable. Cuantitativamente, los cruzamientos de los ratones *H1foo*^{-/-} entre ellos dio lugar a camadas semejantes en número y tamaño al establecido entre ratones heterocigotos (Figura 29). Esto que nos permitió descartar la existencia de letalidad intrauterina causada por defectos durante el desarrollo embrionario, así como una letalidad perinatal. Para evaluar la posible aparición de un fenotipo de infertilidad tardío, cruzamos individuos KO de segunda generación (F2) entre ellos. Los resultados de este análisis de fertilidad mostraron un tamaño y frecuencia de camadas normal para el cruzamiento de individuos KO de segunda generación, lo que evidenció la ausencia de un fenotipo tardío en sucesivas generaciones (Tabla 14).

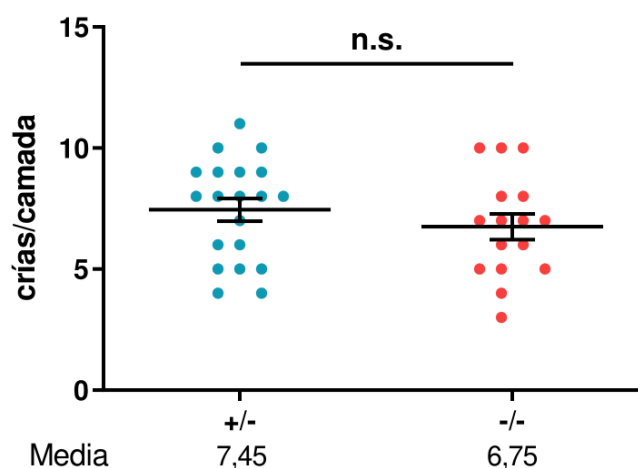


Figura 29. Ensayo de fertilidad de ratones heterocigotos (azul) y mutantes homocigotos (rojo) mostrando el número de crías obtenidas en cada camada para cada uno de los cruces. El valor medio de cada condición se dispone bajo la gráfica. Análisis Welch's *t* test: n.s.: no significativo.

	Numero de camadas	Número de crías por camada
Hembra #1	6	7,5
Hembra #2	5	7

Tabla 14. Cruce de machos KO con hembras KO de segunda generación (F2) evidenciando la ausencia de un fenotipo infértil tardío.

A continuación, con el fin de detectar posibles anomalías sutiles en el sistema reproductivo de las hembras y los machos, decidimos llevar a cabo una evaluación de los ovarios y testículos pertenecientes a ratones *H1foo*^{+/+} y *H1foo*^{-/-} adultos. En primer lugar, realizamos un análisis histológico de secciones de ovarios de las ratonas mutantes. Nuestros resultados demuestran que los ovarios de las hembras adultas carentes de H1FOO presentan una normal

distribución de los folículos y una apariencia del estroma similar a la de sus hermanas de camada WT (**Figura 30a**). Por otro lado, los testículos de los machos *H1foo*^{-/-} presentan un tamaño y peso similar a los de los individuos WT (**Figura 30b**).

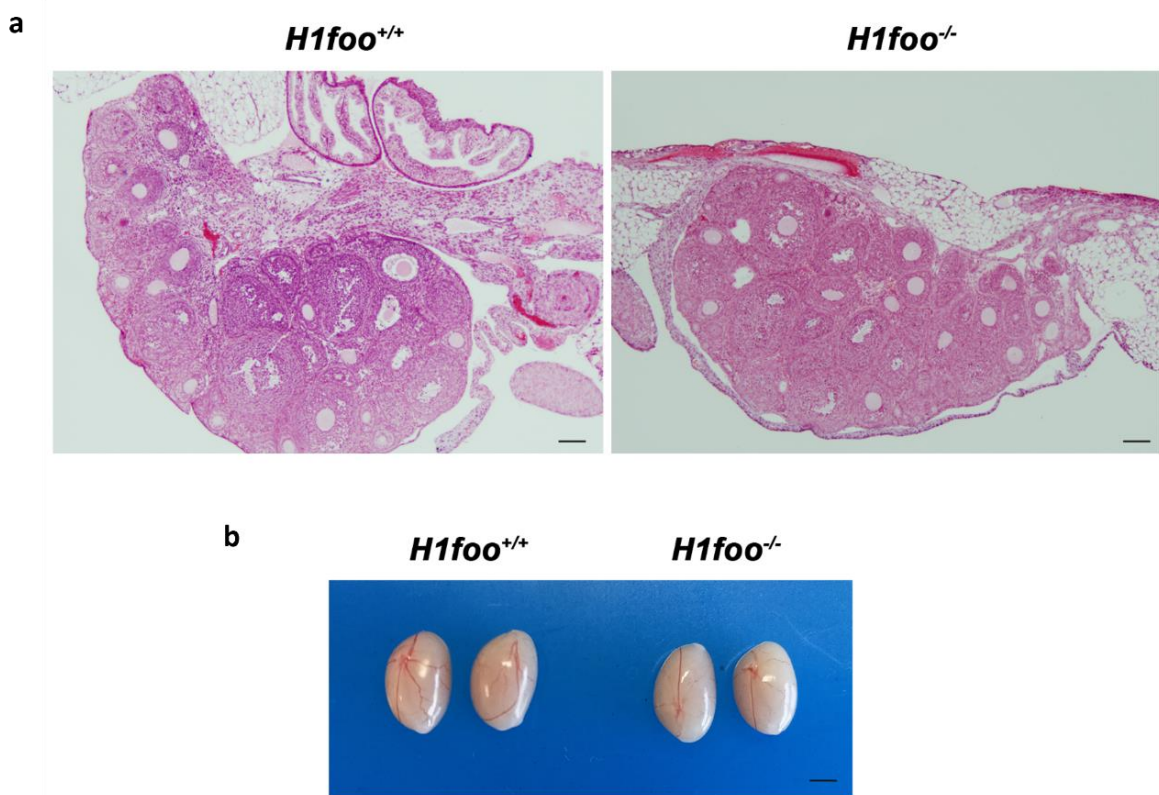


Figura 30. a) Análisis histopatológico de secciones ováricas de ratonas *H1foo*^{+/+} y *H1foo*^{-/-} teñidas con hematoxilina-eosina, mostrando la ausencia de defectos en los ovarios de las ratonas adultas carentes de H1FOO. Barras de escala, 20 μm. **b)** La delección genética de *H1foo* no provoca diferencias en el tamaño testicular en ratón (testículos tomados de ratones de 3 meses de edad). Barra de escala, 2 mm.

2.3. La ausencia de H1FOO no altera la sinapsis, la generación de DSBs ni la dinámica telomérica

A continuación, y para profundizar en el estudio de la implicación de H1FOO en la progresión meiótica en hembras, analizamos la dinámica de ensamblaje y desensamblaje del SC en oocitos embrionarios a 16,5 dpc mediante doble inmunofluorescencia de las proteínas del SC SYCP3 y SYCP1. La proteína de los TFs SYCP1 se dispone en las regiones sinapsadas durante la primera profase meiótica. En los oocitos *H1foo*^{-/-} se detectó una dinámica sináptica comparable a la de los oocitos *H1foo*^{+/-}, que se analizaron como control (**Figura 31a**). Sin embargo, los oocitos mutantes presentan un leve (pero no significativo) retraso en la transición a paquiteno, tal y como indica la ligera acumulación de zigonemas en las hembras KO (**Figura 31b**).

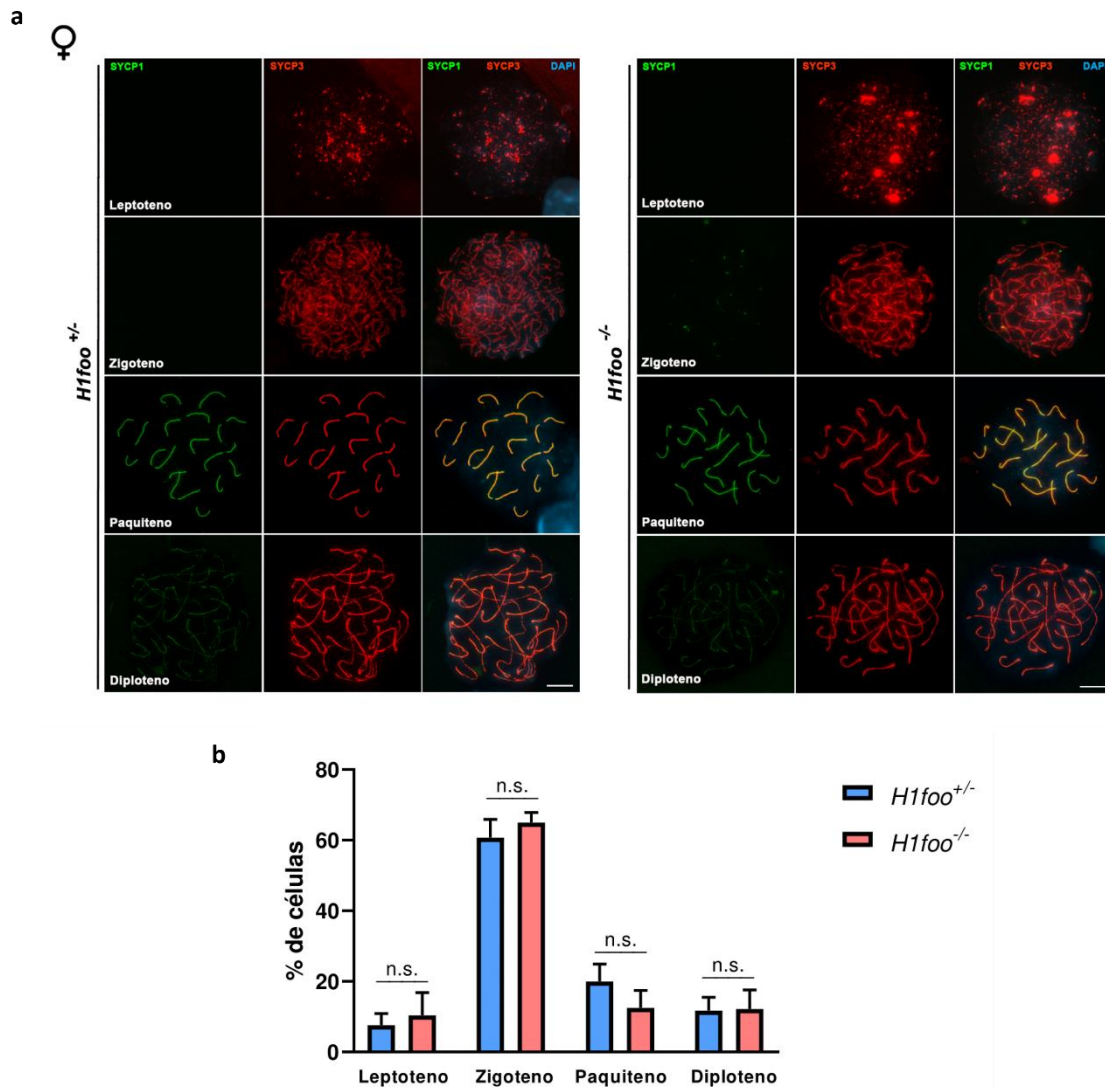


Figura 31. a) Doble inmunofluorescencia de SYCP1 (verde) y SYCP3 (rojo) sobre esparcidos de oocitos de ratonas *H1foo*^{+/-} y *H1foo*^{-/-} a 16,5 dpc. Los oocitos que no expresan H1FOO muestran un comportamiento cromosómico adecuado y los procesos de sinapsis y desinapsis evidencian un marcaje de SYCP1 similar al de sus hermanas de camada heterocigotas. Barras de escala, 10 μ m. **b)** Distribución porcentual del número de células en cada estadio en las preparaciones de esparcidos de oocitos a 16,5 dpc, mostrando una leve (aunque no significativa) acumulación de células en zigoteno en las ratonas *H1foo*^{-/-}. n=3. Análisis Welch's *t* test: n.s.: no significativo.

Teniendo en cuenta la importancia biológica y la complejidad de los mecanismos que gobiernan la generación de las DSBs, decidimos evaluar si estas roturas se inducen adecuadamente en los oocitos deficientes en H1FOO. En concreto, para descartar que el ligero retraso en la transición zigoteno-paquiteno en los oocitos mutantes fuera consecuencia de una desregulación de las etapas tempranas de resolución de DSBs, llevamos a cabo un análisis mediante inmunofluorescencia de γ -H2AX. Como se ha indicado previamente, esta variante histónica cataliza la activación de la maquinaria de recombinación al ser fosforilada por la quinasa ATM. Los oocitos *H1foo*^{-/-} presentan niveles similares de γ -H2AX en comparación con los heterocigotos tanto en zigoteno como en paquiteno, por lo que pudimos descartar la existencia de un mecanismo aberrante en la inducción de DSBs (**Figura 32a**).

Con el objetivo de investigar si había alguna otra causa que pudiera estar contribuyendo al ligero retraso en la progresión de la primera profase meiótica de los oocitos mutantes, como

podría ser la posible presencia de sinapsis entre cromosomas no homólogos, se llevó a cabo un análisis de los centrómeros y telómeros en esparcidos de oocitos. A través de este análisis, se observó una dinámica telomérica (identificada mediante la proteína SUN1, tal como se muestra en **la Figura 32b**) y centromérica (identificada mediante la marcaje de la proteína ACA, **Figura 32c**) completamente normal en los cromosomas de los oocitos $H1foo^{-/-}$, siendo comparable a la de los controles heterocigotos.

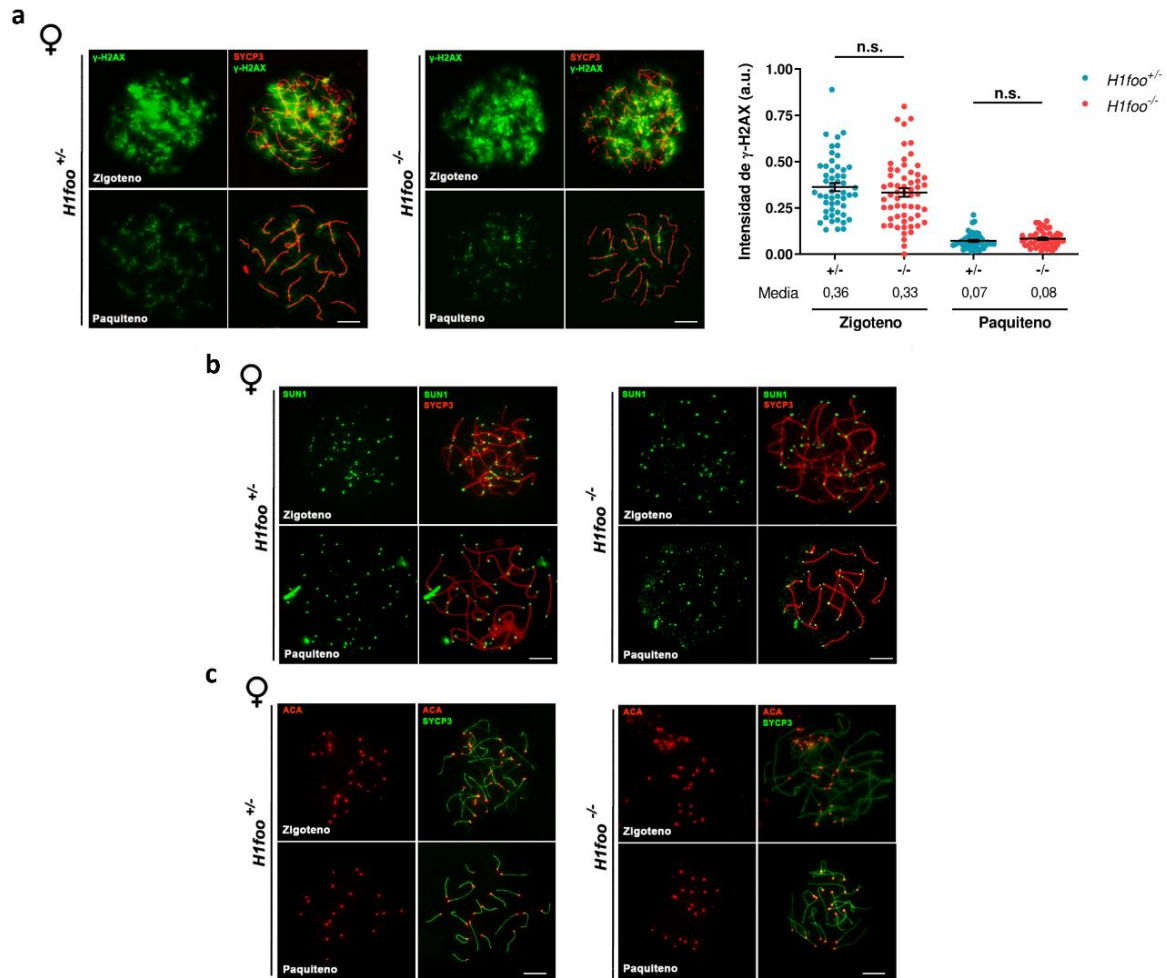


Figura 32. a) Doble inmunofluorescencia de γ -H2AX (verde) y SYCP3 (rojo) sobre esparcidos de oocitos de ratonas $H1foo^{+/-}$ y $H1foo^{-/-}$ a 16,5 dpc. Los oocitos heterocigotos y los deficientes en H1FOO muestran un mismo patrón de distribución de γ -H2AX (señal decorando toda la cromatina en zigoteno y rodeando sutilmente los ejes cromosómicos en paquiteno). A la derecha del panel se dispone el gráfico de cuantificación de la intensidad de señal de γ -H2AX. n=3. Análisis Welch's t test: n.s.: no significativo. **b)** Doble inmunofluorescencia de SUN1 (verde) y SYCP3 (rojo) sobre esparcidos de oocitos de ratonas $H1foo^{+/-}$ y $H1foo^{-/-}$ a 16,5 dpc, mostrando una dinámica telomérica adecuada tanto en las zigonemas como en las paquinemas de los oocitos pertenecientes a ambos genotipos. **c)** Doble inmunofluorescencia de ACA (rojo) y SYCP3 (verde) sobre esparcidos de oocitos de ratonas $H1foo^{+/-}$ y $H1foo^{-/-}$ a 16,5 dpc, mostrando una disposición apropiada de los centrómeros en los oocitos de ambos genotipos tanto en zigoteno como en paquiteno. Barras de escala, 10 μ m.

Dado que atendiendo a los datos de scRNA-seq tanto en humanos como en ratón (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000178804-H1-8/single+cell+type>; da Cruz et al., 2016), $H1foo$ se transcribe en ratón en el estadio de espermatogonia y paquiteno, llevamos a cabo un análisis de la dinámica de sinapsis también en machos $H1foo^{-/-}$ para evaluar la posible existencia de un fenotipo sináptico. Consideramos esencial evaluar sinapsis en los espermatocitos mutantes

para descartar que la ausencia de expresión de H1FOO en espermatoцитos que sugieren nuestros resultados (**Figura 28**), no fuera debida a motivos técnicos (como podría ser la interferencia del fijador empleado en el esparcido de espermatoцитos con el anticuerpo reconecedor de H1FOO). Por tanto, analizamos mediante IF la distribución de las proteínas del SC SYCP3 y SYCP1 en esparcidos de espermatoцитos. De este modo, pudimos concluir que no existe ninguna alteración en la sinapsis y desinapsis de los ejes cromosómicos de los machos KO (**Figura 33**). Estos resultados, en su conjunto, evidencian que H1FOO no desempeña ningún rol crítico en la progresión de la meiosis temprana ni en machos ni en hembras.

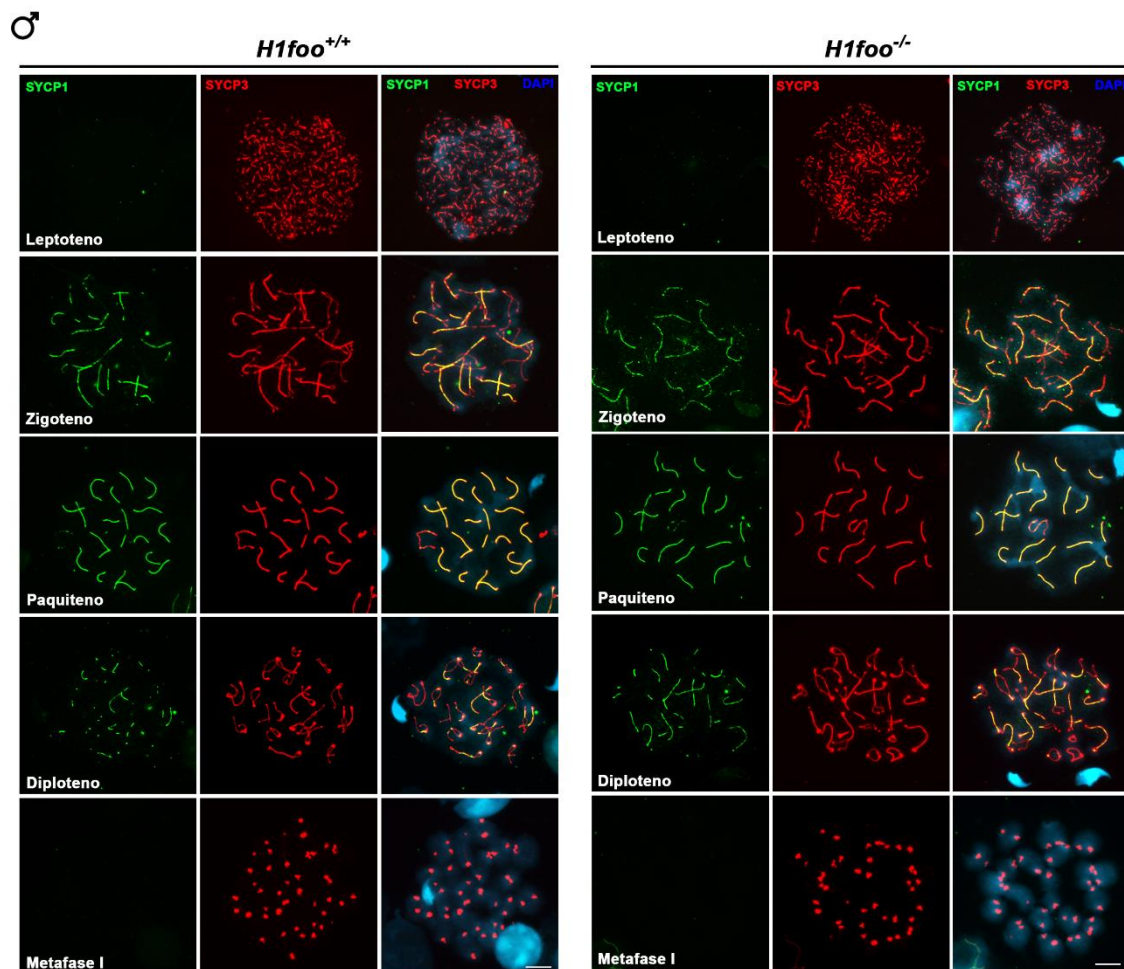


Figura 33. Doble inmunofluorescencia de SYCP1 (verde) y SYCP3 (rojo) sobre esparcidos de espermatoцитos de ratones *H1foo*^{+/+} y *H1foo*^{-/-}, mostrando una sinapsis y desinapsis adecuada del SC en los espermatoцитos de los individuos mutantes y una correcta progresión meiótica desde leptoteno hasta metafase I. Barras de escala, 10 μm.

2.4. La pérdida de H1FOO no altera la reprogramación de MEFs

Las células somáticas pueden ser reprogramadas dando lugar a iPSCs mediante la expresión ectópica de los factores *Klf4* y *Myc* (K. Takahashi & Yamanaka, 2006). Esta reprogramación desencadena una cascada de eventos celulares que incluyen una reorganización del perfil epigenético. Diversos análisis de transcriptómica han permitido identificar una serie de constituyentes de los oocitos que están involucrados en potenciar la reprogramación de células somáticas (CORFs, *Candidate Oocyte Reprogramming Factors*) (Awe & Byrne, 2013). H1FOO se ha descrito como uno de estos CORFs, y su sobreexpresión ha sido relacionada con un incremento en la eficiencia de reprogramación

(Kunitomi et al., 2016). Para profundizar en el posible rol que desempeña H1FOO en la regulación de los mecanismos de redistribución epigenética desencadenados durante la reprogramación *in vitro* de cultivos celulares, indujimos la generación de iPSCs utilizando MEFs generados a partir de embriones $H1foo^{+/+}$, $H1foo^{+/-}$ y $H1foo^{-/-}$. A continuación, llevamos a cabo un conteo del número de colonias con tinción positiva para fosfatasa alcalina (AP, *Alkaline Phosphatase*), un marcador típico de células en estado desdiferenciado. Nuestros resultados evidencian que no existen diferencias significativas en la capacidad de generación de iPSCs a partir de los MEFs de los tres genotipos analizados (**Figura 34**). Por tanto, podemos concluir que, pese a que un incremento en la expresión de $H1foo$ contribuye a la generación de iPSCs de mejor calidad (Kunitomi et al., 2016), su ausencia no supone un impedimento para la capacidad de reprogramación de los MEFs hacia iPSCs.

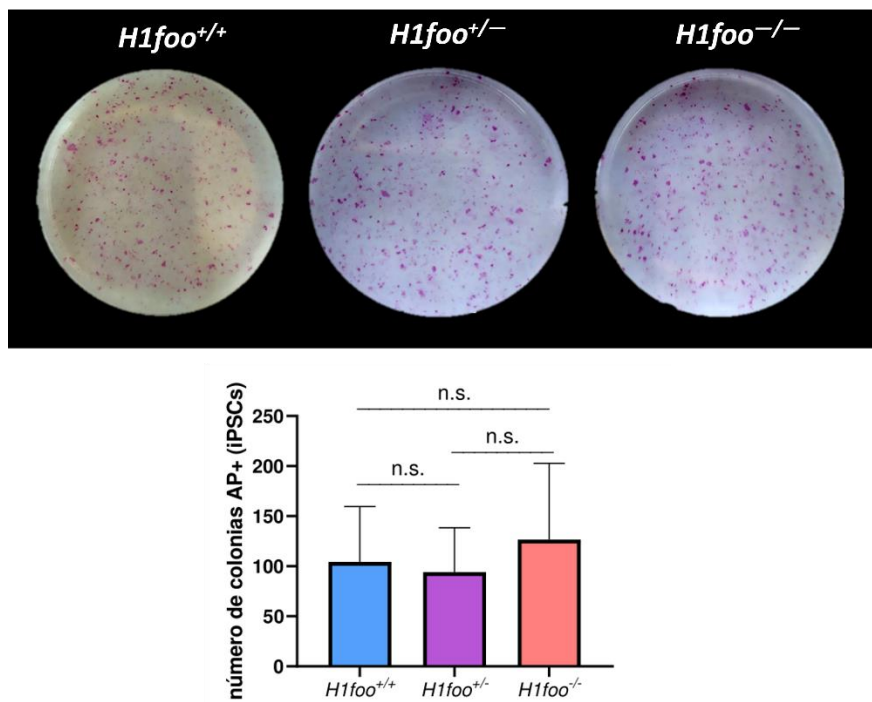


Figura 34. Infección de MEFs de cada genotipo indicado con tres de los factores de Yamanaka (OCT4, SOX2 y KLF4) para permitir su reprogramación a iPSCs. El número de colonias positivas para AP fue contado y se representó en el gráfico dispuesto bajo la imagen de las placas. La ausencia de $H1foo$ no afecta significativamente a la generación de iPSCs. n=12. Análisis Welch's *t* test: n.s.: no significativo.

DISCUSIÓN



1. Caracterización *in vivo* de la mutación c.613C>T de *SYCE1* asociada a POF

La integridad estructural y funcional del SC depende de la correcta dinámica de carga de las proteínas que lo componen. En la presente Tesis Doctoral, demostramos que, en el contexto del SC, las proteínas *SYCE1* y *SIX6OS1* establecen dos interfaces de interacción que se encuentran alteradas en diferentes mutaciones de *SYCE1* asociadas a infertilidad en humanos. La primera región de interacción está mediada por el core estructural de *SYCE1* (*SYCE1_{core}*), comprendido entre los aminoácidos 25 y 179. El *core* de *SYCE1* forma consigo mismo un dímero antiparalelo, y al interactuar con la región N-terminal de *SIX6OS1* (*SIX6OS1_N*, aminoácidos 1-67), *SYCE1_{core}* sufre un cambio conformacional para generar un complejo 1:1 con *SIX6OS1*. La segunda interfaz de interacción se establece entre la región C-terminal de *SYCE1* (más concretamente, entre los aminoácidos 177 y 305) y la región aminoacídica de *SIX6OS1* comprendida entre sus aminoácidos 22 y 262. Durante la primera parte de este trabajo, hemos generado dos líneas mutantes murinas diferentes: una portadora de una delección interna de 12 aminoácidos localizados en el dominio N-terminal de *SIX6OS1* (Δ 10-21) y otra portadora de una mutación en *SYCE1* asociada a POF en humanos (p.Gln241*). Estas mutaciones bloquean específicamente la primera y la segunda interfaz de interacción entre *SYCE1* y *SIX6OS1*, lo que nos ha permitido demostrar que la integridad de ambas es esencial para el ensamblaje del SC y la progresión meiótica *in vivo*.

1.1. La variante *SYCE1_{POF}* causa infertilidad a consecuencia de un ensamblaje incorrecto del SC

Más de un 1% de las mujeres en edad reproductiva experimentan POF, un síndrome caracterizado por el cese prematuro del ciclo menstrual asociado a niveles aberrantes de hormona FSH. La mayoría de los casos de POF son idiopáticos, y estos se subdividen en formas esporádicas y familiares. Los casos idiopáticos presentan una importante base genética, pero el panel de genes cuya mutación o ausencia provoca esta enfermedad se encuentra aún en vías de ser ampliado (C. Huang et al., 2021). La secuenciación del exoma completo ha permitido detectar mutaciones puntuales en genes como *SYCE1* (L. De Vries et al., 2014; McGuire et al., 2011; Zhe et al., 2020) y *SIX6OS1* (Fan et al., 2021) asociadas a POF. Estas son, hasta la fecha, las únicas proteínas del CE en las que se han detectado mutaciones vinculadas con esta condición infértil. La secuenciación del genoma codificante de pacientes con POF es esencial para detectar nuevas mutaciones en genes meióticos que puedan estar provocando una desregulación del ensamblaje del SC (Jin et al., 2020).

La mutación c.613C>T en la secuencia de *SYCE1* es una de las variantes identificadas en pacientes de POF (L. De Vries et al., 2014). Para analizar en detalle el mecanismo por el cual esta variante causa infertilidad, desarrollamos un ratón modificado genéticamente portador de dicha mutación (*Syce1^{POF/POF}*). Estos animales mutantes presentan un fenotipo infértil caracterizado por un ensamblaje inadecuado del SC. Esta alteración estructural es consecuencia de la reducción en la carga de *SYCP1* y *SYCE3* a los ejes cromosómicos, así como por la ausencia total de *SYCE1* y de las proteínas que dependen este componente del CE para su acoplamiento al SC (*SIX6OS1*, *SYCE2* y *TEX12*). Además, en los gametocitos mutantes existe un defecto en la maquinaria de recombinación meiótica, puesto que las roturas en el DNA no se reparan eficientemente y no se generan COs, lo que contribuye al establecimiento de un bloqueo meiótico en estadio de zigoteno-*like*. Estos resultados ponen de manifiesto el mecanismo por el cual la variante *SYCE1_{POF}* causa infertilidad en humanos. Los ratones heterocigotos para la mutación son fértiles y

completamente viables, lo que evidencia que el patrón de herencia de esta mutación es autosómico recesivo. Este hecho apoya las observaciones en humanos (L. De Vries et al., 2014), según las cuales los individuos heterocigotos de ambos sexos de esta familia analizada no presentan ningún síntoma clínico. En el presente estudio *in vivo* hemos demostrado que los ratones macho *Syce1*^{POF/POF} son infértiles al igual que las hembras homocigotas. Dado que en la familia analizada ningún macho presentaba la mutación de *SYCE1* en homocigosis, nuestros resultados nos permiten anticipar una muy probable condición infértil en aquellos hombres que porten esta mutación en homocigosis.

Dada la importante función estructural que desempeña el SC durante la gametogénesis, los mutantes nulos de las proteínas que los componen presentan severos problemas de fertilidad. Las proteínas que componen el SC se encuentran interaccionando de una manera estrictamente regulada, y la ausencia o mutación de cada una de ellas puede dar lugar a diferentes fenotipos meióticos. Se ha descrito que los mutantes nulos de las proteínas del CE son infértiles: en los túbulos seminíferos de los machos mutantes no se producen espermatozoides y las hembras presentan una disminución de la reserva ovárica como consecuencia de diferentes grados de fallo sináptico (Bolcun-Filas et al., 2007, 2009; Gómez-H et al., 2016; Hamer et al., 2008; Lu et al., 2014; Schramm et al., 2011). Por ello, el correcto ensamblaje del CE del SC es esencial para el mantenimiento de la dinámica cromosómica tanto en machos como en hembras. Este hecho contrasta con el fenotipo observado en los mutantes del LE del SC, los cuales sí presentan dimorfismo sexual: los machos son infértiles, mientras que las hembras son subfértiles (F. Yang et al., 2006; Yuan et al., 2002). Nuestros resultados demuestran una ausencia de dimorfismo sexual en el fenotipo ocasionado por la mutación POF de *SYCE1*, en concordancia con los mutantes nulos de las proteínas del CE y de los TFs del SC (Bolcun-Filas et al., 2007, 2009; F. A. T. De Vries et al., 2005; Gómez-H et al., 2016; Hamer et al., 2008; Schramm et al., 2011).

En lo que respecta a la dinámica de expresión de la variante *SYCE1*_{POF}, hemos detectado tanto el transcrito *Syce*_{POF} como el producto proteico *SYCE1*_{POF} mediante RT-PCR y WB de extractos proteicos endógenos de testículo, respectivamente. Cuantitativamente, los niveles de expresión del producto mutante se ven reducidos tanto en el mRNA como en la expresión de la proteína. Una posible explicación para la reducción en los niveles de expresión detectada en nuestro mutante podría deberse a la activación de mecanismos de adaptación transcripcional como la degradación de RNA mensajero por mutación terminadora (NMD, *Nonsense-Mediated mRNA Decay*). En mamíferos, esta vía degrada transcritos aberrantes que contienen codones de terminación prematuros mediante el complejo EJC (*Exon Junction Complex*) (Chang et al., 2007). Esta estructura proteica se localiza en el sitio de unión de dos exones contiguos del mRNA, y es eliminada posteriormente por los ribosomas en el citoplasma. Si un codón de terminación prematuro aparece al menos 50 nucleótidos aguas arriba de la última unión de exones, el complejo EJC permanecerá unido al mRNA, lo que cataliza la puesta en marcha de la NMD y la degradación del mRNA (Lindeboom et al., 2016). La mutación POF de *SYCE1* genera un codón de STOP justo al comienzo del exón 11, lo que provocaría que el complejo EJC localizado entre los exones 11 y 12 pueda activar la degradación del transcrito mediante NMD. La puesta en marcha de esta vía podría explicar la consecuente reducción de expresión *in vivo* de *SYCE1*_{POF} observada en los animales mutantes.

En los últimos años se ha hipotetizado que los fragmentos de mRNA generados tras la degradación mediante NMD, si tienen una longitud superior a los 200 nucleótidos, podrían actuar como RNA largos no codificantes (lncRNAs, *long noncoding RNA*) (El-Brolosy & Stainier, 2017; Vance & Ponting, 2014). De este modo, serían capaces de guiar a diversos factores de

transcripción o remodeladores de la cromatina a las regiones reguladoras de genes compensadores, modulando su expresión. Pese a que la reducción parcial o total de la señal de las proteínas del SC analizadas en nuestro modelo murino mediante IF parece una causa directa de la ausencia de localización de la variante SYCE1_{POF} a los ejes cromosómicos, estos mecanismos de adaptación transcripcional podrían tener un efecto en la regulación de la expresión génica del resto de componentes del SC en los gametocitos mutantes.

La caracterización del modelo murino *Syce1*^{POF/POF} evidenció una desregulación en el ensamblaje del SC, por lo que decidimos evaluar el mecanismo molecular específico causante de este defecto. SYCE1 se integra en el soporte molecular que representa el SC a través de su interacción con las proteínas SYCE3 y SIX6OS1 (Gómez-H et al., 2016; Lu et al., 2014). Mediante un análisis citológico y bioquímico, hemos demostrado que la mutación POF de *SYCE1* altera su capacidad para interactuar con SYCE3 *in vitro*, pero no con SIX6OS1. La disrupción de la unión de SYCE1_{POF} con SYCE3 sugiere que la interacción que se establece entre SYCE1_{POF} y SIX6OS1 podría ser insuficiente para garantizar una carga efectiva de todos los componentes del SC en los gametocitos mutantes. Mientras que en los gametocitos silvestres SYCE3 recluta a SYCE1 al CE, en los mutantes, la pérdida de interacción de SYCE3 con el producto SYCE1_{POF} (el cual además presenta unos reducidos niveles de expresión endógena, como se ha discutido previamente) provocaría un fallo en el reclutamiento de SYCE1_{POF} al SC. En consecuencia, los componentes del CE dependientes de SYCE1 (es decir, SIX6OS1, TEX12 y SYCE2) no llegan a localizarse sobre los ejes cromosómicos en los gametocitos mutantes. Además, nuestros resultados sugieren que entre SYCE1 y SYCE3 se establece una relación cooperativa por la cual no solo SYCE1 depende de SYCE3 para ser cargado al SC, sino que SYCE3 necesita de la región C-terminal de SYCE1 para su propia estabilización. Este *feedback* explicaría el mecanismo por el cual la pérdida del dominio C-terminal de SYCE1 a consecuencia de la mutación POF provoca una reducción significativa en los niveles de SYCE3 en los ejes cromosómicos.

De manera paralela a nuestro proyecto, el grupo liderado por el Dr. Ricardo Benavente llevó a cabo una misma caracterización de la mutación POF de *SYCE1* (Hernández-López et al., 2020). En su trabajo, proponen un fenotipo meiótico similar al que describimos en la presente Tesis Doctoral, según el cual los cromosomas homólogos tanto de los espermatozoides como de los oocitos mutantes no llegan a sinapsar. Consecuentemente, tanto los machos como las hembras mutantes son infértiles. Sin embargo, y en contraste con nuestros resultados, no detectan el producto mutante en los testículos de los ratones *Syce1*^{POF/POF} mediante WB, seguramente debido a cuestiones metodológicas (como podría ser una menor sensibilidad de su anticuerpo). Por otro lado, en ambos trabajos hemos demostrado mediante IF la ausencia del producto SYCE1_{POF} sobre los ejes cromosómicos de los gametocitos *in vivo*, lo que apoya nuestra teoría de que la escasa cantidad de proteína mutante generada es degradada o no llega a localizarse debidamente en el núcleo celular.

La forma aberrante de SYCE1 provoca una profunda desestructuración del SC más allá de lo discutido en el microambiente del CE. De este modo, se ha comprobado que no solo SYCE1, sino también SYCE3, SYCE2 y TEX12 son necesarias para la estabilización de las regiones N-terminal de SYCP1 y para la consecuente elongación del SC (Hernández-Hernández et al., 2016). En los gametocitos *Syce1*^{POF/POF} observamos una reducción en el marcaje de SYCP1 en términos de intensidad, así como una distribución aberrante a lo largo de todos los ejes sin sinapsar. La ausencia de SYCE1 (así como de SYCE2 y TEX12) sobre los ejes cromosómicos a consecuencia de la mutación POF, explica la alteración en la dinámica de ensamblaje de los TFs detectada en los gametocitos mutantes.

Por último, la desestructuración del SC que presentan los gametocitos *Syce1*^{POF/POF} ocasiona una acumulación de DSBs sin reparar, como se observa por el incremento en la señal de γ -H2AX y la acumulación de las recombinasas RAD51 y DMC1 sobre los ejes cromosómicos durante el bloqueo meiótico. Este evento podría provocar finalmente una eliminación programada de los gametocitos mutantes mediante la activación de un *checkpoint* dependiente de CHK2, HORMAD1/2 y TRIP13 (Rinaldi et al., 2017).

1.2. SYCE1 interacciona con SIX6OS1 a través de dos interfaces

Una vez determinado el fenotipo meiótico de los mutantes *Syce1*^{POF/POF}, profundizamos en el análisis molecular del mecanismo por el cual la variante SYCE1_{POF} causa infertilidad. Para ello, y tras detectar que SIX6OS1 mantiene la capacidad de interactuar con SYCE1_{POF}, llevamos a cabo un análisis estructural de ambas proteínas en colaboración con el laboratorio liderado por el Dr. Davies.

Los resultados de SEC-SAXS demostraron que SYCE1_{core}-SIX6OS1_N forman un complejo 1:1, siendo su longitud y el radio de su sección transversal de 138 Å y 11 Å, respectivamente. Estos valores suponen una modificación con respecto a las dimensiones que presenta el homodímero establecido por el *core* de SYCE1 (186 Å y 9 Å, respectivamente). El grupo del Dr. Davies había propuesto previamente un modelo estructural según el cual son los aminoácidos 52-279 de SYCE1_{core} los que median la generación del homodímero antiparalelo ($\alpha 2$ y $\alpha 3$ en **Figura 35a**) (Dunne & Davies, 2019b). Las dimensiones del complejo SYCE1_{core}-SIX6OS1_N (longitud de 138 Å) sugieren el mantenimiento de una estructura de tipo hélice superenrollada de unos 92 aminoácidos, a razón de 1,5 Å por residuo (Lupas & Gruber, 2005). Esto podría explicarse porque la región 52-179 de SYCE1 se dispone formando una estructura de hélice-giro-hélice, a la que se acopla la hélice α formada por los aminoácidos 25-50 de SYCE1 y la hélice α de SIX6OS1_N. Así se constituiría finalmente una hélice superenrollada de cuatro hélices, lo cual es coherente con su radio de 11 Å (**Figura 35b**). Finalmente, el establecimiento de la segunda interfaz de unión entre los aminoácidos 177-305 de SYCE1 y los residuos 22-262 de SIX6OS1 sugieren que SYCE1_{core}-SIX6OS1_N probablemente se dispongan paralelamente para formar un complejo 1:1 por medio de su primer y segundo dominio de interacción (**Figura 35c**).

Nuestro análisis del complejo SYCE1-SIX6OS1 revela cómo las mutaciones de *SYCE1* identificadas en pacientes infértiles afectan su capacidad de interactuar con SIX6OS1. La mutación c.197-2A>G de *SYCE1*, asociada a NOA, da lugar a un producto truncado que abarca primeros 65 aminoácidos de la proteína (Maor-Sagie et al., 2015). En este producto aberrante se ven alterados los dos dominios de interacción entre SYCE1 y SIX6OS1, por lo que podría comportarse como un alelo nulo. Otra de las mutaciones de *SYCE1* que provoca NOA (c.375-2A>G) daría lugar a una delección interna de los aminoácidos comprendidos entre las posiciones 126 y 155 (Pashaei et al., 2020). Esta edición altera el *core* de SYCE1, comprometiendo la primera interfaz de unión con SIX6OS1. Dado que la segunda quedaría inalterada, predecimos el mantenimiento de un complejo 1:1 modificado entre ambas proteínas establecido a través de este segundo dominio de interacción (**Figura 35c**). Por otro lado, la delección $\Delta 10-21$ de SIX6OS1 afecta también al primer dominio de interacción, pero el *core* de SYCE1 permanece intacto. Esto permitiría el establecimiento de un complejo 2:2 mediante el cual dos monómeros de SIX6OS1 se acoplarían al dímero antiparalelo establecido por dos unidades de SYCE1 (**Figura 35c**). La mutación c.613C>T en *SYCE1* vinculada a POF genera un codón de STOP prematuro (p.Gln241*), dando lugar a un producto truncado de 240 aminoácidos (L. De Vries et al., 2014). Esta mutación provoca una pérdida del segundo dominio de unión a SIX6OS1, por lo que estructuralmente, entre

ambas proteínas se podría estar manteniendo un complejo 1:1 modificado y mantenido a través del primer dominio de interacción (Figura 35c).

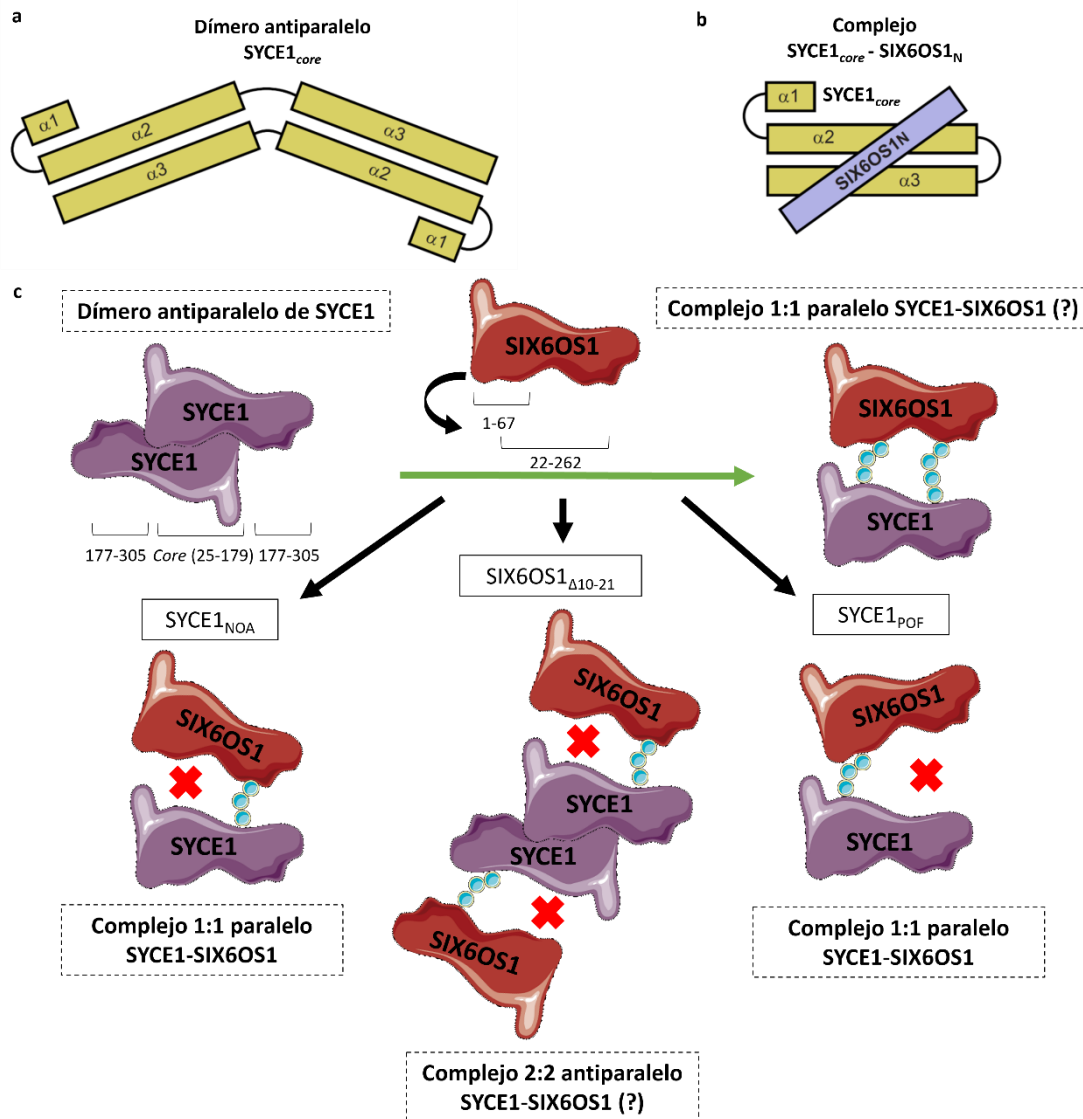


Figura 35. a-b) Modelos estructurales teóricos del dímero antiparalelo establecido entre dos unidades *core* de SYCE1 **(a)** y del complejo 1:1 generado entre SYCE1_{core} y SIX6OS1_N **(b)**. Las hélices de SYCE1_{core} se referencian como α1, α2 y α3, y corresponden a las regiones aminoacídicas 25-50, 52-113 y 118-179 de SYCE1, respectivamente. Los modelos presentados son compatibles con los datos biofísicos presentados en esta Tesis y en el artículo en el que se describe la estructura del *core* de SYCE1 (Dunne & Davies, 2019b). SIX6OS1_N podría acoplarse entre las hélices α2 y α3 de SYCE1_{core} modificando la disposición propia del homodímero de SYCE1 y generando con él un complejo 1:1. **c)** Representación esquemática del dímero antiparalelo establecido por el *core* SYCE1 y del cambio conformacional que sufre al unirse a SIX6OS1. Esta unión da lugar a un complejo 1:1 mediante las dos interfaces de interacción (representadas por esferas azules) establecidas entre SYCE1_{core}-SIX6OS1_N y entre SYCE1₁₇₇₋₃₀₅ y SIX6OS1₂₂₋₂₆₂, respectivamente. Las consecuencias estructurales teóricas de una de las mutaciones de SYCE1 asociadas con NOA (c.375-2A>G, parte inferior izquierda del panel) y POF (c.613C>T, parte inferior derecha), así como de la delección Δ10-21 de SIX6OS1 (parte inferior central) aparecen representadas. Las cruces rojas indican los puntos de interacción comprometidos por cada mutación.

Tras la publicación de nuestro trabajo se ha identificado un importante número de mutaciones en *SYCE1* y *SIX6OS1* en pacientes infértiles. Entre ellas, la mutación c.689_690del de *SYCE1*, detectada en homocigosis en dos pacientes afectados por NOA y en heterocigosis junto a otras variantes en una mujer con POF y otro individuo con NOA (Feng et al., 2022; Hou et al., 2022; Y. Huang et al., 2022; Tang et al., 2022). Esta mutación da lugar a un cambio del marco de lectura a la altura de la fenilalanina 230 de *SYCE1* y genera una proteína aberrante que presumiblemente vería comprometido su segundo dominio de interacción con *SIX6OS1* (mediado por *SYCE1*₁₇₇₋₃₀₅). La patogénesis de las mutaciones puntuales de *SYCE1* c.373A>G [p.Arg125Gly] y c.475G>A [p.Glu159Lys] descritas en homocigosis respectivamente en un paciente de NOA y en heterocigosis en una mujer con POF (Ghieh et al., 2022; Hou et al., 2022) se puede explicar por la alteración del *core* estructural de *SYCE1*. Esta anomalía provocaría la pérdida de su conformación tridimensional característica y el consecuente fallo en la estructuración del SC, y explicaría también el mecanismo de infertilidad por NOA de la variante c.271+2T>C [p.Ala66_Leu91delinsVal] de *SYCE1* (Hou et al., 2022).

En lo que respecta a las variantes de *SIX6OS1* asociadas con infertilidad, nuestro modelo ayuda a explicar el mecanismo por el cual las mutaciones c.204_205del [p.His68Glnfs*2] y c.508C>T [p.Arg170*] de *SIX6OS1* provocan NOA y POF (Fan et al., 2021; Hou et al., 2022). Ambas variantes presentan un codón de STOP prematuro dentro de la región aminoacídica 22-262 de *SIX6OS1*, responsable de la segunda interfaz de interacción con *SYCE1*. Por otro lado, la mutación c.7G>A [p.Asp3Asn] de *SIX6OS1* (Ali et al., 2022) se localiza en la región *SIX6OS1*_N a través de la cual se establece la interacción con el *core* de *SYCE1*. Además, la variante c.135_136del [p.Lys45Asnfs*5] de *SIX6OS1* causante de NOA (Hou et al., 2022) ocasiona un cambio del marco de lectura a la altura de la lisina 45, por lo que ambos dominios de interacción con *SYCE1* podrían verse alterados como consecuencia de esta mutación. Sin embargo, la identificación de la variante c.958G>T [p.Glu320*] de *SIX6OS1* en un paciente infértil (Fan et al., 2021) supone un desafío para nuestro modelo, puesto que no compromete ninguna de las interacciones con *SYCE1* que describimos. Este hecho sugiere que el mecanismo por el que esta mutación causa infertilidad es dependiente del diálogo molecular establecido entre *SIX6OS1* y otras proteínas del SC.

Una vez determinadas las dos conformaciones que adquiere *SYCE1*_{core} *in vitro* (homodímero antiparalelo cuando aparece aislado y complejo 1:1 cuando se une a *SIX6OS1*_N), nos planteamos analizar cuál es su conformación biológica más estable en el SC de los mamíferos. Las temperaturas de *melting* del complejo *SYCE1-SIX6OS1*_N y de los homodímeros de *SYCE1* determinadas mediante dicroísmo circular son bastante similares entre ellas, abarcando un rango de entre 38°C y 41°C. Sin embargo, otros componentes muy estables del SC como *SYCE2-TEX12* y *SYCP3* presentan temperaturas de *melting* muy superiores, de unos 65°C (Davies et al., 2012; Syrjänen et al., 2014). Por tanto, estas temperaturas de *melting* relativamente bajas que muestra *SYCE1* tanto al presentarse como homodímero como al acomplejarse a *SIX6OS1*_N sugieren que sufre un cambio conformacional *in vivo*, y que cada configuración funciona en diferentes etapas de la meiosis o se localiza en posiciones concretas dentro del SC.

Pese a los resultados obtenidos a partir de nuestros estudios, los mecanismos por los que *SYCE1* y *SIX6OS1* interactúan en el escenario del SC de mamíferos necesitan aún ser estudiados en mayor detalle. Nuestro análisis de las mutaciones de *SYCE1* asociadas a infertilidad y de la delección interna en el dominio N-terminal de *SIX6OS1* revelan la existencia de al menos cuatro posibles conformaciones en las que *SYCE1* se asocia a *SIX6OS1* (**Figura 35c**). Dada la competición directa entre la unión de *SIX6OS1*_N y la homodimerización de *SYCE1*_{core}, todas estas

conformaciones podrían ser establecidas entre los productos WT debido a alteraciones de los niveles proteicos, concentraciones locales de proteínas, cambios alostéricos y modificaciones postraduccionales. Por tanto, las conformaciones alteradas de SYCE1 y del complejo SYCE1-SIX6OS1 son candidatos de interés para explicar la heterogeneidad estructural y la propagación de señales a lo largo de la longitud del SC, pudiendo regular mecanismos como la generación e interferencia de COs. De este modo, mientras progresamos hacia una comprensión molecular completa del SC de mamíferos, las interacciones multivalentes entre SYCE1 y SIX6OS1 que describimos proporcionan nuevas posibilidades hacia la idea de una estructuración dinámica del SC que explica sus funciones durante la meiosis.

1.3. La delección $\Delta 10-21$ de SIX6OS1 provoca infertilidad debido a un ensamblaje defectivo del SC

El desarrollo de un segundo modelo murino con una delección de la región comprendida entre los aminoácidos 10 y 21 ($\Delta 10-21$) de SIX6OS1 (*Six6os1* ^{$\Delta 10-21/\Delta 10-21$}) nos permitió profundizar en el mecanismo de interacción entre SYCE1 y SIX6OS1 *in vivo*.

Los ratones homocigotos son infértiles y presentan un ensamblaje inadecuado del SC. La señal residual de SYCP1, SYCE3, SYCE1 y SIX6OS1 detectada por IF en los espermatoцитos *Six6os1* ^{$\Delta 10-21/\Delta 10-21$} , así como su incapacidad para reclutar SYCE2 y TEX12 a los ejes cromosómicos, sugieren que la eliminación de este dominio es esencial para la sinapsis entre los cromosomas homólogos. Además, la acumulación de γ -H2AX, DMC1 y RAD51 en el bloqueo meiótico evidencian una desregulación de la maquinaria de recombinación meiótica, lo que provoca un bloqueo meiótico en zigoteno-*like* en los gametocitos mutantes.

El producto SIX6OS1 _{$\Delta 10-21$} presenta una llamativa dinámica de expresión en los testículos murinos. El incremento en la expresión del transcrito *Six6os1* _{$\Delta 10-21$} en comparación con la versión WT no se correlaciona con la reducción en la intensidad de expresión de la proteína mutante que detectamos en los testículos. Esta discrepancia entre los niveles de mRNA y de proteína podría explicarse a consecuencia de la aparición de fallos en el procesamiento postranscripcional del transcrito mutante. En eucariotas, al comienzo de la transcripción (cuando el RNA en síntesis alcanza una longitud de unos 30 nucleótidos), el complejo enzimático de *capping* se acopla al transcrito para catalizar la adición del *cap-5'* (Cho et al., 1997). Esta modificación postranscripcional es necesaria para la exportación del transcrito al citoplasma y para su posterior reconocimiento por parte de los ribosomas. La pérdida de 36 nucleótidos en el dominio N-terminal de *Six6os1* como consecuencia de la mutación $\Delta 10-21$ podría comprometer el reconocimiento del transcrito naciente por parte del complejo enzimático de *capping*, lo que supondría una alteración en la adición del *cap-5'* y una acumulación de transcritos sin procesar. Dado que los transcritos generados son inmaduros, finalmente no son debidamente traducidos, lo que explicaría la reducción del nivel de expresión proteica de SIX6OS1 _{$\Delta 10-21$} pese a la acumulación del transcrito mutante.

Otra posible explicación para el desacoplamiento entre los niveles de transcripción y traducción del producto *Six6os1* _{$\Delta 10-21$} la podemos encontrar en la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (Pavitt & Ron, 2012; Walter & Ron, 2011) (Pavitt & Ron, 2012; Walter & Ron, 2011). Este mecanismo se desencadena ante la presencia de proteínas con un plegamiento incorrecto a causa de cualquier estrés celular o de una mutación, como podría ser la delección *in frame* de la región de aminoácidos 10-21 de SIX6OS1. De este modo, la reducción en la estabilidad de la proteína mutante podría provocar un *feedback loop* que incremente la transcripción de *Six6os1* en un intento de restaurar la función normal de la proteína a través de una regulación

positiva de la transcripción. La modificación tanto de la actividad transcripcional como traduccional como consecuencia de una mutación ha sido previamente descrita, por ejemplo, en la delección F508 del gen *CFTR* (Hutt et al., 2018). Esta mutación es una de las más frecuentes entre los pacientes afectados por fibrosis quística (Bobadilla et al., 2002), e implica la pérdida de 3 bp en la secuencia del gen *CFTR* y, como consecuencia, la delección de la fenilalanina 508. El producto proteico mutante presenta una estabilidad reducida debido a su plegamiento aberrante, lo que desencadena la puesta en marcha de un mecanismo de recuperación de la actividad del canal CFTR regulado por el factor de iniciación de la traducción eucariota eIF3a (Hutt et al., 2018).

Por otro lado, el análisis de mutantes murinos que presentan un bloqueo meiótico que no existe en condiciones fisiológicas plantea el debate de cuál es el mejor control WT con el que establecer comparaciones. Para este experimento, se utilizaron testículos de ratones silvestres de 13 dpp (en los que los meiocitos más avanzados en la primera ola de espermatogénesis se encuentran en estadio de zigoteno tardío-paquiteno) y testículos de ratones mutantes adultos (bloqueados en zigoteno-*like*), con el objetivo de analizar espermatozoides en un estadio meiótico similar. Sin embargo, la existencia de un diferente contenido celular podría contribuir a explicar la diferencia de intensidad de expresión observada entre genotipos.

Dado que las dos mutaciones descritas en la presente Tesis Doctoral (*SYCE1^{POF}* y *SIX6OS1^{Δ10-21}*) afectan a diferentes dominios de unión entre ambas, decidimos evaluar cuál desencadena una desestructuración más severa del SC. La mutación POF en *SYCE1* da lugar a una reducción en la longitud de la secuencia aminoacídica mucho mayor que la ocasionada por la mutación $\Delta 10-21$ de *SIX6OS1* (111 frente a 12 aminoácidos, respectivamente). Además, *SYCE1^{POF}* pierde la capacidad de interactuar con *SYCE3*, la primera proteína del CE que se carga en los ejes cromosómicos. Por ello, la mutación POF en *SYCE1* podría dar lugar a un fallo en el ensamblaje del SC más temprano que el provocado por la delección $\Delta 10-21$ de *SIX6OS1*. Dado que la integridad de *SYCE1* permite el mantenimiento de su interacción con *SYCE3*, los mutantes *Six6os1^{Δ10-21/Δ10-21}* presentan una severidad fenotípica ligeramente menor que los ratones *Syce1^{POF/POF}*. De este modo, en los espermatozoides *Six6os1^{Δ10-21/Δ10-21}* existe una señal residual de *SYCE1* y *SIX6OS1* en los ejes cromosómicos en el momento del bloqueo, mientras que ambas proteínas no se llegan a cargar en los espermatozoides *Syce1^{POF/POF}*. Estos resultados apoyan el orden jerárquico previamente descrito en el ensamblaje del SC, según el cual *SYCP1* y *SYCE3* son iniciadores del establecimiento del entramado de sinapsis y *SYCE2-TEX12* se cargan en los pasos finales del proceso (Dunce et al., 2018). Por tanto, *SYCE1* y *SIX6OS1* podrían funcionar como agentes intermediarios de la sinapsis, y su correcto acoplamiento al andamio molecular que representa el SC es estrictamente necesario para el reclutamiento de *SYCE2* y *TEX12*, así como para la consecuente compleción de la sinapsis entre los cromosomas homólogos (**Figura 4**).

Por tanto, en la presente Tesis Doctoral hemos desarrollado dos modelos animales modificados genéticamente en los cuales quedan comprometidas la primera (*Six6os1^{Δ10-21/Δ10-21}*) y la segunda (*Syce1^{POF/POF}*) interfaz de interacción entre *SYCE1* y *SIX6OS1*. Mediante estos mutantes, hemos demostrado que el mantenimiento del dominio inalterado en cada modelo es suficiente para garantizar la unión estructural entre ambas proteínas. Sin embargo, la integridad de ambas interfaces por las que interactúan *SYCE1* y *SIX6OS1* es esencial para garantizar el ensamblaje del SC, la progresión de la meiosis y, consecuentemente, la fertilidad en mamíferos.

2. La histona específica de oocitos H1FOO no es esencial para la gametogénesis

Las histonas son proteínas básicas que se asocian al DNA en los núcleos de las células eucariotas permitiendo la compactación de la cromatina. A través de las múltiples modificaciones que sufren estas proteínas (entre las que se incluyen acetilación, metilación y fosforilación), modifican la estructura y la carga eléctrica de la cromatina, interfiriendo en su capacidad para regular la expresión génica (Bannister & Kouzarides, 2011). Los patrones de expresión y modificación de histonas están altamente regulados y difieren entre tipos celulares y condiciones fisiológicas diferentes. Haciendo uso de un modelo murino mutante nulo, en la presente Tesis Doctoral hemos demostrado por primera vez que la histona linker específica de oocitos H1FOO no es esencial para la fertilidad ni para el desarrollo embrionario en ratón. Llevando a cabo un análisis citológico e histológico, hemos podido determinar que la ausencia de esta histona es tolerada *in vivo* durante la gametogénesis, ya que los ratones portadores del alelo nulo en homocigosis generan gametos funcionales y son completamente fértiles.

2.1. La ausencia de *H1foo* no afecta a la gametogénesis en ratón

En los oocitos de mamíferos se expresa específicamente una histona *linker* denominada H1FOO, homóloga de la histona B4 de *Xenopus*. Esta histona se caracteriza por su secuencia excepcionalmente larga en comparación con otras histonas de la familia H1, al estar codificada por 304 aminoácidos en ratón. Su patrón de expresión se extiende desde el estadio de vesícula germinal hasta el embrión en estadio de dos o cuatro células, coincidiendo con el momento en el cual el genoma del embrión se convierte en transcripcionalmente activo (M. Tanaka et al., 2001). Su patrón de expresión se encuentra altamente regulado por modificaciones epigenéticas como la metilación del DNA ubicado aguas arriba del gen de *H1foo* (Maeda et al., 2008).

Para determinar el patrón de expresión de H1FOO en oocitos murinos, llevamos a cabo diferentes experimentos de inmunofluorescencia en oocitos a distintos estadios de desarrollo. De este modo, pudimos describir que H1FOO aparece decorando la cromatina en los oocitos WT en metafase II. Este patrón se mantiene en concordancia con la primera descripción de H1FOO en mamíferos (M. Tanaka et al., 2001). La ausencia de señal en los cromosomas de los oocitos *H1foo*^{-/-} nos permitió validar la especificidad del marcaje, así como la pérdida de función de nuestro modelo mutante. Además, pudimos descartar la existencia de una expresión temprana (más concretamente, durante la profase I) de H1FOO en oocitos, pese a que *H1foo* se transcribe durante este estadio. Esto, sumado a la ausencia de un fenotipo meiótico, podría indicar la existencia de un desacoplamiento de la transcripción y la traducción durante la primera división meiótica en hembras y en estadios meióticos más tardíos en machos. Esta represión de la traducción proteica es un mecanismo molecular ampliamente estudiado en la gametogénesis del ratón y es esencial para el correcto desarrollo de la gametogénesis y para el desarrollo embrionario (M. Guo et al., 2022; Nothias et al., 1996).

La profase de la primera división meiótica es el estadio más largo y complejo dentro del programa gametogénico, e incluye una sucesión minuciosamente regulada de eventos entre los que se encuentran la sinapsis entre cromosomas homólogos, la generación de (Grey & de Massy, 2021) o para generar COs (Grey & de Massy, 2021). Dado que H1FOO se expresa en estadios meióticos más avanzados, la deficiencia de *H1foo* no debería alterar la progresión de la primera profase meiótica. Consecuentemente, hemos demostrado mediante un análisis de la sinapsis y de la dinámica telomérica de los oocitos mutantes que la ausencia de *H1foo* no dificulta el avance

de los gametocitos por la profase I. Además, el hecho de que *H1FOO* se transcriba en testículos humanos y murinos durante la espermatogénesis, y dada su descrita capacidad para ensamblarse de forma rápida en el genoma paterno tras la fertilización reemplazando las protaminas (de Macedo et al., 2021; Mizusawa et al., 2010), analizamos la progresión de la espermatogénesis en ausencia de *H1FOO*. La presencia de espermatozoides en los túbulos seminíferos de los espermatocitos *H1foo*^{-/-} demostró que la ausencia de *H1FOO* no provoca infertilidad en ratón y nos permitió descartar un posible dimorfismo sexual en nuestro mutante.

El papel de *H1FOO* en la maduración de los oocitos ha sido un importante objetivo de estudio de en campo de la Biología Molecular. Así, su inhibición mediante oligonucleótidos antisentido morfolino (microinyectados en oocitos murinos en estadio de vesícula germinal) ha demostrado ocasionar un fallo en la extrusión del primer cuerpo polar y un bloqueo en metafase I *in vitro* (Furuya et al., 2007). De manera similar, la maduración de oocitos bovinos también demostró verse obstaculizada *in vitro* tras la inhibición de *H1foo* mediada por siRNAs (Yun et al., 2015). Por el contrario, y en apoyo a nuestras observaciones, otro estudio ha demostrado que el *knockdown* de *H1foo* usando siRNAs no tiene efecto alguno en el crecimiento, maduración y fertilización de los oocitos (Funaya et al., 2022). Todo ello sugiere que *H1FOO*, en caso de estar implicado en la maduración de los oocitos, lo hace de una manera muy regulada espaciotemporalmente e incluso presentando diferencias entre especies.

La poliadenilación citoplasmática es un proceso esencial que controla la traducción de los mRNAs maternos en el oocito y en los estadios tempranos del desarrollo embrionario (Richter, 1999). Mientras que el mRNA de la mayoría de las histonas H1 somáticas no sufre poliadenilación, el mRNA de *H1foo* es poliadenilado. En los oocitos murinos en desarrollo y en los de *Xenopus*, la presencia de dos elementos 3' UTR (UUUUUUAU y AAUAAA) son requeridos para la poliadenilación y consecuente traducción del mRNA (Fox et al., 1989). El incremento de especie inmunoreactiva de *H1FOO* desde el estadio de vesícula germinal a metafase II es consistente con la presencia de dichos elementos en el dominio 3' UTR de la secuencia de *H1foo*. Tras la fertilización, la desadenilación del mRNA de *H1foo* en el embrión temprano provoca la represión de su traducción y la rápida (Voeltz & Steitz, 1998) expresión de *H1FOO* (Voeltz & Steitz, 1998). Pero, ¿cuál podría ser la importancia biológica de este patrón de expresión tan regulado? La tasa de transcripción decae durante el desarrollo del oocito, como así se ha demostrado usando un gen reportero dependiente de los factores de transcripción Sp1 y TBP (Worrad et al., 1994). Esta caída en la actividad transcripcional coincide en el tiempo con la condensación de la cromatina que ocurre durante el desarrollo del oocito (Wickramasinghe et al., 1991). Por tanto, *H1FOO*, al asociarse al DNA y modificar el nivel de compactación de la cromatina, podría ser un importante regulador de la actividad transcripcional en el oocito y en el embrión, salvaguardando el correcto mantenimiento del programa de diferenciación durante el desarrollo temprano en mamíferos. Sin embargo, y de acuerdo con nuestros resultados, ninguna de las alteraciones observadas *in vitro* como consecuencia de una desregulación de *H1foo* suponen una alteración en la progresión de la preimplantación de los embriones murinos *in vivo*. De este modo, no hemos observado defectos histológicos ni una modificación en el tamaño o frecuencia de las camadas generadas a partir del cruzamiento de ratones mutantes entre sí. Por ello, y pese al importante supuesto papel que desempeñaría *H1FOO* en la regulación del estado de la cromatina durante la oogénesis y la embriogénesis, podemos hipotetizar que o bien *H1FOO* no lleva a cabo ningún papel esencial durante estos procesos, o su ausencia se ve suplida por la activación de mecanismos de compensación ejercidos por otras histonas o por otros componentes celulares.

En conjunto, podemos concluir que, al contrario de las observaciones presentadas en previos ensayos *in vitro* y en concordancia con las líneas de investigación más recientes, nuestros resultados demuestran que la ausencia de H1FOO parece ser tolerada *in vivo*, con los mecanismos compensatorios causantes de dicha tolerancia aún por ser analizados en mayor detalle.

2.2. Los MEFs *H1foo*^{-/-} mantienen intacta su capacidad de reprogramación

Los componentes del oocito juegan un rol crucial en la reprogramación acontecida durante la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, *Somatic Cell Nuclear Transfer*). Durante la SCNT ocurre un rápido intercambio de las histonas *linker* somáticas por H1FOO en la cromatina del núcleo somático inyectado, de manera similar al programa de remplazo de histonas que ocurre tras la fertilización (Becker et al., 2005). La histona B4 de *Xenopus* (el homólogo de la histona H1FOO murina) es necesaria durante este proceso para la activación de genes de pluripotencia, probablemente al hacer accesible la cromatina somática a la maquinaria del oocito y, subsecuentemente, provocar una carga de grandes cantidades de RNA polimerasa II (Jullien et al., 2014). Además de la SCNT, otro mecanismo que permite la generación de células madre pluripotentes es la reprogramación mediante la sobreexpresión de factores de transcripción, lo que se conoce como iPSCs (Yamanaka & Blau, 2010). Así, la expresión exógena de *H1foo* ha demostrado incrementar el número y calidad de iPSCs murinas generadas cuando se coexpresa con los factores de Yamanaka *Oct4*, *Sox2* y *Klf4* (Kunitomi et al., 2016). Por ello, el potencial de diferenciación de las iPSCs se ve incrementado tanto *in vitro* como *in vivo* como consecuencia de la sobreexpresión de *H1foo* (Kunitomi et al., 2016). Además, la expresión ectópica de *H1foo* se ha relacionado con una prevención de la normal diferenciación a cuerpos embrioides (Hayakawa et al., 2012), evidenciando el impacto de esta histona en la regulación epigenética. Todos estos resultados contrastan con nuestras observaciones según las cuales los MEFs *H1foo*^{-/-} se desdiferencian y generan iPSCs de manera similar a sus controles WT y heterocigotos. El número de colonias con tinción positiva de AP (marcador de células desdiferenciadas) fue similar en las tres condiciones testadas, lo que se puede explicar por la puesta en marcha de diversos mecanismos de compensación como respuesta a la ausencia de H1FOO durante la reprogramación. Estos mecanismos podrían ser mediados por histonas H1 somáticas que sean capaces de asociarse a la cromatina del núcleo de células de la línea somática (Becker et al., 2005; Teranishi et al., 2004).

La divergencia en los resultados sobre la implicación de H1FOO en reprogramación también puede ser explicada por las diferentes aproximaciones metodológicas empleadas en nuestro grupo de investigación y el resto de laboratorios. En los últimos años, se ha demostrado en varios modelos de experimentación que la manipulación de un gen mediante mutaciones genéticas (como es nuestro mutante nulo) puede dar lugar a un fenotipo diferente al obtenido por un *knockdown* del mismo gen (Rossi et al., 2015). De este modo, el análisis del transcriptoma y proteoma de los mutantes genéticos ha evidenciado un incremento de la expresión de multitud de genes exclusivamente en el mutante genético (Rossi et al., 2015). Además, no existen evidencias de que exista una transcripción activa de H1FOO durante la reprogramación, por lo que su posible participación durante este proceso necesita aún ser estudiada en mayor detalle. Agrupando todas estas observaciones, podemos concluir que H1FOO es un factor dispensable para la reprogramación celular a iPSCs.

Como conclusión, en esta segunda parte de la presente Tesis Doctoral hemos ampliado los conocimientos acerca de la función de la histona específica de oocitos H1FOO y hemos demostrado que es prescindible para la fertilidad en mamíferos y para la reprogramación de iPSCs.

3. Relevancia del estudio

La infertilidad humana es un problema de salud pública que afecta a entorno al 10-15% de las parejas en edad reproductiva, y hasta un 25% de los casos son de etiología desconocida. Muchas de estas situaciones se deben a problemas genéticos aún por descifrar, por lo que entender las bases genéticas de la infertilidad es esencial para tratar adecuadamente a una pareja estéril y evaluar con criterio la técnica de reproducción asistida que mejor se puede ajustar para cada caso. Como consecuencia de ello, en los últimos años los esfuerzos de la comunidad científica se han enfocado en descifrar el panel de genes que regulan la fertilidad, principalmente mediante la generación de modelos animales modificados genéticamente.

Una de las principales causas de infertilidad femenina es el POF, que afecta a entorno al 1% de mujeres menores de 40 años. La etiología genética del POF es muy heterogénea y la causa genética de la gran mayoría de pacientes es aún desconocida. En la última década, el desarrollo de técnicas de secuenciación del genoma codificante ha permitido identificar multitud de genes implicados en meiosis como agentes causantes de la enfermedad. Entre ellos, destacan *SYCE1* (L. De Vries et al., 2014), *STAG3* (Caburet (Tran & Schimenti, 2019)l., 2014), *SPO11* (Tran & Schimenti, 2019), *MSH4* (Carlosama et al., 2017), *MSH5* (T. Guo et al., 2017), *DMC1* (He et al., 2018), *BRCA2* (Caburet et al., 2021), *MEIOB* (Caburet et al., 2019; Y. Wu et al., 2021) y *HSF2BP* (Felipe-Medina et al., 2020).

En el presente estudio, y en colaboración con el grupo del Dr. Owen R. Davies (Universidad de Newcastle, Reino Unido), especializado en el análisis estructural de las proteínas implicadas en la división meiótica, hemos llevado a cabo un análisis funcional de una mutación puntual en la secuencia de *SYCE1* detectada en dos mujeres afectadas por POF (L. De Vries et al., 2014). Estas pacientes portaban en homocigosis una mutación en la posición nucleotídica 721 de *SYCE1* (c.613C>T), que generaría un codón de STOP prematuro a la altura de la glutamina 241 (p.Gln241*). Dicha mutación daría lugar a un producto de *SYCE1* truncado codificado por solo 240 aminoácidos, en contraste con los 351 que lo componen en la forma canónica silvestre. Sin embargo, y dado que esta mutación no afecta al núcleo estructural de *SYCE1*, el mecanismo molecular que se encuentra alterado y que por tanto es el responsable de la infertilidad en estas mujeres no había sido descrito al inicio de esta Tesis Doctoral. Combinando estudios genéticos, celulares y bioquímicos, hemos desvelado que *SYCE1* establece dos dominios de interacción con *SIX6OS1*. Estas interfaces de unión se ven comprometidas a consecuencia de diversas mutaciones identificadas en el genoma de distintos pacientes infértiles. En concreto, la mutación c.613C>T en la secuencia de *SYCE1* altera la interacción entre ambas proteínas que se establece entre los aminoácidos 177 y 305 de *SYCE1* y los residuos 22-262 de *SIX6OS1*. Pese a que la alteración de exclusivamente uno de los dominios de unión no provoca una pérdida de interacción entre ambas proteínas, sí es suficiente para desencadenar un ensamblaje aberrante del SC. Como resultado, los gametocitos mutantes presentan un bloqueo meiótico en estadio de zigoteno-*like* y los individuos afectados son infértiles. Por tanto, a partir de nuestros resultados hemos propuesto un modelo de interacción entre *SYCE1* y *SIX6OS1* que podría ayudar a predecir el mecanismo molecular por el cual distintas mutaciones en la secuencia de estas proteínas causan infertilidad. En definitiva, la información presentada en esta Tesis Doctoral podría implicar la mejora del consejo genético de parejas en las que se identifican mutaciones asociadas a *SYCE1* y *SIX6OS1*.

Por otro lado, la epigenética y la dinámica de la cromatina desempeñan también un papel fundamental en la regulación de la gametogénesis. La estructura de la cromatina está regulada principalmente por las histonas, entre las que se encuentran las pertenecientes a la familia H1. La existencia de una histona H1 (H1FOO) cuyo patrón de expresión se ve restringido a oocitos y embriones tempranos ofrecía la posibilidad de que llevara a cabo una función relevante en meiosis y embriogénesis. Sin embargo, la ausencia de su análisis *in vivo* generaba un debate abierto en torno a su posible implicación en fertilidad. De este modo, en la presente Tesis Doctoral hemos presentado por primera vez el estudio *in vivo* de la función de H1FOO en el control de la ovogénesis, demostrando que su ausencia no compromete la función fértil en mamíferos y contribuyendo, en definitiva, a la expansión del conocimiento disponible en el campo de la Genética Reproductiva.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. Los gametocitos masculinos y femeninos de los ratones portadores de una mutación de *SYCE1* causante de POF en humanos (c.613C>T) presentan un ensamblaje defectivo del SC y una reparación defectuosa de las DSBs.
2. Los gametocitos *Syce1*^{POF/POF} presentan un bloqueo meiótico en estadio de zigoteno-like, y consecuentemente, tanto machos como hembras son infértiles.
3. La mutación c.613C>T de *SYCE1* altera su capacidad para interactuar con *SYCE3* *in vitro*.
4. La delección $\Delta 10-21$ de *SIX6OS1* compromete el primer sitio de unión a *SYCE1*, pero su interacción se mantiene en sistemas heterólogos.
5. La mutación POF de *SYCE1* compromete la segunda interfaz de interacción con *SIX6OS1*, pero la interacción entre ambos productos se mantiene *in vitro*.
6. Los ratones *Six6os1* ^{$\Delta 10-21/\Delta 10-21$} son infértiles y muestran un fenotipo meiótico similar a los mutantes *Syce1*^{POF/POF}, por lo que la integridad de los dos dominios de interacción entre *SYCE1* y *SIX6OS1* son esenciales para la fertilidad.
7. La histona específica de oocitos H1FOO es dispensable para la gametogénesis en mamíferos.
8. Los gametocitos de los ratones *H1foo*^{-/-} presentan una sinapsis adecuada entre cromosomas homólogos.
9. La generación de DSBs ocurre de manera eficaz y no existen alteraciones en las dinámicas telomérica y centromérica de los oocitos deficientes en H1FOO.
10. La ausencia de H1FOO no afecta a la capacidad de reprogramación de MEFs para generar iPSCs.

REFERENCIAS



REFERENCIAS

- Abby, E., Tourpin, S., Ribeiro, J., Daniel, K., Messiaen, S., Moison, D., Guerquin, J., Gaillard, J. C., Armengaud, J., Langa, F., Toth, A., Martini, E., & Livera, G. (2016). Implementation of meiosis prophase I programme requires a conserved retinoid-independent stabilizer of meiotic transcripts. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS10324>
- Abu-Abed, S., MacLean, G., Fraulob, V., Chambon, P., Petkovich, M., & Dollé, P. (2002). Differential expression of the retinoic acid-metabolizing enzymes CYP26A1 and CYP26B1 during murine organogenesis. *Mechanisms of Development*, 110(1–2), 173–177. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00572-X](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00572-X)
- Acquaviva, L., Boekhout, M., Karasu, M. E., Brick, K., Pratto, F., Li, T., van Overbeek, M., Kauppi, L., Camerini-Otero, R. D., Jasin, M., & Keeney, S. (2020). Ensuring meiotic DNA break formation in the mouse pseudoautosomal region. *Nature* 2020 582:7812, 582(7812), 426–431. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2327-4>
- Adams, I. R., & McLaren, A. (2002). Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development*, 129(5), 1155–1164. <https://doi.org/10.1242/DEV.129.5.1155>
- Adhikari, D., & Liu, K. (2009). Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine Reviews*, 30(5), 438–464. <https://doi.org/10.1210/ER.2008-0048>
- Aflatoonian, A., Baghianimoghadam, B., Partovi, P., Abdoli, A., Hemmati, P., Tabibnejad, N., & Dehghani, M. (2011). A new classification for female infertility. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology* 2011, 38(4), 379–381, 38(4), 379–381. <https://doi.org/pii/1630543039464-1876945411>
- Ahmad, A., Ahmed, A., & Patrizio, P. (2013). Cystic fibrosis and fertility. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 25(3), 167–172. <https://doi.org/10.1097/GCO.0B013E32835F1745>
- Ali, H., Unar, A., Zubair, M., Dil, S., Ullah, F., Khan, I., Hussain, A., & Shi, Q. (2022). In silico analysis of a novel pathogenic variant c.7G > A in C14orf39 gene identified by WES in a Pakistani family with azoospermia. *Molecular Genetics and Genomics*, 297(3), 719–730. <https://doi.org/10.1007/S00438-022-01876-4>
- Anderson, E. L., Baltus, A. E., Roepers-Gajadien, H. L., Hassold, T. J., De Rooij, D. G., Van Pelt, A. M. M., & Page, D. C. (2008). Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39), 14976–14980. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0807297105>
- Andrabi, S. M. H. (2007). Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24(12), 561–569. <https://doi.org/10.1007/S10815-007-9177-Y/TABLES/3>
- Arnhold, I. J., Lofrano-Porto, A., & Latronico, A. C. (2009). Inactivating Mutations of Luteinizing Hormone β -Subunit or Luteinizing Hormone Receptor Cause Oligo-Amenorrhea and Infertility in Women. *Hormone Research in Paediatrics*, 71(2), 75–82. <https://doi.org/10.1159/000183895>

- Asadi, F., Gilani, M. A. S., Ghaheri, A., Saffari, J. R., & Zamanian, M. (2017). The Prevalence of Y Chromosome Microdeletions in Iranian Infertile Men with Azoospermia and Severe Oligospermia. *Cell Journal*, *19*(1), 27–33. <https://doi.org/10.22074/CELLJ.2016.4863>
- Awe, J. P., & Byrne, J. A. (2013). Identifying candidate oocyte reprogramming factors using cross-species global transcriptional analysis. *Cellular Reprogramming*, *15*(2), 126–133. <https://doi.org/10.1089/CELL.2012.0060>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, *21*(3), 381–395. <https://doi.org/10.1038/CR.2011.22>
- Bao, J., & Bedford, M. T. (2016). Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. *Reproduction (Cambridge, England)*, *151*(5), R55. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0562>
- Bashamboo, A., Ferraz-De-Souza, B., Loureno, D., Lin, L., Sebire, N. J., Montjean, D., Bignon-Topalovic, J., Mandelbaum, J., Siffroi, J. P., Christin-Maitre, S., Radhakrishna, U., Rouba, H., Ravel, C., Seeler, J., Achermann, J. C., & McElreavey, K. (2010). Human Male Infertility Associated with Mutations in NR5A1 Encoding Steroidogenic Factor 1. *The American Journal of Human Genetics*, *87*(4), 505–512. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2010.09.009>
- Baudat, F., Buard, J., Grey, C., Fledel-Alon, A., Ober, C., Przeworski, M., Coop, G., & De Massy, B. (2010). PRDM9 is a Major Determinant of Meiotic Recombination Hotspots in humans and mice. *Science (New York, N.Y.)*, *327*(5967), 836. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1183439>
- Baudat, F., Imai, Y., & de Massy, B. (2013). Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nature Reviews Genetics*, *14*(11), 794–806. <https://doi.org/10.1038/nrg3573>
- Becker, M., Becker, A., Miyara, F., Han, Z., Kihara, M., Brown, D. T., Hager, G. L., Latham, K., Adashi, E. Y., & Misteli, T. (2005). Differential In Vivo Binding Dynamics of Somatic and Oocyte-specific Linker Histones in Oocytes and During ES Cell Nuclear Transfer. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(8), 3887. <https://doi.org/10.1091/MBC.E05-04-0350>
- Bellani, M. A., Boateng, K. A., McLeod, D., & Camerini-Otero, R. D. (2010). The Expression Profile of the Major Mouse SPO11 Isoforms Indicates that SPO11 β Introduces Double Strand Breaks and Suggests that SPO11 α Has an Additional Role in Prophase in both Spermatocytes and Oocytes. *Molecular and Cellular Biology*, *30*(18), 4391. <https://doi.org/10.1128/MCB.00002-10>
- Ben Khelifa, M., Coutton, C., Zouari, R., Karaouzène, T., Rendu, J., Bidart, M., Yassine, S., Pierre, V., Delaroche, J., Hennebicq, S., Grunwald, D., Escalier, D., Pernet-Gallay, K., Jouk, P. S., Thierry-Mieg, N., Touré, A., Arnoult, C., & Ray, P. F. (2014). Mutations in DNAH1, which Encodes an Inner Arm Heavy Chain Dynein, Lead to Male Infertility from Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella. *American Journal of Human Genetics*, *94*(1), 95. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2013.11.017>
- Berta, P., Hawkins, J. B., Sinclair, A. H., Taylor, A., Griffiths, B. L., Goodfellow, P. N., & Fellous, M. (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* *1990* *348*:6300, *348*(6300), 448–450. <https://doi.org/10.1038/348448a0>
- Bishop, D. K. (1994). RecA homologs Dmc1 and Rad51 interact to form multiple nuclear complexes prior to meiotic chromosome synapsis. *Cell*, *79*(6), 1081–1092. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90038-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90038-8)

- Bobadilla, J. L., Macek, M., Fine, J. P., & Farrell, P. M. (2002). Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Human Mutation*, *19*(6), 575–606. <https://doi.org/10.1002/HUMU.10041>
- Boivin, J., Bunting, L., Collins, J. A., & Nygren, K. G. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *22*(6), 1506–1512. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEM046>
- Bolcun-Filas, E., Costa, Y., Speed, R., Taggart, M., Benavente, R., De Rooij, D. G., & Cooke, H. J. (2007). SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. *The Journal of Cell Biology*, *176*(6), 741. <https://doi.org/10.1083/JCB.200610027>
- Bolcun-Filas, E., & Handel, M. A. (2018). Meiosis: the chromosomal foundation of reproduction. *Biology of Reproduction*, *99*(1), 112–126. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOY021>
- Bolcun-Filas, E., Speed, R., Taggart, M., Grey, C., De Massy, B., Benavente, R., & Cooke, H. J. (2009). Mutation of the mouse *Syce1* gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair. *PLoS Genetics*, *5*(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1000393>
- Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M. J., Rossant, J., Hamada, H., & Koopman, P. (2006). Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science*, *312*(5773), 596–600. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1125691>
- Brick, K., Smagulova, F., Khil, P., Camerini-Otero, R. D., & Petukhova, G. V. (2012). Genetic recombination is directed away from functional genomic elements in mice. *Nature*, *485*(7400), 642–645. <https://doi.org/10.1038/NATURE11089>
- Brown, M. S., & Bishop, D. K. (2015). DNA Strand Exchange and RecA Homologs in Meiosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(1), 16659–16660. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A016659>
- Bullejos, M., & Koopman, P. (2004). Germ cells enter meiosis in a rostro-caudal wave during development of the mouse ovary. *Molecular Reproduction and Development*, *68*(4), 422–428. <https://doi.org/10.1002/MRD.20105>
- Burgoyne, P. S., Mahadevaiah, S. K., & Turner, J. M. A. (2009). The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nature Reviews Genetics*, *10*(3), 207–216. <https://doi.org/10.1038/NRG2505>
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A., & Chen, D. J. (2001). ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(45), 42462–42467. <https://doi.org/10.1074/JBC.C100466200>
- Burton, N. O., & Greer, E. L. (2022). Multigenerational epigenetic inheritance: Transmitting information across generations. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *127*, 121–132. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2021.08.006>
- Caburet, S., Arboleda, V. A., Llano, E., Overbeek, P. A., Barbero, J. L., Oka, K., Harrison, W., Vaiman, D., Ben-Neriah, Z., García-Tuñón, I., Fellous, M., Pendás, A. M., Veitia, R. A., & Vilain, E. (2014).

- Mutant Cohesin in Premature Ovarian Failure. *The New England Journal of Medicine*, 370(10), 943. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1309635>
- Caburet, S., Heddar, A., Dardillac, E., Creux, H., Lambert, M., Messiaen, S., Tourpin, S., Livera, G., Lopez, B. S., & Misrahi, M. (2021). Homozygous hypomorphic BRCA2 variant in primary ovarian insufficiency without cancer or Fanconi anaemia trait. *Journal of Medical Genetics*, 58(2), 125–134. <https://doi.org/10.1136/JMEDGENET-2019-106672>
- Caburet, S., Todeschini, A. L., Petrillo, C., Martini, E., Farran, N. D., Legois, B., Livera, G., Younis, J. S., Shalev, S., & Veitia, R. A. (2019). A truncating MEIOB mutation responsible for familial primary ovarian insufficiency abolishes its interaction with its partner SPATA22 and their recruitment to DNA double-strand breaks. *EBioMedicine*, 42, 524–531. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2019.03.075>
- Carlosama, C., Elzaiat, M., Patiño, L. C., Mateus, H. E., Veitia, R. A., & Laissue, P. (2017). A homozygous donor splice-site mutation in the meiotic gene MSH4 causes primary ovarian insufficiency. *Human Molecular Genetics*, 26(16), 3161–3166. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDX199>
- Carlosama, C., Patiño, L. C., Beau, I., Morel, A., Delemer, B., Young, J., Binart, N., & Laissue, P. (2018). A novel mutation in KHDRBS1 in a patient affected by primary ovarian insufficiency. *Clinical Endocrinology*, 89(2), 245–246. <https://doi.org/10.1111/CEN.13749>
- Chang, Y. F., Imam, J. S., & Wilkinson, M. F. (2007). The Nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 51–74. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.76.050106.093909>
- Chassot, A. A., Ranc, F., Gregoire, E. P., Roepers-Gajadien, H. L., Taketo, M. M., Camerino, G., de Rooij, D. G., Schedl, A., & Chaboissier, M. C. (2008). Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Human Molecular Genetics*, 17(9), 1264–1277. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDN016>
- Chen, A., Tiosano, D., Guran, T., Baris, H. N., Bayram, Y., Mory, A., Shapiro-Kulnane, L., Hodges, C. A., Akdemir, Z. C., Turan, S., Jhangiani, S. N., Van Den Akker, F., Hoppel, C. L., Salz, H. K., Lupski, J. R., & Buchner, D. A. (2018). Mutations in the mitochondrial ribosomal protein MRPS22 lead to primary ovarian insufficiency. *Human Molecular Genetics*, 27(11), 1913–1926. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy098>
- Cho, E. J., Takagi, T., Moore, C. R., & Buratowski, S. (1997). mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes & Development*, 11(24), 3319. <https://doi.org/10.1101/GAD.11.24.3319>
- Choi, Y., Jeon, S., Choi, M., Lee, M. H., Park, M., Lee, D. R., Jun, K. Y., Kwon, Y., Lee, O. H., Song, S. H., Kim, J. Y., Lee, K. A., Yoon, T. K., Rajkovic, A., & Shim, S. H. (2010). Mutations in SOHLH1 gene associate with nonobstructive Azoospermia. *Human Mutation*, 31(7), 788–793. <https://doi.org/10.1002/HUMU.21264>
- Clarke, H. J., Mclay, D. W., & Mohamed, O. A. (1998). Linker Histone Transitions During Mammalian Oogenesis and Embryogenesis. *Dev. Genet*, 22, 17–30. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6408\(1998\)22:1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1998)22:1)
- Combes, A. N., Wilhelm, D., Davidson, T., Dejana, E., Harley, V., Sinclair, A., & Koopman, P. (2009). Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Developmental Biology*, 326(1), 112–120. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2008.10.040>

- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, N.Y.)*, *339*(6121), 819–823. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1231143>
- Cook, M. S., Coveney, D., Batchvarov, I., Nadeau, J. H., & Capel, B. (2009). BAX-mediated cell death affects early germ cell loss and incidence of testicular teratomas in Dnd1Ter/Ter mice. *Developmental Biology*, *328*(2), 377–383. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2009.01.041>
- Costa, Y., Speed, R., Öllinger, R., Aisheimer, M., Semple, C. A., Gautier, P., Maratou, K., Novak, I., Höög, C., Benavente, R., & Cooke, H. J. (2005). Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *Journal of Cell Science*, *118*(12), 2755–2762. <https://doi.org/10.1242/JCS.02402>
- Coucouvani, E., & Martin, G. R. (1999). BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo. *Development (Cambridge, England)*, *126*(3), 535–546. <https://doi.org/10.1242/DEV.126.3.535>
- Crichton, J. H., Dunce, J. M., Dunne, O. M., Salmon, L. J., Devenney, P. S., Lawson, J., Adams, I. R., & Davies, O. R. (2023). Structural maturation of SYCP1-mediated meiotic chromosome synapsis by SYCE3. *Nature Structural & Molecular Biology*, *30*(2), 188–199. <https://doi.org/10.1038/S41594-022-00909-1>
- Cui, Y. H., Chen, W., Wu, S., Wan, C. L., & He, Z. (2023). Generation of male germ cells in vitro from the stem cells. *Asian Journal of Andrology*, *25*(1), 13–20. <https://doi.org/10.4103/AJA20226>
- Cutter, A. R., & Hayes, J. J. (2015). A brief review of nucleosome structure. *FEBS Letters*, *589*(20), 2914–2922. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2015.05.016>
- da Cruz, I., Rodríguez-Casuriaga, R., Santifñaque, F. F., Farías, J., Curti, G., Capoano, C. A., Folle, G. A., Benavente, R., Sotelo-Silveira, J. R., & Geisinger, A. (2016). Transcriptome analysis of highly purified mouse spermatogenic cell populations: gene expression signatures switch from meiotic-to postmeiotic-related processes at pachytene stage. *BMC Genomics*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/S12864-016-2618-1>
- Davies, O. R., Maman, J. D., & Pellegrini, L. (2012). Structural analysis of the human SYCE2-TEX12 complex provides molecular insights into synaptonemal complex assembly. *Open Biology*, *2*(7). <https://doi.org/10.1098/RSOB.120099>
- de Macedo, M. P., Glanzner, W. G., Gutierrez, K., & Bordignon, V. (2021). Chromatin role in early programming of embryos. *Animal Frontiers: The Review Magazine of Animal Agriculture*, *11*(6), 57. <https://doi.org/10.1093/AF/VFAB054>
- De Rooij, D. G. (2017). The nature and dynamics of spermatogonial stem cells. *Development (Cambridge, England)*, *144*(17), 3022–3030. <https://doi.org/10.1242/DEV.146571>
- De Vries, F. A. T., De Boer, E., Van Den Bosch, M., Baarends, W. M., Ooms, M., Yuan, L., Liu, J. G., Van Zeeland, A. A., Heyting, C., & Pastink, A. (2005). Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes & Development*, *19*(11), 1376–1389. <https://doi.org/10.1101/GAD.329705>
- De Vries, L., Behar, D. M., Smirin-Yosef, P., Lagovsky, I., Tzur, S., Basel-Vanagaite, L., The, J. Z., & Shafer, S. L. (2014). Exome Sequencing Reveals SYCE1 Mutation Associated With Autosomal Recessive

- Primary Ovarian Insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 10, 99. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1268>
- Ding, X., Xu, R., Yu, J., Xu, T., Zhuang, Y., & Han, M. (2007). SUN1 Is Required for Telomere Attachment to Nuclear Envelope and Gametogenesis in Mice. *Developmental Cell*, 12(6), 863–872. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2007.03.018>
- Dix, D. J., Allen, J. W., Collins, B. W., Poorman-Allen, P., Mori, C., Blizard, D. R., Brown, P. R., Goulding, E. H., Strong, B. D., & Eddy, E. M. (1997). HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development (Cambridge, England)*, 124(22), 4595–4603. <https://doi.org/10.1242/DEV.124.22.4595>
- Doenecke, D., Albig, W., Bode, C., Drabent, B., Franke, K., Gavenis, K., & Witt, O. (1997). Histones: genetic diversity and tissue-specific gene expression. *Histochemistry and Cell Biology* 1997 107:1, 107(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/S004180050083>
- Doherty, E., Pakarinen, P., Tiitinen, A., Kiilavuori, A., Huhtaniemi, I., Forrest, S., & Aittomäki, K. (2002). A Novel Mutation in the FSH Receptor Inhibiting Signal Transduction and Causing Primary Ovarian Failure. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(3), 1151–1155. <https://doi.org/10.1210/JCEM.87.3.8319>
- Drabent, B., Saftig, P., Bode, C., & Doenecke, D. (2000). Spermatogenesis proceeds normally in mice without linker histone H1t. *Histochemistry and Cell Biology* 2000 113:6, 113(6), 433–442. <https://doi.org/10.1007/S004180000146>
- Dudley, B. M., Runyan, C., Takeuchi, Y., Schaible, K., & Molyneaux, K. (2007). BMP signaling regulates PGC numbers and motility in organ culture. *Mechanisms of Development*, 124(1), 68–77. <https://doi.org/10.1016/J.MOD.2006.09.005>
- Dunce, J. M., Dunne, O. M., Ratcliff, M., Millán, C., Madgwick, S., Usón, I., & Davies, O. R. (2018). Structural basis of meiotic chromosome synapsis through SYCP1 self-assembly. *Nature Structural & Molecular Biology* 2018 25:7, 25(7), 557–569. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0078-9>
- Dunne, O. M., & Davies, O. R. (2019a). A molecular model for self-assembly of the synaptonemal complex protein SYCE3. *Journal of Biological Chemistry*, 294(23), 9260–9275. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA119.008404>
- Dunne, O. M., & Davies, O. R. (2019b). Molecular structure of human synaptonemal complex protein SYCE1. *Chromosoma*, 128(3), 223–236. <https://doi.org/10.1007/S00412-018-00688-Z>
- Eaker, S., Cobb, J., Pyle, A., & Handel, M. A. (2002). Meiotic prophase abnormalities and metaphase cell death in MLH1-deficient mouse spermatocytes: Insights into regulation of spermatogenic progress. *Developmental Biology*, 249(1), 85–95. <https://doi.org/10.1006/DBIO.2002.0708>
- Elborn, J. S. (2016). Cystic fibrosis. *The Lancet*, 388(10059), 2519–2531. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00576-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00576-6)
- El-Brolosy, M. A., & Stainier, D. Y. R. (2017). Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genetics*, 13(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1006780>
- Endo, T., Mikedis, M. M., Nicholls, P. K., Page, D. C., & de Rooij, D. G. (2019). Retinoic Acid and Germ Cell Development in the Ovary and Testis. *Biomolecules* 2019, Vol. 9, Page 775, 9(12), 775. <https://doi.org/10.3390/BIOM9120775>

- Fan, S., Jiao, Y., Khan, R., Jiang, X., Javed, A. R., Ali, A., Zhang, H., Zhou, J., Naeem, M., Murtaza, G., Li, Y., Yang, G., Zaman, Q., Zubair, M., Guan, H., Zhang, X., Ma, H., Jiang, H., Ali, H., ... Shi, Q. (2021). Homozygous mutations in C14orf39/SIX6OS1 cause non-obstructive azoospermia and premature ovarian insufficiency in humans. *American Journal of Human Genetics*, *108*(2), 324. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2021.01.010>
- Fausser, B. C. J. M. (2004). Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, *81*(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.10.004>
- Fawcett, D. W. (1956). The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, *2*(4), 403–406. <https://doi.org/10.1083/JCB.2.4.403>
- Felipe-Medina, N., Caburet, S., Sánchez-Sáez, F., Condezo, Y. B., de Rooij, D. G., Gómez-H, L., Garcia-Valiente, R., Todeschini, A. L., Duque, P., Sánchez-Martin, M. A., Shalev, S. A., Llano, E., Veitia, R. A., & Pendás, A. M. (2020). A missense in HSF2BP causing primary ovarian insufficiency affects meiotic recombination by its novel interactor C19ORF57/BRME1. *ELife*, *9*. <https://doi.org/10.7554/eLife.56996>
- Feng, K., Ge, H., Chen, H., Cui, C., Zhang, S., Zhang, C., Meng, L., Guo, H., & Zhang, L. (2022). Novel exon mutation in SYCE1 gene is associated with non-obstructive azoospermia. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *26*(4), 1245–1252. <https://doi.org/10.1111/JCMM.17180>
- Ferlin, A., Vinanzi, C., Garolla, A., Selice, R., Zuccarello, D., Cazzadore, C., & Foresta, C. (2006). Male infertility and androgen receptor gene mutations: clinical features and identification of seven novel mutations. *Clinical Endocrinology*, *65*, 606–610. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02635.x>
- Fernandez-Capetillo, O., Mahadevaiah, S. K., Celeste, A., Romanienko, P. J., Camerini-Otero, R. D., Bonner, W. M., Manova, K., Burgoyne, P., & Nussenzweig, A. (2003). H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Developmental Cell*, *4*(4), 497–508. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00093-5](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00093-5)
- Fox, C. A., Sheets, M. D., & Wickens, M. P. (1989). Poly(A) addition during maturation of frog oocytes: distinct nuclear and cytoplasmic activities and regulation by the sequence UUUUUUAU. *Genes & Development*, *3*(12B), 2151–2162. <https://doi.org/10.1101/GAD.3.12B.2151>
- Franca, M. M., Condezo, Y. B., Elzaiat, M., Felipe-Medina, N., Sánchez-Sáez, F., Muñoz, S., Sainz-Urruela, R., Martín-Hervás, M. R., García-Valiente, R., Sánchez-Martín, M. A., Astudillo, A., Mendez, J., Llano, E., Veitia, R. A., Mendonca, B. B., & Pendás, A. M. (2022). A truncating variant of RAD51B associated with primary ovarian insufficiency provides insights into its meiotic and somatic functions. *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/S41418-022-01021-Z>
- França, M. M., & Mendonca, B. B. (2022). Genetics of ovarian insufficiency and defects of folliculogenesis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, *36*(1), 101594. <https://doi.org/10.1016/J.BEEM.2021.101594>
- Franke, D., & Svergun, D. I. (2009). DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography*, *42*(Pt 2), 342–346. <https://doi.org/10.1107/S0021889809000338>

- Fraune, J., Schramm, S., Alsheimer, M., & Benavente, R. (2012). The mammalian synaptonemal complex: Protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Experimental Cell Research*, *318*(12), 1340–1346. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2012.02.018>
- Funaya, S., Kawabata, Y., Sugie, K., Abe, K. I., Suzuki, Y., Suzuki, M. G., & Aoki, F. (2022). Involvement of the linker histone H1foo in the regulation of oogenesis. *Reproduction*, *164*(2), 19–29. <https://doi.org/10.1530/REP-21-0233>
- Funaya, S., Ooga, M., Suzuki, M. G., & Aoki, F. (2018). Linker histone H1FOO regulates the chromatin structure in mouse zygotes. *FEBS Letters*, *592*(14), 2414–2424. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13175>
- Furuya, M., Tanaka, M., Teranishi, T., Matsumoto, K., Hosoi, Y., Saeki, K., Ishimoto, H., Minegishi, K., Iritani, A., & Yoshimura, Y. (2007). H1foo is indispensable for meiotic maturation of the mouse oocyte. *The Journal of Reproduction and Development*, *53*(4), 895–902. <https://doi.org/10.1262/JRD.19008>
- Fyodorov, D. V., Zhou, B. R., Skoultchi, A. I., & Bai, Y. (2018). Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *19*(3), 192. <https://doi.org/10.1038/NRM.2017.94>
- Gao, S., Chung, Y. G., Parseghian, M. H., King, G. J., Adashi, E. Y., & Latham, K. E. (2004). Rapid H1 linker histone transitions following fertilization or somatic cell nuclear transfer: Evidence for a uniform developmental program in mice. *Developmental Biology*, *266*(1), 62–75. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.10.003>
- Gaucher, J., Reynoird, N., Montellier, E., Boussouar, F., Rousseaux, S., & Khochbin, S. (2010). From meiosis to postmeiotic events: The secrets of histone disappearance. *FEBS Journal*, *277*(3), 599–604. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2009.07504.X>
- Geisinger, A., & Benavente, R. (2016). Mutations in Genes Coding for Synaptonemal Complex Proteins and Their Impact on Human Fertility. *Cytogenetic and Genome Research*, *150*(2), 77–85. <https://doi.org/10.1159/000453344>
- Georgiou, I., Syrrou, M., Pardalidis, N., Karakitsios, K., Mantzavinos, T., Giotitsas, N., Loutradis, D., Dimitriadis, F., Saito, M., Miyagawa, I., Tzoumis, P., Sylakos, A., Kanakas, N., Moustakareas, T., Baltogiannis, D., Touloupides, S., Giannakis, D., Fatouros, M., & Sofikitis, N. (2006). Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method. *Asian J Androl*, *8*(6), 86–107. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2006.00231.x>
- Geyer, C. B. (2017). Setting the stage: The first round of spermatogenesis. *The Biology of Mammalian Spermatogonia*, 39–63. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7505-1_3/FIGURES/3
- Ghafari, F., Gutierrez, C. G., & Hartshorne, G. M. (2007). Apoptosis in mouse fetal and neonatal oocytes during meiotic prophase one. *BMC Developmental Biology*, *7*. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-87>
- Ghieh, F., Barbotin, A. L., Swierkowski-Blanchard, N., Leroy, C., Fortemps, J., Gerault, C., Hue, C., Mambu Mambuani, H., Jaillard, S., Albert, M., Bailly, M., Izard, V., Molina-Gomes, D., Marcelli, F., Prasivoravong, J., Serazin, V., Dieudonne, M. N., Delcroix, M., Garchon, H. J., ... Vialard, F. (2022). Whole-exome sequencing in patients with maturation arrest: a potential additional diagnostic tool for prevention of recurrent negative testicular sperm extraction outcomes. *Human Reproduction*, *37*(6), 1334–1350. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEAC057>

- Gomes, K. M. S., Costa, I. C., Dos Santos, J. F., Dourado, P. M. M., Forni, M. F., & Ferreira, J. C. B. (2017). Induced pluripotent stem cells reprogramming: Epigenetics and applications in the regenerative medicine. *Revista Da Associacao Medica Brasileira (1992)*, *63*(2), 180–189. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.63.02.180>
- Gómez-H, L., Felipe-Medina, N., Sánchez-Martín, M., Davies, O. R., Ramos, I., García-Tuñón, I., De Rooij, D. G., Dereli, I., Tóth, A., Barbero, J. L., Benavente, R., Llano, E., & Pendas, A. M. (2016). C14ORF39/SIX6OS1 is a constituent of the synaptonemal complex and is essential for mouse fertility. *Nature Communications 2016 7:1*, *7*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/ncomms13298>
- Gonen, N., Quinn, A., O'Neill, H. C., Koopman, P., & Lovell-Badge, R. (2017). Normal Levels of Sox9 Expression in the Developing Mouse Testis Depend on the TES/TESCO Enhancer, but This Does Not Act Alone. *PLoS Genetics*, *13*(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1006520>
- Grande, G., Barrachina, F., Soler-Ventura, A., Jodar, M., Mancini, F., Marana, R., Chiloiro, S., Pontecorvi, A., Oliva, R., & Milardi, D. (2022). The Role of Testosterone in Spermatogenesis: Lessons From Proteome Profiling of Human Spermatozoa in Testosterone Deficiency. *Frontiers in Endocrinology*, *13*, 852661. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2022.852661>
- Gravholt, C. H., Viuff, M. H., Brun, S., Stochholm, K., & Andersen, N. H. (2019). Turner syndrome: mechanisms and management. *Nature Reviews Endocrinology 2019 15:10*, *15*(10), 601–614. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0224-4>
- Grey, C., & de Massy, B. (2021). Chromosome Organization in Early Meiotic Prophase. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 1397. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.688878/BIBTEX>
- Griswold, M. D. (2016). Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev*, *96*, 1–17. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2015.-Mam>
- Guan, Y., Adrian Leu, N., Ma, J., Chmátal, L., Ruthel, G., Bloom, J. C., Lampson, M. A., Schimenti, J. C., Luo, M., & Jeremy Wang, P. (2020). SKP1 drives the prophase I to metaphase I transition during male meiosis. *Science Advances*, *6*(13). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAZ2129>
- Guo, F., Li, X., Liang, D., Li, T., Zhu, P., Guo, H., Wu, X., Wen, L., Gu, T. P., Hu, B., Walsh, C. P., Li, J., Tang, F., & Xu, G. L. (2014). Active and passive demethylation of male and female pronuclear DNA in the mammalian zygote. *Cell Stem Cell*, *15*(4), 447–459. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2014.08.003>
- Guo, M., Luo, C., Wang, Z., Chen, S., Morris, D., Ruan, F., Chen, Z., Yang, L., Wei, X., Wu, C., Luo, B., Lv, Z., Huang, J., Zhang, D., Yu, C., Gao, Q., Wang, H., Zhang, Y., Sun, F., ... Tang, C. (2022). Uncoupling transcription and translation through miRNA-dependent poly(A) length control in haploid male germ cells. *Development (Cambridge, England)*, *149*(12). <https://doi.org/10.1242/DEV.199573>
- Guo, T., Zhao, S., Zhao, S., Chen, M., Li, G., Jiao, X., Wang, Z., Zhao, Y., Qin, Y., Gao, F., & Chen, Z. J. (2017). Mutations in MSH5 in primary ovarian insufficiency. *Human Molecular Genetics*, *26*(8), 1452–1457. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDX044>
- Hacker, A., Capel, B., Goodfellow, P., & Lovell-Badge, R. (1995). Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development (Cambridge, England)*, *121*(6), 1603–1614. <https://doi.org/10.1242/DEV.121.6.1603>

- Hamer, G., Gell, K., Kouznetsova, A., Novak, I., Benavente, R., & Höög, C. (2006). Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *Journal of Cell Science*, *119*(19), 4025–4032. <https://doi.org/10.1242/JCS.03182>
- Hamer, G., Wang, H., Bolcun-Filas, E., Cooke, H. J., Benavente, R., & Höög, C. (2008). Progression of meiotic recombination requires structural maturation of the central element of the synaptonemal complex. *Journal of Cell Science*, *121*(15), 2445–2451. <https://doi.org/10.1242/JCS.033233>
- Hamza, L., Gaïtch, N., Sallem, A., Boucekkine, N., Girodon, E., Oumeziane, A., Attal, N., Wolf, J. P., & Bienvenu, T. (2020). Two frequent loss-of-function mutations in Aurora Kinase C gene in Algerian infertile men with macrozoospermia. *Andrologia*, *52*(11), e13868. <https://doi.org/10.1111/AND.13868>
- Handel, M. A., & Schimenti, J. C. (2010). Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nature Reviews Genetics* *2010* *11:2*, *11*(2), 124–136. <https://doi.org/10.1038/nrg2723>
- Hargan-Calvopina, J., Taylor, S., Cook, H., Hu, Z., Lee, S. A., Yen, M. R., Chiang, Y. S., Chen, P. Y., & Clark, A. T. (2016). Stage-specific demethylation in primordial germ cells safeguards against precocious differentiation. *Developmental Cell*, *39*(1), 75. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2016.07.019>
- Hart, R. J. (2016). Physiological Aspects of Female Fertility: Role of the Environment, Modern Lifestyle, and Genetics. *Physiol Rev*, *96*, 873–909. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2015>.-Across
- Hawksworth, D. J., Szafran, A. A., Jordan, P. W., Dobs, A. S., & Herati, A. S. (2018). Management Update Infertility in Patients With Klinefelter Syndrome: Optimal Timing for Sperm and Testicular Tissue Cryopreservation. *Reviews in Urology*, *20*(2), 56–62. <https://doi.org/10.3909/riu0790>
- Hayakawa, K., Ohgane, J., Tanaka, S., Yagi, S., & Shiota, K. (2012). Oocyte-specific linker histone H1foo is an epigenomic modulator that decondenses chromatin and impairs pluripotency. *Epigenetics*, *7*(9), 1029. <https://doi.org/10.4161/EPI.21492>
- He, W. Bin, Tu, C. F., Liu, Q., Meng, L. L., Yuan, S. M., Luo, A. X., He, F. S., Shen, J., Li, W., Du, J., Zhong, C. G., Lu, G. X., Lin, G., Fan, L. Q., & Tan, Y. Q. (2018). DMC1 mutation that causes human non-obstructive azoospermia and premature ovarian insufficiency identified by whole-exome sequencing. *Journal of Medical Genetics*, *55*(3), 198–204. <https://doi.org/10.1136/JMEDGENET-2017-104992>
- Hellmuth, S., Gómez-H, L., Pendás, A. M., & Stemmann, O. (2020). Securin-independent regulation of separase by checkpoint-induced shugoshin–MAD2. *Nature*, *580*(7804), 536–541. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2182-3>
- Hellmuth, S., Gutiérrez-Caballero, C., Llano, E., Pendás, A. M., & Stemmann, O. (2018). Local activation of mammalian separase in interphase promotes double-strand break repair and prevents oncogenic transformation. *The EMBO Journal*, *37*(22). <https://doi.org/10.15252/EMBJ.201899184>
- Hellmuth, S., Rata, S., Brown, A., Heidmann, S., Novak, B., & Stemmann, O. (2015). Human Chromosome Segregation Involves Multi-Layered Regulation of Separase by the Peptidyl-Prolyl-Isomerase Pin1. *Molecular Cell*, *58*(3), 495–506. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2015.03.025>

- Herbert, M., Levasseur, M., Homer, H., Yallop, K., Murdoch, A., & McDougall, A. (2003). Homologue disjunction in mouse oocytes requires proteolysis of securin and cyclin B1. *Nature Cell Biology*, 5(11), 1023–1025. <https://doi.org/10.1038/NCB1062>
- Hergeth, S. P., & Schneider, R. (2015). The H1 linker histones: multifunctional proteins beyond the nucleosomal core particle. *EMBO Reports*, 16(11), 1439. <https://doi.org/10.15252/EMBR.201540749>
- Hernández-Hernández, A., Masich, S., Fukuda, T., Kouznetsova, A., Sandin, S., Daneholt, B., & Höög, C. (2016). The central element of the synaptonemal complex in mice is organized as a bilayered junction structure. *Journal of Cell Science*, 129(11), 2239–2249. <https://doi.org/10.1242/JCS.182477/260248/AM/THE-CENTRAL-ELEMENT-OF-THE-SYNAPTONEMAL-COMPLEX-IN>
- Hernández-López, D., Geisinger, A., Trovero, M. F., Santiñaque, F. F., Brauer, M., Folle, G. A., Benavente, R., & Rodríguez-Casuriaga, R. (2020). Familial primary ovarian insufficiency associated with an SYCE1 point mutation: defective meiosis elucidated in humanized mice. *Molecular Human Reproduction*, 26(7), 485–497. <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAAA032>
- Hinch, A. G., Becker, P. W., Li, T., Moralli, D., Zhang, G., Bycroft, C., Green, C., Keeney, S., Shi, Q., Davies, B., & Donnelly, P. (2020). The Configuration of RPA, RAD51, and DMC1 Binding in Meiosis Reveals the Nature of Critical Recombination Intermediates. *Molecular Cell*, 79(4), 689–701.e10. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2020.06.015>
- Hogarth, C. A., & Griswold, M. D. (2010). The key role of vitamin A in spermatogenesis Find the latest version: The key role of vitamin A in spermatogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(4). <https://doi.org/10.1172/JCI41303>
- Hou, D., Yao, C., Xu, B., Luo, W., Ke, H., Li, Z., Qin, Y., & Guo, T. (2022). Variations of C14ORF39 and SYCE1 Identified in Idiopathic Premature Ovarian Insufficiency and Nonobstructive Azoospermia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 107(3), 724–734. <https://doi.org/10.1210/CLINEM/DGAB777>
- Huang, C., Guo, T., & Qin, Y. (2021). Meiotic Recombination Defects and Premature Ovarian Insufficiency. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.652407>
- Huang, Y., Tian, R., Xu, J., Ji, Z., Zhang, Y., Zhao, L., Yang, C., Li, P., Zhi, E., Bai, H., Han, S., Luo, J., Zhao, J., Zhang, J., Zhou, Z., Li, Z., & Yao, C. (2022). Novel copy number variations within SYCE1 caused meiotic arrest and non-obstructive azoospermia. *BMC Medical Genomics*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12920-022-01288-8/TABLES/2>
- Huber, S., & Fieder, M. (2018). Evidence for a maximum “shelf-life” of oocytes in mammals suggests that human menopause may be an implication of meiotic arrest. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-32502-2>
- Hutt, D. M., Loguercio, S., Roth, D. M., Su, A. I., & Balch, W. E. (2018). Correcting the F508del-CFTR variant by modulating eukaryotic translation initiation factor 3-mediated translation initiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(35), 13477. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA118.003192>
- Hyeseong, C., & Wolffe, A. P. (1994). *Xenopus laevis* B4, an intron-containing oocyte-specific linker histone-encoding gene. *Gene*, 143(2), 233–238. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90102-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90102-3)

- Inaba, K., & Mizuno, K. (2016). Sperm dysfunction and ciliopathy. *Reproductive Medicine and Biology*, 15(2), 77–94. <https://doi.org/10.1007/S12522-015-0225-5>
- Ishiguro, K. ichiro. (2019). The cohesin complex in mammalian meiosis. *Genes to Cells*, 24(1), 6–30. <https://doi.org/10.1111/GTC.12652>
- Ishiguro, K. ichiro, Matsuura, K., Tani, N., Takeda, N., Usuki, S., Yamane, M., Sugimoto, M., Fujimura, S., Hosokawa, M., Chuma, S., Ko, M. S. H., Araki, K., & Niwa, H. (2020). MEIOSIN Directs the Switch from Mitosis to Meiosis in Mammalian Germ Cells. *Developmental Cell*, 52(4), 429–445.e10. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2020.01.010>
- Izzo, A., Kamieniarz, K., & Schneider, R. (2008). The histone H1 family: Specific members, specific functions? *Biological Chemistry*, 389(4), 333–343. <https://doi.org/10.1515/BC.2008.037/MACHINEREADABLECITATION/RIS>
- Jaillard, S., Bell, K., Akloul, L., Walton, K., McElreavy, K., Stocker, W. A., Beaumont, M., Harrisson, C., Jääskeläinen, T., Palvimo, J. J., Robevska, G., Launay, E., Satié, A. P., Listyasari, N., Bendavid, C., Sreenivasan, R., Duros, S., van den Bergen, J., Henry, C., ... Sinclair, A. H. (2020). New insights into the genetic basis of premature ovarian insufficiency: Novel causative variants and candidate genes revealed by genomic sequencing. *Maturitas*, 141, 9–19. <https://doi.org/10.1016/J.MATURITAS.2020.06.004>
- Jan, S. Z., Hamer, G., Repping, S., de Rooij, D. G., Van Pelt, A. M. M., & Vormer, T. L. (2012). Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(12), 1838–1850. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2012.02.008>
- Jayaramaiah Raja, S., & Renkawitz-Pohl, R. (2005). Replacement by Drosophila melanogaster protamines and Mst77F of histones during chromatin condensation in late spermatids and role of sesame in the removal of these proteins from the male pronucleus. *Molecular and Cellular Biology*, 25(14), 6165–6177. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.14.6165-6177.2005>
- Jégoua, B. (1993). The Sertoli-Germ Cell Communication Network in Mammals. *International Review of Cytology*, 147(C), 25–96. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60766-4](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60766-4)
- Jin, H., Ahn, J. W., Park, Y. J., Sim, J. M., Park, H. S., Ryu, C. S., Kim, N. K., & Kwack, K. B. (2020). Identification of potential causal variants for premature ovarian failure by whole exome sequencing. *BMC Medical Genomics*, 13(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S12920-020-00813-X/TABLES/1>
- Jullien, J., Miyamoto, K., Pasque, V., Allen, G. E., Bradshaw, C. R., Garrett, N. J., Halley-Stott, R. P., Kimura, H., Ohsumi, K., & Gurdon, J. B. (2014). Hierarchical Molecular Events Driven by Oocyte-Specific Factors Lead to Rapid and Extensive Reprogramming. *Molecular Cell*, 55(4), 524–536. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2014.06.024>
- Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., & Krausz, C. (2012). European Association of Urology Guidelines on Male Infertility: The 2012 Update. *European Urology*, 62(2), 324–332. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2012.04.048>
- Kagiwada, S., Kurimoto, K., Hirota, T., Yamaji, M., & Saitou, M. (2013). Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. *The EMBO Journal*, 32(3), 340. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2012.331>

- Kasipillai, T., Macarthur, D. G., Kirby, A., Thomas, B., Lambalk, C. B., Daly, M. J., & Welt, C. K. (2013). Mutations in eIF4ENIF1 Are Associated With Primary Ovarian Insufficiency and the Program in Medical and Population Genetics (D. E1534 *Jcem.Endojournals.Org J Clin Endocrinol Metab*, 98(9), 1534–1539. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1102>
- Kauppi, L., Barchi, M., Baudat, F., Romanienko, P. J., Keeney, S., & Jasin, M. (2011). Distinct properties of the XY pseudoautosomal region crucial for male meiosis. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6019), 916–920. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1195774>
- Kauppi, L., Barchi, M., Lange, J., Baudat, F., Jasin, M., & Keeney, S. (2013). Numerical constraints and feedback control of double-strand breaks in mouse meiosis. *Genes & Development*, 27(8), 873–886. <https://doi.org/10.1101/GAD.213652.113>
- Kauppi, L., Jasin, M., & Keeney, S. (2012). The tricky path to recombining X and Y chromosomes in meiosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1267(1), 18–23. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2012.06593.X>
- Kawashima, I., & Kawamura, K. (2017). Disorganization of the germ cell pool leads to primary ovarian insufficiency. *Reproduction (Cambridge, England)*, 153(6), R205–R213. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0015>
- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., & Iliakis, G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research*, 36(17), 5678–5694. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKN550>
- Kluin, P. M., Kramer, M. F., & de Rooij, D. G. (1982). Spermatogenesis in the immature mouse proceeds faster than in the adult. *International Journal of Andrology*, 5(3), 282–294. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2605.1982.TB00257.X>
- Komeya, M., Sato, T., & Ogawa, T. (2018). In vitro spermatogenesis: A century-long research journey, still half way around. *Reproductive Medicine and Biology*, 17(4), 407. <https://doi.org/10.1002/RMB2.12225>
- Kong, A., Thorleifsson, G., Frigge, M. L., Masson, G., Gudbjartsson, D. F., Vilmoes, R., Magnusdottir, E., Olafsdottir, S. B., Thorsteinsdottir, U., & Stefansson, K. (2013). Common and low-frequency variants associated with genome-wide recombination rate. *Nature Genetics* 2013 46:1, 46(1), 11–16. <https://doi.org/10.1038/ng.2833>
- Koubova, J., Menke, D. B., Zhou, Q., Cape, B., Griswold, M. D., & Page, D. C. (2006). Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2474–2479. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0510813103>
- Krakauer, D. C., & Mira, A. (1999). Mitochondria and germ-cell death. *Nature* 1999 400:6740, 400(6740), 125–126. <https://doi.org/10.1038/22026>
- Krausz, C., Riera-Escamilla, A., Moreno-Mendoza, D., Holleman, K., Cioppi, F., Algaba, F., Pybus, M., Friedrich, C., Wyrwoll, M. J., Casamonti, E., Pietroforte, S., Nagirnaja, L., Lopes, A. M., Kliesch, S., Pilatz, A., Carrell, D. T., Conrad, D. F., Ars, E., Ruiz-Castañé, E., ... Tüttelmann, F. (2020). Genetic dissection of spermatogenic arrest through exome analysis: clinical implications for the management of azoospermic men. *Genetics in Medicine*, 22(12), 1956–1966. <https://doi.org/10.1038/S41436-020-0907-1>

- Kumar, D. L., & Defalco, T. (2017). Of Mice and Men: In Vivo and in Vitro Studies of Primordial Germ Cell Specification. *Seminars in Reproductive Medicine*, 35(2), 139–146. <https://doi.org/10.1055/S-0037-1599085/ID/JR001059-43>
- Kumar, R., Oliver, C., Brun, C., Juarez-Martinez, A. B., Tarabay, Y., Kadlec, J., & De Massy, B. (2018). Mouse REC114 is essential for meiotic DNA double-strand break formation and forms a complex with MEI4. *Life Science Alliance*, 1(6). <https://doi.org/10.26508/LSA.201800259>
- Kunitomi, A., Yuasa, S., Sugiyama, F., Saito, Y., Seki, T., Kusumoto, D., Kashimura, S., Takei, M., Tohyama, S., Hashimoto, H., Egashira, T., Tanimoto, Y., Mizuno, S., Tanaka, S., Okuno, H., Yamazawa, K., Watanabe, H., Oda, M., Kaneda, R., ... Fukuda, K. (2016). H1foo Has a Pivotal Role in Qualifying Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 6(6), 825–833. <https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2016.04.015>
- Kuo, Y. C., Lin, Y. H., Chen, H. I., Wang, Y. Y., Chiou, Y. W., Lin, H. H., Pan, H. A., Wu, C. M., Su, S. M., Hsu, C. C., & Kuo, P. L. (2012). SEPT12 mutations cause male infertility with defective sperm annulus. *Human Mutation*, 33(4), 710–719. <https://doi.org/10.1002/HUMU.22028>
- Kusz-Zamelczyk, K., Sajek, M., Spik, A., Glazar, R., Jędrzejczak, P., Latos-Bieleńska, A., Kotecki, M., Pawelczyk, L., & Jaruzelska, J. (2013). Mutations of NANOS1, a human homologue of the *Drosophila* morphogen, are associated with a lack of germ cells in testes or severe oligo-asthenoteratozoospermia. *Journal of Medical Genetics*, 50(3), 187–193. <https://doi.org/10.1136/JMEDGENET-2012-101230>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680A0>
- Lammers, J. H., Offenberg, H. H., Aalderen, M. van, Vink, A. C., Dietrich, A. J., & Heyting, C. (1994). The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Molecular and Cellular Biology*, 14(2), 1137. <https://doi.org/10.1128/MCB.14.2.1137>
- Lange, J., Yamada, S., Tischfield, S. E., Pan, J., Kim, S., Zhu, X., Socci, N. D., Jasin, M., & Keeney, S. (2016). The Landscape of Mouse Meiotic Double-Strand Break Formation, Processing, and Repair. *Cell*, 167(3), 695–708.e16. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.09.035>
- Larose, H., Kent, T., Ma, Q., Shami, A. N., Harerimana, N., Li, J. Z., Hammoud, S. S., & Handel, M. A. (2020). Regulation of meiotic progression by Sertoli-cell androgen signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 31(25), 2841. <https://doi.org/10.1091/MBC.E20-05-0334>
- Larose, H., Shami, A. N., Abbott, H., Manske, G., Lei, L., & Hammoud, S. S. (2019). Gametogenesis: A Journey from Inception to Conception. *Current Topics in Developmental Biology*, 132, 257. <https://doi.org/10.1016/BS.CTDB.2018.12.006>
- Lee, J., Iwai, T., Yokota, T., & Yamashita, M. (2003). Temporally and spatially selective loss of *Rec8* protein from meiotic chromosomes during mammalian meiosis. <https://doi.org/10.1242/jcs.00495>
- Lewis, J. D., Abbott, D. W., & Ausió, J. (2003). A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 81(3), 131–140. <https://doi.org/10.1139/O03-045>

- Lewis, J. D., Song, Y., De Jong, M. E., Bagha, S. M., & Ausió, J. (2003). A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma*, *111*(8), 473–482. <https://doi.org/10.1007/S00412-002-0226-0/METRICS>
- Li, S., Shi, Y., Dang, Y., Hu, B., Xiao, L., Zhao, P., Wang, S., & Zhang, K. (2022). Linker histone H1FOO is required for bovine preimplantation development by regulating lineage specification and chromatin structure. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOAC167>
- Li, Y., Wu, Y. F., Jiang, H. W., Khan, R., Han, Q. Q., Iqbal, F., Jiang, X. H., & Shi, Q. H. (2021). The molecular control of meiotic double-strand break (DSB) formation and its significance in human infertility. *Asian Journal of Andrology*, *23*(6), 555. https://doi.org/10.4103/AJA.AJA_5_21
- Lin, Y., Gill, M. E., Koubova, J., & Page, D. C. (2008). Germ cell-intrinsic and -extrinsic factors govern meiotic initiation in mouse embryos. *Science*, *322*(5908), 1685–1687. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1166340/SUPPL_FILE/LIN-SOM.REVISION.1.PDF
- Lindeboom, R. G. H., Supek, F., & Lehner, B. (2016). The rules and impact of nonsense-mediated mRNA decay in human cancers. *Nature Genetics* *2016* *48:10*, *48*(10), 1112–1118. <https://doi.org/10.1038/ng.3664>
- Lintern-Moore, S., & Moore, G. P. M. (1979). The Initiation of Follicle and Oocyte Growth in the Mouse Ovary. *Biology of Reproduction*, *20*(4), 773–778. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD20.4.773>
- Lipkin, S. M., Moens, P. B., Wang, V., Lenzi, M., Shanmugarajah, D., Gilgeous, A., Thomas, J., Cheng, J., Touchman, J. W., Green, E. D., Schwartzberg, P., Collins, F. S., & Cohen, P. E. (2002). Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nature Genetics*, *31*(4), 385–390. <https://doi.org/10.1038/NG931>
- Llano, E., Gómez, R., Gutiérrez-Caballero, C., Herrán, Y., Sánchez-Martín, M., Vázquez-Quiñones, L., Hernández, T., De Álava, E., Cuadrado, A., Barbero, J. L., Suja, J. A., & Pendás, A. M. (2008). Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Genes & Development*, *22*(17), 2400–2413. <https://doi.org/10.1101/GAD.475308>
- Llano, E., Gómez, R., Gutiérrez-Caballero, C., Herrán, Y., Sánchez-Martín, M., Vázquez-Quiñones, L., Hernández, T., De Álava, E., Cuadrado, A., Luis Barbero, J., Suja, J. A., & Pendás, A. M. (2008). *Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice*. <https://doi.org/10.1101/gad.475308>
- Llano, E., Gomez-H, L., García-Tuñón, I., Sánchez-Martín, M., Caburet, S., Barbero, J. L., Schimenti, J. C., Veitia, R. A., & Pendas, A. M. (2014). STAG3 is a strong candidate gene for male infertility. *Human Molecular Genetics*, *23*(13), 3421–3431. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDU051>
- Llano, E., Herrán, Y., García-Tuñón, I., Gutiérrez-Caballero, C., de Álava, E., Barbero, J. L., Schimenti, J., de Rooij, D. G., Sánchez-Martín, M., & Pendás, A. M. (2012). Meiotic cohesin complexes are essential for the formation of the axial element in mice. *The Journal of Cell Biology*, *197*(7), 877–885. <https://doi.org/10.1083/JCB.201201100>
- Lourenço, D., Brauner, R., Lin, L., Perdigo, A. De, Weryha, G., Muresan, M., Boudjenah, R., Guerra-Junior, G., Maciel-Guerra, A. T., Achermann, J. C., McElreavey, K., & Bashamboo, A. (2009). Mutations in NR5A1 Associated with Ovarian Insufficiency. *The New England Journal of Medicine*, *360*(12), 1200. <https://doi.org/10.1056/NEJM0A0806228>

- Lu, J., Gu, Y., Feng, J., Zhou, W., Yang, X., & Shen, Y. (2014). Structural Insight into the Central Element Assembly of the Synaptonemal Complex. *Scientific Reports*, 4. <https://doi.org/10.1038/SREP07059>
- Lupas, A. N., & Gruber, M. (2005). The structure of α -helical coiled coils. *Advances in Protein Chemistry*, 70, 37–38. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70003-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70003-6)
- Lyons, R. A., Saridogan, E., & Djahanbakhch, O. (2006). The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Human Reproduction Update*, 12(4), 363–372. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DML012>
- MacGregor, G. R., Zambrowicz, B. P., & Soriano, P. (1995). Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells. *Development*, 121(5), 1487–1496. <https://doi.org/10.1242/DEV.121.5.1487>
- Maeda, C., Sato, S., Hattori, N., Tanaka, S., Yagi, S., & Shiota, K. (2008). DNA hypomethylation circuit of the mouse oocyte-specific histone H1foo gene in female germ cell lineage. *Biology of Reproduction*, 78(5), 816–821. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.107.066522>
- Mahadevaiah, S. K., Turner, J. M. A., Baudat, F., Rogakou, E. P., De Boer, P., Blanco-Rodríguez, J., Jasin, M., Keeney, S., Bonner, W. M., & Burgoyne, P. S. (2001). Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nature Genetics*, 27, 271–276. <https://doi.org/10.1038/85830>
- Malmanche, N., Maia, A., & Sunkel, C. E. (2006). The spindle assembly checkpoint: Preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis. *FEBS Letters*, 580(12), 2888–2895. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2006.03.081>
- Mamsen, L. S., Ernst, E. H., Borup, R., Larsen, A., Olesen, R. H., Ernst, E., Anderson, R. A., Kristensen, S. G., & Andersen, C. Y. (2017). Temporal expression pattern of genes during the period of sex differentiation in human embryonic gonads. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-15931-3>
- Mandl, B., Brandt, W. F., Superti-Furga, G., Graninger, P. G., Birnstiel, M. L., & Busslinger, M. (1997). The five cleavage-stage (CS) histones of the sea urchin are encoded by a maternally expressed family of replacement histone genes: functional equivalence of the CS H1 and frog H1M (B4) proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 17(3), 1189–1200. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.3.1189>
- Maor-Sagie, E., Cinnamon, Y., Yaacov, B., Shaag, A., Goldsmidt, H., Zenvirt, S., Laufer, N., Richler, C., & Frumkin, A. (2015). Deleterious mutation in SYCE1 is associated with non-obstructive azoospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(6), 887. <https://doi.org/10.1007/S10815-015-0445-Y>
- McGuire, M. M., Bowden, W., Engel, N. J., Ahn, H. W., Kovanci, E., & Rajkovic, A. (2011). Genomic analysis using high-resolution single nucleotide polymorphism arrays reveals novel microdeletions associated with premature ovarian failure. *Fertility and Sterility*, 95(5), 1595. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2010.12.052>
- Mcmurray, C. T. (2010). Threshold length Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development. *Nat Rev Genet* 11, 786–799 (2010). <https://doi.org/10.1038/nrg2828>

- Menke, D. B., Koubova, J., & Page, D. C. (2003). Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. *Developmental Biology*, *262*(2), 303–312. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00391-9](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00391-9)
- Meuwissen, R. L. J., Offenberg, H. H., Dietrich, A. J. J., Riesewijk, A., Van Iersel, M., & Heyting, C. (1992). A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *The EMBO Journal*, *11*(13), 5091–5100. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1992.TB05616.X>
- Ming, Z., Vining, B., Bagheri-Fam, S., & Harley, V. (2022). SOX9 in organogenesis: shared and unique transcriptional functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *79*, 522. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04543-4>
- Miyamoto, K. (2019). Various nuclear reprogramming systems using egg and oocyte materials. *The Journal of Reproduction and Development*, *65*(3), 203. <https://doi.org/10.1262/JRD.2019-002>
- Mizusawa, Y., Kuji, N., Tanaka, Y., Tanaka, M., Ikeda, E., Komatsu, S., Kato, S., & Yoshimura, Y. (2010). Expression of human oocyte-specific linker histone protein and its incorporation into sperm chromatin during fertilization. *Fertility and Sterility*, *93*(4), 1134–1141. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.11.028>
- Monesi, V. (1965). Differential rate of ribonucleic acid synthesis in the autosomes and sex chromosomes during male meiosis in the mouse. *Chromosoma (BEE.)*, *17*, 11–21. <https://doi.org/10.1007/BF00285153>
- Moriwaki, M., Moore, B., Mosbrugger, T., Neklason, D. W., Yandell, M., Jorde, L. B., & Welt, C. K. (2017). POLR2C Mutations Are Associated With Primary Ovarian Insufficiency in Women. *Journal of the Endocrine Society*, *1*, 162–173. <https://doi.org/10.1210/js.2016-1014>
- Moses, M. J. (1956). Chromosomal Structures in Crayfish Spermatocytes. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, *2*(2), 215. <https://doi.org/10.1083/JCB.2.2.215>
- Mou, L., Wang, Y., Li, H., Huang, Y., Jiang, T., Huang, W., Li, Z., Chen, J., Xie, J., Liu, Y., Jiang, Z., Li, X., Ye, J., Cai, Z., & Gui, Y. (2013). A dominant-negative mutation of HSF2 associated with idiopathic azoospermia. *Human Genetics*, *132*(2), 159–165. <https://doi.org/10.1007/S00439-012-1234-7>
- Muciaccia, B., Boitani, C., Berloco, B. P., Nudo, F., Spadetta, G., Stefanini, M., de Rooij, D. G., & Vicini, E. (2013). Novel stage classification of human spermatogenesis based on acrosome development. *Biology of Reproduction*, *89*(3). <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.113.111682>
- Musacchio, A., & Salmon, E. D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *2007* *8*:5, *8*(5), 379–393. <https://doi.org/10.1038/nrm2163>
- Nagano, T., & Suzuki, F. (1976). The postnatal development of the junctional complexes of the mouse Sertoli cells as revealed by freeze-fracture. *The Anatomical Record*, *185*(4), 403–417. <https://doi.org/10.1002/AR.1091850403>
- Neale, M. J., Pan, J., & Keeney, S. (2005). Endonucleolytic processing of covalent protein-linked double-strand breaks. *Nature*, *436*(7053), 1053. <https://doi.org/10.1038/NATURE03872>
- Nelson, L. M. (2009). Primary Ovarian Insufficiency. *The New England Journal of Medicine*, *360*(6), 606. <https://doi.org/10.1056/NEJMCP0808697>

- Nicol Humphrey H-C Yao, B., & H-C Yao, H. (2014). Building an Ovary: Insights into Establishment of Somatic Cell Lineages in the Mouse. *Sex Dev* (2014) 8 (5): 243–251. <https://doi.org/10.1159/000358072>
- Nothias, J. Y., Miranda, M., & DePamphilis, M. L. (1996). Uncoupling of transcription and translation during zygotic gene activation in the mouse. *The EMBO Journal*, 15(20), 5715. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00955.x>
- O'Donnell, L., Smith, L. B., & Rebourcet, D. (2022). Sertoli cells as key drivers of testis function. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 121, 2–9. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2021.06.016>
- Offenberg, H. H., Schalk, J. A. C., Meuwissen, R. L. J., Van Aalderen, M., Kester, H. A., Dietrich, A. J. J., & Heyting, C. (1998). SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Research*, 26(11), 2572–2579. <https://doi.org/10.1093/NAR/26.11.2572>
- O'Flynn O'Brien, K. L., Varghese, A. C., & Agarwal, A. (2010). The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertility and Sterility*, 93(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2009.10.045>
- Okada, Y. (2022). Sperm chromatin structure: Insights from in vitro to in situ experiments. *Current Opinion in Cell Biology*, 75. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2022.102075>
- O'Neill, C. (2015). The epigenetics of embryo development. *Animal Frontiers*, 5(1), 42–49. <https://doi.org/10.2527/AF.2015-0007>
- Orisaka, M., Miyazaki, Y., Shirafuji, A., Tamamura, C., Tsuyoshi, H., Tsang, B. K., & Yoshida, Y. (2021). The role of pituitary gonadotropins and intraovarian regulators in follicle development: A mini-review. *Reproductive Medicine and Biology*, 20(2), 169. <https://doi.org/10.1002/RMB2.12371>
- Page, S. L., & Hawley, R. S. (2004). The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, 525–558. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.19.111301.155141>
- Pan, C., & Fan, Y. (2016). Role of H1 Linker Histones in Mammalian Development and Stem Cell Differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1859(3), 496. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGRM.2015.12.002>
- Papp, B., & Plath, K. (2013). Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency. *Cell*, 152(6), 1324–1343. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.02.043>
- Parra, M. T., Page, J., Yen, T. J., He, D., Valdeolillos, A., Rufas, J. S., & Suja, J. A. (2002). Expression and behaviour of CENP-E at kinetochores during mouse spermatogenesis. *Chromosoma*, 111(1), 53–61. <https://doi.org/10.1007/s00412-002-0185-5>
- Pashaei, M., Rahimi Bidgoli, M. M., Zare-Abdollahi, D., Najmabadi, H., Haji-Seyed-Javadi, R., Fatehi, F., & Alavi, A. (2020). The second mutation of SYCE1 gene associated with autosomal recessive nonobstructive azoospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(2), 451–458. <https://doi.org/10.1007/S10815-019-01660-1/FIGURES/5>
- Pastore, L. M., Christianson, M. S., Stelling, J., Kearns, W. G., & Segars, J. H. (2018). Reproductive ovarian testing and the alphabet soup of diagnoses: DOR, POI, POF, POR, and FOR. *Journal of*

- Assisted Reproduction and Genetics*, 35(1), 17–23. <https://doi.org/10.1007/S10815-017-1058-4/METRICS>
- Pavitt, G. D., & Ron, D. (2012). New Insights into Translational Regulation in the Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6), a012278. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A012278>
- Penberthy, K. K., Lysiak, J. J., & Ravichandran, K. S. (2018). *Rethinking Phagocytes: Clues from the Retina and Testes*. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.01.004>
- Perry, J., Palmer, S., Gabriel, A., & Ashworth, A. (2001). A Short Pseudoautosomal Region in Laboratory Mice. *Genome Research*, 11(11), 1826. <https://doi.org/10.1101/GR.203001>
- Peters, A. H. F. M., Plug, A. W., Van Vugt, M. J., De Boer, P., Peters, A. H. F. M., Plug, A. W., Van Vugt, M. J., & De, P. (1997). A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome Research*, 5, 66–71.
- Petronczki, M., Siomos, M. F., & Nasmyth, K. (2003). Un Ménage à Quatre: The Molecular Biology of Chromosome Segregation in Meiosis. *Cell*, 112(4), 423–440. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00083-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00083-7)
- Phizicky, D. V., Berchowitz, L. E., & Bell, S. P. (2018). Multiple kinases inhibit origin licensing and helicase activation to ensure reductive cell division during meiosis. *ELife*, 7. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.33309>
- Prasada Rao, H. B. D., Qiao, H., Bhatt, S. K., Bailey, L. R. J., Tran, H. D., Bourne, S. L., Qiu, W., Deshpande, A., Sharma, A. N., Beebout, C. J., Pezza, R. J., & Hunter, N. (2017). A SUMO-ubiquitin relay recruits proteasomes to chromosome axes to regulate meiotic recombination. *Science (New York, N.Y.)*, 355(6323), 403–407. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAF6407>
- Pratto, F., Brick, K., Khil, P., Smagulova, F., Petukhova, G. V., & Camerini-Otero, R. D. (2014). Recombination initiation maps of individual human genomes. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6211), 1256442. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1256442>
- Prendergast, L., & Reinberg, D. (2021). The missing linker: emerging trends for H1 variant-specific functions. *Genes & Development*, 35(1–2), 40–58. <https://doi.org/10.1101/GAD.344531.120>
- Qiao, H., Rao, H. B. D. P., Yang, Y., Fong, J. H., Cloutier, J. M., Deacon, D. C., Nagel, K. E., Swartz, R. K., Strong, E., Holloway, J. K., Cohen, P. E., Schimenti, J., Ward, J., & Hunter, N. (2013). Antagonistic roles of ubiquitin ligase HEI10 and SUMO ligase RNF212 regulate meiotic recombination. *Nature GeNetics*, 46(2). <https://doi.org/10.1038/ng.2858>
- Qin, Y., Choi, Y., Zhao, H., Simpson, J. L., Chen, Z. J., & Rajkovic, A. (2007). NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure. *American Journal of Human Genetics*, 81(3), 576–581. <https://doi.org/10.1086/519496>
- Qiu, S., & Huang, J. (2021). MRN complex is an essential effector of DNA damage repair. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 22(1), 31–37. <https://doi.org/10.1631/jzus.B2000289>
- Richardson, B. E., & Lehmann, R. (2010). Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010 11:1, 11(1), 37–49. <https://doi.org/10.1038/nrm2815>

- Richter, J. D. (1999). Cytoplasmic Polyadenylation in Development and Beyond. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), 446. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.2.446-456.1999>
- Rinaldi, V. D., Bolcun-Filas, E., Kogo, H., Kurahashi, H., & Schimenti, J. C. (2017). The DNA Damage Checkpoint Eliminates Mouse Oocytes with Chromosome Synapsis Failure. *Molecular Cell*, 67(6), 1026-1036.e2. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2017.07.027>
- Robert, T., Nore, A., Brun, C., Maffre, C., Crimi, B., Bourbon, H. M., & De Massy, B. (2016). The TopoVIB-Like protein family is required for meiotic DNA double-strand break formation. *Science (New York, N.Y.)*, 351(6276), 943–949. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD5309>
- Roig, I., Dowdle, J. A., Toth, A., de Rooij, D. G., Jasin, M., & Keeney, S. (2010). Mouse TRIP13/PCH2 is required for recombination and normal higher-order chromosome structure during meiosis. *PLoS Genetics*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1001062>
- Romanienko, P. J., & Camerini-Otero, R. D. (2000). The Mouse Spo11 Gene Is Required for Meiotic Chromosome Synapsis. *Molecular Cell*, 6(5), 975–987. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00097-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00097-6)
- Rossi, A., Kontarakis, Z., Gerri, C., Nolte, H., Hölper, S., Krüger, M., & Stainier, D. Y. R. (2015). Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature* 2015 524:7564, 524(7564), 230–233. <https://doi.org/10.1038/nature14580>
- Ruth, K. S., Day, F. R., Hussain, J., Martínez-Marchal, A., Aiken, C. E., Azad, A., Thompson, D. J., Knoblochova, L., Abe, H., Tarry-Adkins, J. L., Gonzalez, J. M., Fontanillas, P., Claringbould, A., Bakker, O. B., Sulem, P., Walters, R. G., Terao, C., Turon, S., Horikoshi, M., ... Perry, J. R. B. (2021). Genetic insights into biological mechanisms governing human ovarian ageing. *Nature* 2021 596:7872, 596(7872), 393–397. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03779-7>
- Saba, R., Kato, Y., & Saga, Y. (2014). NANOS2 promotes male germ cell development independent of meiosis suppression. *Developmental Biology*, 385(1), 32–40. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2013.10.018>
- Sánchez-Sáez, F., Gómez-H, L., Dunne, O. M., Gallego-Páramo, C., Felipe-Medina, N., Sánchez-Martín, M., Llano, E., Pendas, A. M., & Davies, O. R. (2020). Meiotic chromosome synapsis depends on multivalent SYCE1-SIX6OS1 interactions that are disrupted in cases of human infertility. *Sci. Adv* (Vol. 6). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb1660>
- Sánchez-Sáez, F., Sainz-Urruela, R., Felipe-Medina, N., Condezo, Y. B., Sánchez-Martín, M., Llano, E., & Pendas, A. M. (2022). The Oocyte-Specific Linker Histone H1FOO Is Not Essential for Mouse Oogenesis and Fertility. *Cells*, 11(22). <https://doi.org/10.3390/CELLS11223706>
- Scherthan, H. (2001). A bouquet makes ends meet. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001 2:8, 2(8), 621–627. <https://doi.org/10.1038/35085086>
- Schilit, S. L. P., Menon, S., Friedrich, C., Kammin, T., Wilch, E., Hanscom, C., Jiang, S., Kliesch, S., Talkowski, M. E., Tüttelmann, F., MacQueen, A. J., & Morton, C. C. (2020). SYCP2 Translocation-Mediated Dysregulation and Frameshift Variants Cause Human Male Infertility. *American Journal of Human Genetics*, 106(1), 41–57. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2019.11.013>
- Schimenti, J. C., & Handel, M. A. (2018). Unpackaging the genetics of mammalian fertility: strategies to identify the “reproductive genome.” *Biology of Reproduction*, 99(6), 1119–1128. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOY133>

- Schramm, S., Fraune, J., Naumann, R., Hernandez-Hernandez, A., Höög, C., Cooke, H. J., Alsheimer, M., & Benavente, R. (2011). A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination, and fertility. *PLoS Genetics*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1002088>
- Séguéla-Arnaud, M., Choinard, S., Larchevêque, C., Girard, C., Froger, N., Crismani, W., & Mercier, R. (2017). RMI1 and TOP3 α limit meiotic CO formation through their C-terminal domains. *Nucleic Acids Research*, 45(4), 1860–1871. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW1210>
- Sharma, S., Wistuba, J., Pock, T., Schlatt, S., & Neuhaus, N. (2019). Spermatogonial stem cells: updates from specification to clinical relevance. *Human Reproduction Update*, 25(3), 275–297. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMZ006>
- Simmler, M. C., Rouyer, F., Vergnaud, G., Nyström-Lahti, M., Ngo, K. Y., De La Chapelle, A., & Weissenbach, J. (1985). Pseudoautosomal DNA sequences in the pairing region of the human sex chromosomes. *Nature*, 317(6039), 692–697. <https://doi.org/10.1038/317692A0>
- Singh, P., Schimenti, J. C., & Bolcun-Filas, E. (2015). A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications. *Genetics*, 199(1), 1–15. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.114.169771>
- Smith, B. E., & Braun, R. E. (2012). Germ cell migration across Sertoli cell tight junctions. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6108), 798–802. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1219969>
- Smith, Z. D., Chan, M. M., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Gnirke, A., Regev, A., & Meissner, A. (2012). A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature*, 484(7394), 339. <https://doi.org/10.1038/NATURE10960>
- Soriano, P., Keitges, E. A., Schorderet, D. F., Harbers, K., Gartler, S. M., & Jaenisch, R. (1987). High rate of recombination and double crossovers in the mouse pseudoautosomal region during male meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(20), 7218–7220. <https://doi.org/10.1073/PNAS.84.20.7218>
- Stemann, O., Zou, H., Gerber, S. A., Gygi, S. P., & Kirschner, M. W. (2001). Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell*, 107(6), 715–726. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00603-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00603-1)
- Stewart, K. R., Veselovska, L., & Kelsey, G. (2016). Establishment and functions of DNA methylation in the germline. *Epigenomics*, 8(10), 1399–1413. <https://doi.org/10.2217/epi-2016-0056>
- Sudhakar, D. V. S., Shah, R., & Gajbhiye, R. K. (2021). Genetics of Male Infertility – Present and Future: A Narrative Review. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 14(3), 217. https://doi.org/10.4103/JHRS.JHRS_115_21
- Sun, Y.-C., Sun, X.-F., Dyce, P. W., Shen, W., & Chen, H. (2017). The role of germ cell loss during primordial follicle assembly: a review of current advances. *Int. J. Biol. Sci*, 13(4), 449–457. <https://doi.org/10.7150/ijbs.18836>
- Sung, P., & Klein, H. (2006). Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006 7:10, 7(10), 739–750. <https://doi.org/10.1038/nrm2008>
- Suzuki, A., & Saga, Y. (2008). Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes & Development*, 22(4), 430. <https://doi.org/10.1101/GAD.1612708>

- Suzuki, H., Sada, A., Yoshida, S., & Saga, Y. (2009). The heterogeneity of spermatogonia is revealed by their topology and expression of marker proteins including the germ cell-specific proteins Nanos2 and Nanos3. *Developmental Biology*, 336(2), 222–231. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2009.10.002>
- Syrjänen, J. L., Pellegrini, L., & Davies, O. R. (2014). A molecular model for the role of SYCP3 in meiotic chromosome organisation. *ELife*, 2014(3). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.02963.001>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.07.024>
- Takahashi, Y., Morales Valencia, M., Yu, Y., Ouchi, Y., Takahashi, K., Shokhirev, M. N., Lande, K., Williams, A. E., Fresia, C., Kurita, M., Hishida, T., Shojima, K., Hatanaka, F., Nuñez-Delgado, E., Esteban, C. R., & Izpisua Belmonte, J. C. (2023). Transgenerational inheritance of acquired epigenetic signatures at CpG islands in mice. *Cell*, 186(4), 715-731.e19. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2022.12.047>
- Takasaki, N., Tachibana, K., Ogasawara, S., Matsuzaki, H., Hagiuda, J., Ishikawa, H., Mochida, K., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., Noce, T., Ito, C., Toshimori, K., & Narimatsu, H. (2014). A heterozygous mutation of GALNTL5 affects male infertility with impairment of sperm motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(3), 1120–1125. https://doi.org/10.1073/PNAS.1310777111/SUPPL_FILE/PNAS.201310777SI.PDF
- Takemoto, K., Tani, N., Takada-Horisawa, Y., Fujimura, S., Tanno, N., Yamane, M., Okamura, K., Sugimoto, M., Araki, K., & Ishiguro, K. ichiro. (2020). Meiosis-Specific C19orf57/4930432K21Rik/BRME1 Modulates Localization of RAD51 and DMC1 to DSBs in Mouse Meiotic Recombination. *Cell Reports*, 31(8). <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.107686>
- Tanaka, H., Iguchi, N., Isotani, A., Kitamura, K., Toyama, Y., Matsuoka, Y., Onishi, M., Masai, K., Maekawa, M., Toshimori, K., Okabe, M., & Nishimune, Y. (2005). HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Molecular and Cellular Biology*, 25(16), 7107–7119. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.16.7107-7119.2005>
- Tanaka, M., Hennebold, J. D., Macfarlane, J., & Adashi, E. Y. (2001). A mammalian oocyte-specific linker histone gene H1oo: homology with the genes for the oocyte-specific cleavage stage histone (cs-H1) of sea urchin and the B4/H1M histone of the frog. *Development (Cambridge, England)*, 128(5), 655–664. <https://doi.org/10.1242/DEV.128.5.655>
- Tanaka, M., Kihara, M., Hennebold, J. D., Eppig, J. J., Viveiros, M. M., Emery, B. R., Carrell, D. T., Kirkman, N. J., Meczekalski, B., Zhou, J., Bondy, C. A., Becker, M., Schultz, R. M., Misteli, T., De La Fuente, R., King, G. J., & Adashi, E. Y. (2005). H1FOO is coupled to the initiation of oocytic growth. *Biology of Reproduction*, 72(1), 135–142. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.104.032474>
- Tanaka, M., Kihara, M., Meczekalski, B., King, G. J., & Adashi, E. Y. (2003). H1oo: A pre-embryonic H1 linker histone in search of a function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 202(1–2), 5–9. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(03\)00054-6](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(03)00054-6)
- Tang, D., Li, K., Geng, H., Xu, C., Lv, M., Gao, Y., Wang, G., Yu, H., Shao, Z., Shen, Q., Jiang, H., Zhang, X., He, X., & Cao, Y. (2022). Identification of deleterious variants in patients with male infertility

- due to idiopathic non-obstructive azoospermia. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 20(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12958-022-00936-Z/FIGURES/5>
- Tarsounas, M., Morita, T., Pearlman, R. E., & Moens, P. B. (1999). Rad51 and Dmc1 Form Mixed Complexes Associated with Mouse Meiotic Chromosome Cores and Synaptonemal Complexes. *The Journal of Cell Biology*, 147(2), 207. <https://doi.org/10.1083/JCB.147.2.207>
- Teranishi, T., Tanaka, M., Kimoto, S., Ono, Y., Miyakoshi, K., Kono, T., & Yoshimura, Y. (2004). Rapid replacement of somatic linker histones with the oocyte-specific linker histone H1foo in nuclear transfer. *Developmental Biology*, 266(1), 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.10.004>
- Terme, J. M., Sesé, B., Millán-Ariño, L., Mayor, R., Belmonte, J. C. I., Barrero, M. J., & Jordan, A. (2011). Histone H1 variants are differentially expressed and incorporated into chromatin during differentiation and reprogramming to pluripotency. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(41), 35347–35357. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.281923>
- Tóth, A., Rabitsch, K. P., Gálová, M., Schleiffer, A., Buonomo, S. B. C., & Nasmyth, K. (2000). Functional Genomics Identifies Monopolin: A Kinetochore Protein Required for Segregation of Homologs during Meiosis I. *Cell*, 103(7), 1155–1168. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00217-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00217-8)
- Tran, T. N., & Schimenti, J. C. (2019). A segregating human allele of SPO11 modeled in mice disrupts timing and amounts of meiotic recombination, causing oligospermia and a decreased ovarian reserve†. *Biology of Reproduction*, 101(2), 347–359. <https://doi.org/10.1093/BiolRE/IOZ089>
- Turner, B. M. (2009). Epigenetic responses to environmental change and their evolutionary implications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1534), 3403–3418. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2009.0125>
- Turner, J. M. A. (2015). Meiotic Silencing in Mammals. *Annual Review of Genetics*, 49, 395–412. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENET-112414-055145>
- Turner, J. M. A., Mahadevaiah, S. K., Fernandez-Capetillo, O., Nussenzweig, A., Xu, X., Deng, C. X., & Burgoyne, P. S. (2004). Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nature Genetics* 2004 37:1, 37(1), 41–47. <https://doi.org/10.1038/ng1484>
- Uda, M., Ottolenghi, C., Crisponi, L., Garcia, J. E., Deiana, M., Kimber, W., Forabosco, A., Cao, A., Schlessinger, D., & Pilia, G. (2004). Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Human Molecular Genetics*, 13(11), 1171–1181. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDH124>
- Van Der Bijl, N., Röpke, A., Biswas, U., Wöste, M., Jessberger, R., Kliesch, S., Friedrich, C., & Tüttelmann, F. (2019). Mutations in the stromal antigen 3 (STAG3) gene cause male infertility due to meiotic arrest. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 34(11), 2112–2119. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEZ204>
- Vance, K. W., & Ponting, C. P. (2014). Transcriptional regulatory functions of nuclear long noncoding RNAs. *Trends in Genetics*, 30(8), 348–355. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2014.06.001>
- Vander Borgh, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry*, 62, 2–10. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2018.03.012>
- Villa, P. A., Lainez, N. M., Jonak, C. R., Berlin, S. C., Ethell, I. M., & Coss, D. (2023). Altered GnRH neuron and ovarian innervation characterize reproductive dysfunction linked to the Fragile X messenger

- ribonucleoprotein (Fmr1) gene mutation. *Frontiers in Endocrinology*, *14*, 422. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2023.1129534/BIBTEX>
- Vincent, J. J., Huang, Y., Chen, P. Y., Feng, S., Calvopiña, J. H., Nee, K., Lee, S. A., Le, T., Yoon, A. J., Faull, K., Fan, G., Rao, A., Jacobsen, S. E., Pellegrini, M., & Clark, A. T. (2013). Stage-Specific Roles for Tet1 and Tet2 in DNA Demethylation in Primordial Germ Cells. *Cell Stem Cell*, *12*(4), 470. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2013.01.016>
- Voeltz, G. K., & Steitz, J. A. (1998). AUUUA sequences direct mRNA deadenylation uncoupled from decay during *Xenopus* early development. *Molecular and Cellular Biology*, *18*(12), 7537–7545. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.12.7537>
- Walter, P., & Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science (New York, N.Y.)*, *334*(6059), 1081–1086. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1209038>
- Wang, B., Mu, Y., Ni, F., Zhou, S., Wang, J., Cao, Y., & Ma, X. (2010). Analysis of FOXO3 mutation in 114 Chinese women with premature ovarian failure. *Reproductive BioMedicine Online*, *20*(4), 499–503. <https://doi.org/10.1016/J.RBMO.2010.01.008>
- Wang, H., La Russa, M., & Qi, L. S. (2016). CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annual Review of Biochemistry*, *85*, 227–264. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060815-014607>
- Ward, W. S., & Coffey, D. S. (1991). DNA Packaging and Organization in Mammalian Spermatozoa: Comparison with Somatic Cell. *Biology of Reproduction*, *44*(4), 569–574. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD44.4.569>
- Watanabe, Y., Kitajima, T. S., Hyman, T., Yanagida, M., & Hirano, T. (2005). Shugoshin protects cohesin complexes at centromeres. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *360*(1455), 515. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2004.1607>
- Wellard, S. R., Schindler, K., & Jordan, P. W. (2020). Aurora B and C kinases regulate chromosome desynapsis and segregation during mouse and human spermatogenesis. *Journal of Cell Science*, *133*(23). <https://doi.org/10.1242/JCS.248831>
- Western, P. S., Miles, D. C., Van Den Bergen, J. A., Burton, M., & Sinclair, A. H. (2008). Dynamic Regulation of Mitotic Arrest in Fetal Male Germ Cells. *Stem Cells*, *26*, 339–347. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0622>
- Wickramasinghe, D., Ebert, K. M., & Albertini, D. F. (1991). Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase characteristics in growing mouse oocytes. *Developmental Biology*, *143*(1), 162–172. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(91\)90063-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(91)90063-9)
- Wilkins, A. S., & Holliday, R. (2009). Anecdotal, Historical and Critical Commentaries on Genetics: The Evolution of Meiosis From Mitosis. *Genetics*, *181*(1), 3. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.108.099762>
- Willerton, L., Smith, R. A., Russell, D., & Mackay, S. (2004). Effects of FGF9 on embryonic Sertoli cell proliferation and testicular cord formation in the mouse. *The International Journal of Developmental Biology*, *48*(7), 637–643. <https://doi.org/10.1387/IJDB.031778LW>
- Wojtasz, L., Daniel, K., Roig, I., Bolcun-Filas, E., Xu, H., Boonsanay, V., Eckmann, C. R., Cooke, H. J., Jasin, M., Keeney, S., McKay, M. J., & Toth, A. (2009). Mouse HORMAD1 and HORMAD2, two conserved meiotic chromosomal proteins, are depleted from synapsed chromosome axes with

- the help of TRIP13 AAA-ATPase. *PLoS Genetics*, 5(10).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1000702>
- Wold, M. S. (2003). Replication Protein A: A Heterotrimeric, Single-Stranded DNA-Binding Protein Required for Eukaryotic DNA Metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, 66:1, 61-92
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.66.1.61>
- Worrad, D. M., Ram, P. T., & Schultz, R. M. (1994). Regulation of gene expression in the mouse oocyte and early preimplantation embryo: developmental changes in Sp1 and TATA box-binding protein, TBP. *Development*, 120(8), 2347–2357. <https://doi.org/10.1242/DEV.120.8.2347>
- Wu, H., & Yi, E. S. (2006). Epigenetic Regulation of Stem Cell Differentiation. *Pediatric Research* 2006 59:4, 59(4), 21–25. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000203565.76028.2a>
- Wu, Y., Li, Y., Murtaza, G., Zhou, J., Jiao, Y., Gong, C., Hu, C., Han, Q., Zhang, H., Zhang, Y., Shi, B., Ma, H., Jiang, X., & Shi, Q. (2021). Whole-exome sequencing of consanguineous families with infertile men and women identifies homologous mutations in SPATA22 and MEIOB. *Human Reproduction*, 36(10), 2793–2804. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEAB185>
- Xie, A., Odate, S., Chandramouly, G., & Scully, R. (2010). H2AX post-translational modifications in the ionizing radiation response and homologous recombination. *Cell Cycle*, 9(17), 3602. <https://doi.org/10.4161/CC.9.17.12884>
- Xu, H., Beasley, M. D., Warren, W. D., van der Horst, G. T. J., & McKay, M. J. (2005). Absence of mouse REC8 cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis. *Developmental Cell*, 8(6), 949–961. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2005.03.018>
- Xu, J., Zhao, L., Peng, S., Chu, H., Liang, R., Tian, M., Connell, P. P., Li, G., Chen, C., & Wang, H.-W. (2021). Mechanisms of distinctive mismatch tolerance between Rad51 and Dmc1 in homologous recombination. *Nucleic Acids Research*, 49, 13135–13149. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1141>
- Xu, X., Aprelikova, O., Moens, P., Deng, C. X., & Furth, P. A. (2003). Impaired meiotic DNA-damage repair and lack of crossing-over during spermatogenesis in BRCA1 full-length isoform deficient mice. *Development*, 130(9), 2001–2012. <https://doi.org/10.1242/DEV.00410>
- Xu, Y., Greenberg, R. A., Schonbrunn, E., & Jeremy Wang, P. (2017). Meiosis-specific proteins MEIOB and SPATA22 cooperatively associate with the single-stranded DNA-binding replication protein A complex and DNA double-strand breaks. *Biology of Reproduction*, 96(5), 1096–1104. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOX040>
- Xu, Z., Cetin, B., Anger, M., Cho, U. S., Helmhart, W., Nasmyth, K., & Xu, W. (2009). Structure and function of the PP2A-shugoshin interaction. *Molecular Cell*, 35(4), 426. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2009.06.031>
- Yamada, S., Gupta Hinch, A., Kamido, H., Zhang, Y., Edelman, W., & Keeney, S. (2020). Molecular structures and mechanisms of DNA break processing in mouse meiosis. *Genes & Development*, 34: 806-818. <https://doi.org/10.1101/gad.336032.119>
- Yamanaka, S., & Blau, H. M. (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 2010 465:7299, 465(7299), 704–712. <https://doi.org/10.1038/nature09229>

- Yang, F., De La Fuente, R., Leu, N. A., Baumann, C., McLaughlin, K. J., & Wang, P. J. (2006). Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis. *The Journal of Cell Biology*, *173*(4), 497. <https://doi.org/10.1083/JCB.200603063>
- Yang, H., Wang, H., & Jaenisch, R. (2014). Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Nature Protocols* *2014* *9*:8, *9*(8), 1956–1968. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.134>
- Yao, C., Yao, R., Luo, H., & Shuai, L. (2022). Germline specification from pluripotent stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*, *13*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S13287-022-02750-1/FIGURES/4>
- Yin, H., Ma, H., Hussain, S., Zhang, H., Xie, X., Jiang, L., Jiang, X., Iqbal, F., Bukhari, I., Jiang, H., Ali, A., Zhong, L., Li, T., Fan, S., Zhang, B., Gao, J., Li, Y., Nazish, J., Khan, T., ... Shi, Q. (2019). A homozygous FANCM frameshift pathogenic variant causes male infertility. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, *21*(1), 62–70. <https://doi.org/10.1038/S41436-018-0015-7>
- Yoshida, S., Sukeno, M., Nakagawa, T., Ohbo, K., Nagamatsu, G., Suda, T., & Nabeshima, Y. I. (2006). The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development (Cambridge, England)*, *133*(8), 1495–1505. <https://doi.org/10.1242/DEV.02316>
- Yoshida, S., Takakura, A., Ohbo, K., Abe, K., Wakabayashi, J., Yamamoto, M., Suda, T., & Nabeshima, Y. I. (2004). Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. *Developmental Biology*, *269*(2), 447–458. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2004.01.036>
- Yuan, L., Liu, J. G., Hoja, M. R., Wilbertz, J., Nordqvist, K., & Höög, C. (2002). Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science (New York, N.Y.)*, *296*(5570), 1115–1118. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1070594>
- Yun, Y., An, P., Ning, J., Zhao, G. M., Yang, W. L., & Lei, A. M. (2015). H1foo is essential for in vitro meiotic maturation of bovine oocytes. *Zygote (Cambridge, England)*, *23*(3), 416–425. <https://doi.org/10.1017/S0967199414000021>
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., De Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I. D., Simpson, J. L., & Van Der Poel, S. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertility and Sterility*, *108*(3), 393–406. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.005>
- Zeleznik, A. J. (2004). The physiology of follicle selection. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *2*, 31 (2004). <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-31>
- Zhang, F., Liu, M., & Gao, J. (2022). Review Alterations in synaptonemal complex coding genes and human infertility. *International Journal of Biological Sciences*, *2022*(5), 1933–1943. <https://doi.org/10.7150/ijbs.67843>
- Zhang, J., Fujiwara, Y., Yamamoto, S., & Shibuya, H. (2019). A meiosis-specific BRCA2 binding protein recruits recombinases to DNA double-strand breaks to ensure homologous recombination. *Nature Communications* *2019* *10*:1, *10*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08676-2>

- Zhao, H., Chen, Z. J., Qin, Y., Shi, Y., Wang, S., Choi, Y., Simpson, J. L., & Rajkovic, A. (2008). Transcription Factor FIGLA is Mutated in Patients with Premature Ovarian Failure. *American Journal of Human Genetics*, *82*(6), 1342–1348. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2008.04.018>
- Zhao, M., Shirley, C. R., Mounsey, S., & Meistrich, M. L. (2004). Nucleoprotein Transitions During Spermiogenesis in Mice with Transition Nuclear Protein Tnp1 and Tnp2 Mutations. *Biology of Reproduction*, *71*(3), 1016–1025. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.104.028191>
- Zhao, W., Vaithiyalingam, S., San Filippo, J., Maranon, D. G., Jimenez-Sainz, J., Fontenay, G. V., Kwon, Y., Leung, S. G., Lu, L., Jensen, R. B., Chazin, W. J., Wiese, C., & Sung, P. (2015). Promotion of BRCA2-Dependent Homologous Recombination by DSS1 via RPA Targeting and DNA Mimicry. *Molecular Cell*, *59*(2), 176–187. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2015.05.032>
- Zhe, J., Ye, D., Chen, X., Liu, Y., Zhou, X., Li, Y., Zhang, J., & Chen, S. (2020). Consanguineous Chinese Familial Study Reveals that a Gross Deletion that Includes the SYCE1 Gene Region Is Associated with Premature Ovarian Insufficiency. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, *27*(2), 461–467. <https://doi.org/10.1007/S43032-019-00037-0>
- Zhou, Q., Nie, R., Li, Y., Friel, P., Mitchell, D., Hess, R. A., Small, C., & Griswold, M. D. (2008). Expression of Stimulated by Retinoic Acid Gene 8 (Stra8) in Spermatogenic Cells Induced by Retinoic Acid: An In Vivo Study in Vitamin A-Sufficient Postnatal Murine Testes. *Biology of Reproduction*, *79*(1), 35. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.107.066795>
- Zhou, Q., Wang, M., Yuan, Y., Wang, X., Fu, R., Wan, H., Xie, M., Liu, M., Guo, X., Zheng, Y., Feng, G., Shi, Q., Zhao, X. Y., Sha, J., & Zhou, Q. (2016). Complete Meiosis from Embryonic Stem Cell-Derived Germ Cells In Vitro. *Cell Stem Cell*, *18*(3), 330–340. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2016.01.017>
- Zhou, Z., Ni, C., Wu, · Ling, Chen, · Biaobang, Xu, Y., Zhang, Z., Mu, J., Li, · Bin, Yan, Z., Fu, J., Wang, W., Zhao, L., Dong, J., Sun, · Xiaoxi, Kuang, Y., Sang, Q., & Wang, · Lei. (1990). Novel mutations in ZP1, ZP2, and ZP3 cause female infertility due to abnormal zona pellucida formation. *Human Genetics*, *138*, 327–337. <https://doi.org/10.1007/s00439-019-01990-1>
- Zickler, D., & Kleckner, N. (1998). The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annual Review of Genetics*, *32*, 619–697. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.GENET.32.1.619>
- Zickler, D., & Kleckner, N. (1999). Meiotic chromosomes: Integrating structure and function. *Annual Review of Genetics*, *33*, 603–754. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.GENET.33.1.603>
- Zorrilla, M., & Yatsenko, A. N. (2013). The Genetics of Infertility: Current Status of the Field. *Current Genetic Medicine Reports*, *1*(4), 247–260. <https://doi.org/10.1007/S40142-013-0027-1>

PUBLICACIONES



BIOCHEMISTRY

Meiotic chromosome synapsis depends on multivalent SYCE1-SIX6OS1 interactions that are disrupted in cases of human infertility

Fernando Sánchez-Sáez^{1*}, Laura Gómez-H^{1*}, Orla M. Dunne², Cristina Gallego-Páramo², Natalia Felipe-Medina¹, Manuel Sánchez-Martín³, Elena Llano⁴, Alberto M. Pendas^{1†}, Owen R. Davies^{2†}

Meiotic reductional division depends on the synaptonemal complex (SC), a supramolecular protein assembly that mediates homologous chromosomes synapsis and promotes crossover formation. The mammalian SC has eight structural components, including SYCE1, the only central element protein with known causative mutations in human infertility. We combine mouse genetics, cellular, and biochemical studies to reveal that SYCE1 undergoes multivalent interactions with SC component SIX6OS1. The N terminus of SIX6OS1 binds and disrupts SYCE1's core dimeric structure to form a 1:1 complex, while their downstream sequences provide a distinct second interface. These interfaces are separately disrupted by SYCE1 mutations associated with nonobstructive azoospermia and premature ovarian failure (POF), respectively. Mice harboring SYCE1's POF mutation and a targeted deletion within SIX6OS1's N terminus are infertile with failure of chromosome synapsis. We conclude that both SYCE1-SIX6OS1 binding interfaces are essential for SC assembly, thus explaining how SYCE1's reported clinical mutations give rise to human infertility.

INTRODUCTION

Meiotic cell division is defined by a unique and highly dynamic program of events that result in homologous chromosome synapsis, crossover (CO) formation, and subsequent homolog segregation into haploid germ cells (1–3). Homologous chromosome pairs are established through interhomolog recombination searches from up to 400 induced double-strand breaks (DSBs) per cell (4). Once established, local recombination-mediated alignments are converted into the single continuous synapsis of aligned homologous chromosomes through the zipper-like assembly of the synaptonemal complex (SC) (5). The SC's supramolecular protein structure mediates continuous 100-nm tethering between homologous chromosome axes and provides the necessary three-dimensional framework for crossover formation (2). Following SC disassembly, crossovers provide the sole physical links between homologs at metaphase I, so are essential for ensuring correct homolog segregation in addition to providing genetic diversity (2).

The SC has an iconic and highly conserved tripartite structure that has been observed across meiotically reproducing eukaryotes (6). This consists of lateral elements (LEs) that coat the two homologous chromosome axes and a midline central element (CE), with a series of transverse filaments that bind together these longitudinal electron-dense structures (Fig. 1A) (7). The protein components of the mammalian SC have been identified as transverse filaments protein SYCP1 (Synaptonemal complex protein 1) (8), CE proteins

SYCE1, SYCE2, and SYCE3 (Synaptonemal complex central element proteins 1 to 3), SIX6OS1, and TEX12 (Testis-expressed protein 12) (9–12), and LE proteins SYCP2 and SYCP3 (13, 14). All transverse filament and CE components are essential for SC assembly, and their individual disruption leads to infertility owing to meiotic arrest with failure of DSB repair (10, 11, 15–18). In contrast, disruption of LE components produces a sexual dimorphism of male infertility and female subfertility (19, 20), with SYCP3 deficiency in females promoting germ cell aneuploidy and embryonic death (21).

In recent years, a variety of cellular imaging, biochemical and structural biology approaches have begun to uncover the molecular structures, interactions, and mechanisms responsible for mammalian SC assembly. SYCP1 self-assembles into a supramolecular lattice that provides the underlying 100-nm synapsis between chromosome axes (22, 23), while SYCP3 assembles into regularly repeating filaments that support chromosomal looping (24, 25). The five CE proteins provide essential structural supports for the SYCP1 lattice that enable its continuous and cooperative extension along the entire chromosome length. In this capacity, CE proteins have been categorized as synaptic initiation factors (SYCE3, SYCE1, and SIX6OS1) and elongation factors (SYCE2 and TEX12), of which their disruption leads to complete loss of tripartite SC structure and failure of extension of short SC-like stretches, respectively (10, 11, 16–18). Of synaptic initiation factors, SYCE3 forms dimers that undergo potentially limitless self-assembly (26, 27), SYCE1 forms antiparallel dimeric assemblies (28), and SIX6OS1 is an SYCE1-interacting protein of unknown structure (11). These likely act as short-range structural supports between SYCP1 molecules, possibly in transverse, longitudinal, and vertical orientations to stabilize a local three-dimensional SYCP1 lattice (22). In contrast, SYCE2 and TEX12 exist as a seemingly constitutive complex that undergoes self-assembly into fibers of many micrometers in length (29), which likely provide the long-range structural supports that stabilize continuous growth of the SYCP1 lattice along the entire chromosome axis (22).

¹Molecular Mechanisms Program, Centro de Investigación del Cáncer and Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (CSIC-Universidad de Salamanca), Salamanca, Spain. ²Biosciences Institute, Faculty of Medical Sciences, Newcastle University, Framlington Place, Newcastle upon Tyne NE2 4HH, UK. ³Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain. ⁴Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain.

*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. Email: owen.davies@newcastle.ac.uk (O.R.D.); amp@usal.es (A.M.P.)

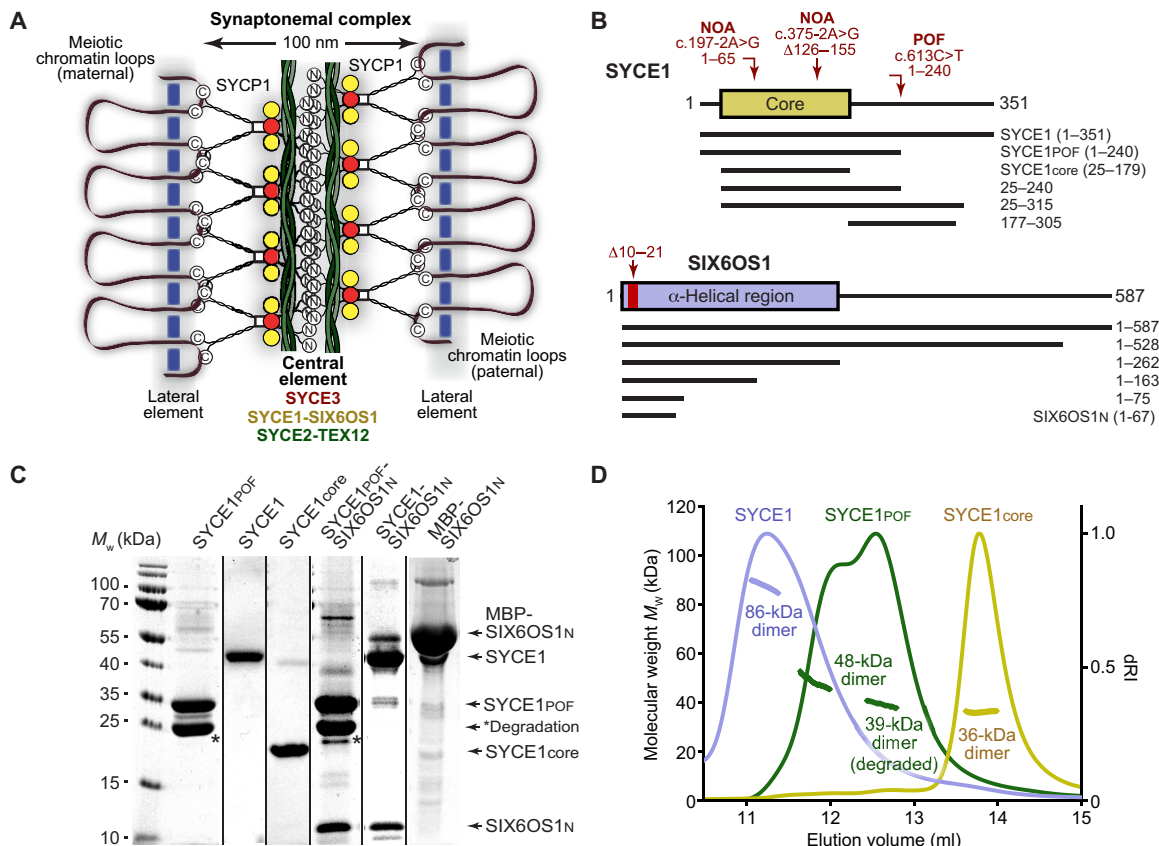


Fig. 1. SYCE1_{POF} retains its core dimeric structure. (A) Schematic of the SC demonstrating its tripartite structure of two chromosome-bound LEs and a midline CE. Synapsis is achieved through N-terminal head-to-head assembly of SYCP1 molecules, which are bound via their C termini to meiotic chromosomes. SYCP1 head-to-head assembly is structurally supported within the CE by SYCE3 (red), an SYCE1-SIX6OS1 complex (yellow), and SYCE2-TEX12 fibrous assemblies (green). (B) Human SYCE1 (top) and SIX6OS1 (bottom) sequence schematics indicating the location and consequence of infertility-associated mutations of SYCE1 and Δ10–21 internal deletion of SIX6OS1, alongside the principal constructs used in this study. (C) SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) analysis of the purified recombinant proteins used in this study. The dominant degradation product of SYCE1_{POF} is indicated by an asterisk; its identity was confirmed by the observed cleavage of degraded MBP- and His-SYCE1_{POF} fusion proteins upon treatment with TEV protease (fig. S1, A and B), consistent with it representing C-terminal degradation down to SYCE1’s structural core. *M_w*, weight-average molecular weight. (D) SEC–MALS analysis. SYCE1 core (yellow), SYCE1_{POF} (green), and full-length SYCE1 (violet) are dimeric species of 36, 48 (39 kDa for the degradation product), and 86 kDa, respectively (theoretical dimers: 37, 55, and 80 kDa). dRI, differential refractive index. Data for SYCE1 core and full-length SYCE1 are reproduced from (28).

Owing to the essential roles of meiotic recombination, synapsis, and chromosome dynamics in mammalian meiosis (15, 30–34), their defects are associated with human infertility, recurrent miscarriage, and aneuploidies (35, 36). As genetic causes of infertility, they typically fall within the category of idiopathic cases, having no readily diagnosable and clinically resolvable cause. Within the 10 to 15% of couples who suffer from infertility, approximately 25% are idiopathic and of likely genetic origin, comprising 50 to 80% of cases of nonobstructive azoospermia (NOA) and premature ovarian failure (POF) (36, 37). While individual infertility mutations are inherently unlikely to become widespread in a population, they can be found within families, especially when consanguineous (38), and provide crucial insights into their common targets and the molecular mechanisms that they disrupt.

Within the SC, familial infertility mutations have been identified for SYCP3 and SYCE1 (36). All identified SYCP3 mutations are autosomal dominant and alter or delete its structural core’s C terminus that mediates filamentous assembly, so likely sequester wild-type (WT) molecules into inactive complexes (24, 36). In contrast, the three identified SYCE1 mutations are autosomal recessive and

were found in two familial cases of NOA and one of POF (36). The two NOA cases are splice-site mutations, c.197-2A>G and c.375-2A>G, which are predicted to result in a truncated product of amino acids 1 to 65 and an internal deletion of amino acids 126 to 155, respectively (39, 40). These remove or delete part of human SYCE1’s structural core that is encoded by amino acids 25 to 179, so can be explained by disruption of its dimeric structure (Fig. 1B) (28, 36). The POF mutation c.613C>T generates a premature stop codon (p.Gln241*) to give a truncated product of amino acids 1 to 240, relative to the canonical 351–amino acid isoform (Fig. 1B) (41). However, as this truncation lies outside SYCE1’s structural core, the molecular mechanism that is disrupted, and thereby responsible for infertility, remains unknown.

Here, we combine mouse genetics and cellular and biochemical studies to reveal a multivalent interaction mode between SYCE1 and SIX6OS1 that is disrupted by infertility-associated mutations of SYCE1. We find that the SIX6OS1 N terminus binds and disrupts the core dimeric structure of SYCE1 (amino acids 25 to 179) to form a 1:1 complex as the first interface, and its downstream sequence binds to SYCE1 amino acids 177 to 305 as the second interface.

SYCE1's infertility-associated mutations c.375-2A>G (NOA) and c.613C>T (POF) specifically disrupt the first and second interfaces, respectively. Mice harboring the SYCE1 POF mutation and a targeted deletion within SIX6OS1 (which disrupts the first interface) are infertile, with failure of SC assembly. We conclude that both SYCE1-SIX6OS1 binding interfaces are essential for SC assembly and meiotic division, thus explaining how human infertility results from the differential targeting of binding interfaces by SYCE1's reported clinical mutations.

RESULTS

SYCE1 POF mutation c.613C>T retains its core dimeric structure

The SYCE1 POF mutation c.613C>T encodes a premature stop codon (p.Gln241*) that is predicted to generate a truncated protein product of amino acids 1 to 240, relative to SYCE1's canonical 351-amino acid isoform (Fig. 1B) (41). We previously demonstrated that an N-terminal structural core encoded by amino acids 25 to 179 (SYCE1core) forms an α -helical antiparallel coiled-coil structure that mediates head-of-head dimerization of SYCE1 (28). As this core region is retained (Fig. 1B), we predicted that SYCE1's antiparallel dimeric structure would be maintained within the 1- to 240-amino acid truncated product of the POF mutation (SYCE1^{POF}). To test this, we purified recombinant SYCE1^{POF}, generating purified material that contained approximately equal quantities of the full protein and a degradation product of apparent size consistent with degradation to the C-terminal boundary of its structural core (Fig. 1C and fig. S1, A and B). Circular dichroism (CD) spectroscopy confirmed that SYCE1^{POF} contains a proportion of α -helical structure consistent with retention of the 25–179 core structure (fig. S1C), and SYCE1^{POF} and SYCE1core demonstrated identical melting temperatures (T_m) of 39°C (fig. S1D). Furthermore, analysis by size exclusion chromatography multiangle light scattering (SEC-MALS) confirmed that the full and degraded proteins are homodimers of 48 and 39 kDa, respectively (Fig. 1D). We conclude that SYCE1^{POF} retains the dimeric structure imposed by its core 25–179 region, so its SC and meiotic defects must result from additional structural or functional roles of its deleted C terminus.

The SYCE1 POF mutation leads to failure of SC assembly and infertility in mice

Having established its retention of core dimeric structure, we next sought to determine the structural and functional consequence of the SYCE1 POF mutation on the SC and meiotic division in vivo. We thus generated mice harboring mutations of *Syce1* alleles to introduce stop codons at amino acid position 243, equivalent to the human p.Gln241* mutation (figs. S2 and S3). While heterozygotes (designated *Syce1*^{POF/WT}) were fertile, both male and female homozygotes (designated *Syce1*^{POF/POF}) were infertile, replicating the autosomal recessive pattern of the POF mutation in humans (41). In male mutant mice, we observed reduced testis size (63% smaller, $n = 3$ mice at 2 months of age; fig. S4A) and a zygotene-like arrest similar to that observed in the SYCE1 knockout (16). There was defective SC assembly, with reduced staining for SYCP1 (Fig. 2A) and SYCE3 (Fig. 2B) and no staining for SYCE1 (Fig. 2C), SIX6OS1 (Fig. 2D), and SYCE2-TEX12 (fig. S4, B and C). Analysis of SYCE1 expression in the testis of *Syce1*^{POF/POF} mice confirmed the presence of *Syce1* transcript and a protein product of the correct molecular

weight, albeit at reduced levels in comparison with WT (fig. S4, D and E, and table S1A). The *Syce1*^{POF} open reading frame achieved WT levels of protein expression in a heterologous 293T cellular system (fig. S4F). We next studied the kinetics of DSB repair. Meiotic DSBs are generated by the nuclease SPO11 and are then resected to form single-stranded DNA ends that invade into the homologous chromosome by the recombinases RAD51 (DNA repair protein RAD51 homolog 1) and DMC1 (Meiotic recombination protein DMC1/LIM15 homolog) (42). DSBs are labeled by the presence of phosphorylated H2AX (γ -H2AX) (43). The distribution of γ -H2AX in mutant spermatocytes was similar to that found in WT cells at early prophase I but show increased staining at zygotene-like arrest (Fig. 2E). The distributions of RAD51 and DMC1 were detected on aligned LEs (Fig. 2, F and G) but in absence of mismatch repair protein MLH1 (DNA mismatch repair protein Mlh1) (marker of crossing-overs) (Fig. 2H). Together, these data indicate generation of DSBs but with failure of their repair and CO formation in *Syce1*^{POF/POF}. In female mutant mice, we observed no follicles in adult ovaries (fig. S5A), and embryonic oocytes demonstrated zygotene arrest with mostly unaligned chromosome axes, recapitulating the human POF syndrome. Analysis of the SC revealed similar defects, with reduction in SYCP1 and SYCE3 (Fig. 3, A and B) staining (though to a lesser extent than males), and absence of SYCE1, SIX6OS1 (Fig. 3, C and D), and SYCE2-TEX12 (fig. S5, B and C). The distribution of γ -H2AX, RAD51, and DMC1 labeling in zygotene-like mutant oocytes was also increased and lacked MLH1 foci (Fig. 3, E to H). Thus, the SYCE1 POF mutation leads to male and female infertility with phenotypes of failed DSB repair, synapsis, and lastly SC assembly, similar to those previously observed upon disruption of structural components of the SC CE (10, 11, 16–18).

SYCE1^{POF} retains SIX6OS1 binding but lacks SYCE3 binding in heterologous systems

As the *Syce1*^{POF/POF} mouse strain indicated a clear structural defect in the SC, we wondered whether the POF mutation may disrupt the known interaction between SYCE1 and fellow SC CE components SIX6OS1 and SYCE3 (11). The expression of SYCE1 and SIX6OS1 in COS7 cells produced cytoplasmic signals that became colocalized in foci upon coexpression (95% cells; Fig. 4A and fig. S6), in keeping with our previous findings (11). SYCE1^{POF} formed similar or slightly reduced numbers of foci that equally colocalized with SIX6OS1, indicating a retention of SIX6OS1 binding (89% cells; Fig. 4A). We further demonstrated a similar coimmunoprecipitation of SIX6OS1 by WT SYCE1 and SYCE1^{POF} upon coexpression in human embryonic kidney (HEK) 293 cells (Fig. 4B). Thus, the SYCE1-SIX6OS1 interaction is retained in the SYCE1 POF mutation. Could other disrupted functions contribute to the effect of the POF mutation? The only other known SYCE1 interactor is SYCE3, which undergoes low-affinity binding, as determined by its dissociation during purification (fig. S7, A and B). In contrast with the WT protein, the expression of SYCE1^{POF} (cytoplasmic foci) in COS7 cells failed to recruit SYCE3 (preferentially nuclear) to their cytoplasmic foci (colocalization between SYCE3 and SYCE1 was observed for 95% of cells expressing WT SYCE1 and 21% of cells expressing SYCE1^{POF}; Fig. 4C and fig. S6). Similarly, SYCE1^{POF} failed to coimmunoprecipitate SYCE3 upon coexpression in HEK293 cells (Fig. 4D). Thus, while the SYCE1-SIX6OS1 complex is retained, the low-affinity SYCE1-SYCE3 complex is largely abolished in the SYCE1 POF mutation.

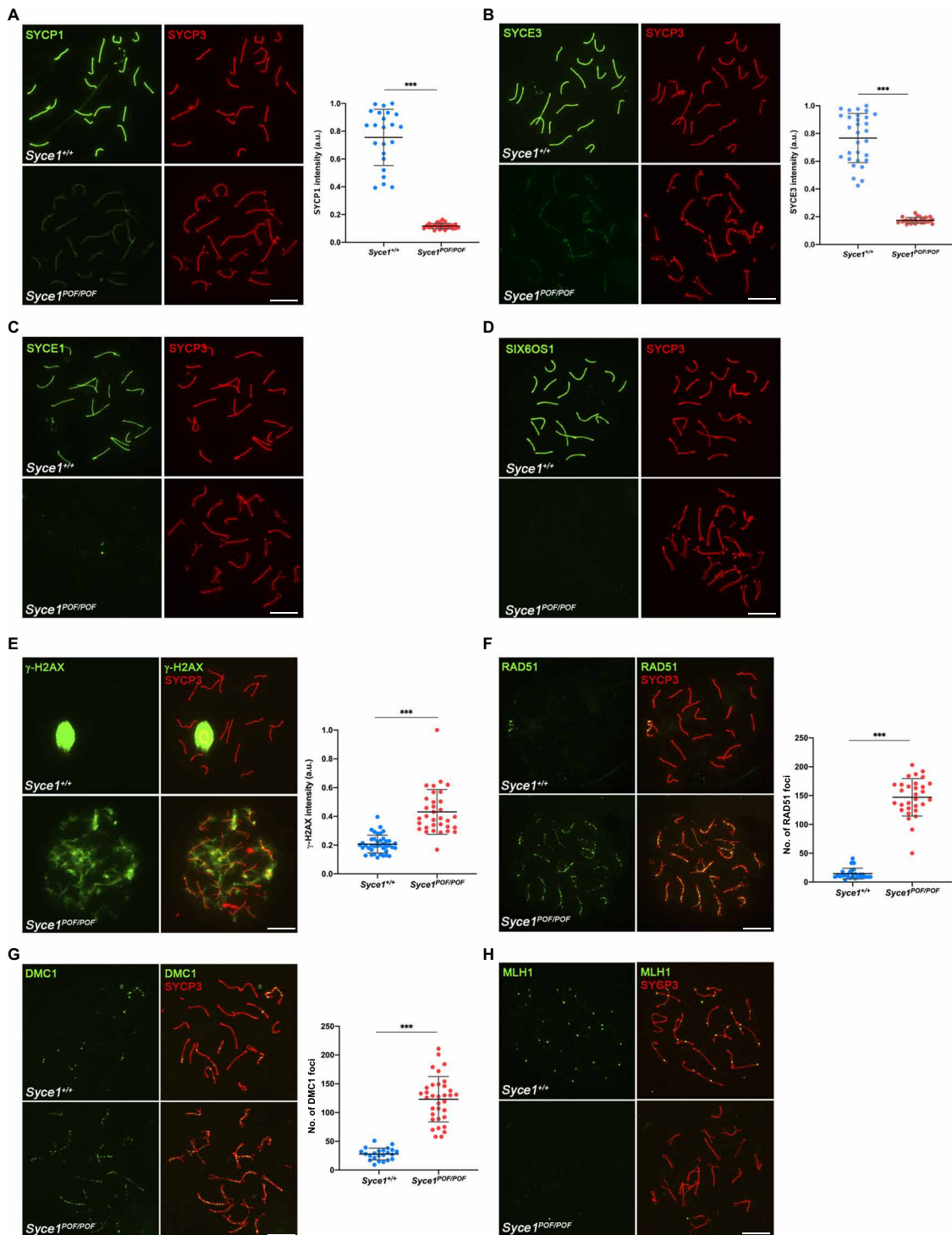


Fig. 2. *Syce1*^{POF/POF} spermatocytes are not able to synapse and DSBs are deficiently repaired. (A) Double immunolabeling of WT pachytene and *Syce1*^{POF/POF} zygotene-like spermatocytes with SYCP3 (red) and SYCP1 (green). In *Syce1*^{POF/POF} spermatocytes, AEs fail to synapse and show a weak staining of SYCP1 along the axial elements (AEs). a.u., arbitrary units. (B to D) Double immunolabeling of spermatocyte spreads with SYCP3 (red) and the CE proteins (green). *Syce1*^{POF/POF} zygotene-like spermatocytes showed a highly reduced signal of SYCE3 (B) and the absence of (C) SYCE1 and (D) SIX6OS1 from the AEs. (E) Double immunolabeling of γ -H2AX (green) and SYCP3 (red) in spermatocyte spreads from WT and *Syce1*^{POF/POF} mice. γ -H2AX staining was persistent in *Syce1*^{POF/POF} zygotene-like spermatocytes, but was restricted to the sex body in WT pachytene cells. (F and G) Double immunofluorescence of (F) RAD51 or (G) DMC1 (green) and SYCP3 (red). *Syce1*^{POF/POF} zygotene-like spermatocytes showed increased numbers of foci of RAD51 and DMC1 along the AEs in comparison with WT, indicating unrepaired DSBs. (H) Double immunolabeling of MLH1 (green) and SYCP3 (red) showing the absence of COs (MLH1) in arrested *Syce1*^{POF/POF} spermatocytes. Fluorescence intensity levels (A, B, and E) and number of foci (F and G) from WT and zygotene-like arrested spermatocytes are quantified in the right-hand plots. Welch's *t* test analysis: ****P* < 0.0001. Scale bars, 10 μ m.

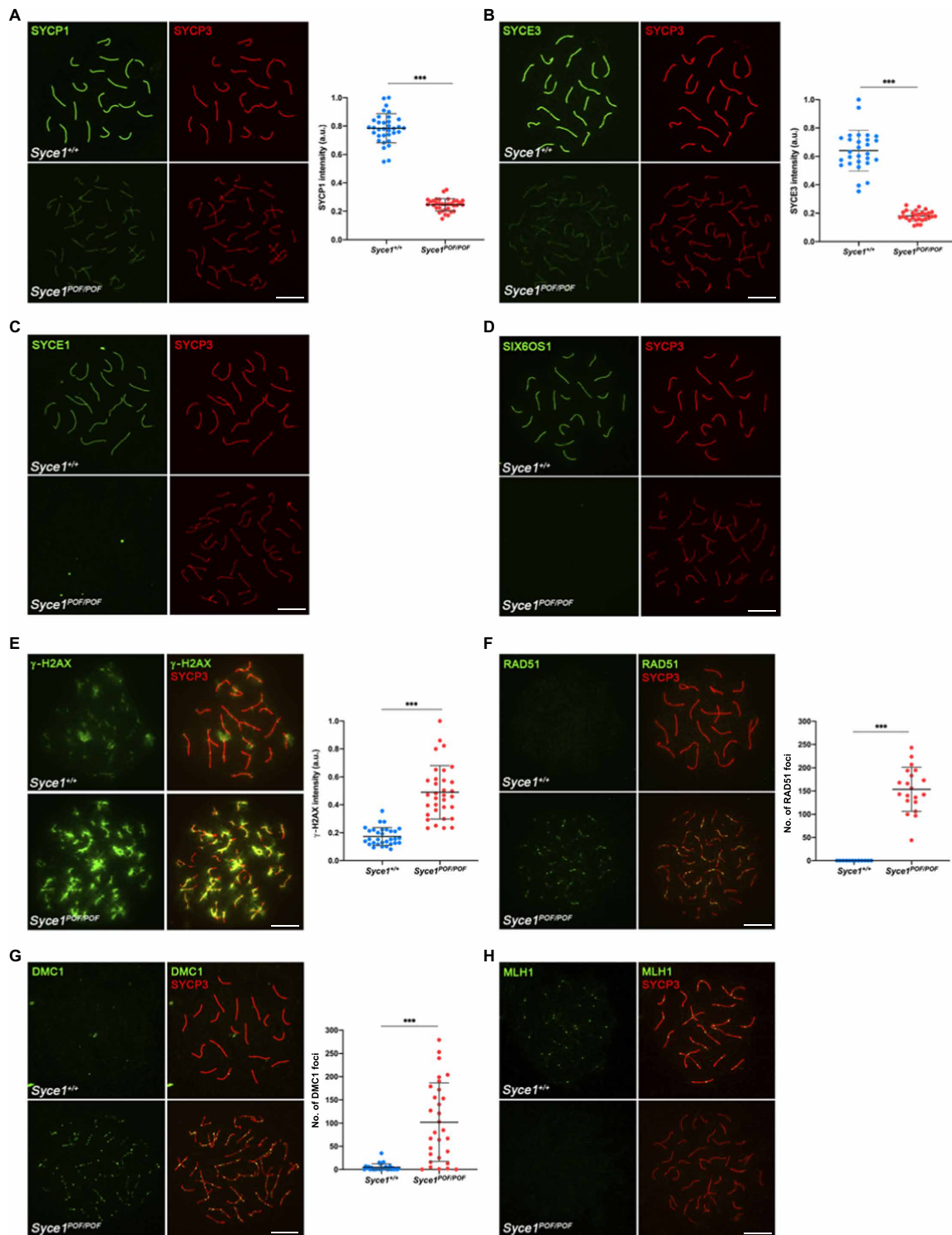


Fig. 3. *Syce1*^{POF/POF} oocytes fail to synapse and do not properly repair DSBs. (A) Double immunolabeling of oocyte spreads from WT and *Syce1*^{POF/POF} mice with SYCP3 (red) and SYCP1 (green). *Syce1*^{POF/POF} oocytes became arrested in a zygotene-like stage where AEs remain unsynapsed and unaligned, with reduced levels of SYCP1. (B to D) Double immunolabeling of oocyte spreads with SYCP3 (red) and the CE proteins (green). *Syce1*^{POF/POF} zygotene-like oocytes showed reduced SYCE3 signal (B) and a complete absence of (C) SYCE1 and (D) SIX6OS1 from the AEs. IP, immunoprecipitation. (E) Double immunostaining of spread preparations of WT pachytene and *Syce1*^{POF/POF} zygotene-like oocytes with γ -H2AX (green) and SYCP3 (red). In *Syce1*^{POF/POF} oocytes, the levels of γ -H2AX increased and were more restricted to AEs in comparison with WT pachytene cells. (F to G) Double immunolabeling of (F) RAD51 or (G) DMC1 (green) and SYCP3 (red), showing higher numbers of foci in AEs from mutant oocytes. (H) Labeling of MLH1 (green) and SYCP3 (red). MLH1 foci are absent from the AEs of *Syce1*^{POF/POF} oocytes. Fluorescence intensity levels (A, B, and E) and number of foci (F and G) from WT and *Syce1*^{POF/POF} zygotene-like oocytes are quantified in the right-hand plots. Welch's *t* test analysis: ****P* < 0.0001. Scale bars, 10 μ m.

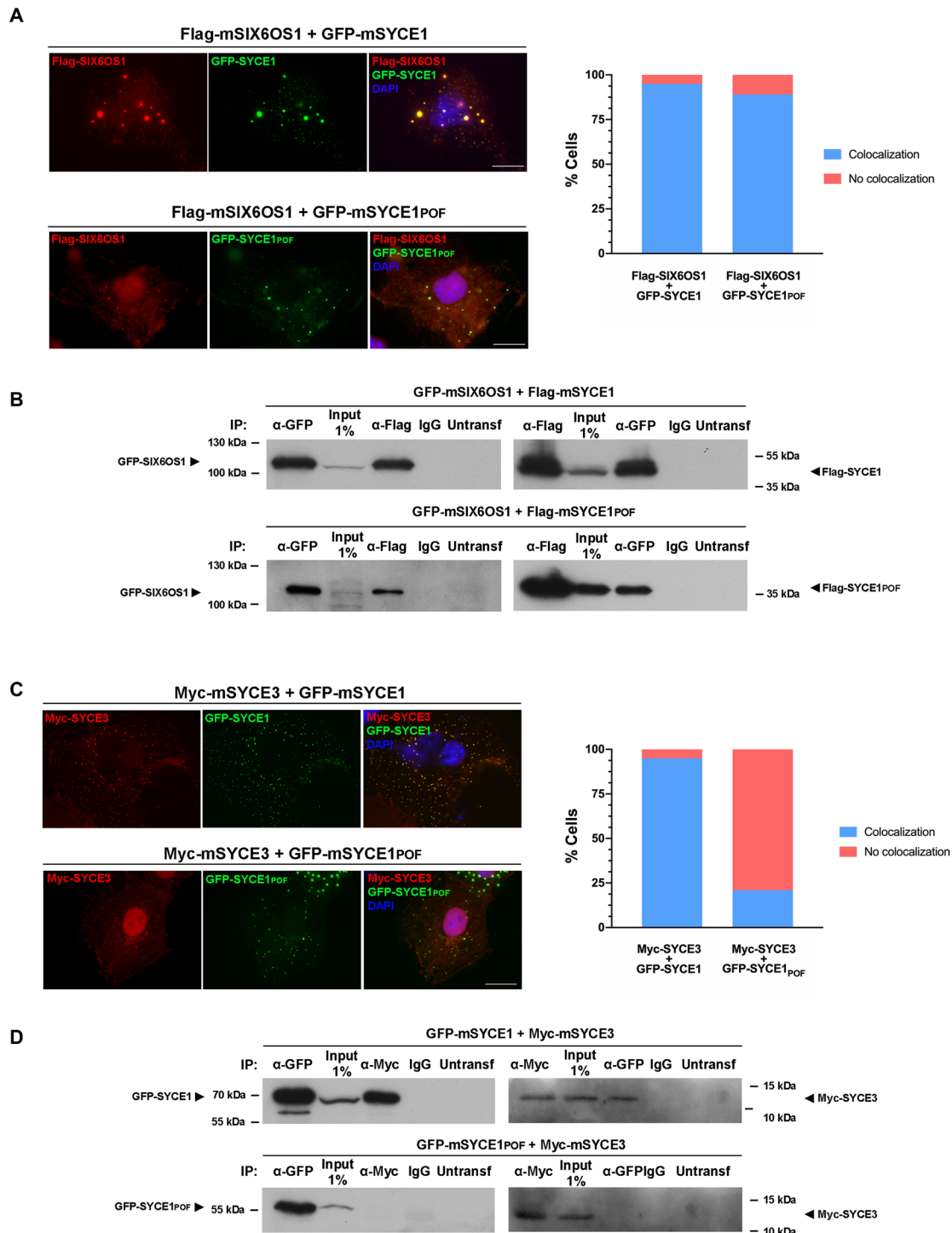


Fig. 4. SYCE1^{POF} retains SIX6OS1 binding but fails to retain the SYCE3-interaction in heterologous systems. (A) Mouse SIX6OS1 colocalized with mouse SYCE1 and SYCE1^{POF} in a cytoplasmatic punctate pattern upon coexpression in COS7 cells; the percentage of cells exhibiting colocalization is shown in the right-hand plot ($n = 100$ cells). DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole. (B) HEK293T cells were cotransfected with the indicated expression vectors. Protein complexes were immunoprecipitated with anti-Flag or anti-enhanced green fluorescent protein (EGFP) antibodies, or mouse immunoglobulin G (IgG) as a negative control, and were analyzed by immunoblotting with the indicated antibody. GFP-mSIX6OS1 coimmunoprecipitated with Flag-mSYCE1 and Flag-mSYCE1^{POF}, suggesting that the POF mutation of SYCE1 alone is insufficient to block the interaction. (C) COS7 cells were transfected with mouse *Syce3* in combination with mouse *Syce1* or *Syce1*^{POF} as indicated. SYCE1 colocalized with SYCE3 in its own cytoplasmatic punctate pattern, and colocalization was substantially diminished for SYCE1^{POF} ($n = 100$ cells). (D) Immunoprecipitation of protein complexes from HEK293T-cotransfected cells with an anti-Myc or anti-EGFP antibody or mouse IgG. SYCE1 coimmunoprecipitated with SYCE3, and the interaction was disrupted for SYCE1 POF, suggesting that the C-terminal region of SYCE1 is required for its interaction with SYCE3. The untransfected lanes in (B) and (D) show the absence of all the proteins in total protein extracts from untransfected 293T cells. Scale bars, 20 μ m.

SYCE1core undergoes conformational change to form a 1:1 complex with SIX6OS1

What is the molecular basis of SIX6OS1 binding by SYCE1? As this is retained in SYCE1_{POF}, we reasoned that SIX6OS1 binding must be mediated by SYCE1's structural core. We screened SYCE1core against a library of SIX6OS1 constructs through bacterial coexpression and identified a robust interaction with amino acids 1 to 67 of SIX6OS1, herein referred to as SIX6OS1_N (Figs. 1B and 5A). We were able to purify the SYCE1core-SIX6OS1_N complex by reciprocal affinity chromatography, ion exchange, and size exclusion chromatography (Fig. 5B) and found it to be stable under all experimental conditions tested. We were further able to purify similar complexes for SYCE1_{POF} (with the same degradation product as upon isolated expression) and full-length SYCE1 (Fig. 1C and fig. S1B), confirming that SIX6OS1 binding is retained by all constructs containing the 25–179 core. CD analysis revealed similar α -helical content for SYCE1-SIX6OS1_N complexes as for their isolated SYCE1 proteins (fig. S1C). CD thermal denaturation revealed slightly increased cooperativity of unfolding and melting temperatures for SYCE1-SIX6OS1_N complexes relative to their isolated SYCE1 proteins (increasing from 39° to 43°C, 39° to 41°C, and 38° to 40°C for SYCE1core, SYCE1_{POF}, and full length, respectively; Fig. 5C and fig. S1D). SEC-MALS analysis revealed that all three SYCE1-SIX6OS1_N complexes are 1:1, with molecular weights of 27, 37, and 46 kDa, respectively (Fig. 5D and fig. S7C). Thus, the SYCE1core undergoes conformational change from an antiparallel homodimer to a 1:1 complex upon binding to SIX6OS1_N (Fig. 5E).

We analyzed the conformation of the SYCE1core-SIX6OS1_N complex by size exclusion chromatography small-angle x-ray scattering (SEC-SAXS; fig. S7, D and E). The SAXS real-space pair-distance $P(r)$ distribution (the distribution of interatomic distances within a protein structure) demonstrates positive skew, indicating that SYCE1core-SIX6OS1_N retains the rod-like structure of SYCE1core, but with a reduction in its molecular length from 186 to 138 Å (Fig. 5F). Furthermore, its cross-sectional radius is slightly increased from 9 to 11 Å (fig. S7F), suggesting an increase from a two- to four-helical coiled coil. These geometric changes are consistent with the SYCE1core-SIX6OS1_N 1:1 complex forming a shorter but wider coiled coil than the isolated SYCE1core dimer, as indicated by their SAXS *ab initio* models (Fig. 5G). Furthermore, the SAXS $P(r)$ distribution of SYCE1_{POF} indicates a similar elongated structure but with an increased tail to a maximum dimension of 180 Å (Fig. 5F), consistent with it containing the same SYCE1core-SIX6OS1_N structure with an extended and potentially unstructured C terminus to amino acid 240. We conclude that SYCE1core mediates a direct interaction with SIX6OS1_N that imposes a conformational change to a 1:1 complex that adopts a shorter and wider coiled-coil conformation than the isolated SYCE1core antiparallel homodimer.

SYCE1_{POF} disrupts a second SYCE1-SIX6OS1 binding interface

Does the SYCE1core-SIX6OS1_N complex represent the sole means by which SYCE1 interacts with SIX6OS1? We were unable to obtain soluble biochemical complexes containing SIX6OS1 sequences beyond its N terminus and so used yeast two-hybrid (Y2H) to test SYCE1 binding by full-length SIX6OS1. Having confirmed direct binding of SYCE1core to full-length SIX6OS1, we used C-terminal truncation to dissect its minimal binding site to amino acids 1 to 75, in keeping with our biochemical findings, and identified an addi-

tional interaction between SYCE1 177–305 and full-length SIX6OS1 (Fig. 6A).

To establish whether SYCE1core and 177–305 bind to the same or distinct sites within SIX6OS1, we established an internal deletion of SIX6OS1 amino acids 10 to 21 (Δ 10–21) that blocks formation of the SYCE1core-SIX6OS1_N biochemical complex (Fig. 5A). SIX6OS1 1–22 did not interact with any SYCE1 construct (Fig. 6A), indicating that amino acids 10 to 21 are necessary but not sufficient for SYCE1core binding. While Δ 10–21 completely abrogated the Y2H interaction of full-length SIX6OS1 with SYCE1core (25–179), it retained a robust interaction with SYCE1 177–305, suggesting distinct SIX6OS1-binding sites (Fig. 6A). Furthermore, Δ 10–21 blocked the ability of SIX6OS1 1–262 to interact with SYCE1core and SYCE1_{POF} (amino acids 25 to 240) while retaining its binding to full-length and 25–315 SYCE1 (Fig. 6A). Thus, SYCE1 undergoes multivalent interactions with SIX6OS1, with the first binding interface mediated by SYCE1core and SIX6OS1_N (1–67), and the second interface mediated by SYCE1 177–305 and downstream sequence within SIX6OS1 1–262. Furthermore, the first and second binding interfaces are specifically disrupted by SIX6OS1 deletion Δ 10–21 and the SYCE1 POF mutation, respectively, and in both cases, an SYCE1-SIX6OS1 complex is retained through the unaffected alternative site (Fig. 6B).

SIX6OS1 Δ 10–21 retains SYCE1 binding in heterologous systems

Our biochemical and Y2H analyses concluded that SIX6OS1 Δ 10–21 would disrupt the first SYCE1-SIX6OS1 binding interface while retaining complex formation through the second interface. In support of this, we found that SIX6OS1 Δ 10–21 retained its ability to form intense colocalized foci with SYCE1 upon coexpression in COS7 cells (98% of the cells; Fig. 6C), similar to our previous observations for the SYCE1 POF mutation (Fig. 4A). Similarly, SIX6OS1 Δ 10–21 retained its ability to coimmunoprecipitate SYCE1 upon coexpression in HEK293 cells (Fig. 6D). Thus, localization and coimmunoprecipitation data from heterologous systems support our Y2H findings that the second SYCE1-SIX6OS1 binding interface is retained in SIX6OS1 Δ 10–21, mirroring the retention of only the second binding interface that is predicted for the 126–155 deletion of the SYCE1 c.375-2A>G NOA mutation (40).

SIX6OS1 Δ 10–21 leads to failure of SC assembly and murine infertility

Having established that the severe phenotype of the SYCE1 POF mutation likely results from the disruption of the second SYCE1-SIX6OS1 binding interface and its interaction with SYCE3, we wondered whether a similar phenotype would result from the sole disruption of the first SYCE1-SIX6OS1 binding interface. To test this, we generated mice harboring mutations of *Six6os1* alleles encoding internal in-frame deletions of amino acids 10 to 21 (equivalent numbering to the human protein) (fig. S8, A and B). While heterozygotes (designated *Six6os1* ^{Δ 10–21/WT}) were fertile, both male and female homozygotes (designated *Six6os1* ^{Δ 10–21/ Δ 10–21}) were infertile, similar to the SYCE1 POF mutation. In males, we observed reduced testis size (Fig. 7A) and a zygote-like arrest similar to that observed in the *Six6os1* and *Syce1* knockouts (11, 16). The mutant spermatocytes were defective in synapsis and SC assembly, with reduced staining for SC proteins SYCP1 (Fig. 7B) and SYCE3 (Fig. 7C) and no staining for SYCE2-TEX12 (Fig. 7, F and G). In

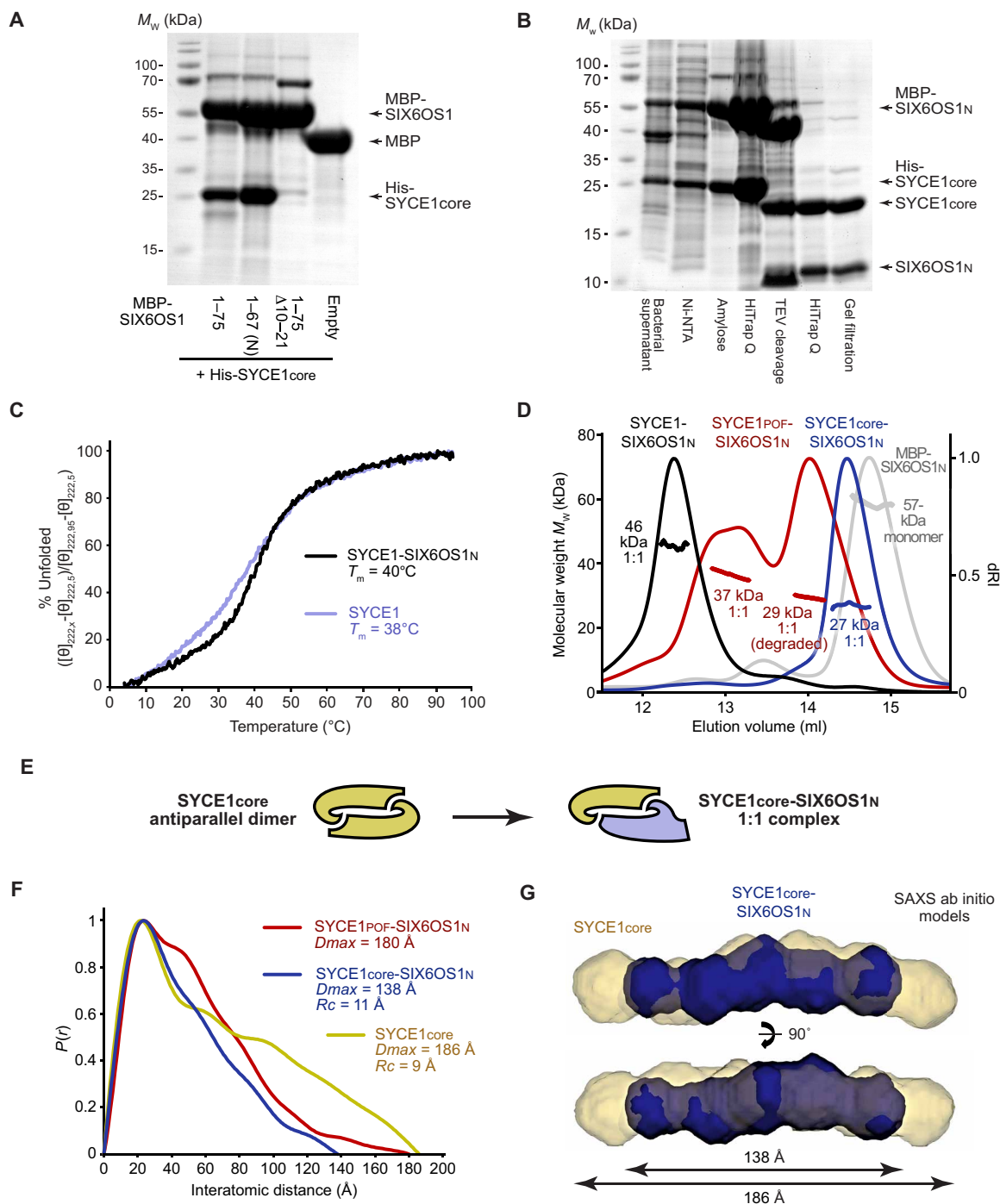


Fig. 5. SYCE1core undergoes conformational change to form a 1:1 complex with SIX6OS1N. (A) Amylose pull-down following coexpression of MBP-SIX6OS1 1–75, 1–67, 1–75 Δ 10–21, and free MBP with His-SYCE1core. (B) SDS-PAGE of the copurification of the SYCE1core-SIX6OS1N complex. Ni-NTA, Ni-nitrilotriacetic acid. (C) CD thermal denaturation recording the CD helical signature at 222 nm between 5° and 95°C, as % unfolded; estimated melting temperatures (T_m) are indicated. (D) SEC-MALS analysis. SYCE1core-SIX6OS1N (blue), SYCE1POF-SIX6OS1N (red) and full-length SYCE1-SIX6OS1N (black) are 1:1 complexes of 27, 37 (29 kDa for the degradation product complex), and 46 kDa, respectively (theoretical 1:1 to 27, 36, and 48 kDa), while MBP-SIX6OS1N (gray) is a 57-kDa monomer (theoretical, 53 kDa). SDS-PAGE of the SYCE1POF-SIX6OS1N sample is shown in Fig. 1C. (E) Schematic of the conformational change of the SYCE1core antiparallel dimer (yellow) into a 1:1 SYCE1core-SIX6OS1N complex (yellow-blue). (F and G) SEC-SAXS analysis. (F) SEC-SAXS $P(r)$ interatomic distance distributions of SYCE1core-SIX6OS1N (blue), SYCE1POF-SIX6OS1N (red), and SYCE1core (yellow), revealing maximum dimensions (D_{max}) of 138, 180, and 186 Å, respectively. Their cross-sectional radii (R_c) are indicated (fig. S7D). (G) SAXS ab initio models of SYCE1core-SIX6OS1N (blue) and SYCE1core (yellow); averaged models were generated from 20 independent DAMMIF runs. Data for SYCE1core and full-length SYCE1 are reproduced from (28).

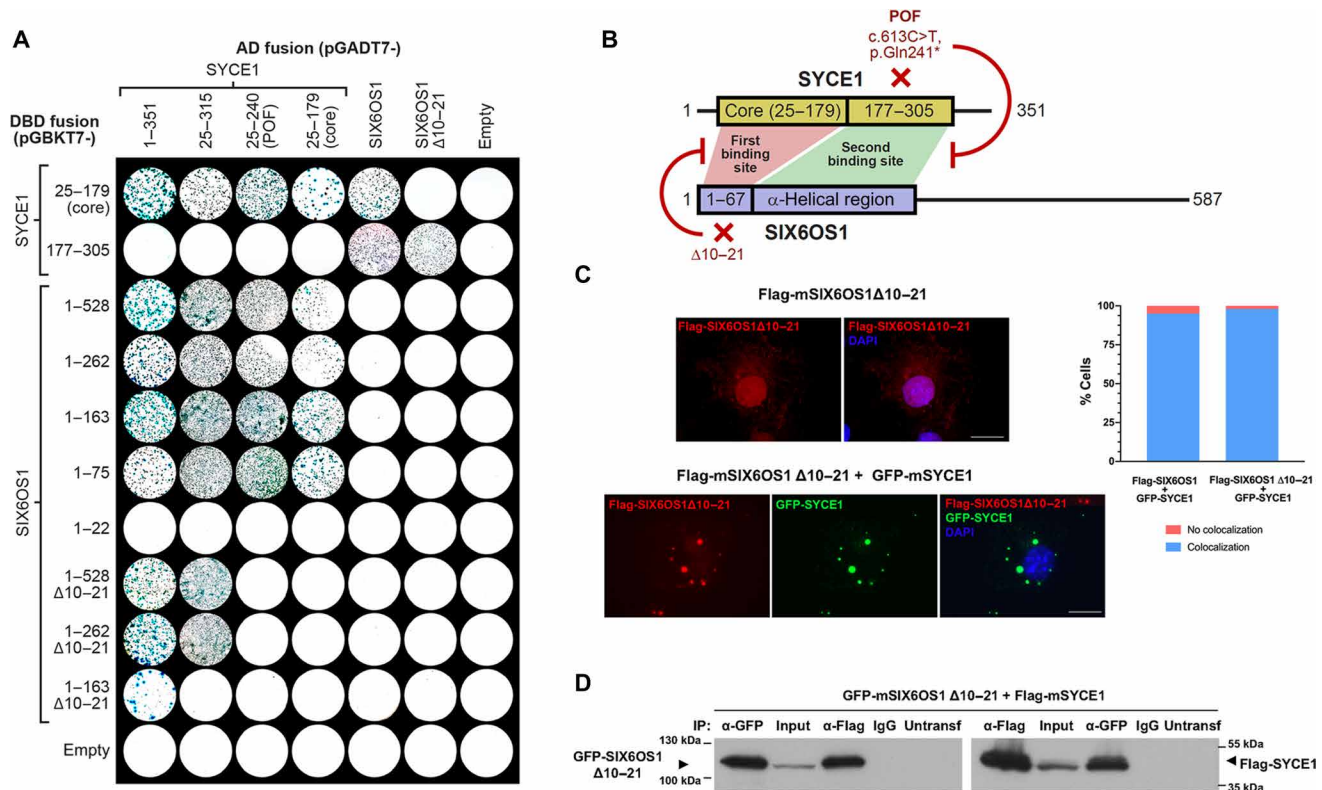


Fig. 6. SYCE1 undergoes multivalent interaction with SIX6OS1 in yeast, but SIX6OS1 Δ 10-21 retains SYCE1 binding in heterologous systems. (A) Y2H analysis of interactions between SYCE1 and SIX6OS1 in which positive reactions are indicated by the growth of blue colonies. These data are representative of three repeats. (B) Schematic of the SYCE1-SIX6OS1 interaction based on the Y2H data in (A), with the two binding sites highlighted in red and green. The SYCE1 POF mutation blocks the second binding interface between SYCE1 177-305 and SIX6OS1 downstream sequence within region 1-262, whereas the SIX6OS1 Δ 10-21 deletion blocks the first binding interface between SYCE1core (25-179) and SIX6OS1_N (1-67). (C) COS7 cells were transfected with mouse *Six6os1* Δ 10-21 alone or in combination with mouse *Syce1*. SIX6OS1 Δ 10-21 showed nuclear localization with some cytoplasmic signal and colocalized in cytoplasmic foci with SYCE1; the percentage of cells exhibiting colocalization is shown. Scale bars, 20 μ m. (D) Coimmunoprecipitation of SIX6OS1 Δ 10-21 and Flag-SYCE1 from cotransfected HEK293T cells using anti-Myc or anti-EGFP antibodies, or mouse IgG as a negative control. SIX6OS1 Δ 10-21 coimmunoprecipitated SYCE1, indicating that the second SYCE1 binding interface is retained. The untransfected lanes confirm the absence of SIX6OS1 Δ 10-21 and SYCE1 in total protein extracts of untransfected 293T cells.

contrast with their complete absence in the SYCE1 POF mutation, we observed some residual staining for SYCE1 (Fig. 7D) and SIX6OS1 (Fig. 7E) even though the levels of transcription of *Six6os1* ^{Δ 10-21} appeared to be increased in the mutant testis (fig. S9 and table S1B). We detected γ -H2AX (fig. S10A) and DMC1/RAD51 foci (fig. S10, B and C) on aligned axial elements but no MLH1 foci (fig. S10D), indicating the proper induction of DSBs with their failed repair and absence of COs. Thus, SIX6OS1 Δ 10-21 leads to infertility with a phenotype of failed DSB repair and SC assembly, similar to the SYCE1 POF mutation and those reported for disruption of structural components of the CE (10, 11, 16-18).

Thus, we conclude that both first and second SYCE1-SIX6OS1 binding interfaces are essential for SC assembly and meiotic progression. Furthermore, these findings explain how the sole disruption of individual SYCE1-SIX6OS1 binding interfaces by SYCE1 NOA (c.375-2A>G) and POF (c.613C>T) mutations result in the reported familial cases of human infertility.

DISCUSSION

The structural and functional integrity of the SC is contingent on the structure and assembly of its constituent protein components.

Here, we report that SC assembly depends on multivalent interactions between CE components SYCE1 and SIX6OS1 that are disrupted by infertility-associated mutations of SYCE1. The first binding interface is formed by the structural core of SYCE1 (SYCE1core; amino acids 25 to 179), which undergoes conformational change from an antiparallel homodimer to a 1:1 complex upon interaction with SIX6OS1's N terminus (SIX6OS1_N; amino acids 1 to 67). The second binding interface is formed by downstream sequence within SIX6OS1 1-262 interacting directly with SYCE1 177-305. Through the generation of mice harboring an internal deletion of SIX6OS1's N terminus (Δ 10-21) and the SYCE1 POF mutation (murine p. Gln243*), which specifically block the first and second binding interfaces, respectively, we find that integrity of both SYCE1-SIX6OS1 binding interfaces is essential for SC assembly and meiotic progression in vivo.

What is the structure of the SYCE1-SIX6OS1 complex? SEC-SAXS analysis revealed that the SYCE1core-SIX6OS1_N 1:1 complex formed by the first binding interface has a length and cross-sectional radius of 138 and 11 \AA , in comparison with 186 and 9 \AA for the SYCE1core dimer. We previously reported a model for SYCE1core in which amino acids 52 to 179 form an antiparallel dimeric coiled coil containing a midline "kink", with α helices of amino acids 25 to 50 packing

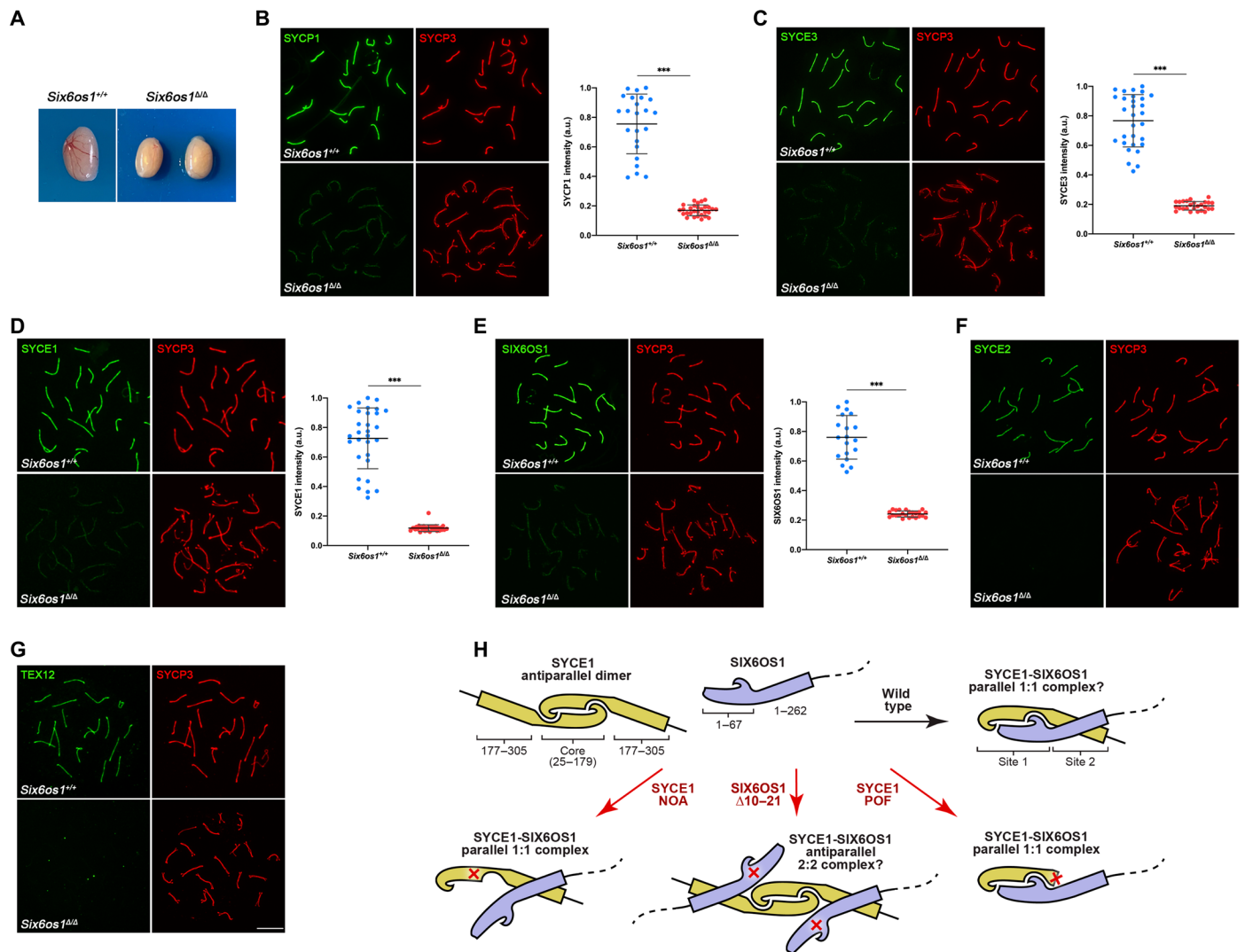


Fig. 7. Synapsis between homologs is disrupted in *Six6os1^{Δ10-21/Δ10-21}* spermatocytes. (A) Genetic deletion of amino acids 10 to 21 of SIX6OS1 led to a reduction of the testis size compared to the WT (mice of 3 months of age). (B) Double immunolabeling of WT pachytene and *Six6os1^{ΔΔ}* zygotene-like spermatocytes with SYCP3 (red) and SYCP1 (green). AEs failed to synapse in *Six6os1^{ΔΔ}* spermatocytes despite partial alignment, with reduced loading of SYCP1 along the AEs. (C to G) Double immunolabeling of spermatocyte spreads with SYCP3 (red) and all CE components (green). *Six6os1^{ΔΔ}* zygotene-like spermatocytes showed reduced signals of (C) SYCE3, (D) SYCE1, and (E) SIX6OS1, and the absence of (F) SYCE2 and (G) TEX12 from the AEs. Scale bars, 10 μm. Plots represent the quantification of fluorescence intensity levels in *Six6os1^{ΔΔ}* zygotene-like and WT pachytene spermatocytes (B to E). Welch's *t* test analysis: ****P* < 0.0001. (H) Schematic of how the SYCE1 antiparallel dimer (yellow) undergoes conformational change upon interaction with SIX6OS1 (blue) to form a possible 1:1 complex through consecutive binding interfaces mediated by SYCE1 core-SIX6OS1_N (site 1) and SYCE1 177–305 and downstream sequence within SIX6OS1 1–262 (site 2). The consequence of SYCE1 mutations associated with POF (c.613C>T) and NOA (c.375-2A>G) and SIX6OS1 Δ10–21 on the integrity, predicted stoichiometry, and conformation of resultant SYCE1-SIX6OS1 complexes is illustrated. Photo credit (A): Laura Gómez-H, Instituto de Biología Celular y Molecular del Cáncer.

against this structural core (fig. S11A) (28). A maximum dimension of 138 Å for SYCE1core-SIX6OS1_N suggests a coiled-coil length of approximately 92 amino acids, given a helical rise of 1.5 Å per amino acid (44). This could be explained by the 52–179 region forming a helix-turn-helix structure through exaggeration of the kink to a full turn, which may combine with the α helix formed by amino acids 25 to 50 and an α helix from SIX6OS1_N to form a four-helical coiled coil, consistent with its 11-Å cross-sectional radius (fig. S11B). The second binding interface between SYCE1 177–305 and downstream sequence within SIX6OS1 1–262 suggests that SYCE1core-SIX6OS1_N likely adopts a parallel configuration to form a single SYCE1-

SIX6OS1 1:1 complex of consecutive first and second binding interfaces (Fig. 7H).

Our analysis of the SYCE1-SIX6OS1 complex reveals how the three reported clinical mutations of SYCE1 differentially affect its interaction with SIX6OS1. The SYCE1 NOA mutation c.197-2A>G is predicted to result in a truncated product of amino acids 1 to 65 (39), which would disrupt both binding sites and so likely abrogates SYCE1-SIX6OS1 complex formation and thus works as a null mutation. The SYCE1 NOA mutation c.375-2A>G is predicted to result in internal deletion of amino acids 126 to 155 (40), which would disrupt the first binding interface while retaining the second binding

interface, and so is likely to result in a conformationally altered 1:1 complex (Fig. 7H). In contrast, while $\Delta 10-21$ SIX6OS1 similarly disrupts the first binding interface and retains the second binding interface, the SYCE1 core remains unaffected and so is predicted to enable formation of a head-to-head 2:2 complex (Fig. 7H). The SYCE1 POF mutation c.613C>T generates a premature stop codon (p.Gln241*) that gives a truncated product of amino acids 1 to 240 (41), which we have demonstrated disrupts the second binding interface while retaining the first binding interface (Fig. 7H). Thus, the latter two infertility-associated mutations of SYCE1 specifically disrupt one SYCE1-SIX6OS1 interface while retaining the other, which combine with our mouse genetic studies to confirm that both interfaces are essential for the structural assembly of the SC and its function in meiosis.

What are the structural roles of SYCE1 and SYCE1-SIX6OS1 within the SC? Our analyses of *Syce1*^{POF/POF} and *Six6os1* ^{$\Delta 10-21/\Delta 10-21$} mouse strains revealed similar phenotypes with retention of some SYCP1 and SYCE3 recruitment to chromosome axes, with absence or substantial reduction of SYCE1 and SIX6OS1, and lack of recruitment of SYCE2-TEX12. This pattern suggests a hierarchical model of SC assembly in which SYCE1 and SYCE1-SIX6OS1 lie downstream of SYCP1 and SYCE3, and upstream of SYCE2-TEX12 (Fig. 1A), which is consistent with existing knockout data (10, 11, 15–18). The disruption of SYCE3 binding by the POF mutation suggests that its SYCE1-SIX6OS1 complex would be defective for SC recruitment, whereas the SYCE1-SYCE3 interaction, and hence SC recruitment, should be retained for the SYCE1-SIX6OS1 complex of the SIX6OS1 $\Delta 10-21$ internal deletion. This explains the greater severity of the CE loading defect in *Syce1*^{POF/POF} than *Six6os1* ^{$\Delta 10-21/\Delta 10-21$} , in which SYCE1 and SIX6OS1 staining was substantially reduced in the latter (83.77% of SYCE1 reduction, 0.12 ± 0.02 in the *Six6os1* ^{$\Delta 10-21/\Delta 10-21$} versus 0.73 ± 0.21 in the WT; 68.27% of SIX6OS1 reduction, 0.24 ± 0.02 in the *Six6os1* ^{$\Delta 10-21/\Delta 10-21$} versus 0.76 ± 0.15 in the WT) but completely absent in the former. Thus, we conclude that the first and second SYCE1-SIX6OS1 interfaces are essential for initiation of SC CE formation and likely function by stabilizing a local three-dimensional SC structure that mediates recruitment and self-assembly of SYCE2-TEX12 into fibers that mediate SC elongation along the chromosome axis. Furthermore, the SYCE1 POF mutation is likely worsened by its additional disruption of SYCE3 binding that removes the residual SYCE1-SIX6OS1 SC recruitment observed for the SIX6OS1 $\Delta 10-21$ internal deletion.

The existence of SYCE1 core as an isolated antiparallel homodimer and in a 1:1 complex with SIX6OS1_N raises the question of which is the biologically relevant conformation. It is important to highlight that the CD melting temperatures of SYCE1-SIX6OS1_N complexes and isolated SYCE1 dimers are very similar, ranging between 38° and 41°C. In contrast, highly stable SC components SYCE2-TEX12 and SYCP3 have melting temperatures of approximately 65°C (24, 29). Thus, the relatively low melting temperatures of SYCE1-SIX6OS1_N complexes and SYCE1 suggest that they may undergo conformational change in vivo, with each conformation functioning at different stages of meiosis and/or at different locations within the SC. Furthermore, our analysis of SYCE1 infertility-associated mutations and a targeted internal deletion of SIX6OS1 revealed at least four possible conformations of SYCE1 and SYCE1-SIX6OS1 complexes (Fig. 7H). Owing to the direct competition between SIX6OS1_N binding and SYCE1 core dimerization, these conformations could be achieved in the absence of mutations,

through alterations of protein levels, local concentrations, allosteric changes, and posttranslational modifications. Hence, alternative conformations of SYCE1 and SYCE1-SIX6OS1 are intriguing candidates for local structural heterogeneity and the propagation of signals along the length of the SC, which could function in roles such as crossover enforcement and interference. Thus, as we progress toward a full molecular understanding of the mammalian SC, the multivalent SYCE1-SIX6OS1 interactions described herein provide tantalizing possibilities for a dynamic role of SC structure in its enigmatic functions in the mechanics of meiosis.

MATERIALS AND METHODS

Recombinant protein expression and purification

Human SYCE1 sequences were cloned into pHAT4 and pMAT11 vectors (45) for bacterial expression as His- and His-MBP (Maltose-Binding Protein) fusions with TEV (Tobacco Etch Virus) cleavage sites for fusion protein removal. Human SIX6OS1 was cloned into pRSF-Duet1 vectors with a TEV-cleavable N-terminal MBP fusion for coexpression with SYCE1. Proteins were expressed in BL21(DE3) *Escherichia coli* cells (Novagen), in 2xYT (Yeast Extract Tryptone) media. Expression was induced with addition of 0.5 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside with the cells incubated at 25°C for 16 hours. Cells were lysed via sonication in 20 mM Tris (pH 8.0) and 500 mM KCl, followed by centrifugation. Supernatant was applied to an amylose (New England Biolabs) affinity chromatography column, followed by HiTrap Q HP (GE Healthcare) anion exchange chromatography. His- and His-MBP/MBP tags were removed by incubation with TEV protease at 4°C for 16 hours. The cleaved proteins were further purified by HiTrap Q HP (GE Healthcare) anion exchange chromatography followed by size exclusion chromatography (HiLoad 16/600 Superdex 200, GE Healthcare). The purified proteins/complexes were concentrated using Microsep Advance 3 kDa (PALL) centrifugal filter units and stored at –80°C. Protein samples were analyzed for purity using Coomassie-stained SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Protein molecular weights and extinction coefficients were calculated using ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) with protein concentrations determined using a Cary 60 ultraviolet (UV) spectrophotometer (Agilent).

Circular dichroism

Far-UV CD spectra were collected using a Jasco J-810 spectropolarimeter (Institute for Cell and Molecular Biosciences, Newcastle University). Wavelength scans were recorded at 4°C from 260 to 185 nm at 0.2-nm intervals using a 0.2-mm path length quartz cuvette (Hellma). Protein samples were measured at 0.2 to 0.4 mg/ml in 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.5) and 150 mM NaF. Nine measurements were taken for each sample, averaged, buffer-corrected and converted to mean residue ellipticity (MRE) ($[\theta]$) ($\times 1000 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ per residue). Spectral deconvolutions were carried out using the Dichroweb CDSSTR algorithm (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk>). CD thermal melts were recorded at 222 nm between 5° and 95°C, at intervals of 0.5°C with a 1°C/min ramping rate. Protein samples were measured at 0.1 mg/ml in 20 mM Tris (pH 8.0), 150 mM KCl, and 2 mM dithiothreitol (DTT), using a 1-mm path length quartz cuvette (Hellma). The data were plotted as % unfolded after conversion to MRE ($[\theta]_{222,x} - [\theta]_{222,5}) / ([\theta]_{222,95} - [\theta]_{222,5})$. The melting temperature was determined as the temperature at which the proteins are 50% unfolded.

Size exclusion chromatography multiangle light scattering

SEC-MALS analysis of protein samples was carried out at concentrations of 5 to 20 mg/ml in 20 mM Tris (pH 8.0), 150 mM KCl, and 2 mM DTT. Samples were loaded onto a Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) column at 0.5 ml/min using an ÄKTA Pure (GE Healthcare) system. The eluate was fed into a DAWN HELEOS II MALS detector (Wyatt Technology), followed by an Optilab T-REX differential refractometer (Wyatt Technology). SEC-MALS data were collected and analyzed using ASTRA 6 software (Wyatt Technology), using Zimm plot extrapolation with a 0.185 ml/g dn/dc value to determine absolute protein molecular weights.

Size exclusion chromatography small-angle x-ray scattering

SEC-SAXS experiments were carried out on beamline B21 at the Diamond Light Source synchrotron facility (Oxfordshire, UK). Protein samples at concentrations 6 to 20 mg/ml were loaded onto a Superdex 200 Increase 10/300 GL size exclusion chromatography column (GE Healthcare) in 20 mM Tris (pH 8.0) and 150 mM KCl at 0.5 ml/min using an Agilent 1200 high-performance liquid chromatography system. The eluate was fed through the experimental cell, with SAXS data recorded at 12.4 keV, in 3.0-s frames with a detector distance of 4.014 m. ScÅtter 3.0 (www.bioisis.net) was used to subtract and average the frames and carry out the Guinier analysis for the R_g and cross-sectional R_g (R_c). $P(r)$ distributions were fitted using PRIMUS. Ab initio modeling was performed using DAMMIF (46) imposing P1 symmetry. Twenty independent runs were averaged. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC was used to generate images of the SAXS ab initio models.

Yeast two-hybrid

Constructs of human SYCE1 and SIX6OS1 were cloned into pGBKT7 and pGADT7 vectors (Clontech). Y2H experiments were carried out using the Matchmaker Gold system (Clontech) according to the manufacturer's guidelines. Y187 yeast strain was transformed with pGBKT7 vectors, while the Y2H gold strain was transformed with pGADT7 vectors. Yeast transformations were carried out using standard lithium acetate methods. Mating of the two strains was carried out in 0.5 ml 2× YPDA (Yeast Peptone Dextrose Adenine) at 30°C, 40 rpm, by mixing respective colonies. After 24 hours, the cultures were centrifuged and pellets were resuspended in 0.5× YPDA. These were then plated onto SD/-Trp/-Leu to select for mated colonies and onto SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His with X- α -gal to detect mated colonies through ADE1, HIS3, and MEL1 reporter gene activation. Plates were then incubated for 5 days at 30°C.

Production of CRISPR-Cas9-edited mice

For developing the *Syce1*^{POF/POF} model, *Syce1*-single-guide RNA (sgRNA) 5'-TGACTTCTTTCCACTATC-3' targeting the intron 10 was predicted at https://eu.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_SEQUENCE. This crRNA (CRISPR RNA), the tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA), and the ssODN (single-stranded donor oligonucleotides) (5'-GGGACTCTTCCTCCG-AAGCCATGAGGCAGCTGCAGCAATGTAAGATGCAGGGT-GGGCAGGAGGAGAAATGTCTAGCACTGACTTCTTTC-CACACCCCAAGGTAGATCTTCAAGGATGAGAA-CAAGAAAGCTGAGG

AGTTCCTAGAGGCTGCAGCTCAGCAGCACGAGCAGCTGCAGCAGAGGTGCCACCAGCTACAG-3') were produced by chemical synthesis at IDT. The ssODN contains the mutated base

(C>T, p.Gln241*) and the peptidyl-glycine α -amidating monooxygenase (PAM) was mutated by substituting it by the human intron sequence (ACTATCAG > CCCCCAG). The crRNA and tracrRNA were annealed to obtain the mature sgRNA. A mixture containing the sgRNAs, recombinant Cas9 protein (IDT), and the ssODN [Cas9 (30 ng/ μ l), annealed sgRNA (20 ng/ μ l each), and ssODN (10 ng/ μ l)] were microinjected into B6/CBA F2 zygotes (hybrids between strains C57BL/6 J and CBA/J) (47) at the Transgenic Facility of the University of Salamanca. Edited founders were identified by polymerase chain reaction (PCR) amplification (Taq polymerase, NZYTech) with primers flanking the exon 11 (primer F 5'-CTGTAGAGAACT-GATGAAAGT-3' and R 5'-CAAGAAAATATGAAGAGACATAC-3') producing an amplicon of 398 base pairs (bp) for both edited and WT alleles, and either direct sequenced or subcloned into pBlueScript (Stratagene) followed by Sanger sequencing, selecting the point mutation in the targeted region of *Syce1* (fig. S2). For generating the *Six6os1* ^{Δ 10-21/ Δ 10-21} (named as *Six6os1* ^{Δ Δ}), *Six6os1*-crRNA G68 5'-ATCTGTTTGTCTCAGTTTGGAC-3' and *Six6os1*-crRNA G75 5'-TACTTATGTCTTGGCTCATAAC-3' targeting exons 2 and 3 and the ssODN (5'-GTTCTTACTTTATGTATGCTCTTTTATATAT-GGCTTCTGAAAGTTTTATTATTTATTTTACA-CAGTGTCCAAGATGAAATGATAATCTGTTTGT-CAGTTTGCAGACATAAGTATTAAGAAGATACGAT-TCAAAGAATTAATAGTAAGTAGTTTTGCATGAAATAAATATTTAGTCTTTTGGTTTTATCTTATATAGCA-3') were predicted, produced, and microinjected, as previously described. Edited founders with the predicted deletion were identified through PCR using primers flanking this region (primer F 5'-CACTTACATTTTCTTTAAGAATGC-3' and R 5'-CCCCTCTCATA-CATACAAGTTGC-3'). The Δ 10-21 allele was 285 bp long versus 413 bp of the WT allele (fig. S8, A and B). The founders were crossed with WT C57BL/6 J to eliminate possible unwanted off-targets. Heterozygous mice were resequenced and crossed to give rise to edited homozygous. Genotyping was performed by analysis of the PCR products of genomic DNA with primers F and R.

Histology

For histological analysis of ovaries, after the necropsy of the mice, their ovaries were removed and fixed in formol 10%. They were processed into serial paraffin sections and stained with hematoxylin and eosin. The samples were analyzed using a microscope OLYMPUS BX51, and images were taken with a digital camera OLYMPUS DP70.

Immunocytology

Testes were detunicated and processed for spreading using a conventional "dry-down" technique. Oocytes from fetal ovaries (E17.5 embryos) were digested with collagenase, incubated in hypotonic buffer, disaggregated, and fixed in paraformaldehyde. Both meiotic preparations were incubated with the following primary antibodies for immunofluorescence (IF): rabbit α SIX6OS1 R1 and R2 [1:100, Proteogenix (11)], rabbit α SYCE1 17406-1-AP (1:50, Proteintech), guinea pig α SYCE1 (1:100, provided by C. Höög), mouse α SYCP3 immunoglobulin G (IgG) sc-74569 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), rabbit serum α SYCP3 K921 (1:500), rabbit α SYCP1 IgG ab15090 (1:200), guinea pig α SYCE3 (1:20, provided by R. Benavente), guinea pig α SYCE2 (1:100, provided by C. Höög), rabbit α TEX12 IgG (1:100, provided by R. Benavente), rabbit anti- γ -H2AX (ser139) IgG #07-164 (1:200) (Millipore), mouse α MLH1 51-1327GR (1:5, BD Biosciences), rabbit α RAD51 PC130 (1:50, Calbiochem), and rabbit

α DMC1 R1 and R2 (1:500, Proteogenix). The secondary antibodies used were goat Alexa 555 α -mouse A-32727, goat Alexa 488 α -mouse A-11001, donkey Alexa 555 α -rabbit A-31572 (1:200, Thermo Fisher Scientific), goat Alexa 488–Fab α -rabbit 111-547-003, and donkey fluorescein isothiocyanate α -guinea pig 706-095-148 (1:100, Jackson ImmunoResearch). Slides were visualized at room temperature using a microscope (Axioplan 2; Carl Zeiss Inc.) with 63 \times objectives with an aperture of 1.4 (Carl Zeiss Inc.). Images were taken with a digital camera (ORCA-ER; Hamamatsu) and processed with OPENLAB 4.0.3 and Photoshop (Adobe). Quantification of fluorescence signals was performed using ImageJ software.

Cell lines and transfections

HEK293T and COS7 cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Cell lines were tested for mycoplasma contamination (Mycoplasma PCR ELISA, Sigma-Aldrich). They were transfected with Jetpei (PolyPlus) according to the manufacturer's protocol.

Immunoprecipitation and Western blotting

HEK293T cells were transiently transfected, and whole-cell extracts were prepared and cleared with protein G Sepharose beads (GE Healthcare) for 1 hour. The antibody was added for 2 hours, and immunocomplexes were isolated by adsorption to protein G Sepharose beads overnight. After washing, the proteins were eluted from the beads with 2 \times SDS gel-loading buffer 100 mM Tris-HCl (pH 7), 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 200 mM β -mercaptoethanol, and 20% glycerol and loaded onto reducing polyacrylamide SDS gels. The proteins were detected by Western blotting with the indicated antibodies. Immunoprecipitations were performed using mouse α -Flag IgG (5 μ g; F1804, Sigma-Aldrich), mouse α -green fluorescent protein (α -GFP) IgG (4 μ g; CSB-MA000051M0m, Cusabio), mouse α -Myc obtained from hybridoma cell myc-1-9E10.2 ATCC (4 μ g), and ChromPure mouse IgG (5 μ g/1 mg protein; 015-000-003). Primary antibodies used for Western blotting were rabbit α -Flag IgG (1:2000; F7425 Sigma-Aldrich), goat α -GFP IgG (sc-5385, Santa Cruz Biotechnology) (1:3000), and rabbit α -Myc Tag IgG (1:3000; #06-549, Millipore). Secondary horseradish peroxidase-conjugated α -mouse (715-035-150, Jackson ImmunoResearch), α -rabbit (711-035-152, Jackson ImmunoResearch), or α -goat (705-035-147, Jackson ImmunoResearch) antibodies were used at 1:5000 dilution. Antibodies were detected by using Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate from Millipore. Both *Syce1*^{POF} and *Six6os1* ^{Δ 10–21} complementary DNAs (cDNAs) used for IF and coimmunoprecipitation experiments were reverse transcription PCR-amplified (the primers used for it were *Syce1* S 5'-GAGCAGTATGGC-CACCAGACC-3' and *Syce* AS 5'-GAGGAGGGTATTAGGTCCTGC-3'; *Six6os1* S 5'-AGTGTCCAAGATGAATGATAATCTG-3' and *Six6os1* AS 5'-GTTCAAAAATAAATACTCAAAAAAAC-3') from total RNA extracted from *Syce1*^{POF/POF} and *Six6os1* ^{Δ 10–21/ Δ 10–21} mice, respectively. PCR-amplified fragments were cloned in pcDNA3-based mammalian expression vectors with different tags (enhanced GFP or Flag) and verified by Sanger sequencing.

Quantitative PCR

Total RNA was isolated from testis of WT and mutant mice. To analyze the expression of *Syce1* and *Six6os1* mRNAs, equal amounts of cDNA were synthesized using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Life Technologies) and Oligo (dT). Quantitative

PCR (qPCR) was performed using FastStart Universal SYBR Green Master Mix (ROX) (Roche) and specific forward and reverse primers: qSYCE1_F 5'-GGACATGGTGAAAAAGTTGCAG-3' and qSYCE1_R 5'-CAGTTCCTTCTGCAGTTGTC-3' for *Syce1*, and qSIX6OS1_F 5'-GCTGAATGTGGAGATAAAGAG-3' and qSIX6OS1_R 5'-AGGAGTTTCAGGAGTTTGGAGG-3' for *Six6os1*. All qPCR reactions were performed at 95°C for 10 min and then 40 cycles of 95°C for 15 s and 62°C for 1 min on the iQ5 Thermal Cycler (Bio-Rad). β -Actin was amplified as a housekeeping gene with the primers q β -actin_F 5'-GGCACCACACCTTCTACAATG-3' and q β -actin_R 5'-GTGTGGTGAAGCTGTAGCC-3'.

Statistics

To compare counts between genotypes, we used the Welch's *t* test (unequal variances *t* test), which was appropriate as the count data were not highly skewed (i.e., were reasonably approximated by a normal distribution) and, in most cases, showed unequal variance. We applied a two-sided test in all the cases. Asterisks denote statistical significance: **P* < 0.01, ***P* < 0.001, and ****P* < 0.0001.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material for this article is available at <http://advances.sciencemag.org/cgi/content/full/6/36/eabb1660/DC1>

[View/request a protocol for this paper from Bio-protocol.](#)

REFERENCES AND NOTES

1. N. Hunter, Meiotic recombination: The essence of heredity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a016618 (2015).
2. D. Zickler, N. Kleckner, Recombination, pairing, and synapsis of homologs during meiosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, (2015).
3. J. Loidl, Conservation and variability of meiosis across the eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **50**, 293–316 (2016).
4. F. Baudat, Y. Imai, B. de Massy, Meiotic recombination in mammals: Localization and regulation. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 794–806 (2013).
5. C. K. Cahoon, R. S. Hawley, Regulating the construction and demolition of the synaptonemal complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 369–377 (2016).
6. M. Westergaard, D. von Wettstein, The synaptonemal complex. *Annu. Rev. Genet.* **6**, 71–110 (1972).
7. K. Schmekel, B. Daneholt, The central region of the synaptonemal complex revealed in three dimensions. *Trends Cell Biol.* **5**, 239–242 (1995).
8. R. L. Meuwissen, H. H. Offenberger, A. J. Dietrich, A. Riesewijk, M. van Iersel, C. Heyting, A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J.* **11**, 5091–5100 (1992).
9. Y. Costa, R. Speed, R. Öllinger, M. Alsheimer, C. A. Semple, P. Gautier, K. Maratou, I. Novak, C. Höög, R. Benavente, H. J. Cooke, Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *J. Cell Sci.* **118**, 2755–2762 (2005).
10. S. Schramm, J. Fraune, R. Naumann, A. Hernandez-Hernandez, C. Höög, H. J. Cooke, M. Alsheimer, R. Benavente, A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination, and fertility. *PLoS Genet.* **7**, e1002088 (2011).
11. L. Gomez-H, N. Felipe-Medina, M. Sánchez-Martín, O. R. Davies, I. Ramos, I. García-Tuñón, D. G. de Rooij, I. Dereli, A. Tóth, J. L. Barbero, R. Benavente, E. Llano, A. M. Pendas, C14ORF39/SIX6OS1 is a constituent of the synaptonemal complex and is essential for mouse fertility. *Nat. Commun.* **7**, 13298 (2016).
12. G. Hamer, K. Gell, A. Kouznetsova, I. Novak, R. Benavente, C. Höög, Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *J. Cell Sci.* **119**, 4025–4032 (2006).
13. H. H. Offenberger, J. A. Schalk, R. L. Meuwissen, M. van Aalderen, H. A. Kester, A. J. Dietrich, C. Heyting, SCP2: A major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2572–2579 (1998).
14. J. H. Lammers, H. H. Offenberger, M. van Aalderen, A. C. Vink, A. J. Dietrich, C. Heyting, The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1137–1146 (1994).

15. F. A. T. de Vries, E. de Boer, M. van den Bosch, W. M. Baarends, M. Ooms, L. Yuan, J.-G. Liu, A. A. van Zeeland, C. Heyting, A. Pastink, Mouse *Sycp1* functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev.* **19**, 1376–1389 (2005).
16. E. Bolcun-Filas, E. Hall, R. Speed, M. Taggart, C. Grey, B. de Massy, R. Benavente, H. J. Cooke, Mutation of the mouse *Syce1* gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair. *PLOS Genet.* **5**, e1000393 (2009).
17. E. Bolcun-Filas, Y. Costa, R. Speed, M. Taggart, R. Benavente, D. G. de Rooij, H. J. Cooke, SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. *J. Cell Biol.* **176**, 741–747 (2007).
18. G. Hamer, H. Wang, E. Bolcun-Filas, H. J. Cooke, R. Benavente, C. Hoog, Progression of meiotic recombination requires structural maturation of the central element of the synaptonemal complex. *J. Cell Sci.* **121**, 2445–2451 (2008).
19. L. Yuan, J. G. Liu, J. Zhao, E. Brundell, B. Daneholt, C. Höög, The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol. Cell* **5**, 73–83 (2000).
20. F. Yang, R. D. L. Fuente, N. A. Leu, C. Baumann, K. J. McLaughlin, P. J. Wang, Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis. *J. Cell Biol.* **173**, 497–507 (2006).
21. L. Yuan, J. G. Liu, M. R. Hoja, J. Wilbertz, K. Nordqvist, C. Höög, Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science* **296**, 1115–1118 (2002).
22. J. M. Dunce, O. M. Dunne, M. Ratcliff, C. Millán, S. Madgwick, I. Usón, O. R. Davies, Structural basis of meiotic chromosome synapsis through SYCP1 self-assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**, 557–569 (2018).
23. K. Schucker, T. Holm, C. Franke, M. Sauer, R. Benavente, Elucidation of synaptonemal complex organization by super-resolution imaging with isotropic resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 2029–2033 (2015).
24. J. L. Syrjanen, L. Pellegrini, O. R. Davies, A molecular model for the role of SYCP3 in meiotic chromosome organisation. *eLife* **3**, (2014).
25. J. L. Syrjanen, I. Heller, A. Candelli, O. R. Davies, E. J. G. Peterman, G. J. L. Wuite, L. Pellegrini, Single-molecule observation of DNA compaction by meiotic protein SYCP3. *eLife* **6**, e22582 (2017).
26. J. Lu, Y. Gu, J. Feng, W. Zhou, X. Yang, Y. Shen, Structural insight into the central element assembly of the synaptonemal complex. *Sci. Rep.* **4**, 7059 (2014).
27. O. M. Dunne, O. R. Davies, A molecular model for self-assembly of the synaptonemal complex protein SYCE3. *J. Biol. Chem.* **294**, 9260–9275 (2019).
28. O. M. Dunne, O. R. Davies, Molecular structure of human synaptonemal complex protein SYCE1. *Chromosoma* **128**, 223–236 (2019).
29. O. R. Davies, J. D. Maman, L. Pellegrini, Structural analysis of the human SYCE2–TEX12 complex provides molecular insights into synaptonemal complex assembly. *Open Biol.* **2**, 120099 (2012).
30. A. Kouznetsova, R. Benavente, A. Pastink, C. Hoog, Meiosis in mice without a synaptonemal complex. *PLOS ONE* **6**, e28255 (2011).
31. H. F. Horn, D. I. Kim, G. D. Wright, E. S. M. Wong, C. L. Stewart, B. Burke, K. J. Roux, A mammalian KASH domain protein coupling meiotic chromosomes to the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **202**, 1023–1039 (2013).
32. X. Ding, R. Xu, J. Yu, T. Xu, Y. Zhuang, M. Han, SUN1 is required for telomere attachment to nuclear envelope and gametogenesis in mice. *Dev. Cell* **12**, 863–872 (2007).
33. P. J. Romanienko, R. D. Camerini-Otero, The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol. Cell* **6**, 975–987 (2000).
34. K. Yoshida, G. Kondoh, Y. Matsuda, T. Habu, Y. Nishimune, T. Morita, The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol. Cell* **1**, 707–718 (1998).
35. M. A. Handel, J. C. Schimenti, Genetics of mammalian meiosis: Regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 124–136 (2010).
36. A. Geisinger, R. Benavente, Mutations in genes coding for synaptonemal complex proteins and their impact on human fertility. *Cytogenet. Genome Res.* **150**, 77–85 (2016).
37. P. Laissue, Aetiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure: From genetic linkage analysis to next generation sequencing. *Mol. Cell. Endocrinol.* **411**, 243–257 (2015).
38. S. Caburet, V. A. Arboleda, E. Llano, P. A. Overbeek, J. L. Barbero, K. Oka, W. Harrison, D. Vaiman, Z. Ben-Neriah, I. García-Tuñón, M. Fellous, A. M. Pendás, R. A. Veitia, E. Vilain, Mutant cohesin in premature ovarian failure. *N. Engl. J. Med.* **370**, 943–949 (2014).
39. E. Maor-Sagie, Y. Cinnamon, B. Yaacov, A. Shaag, H. Goldsmid, S. Zenvirt, N. Laufer, C. Richler, A. Frumkin, Deleterious mutation in SYCE1 is associated with non-obstructive azoospermia. *J. Assist. Reprod. Genet.* **32**, 887–891 (2015).
40. M. Pashaei, M. M. Rahimi Bidgoli, D. Zare-Abdollahi, H. Najmabadi, R. Haji-Seyed-Javadi, F. Fatehi, A. Alavi, The second mutation of SYCE1 gene associated with autosomal recessive nonobstructive azoospermia. *J. Assist. Reprod. Genet.* **37**, 451–458 (2020).
41. L. de Vries, D. M. Behar, P. Smirin-Yosef, I. Lagovsky, S. Tzur, L. Basel-Vanagaite, Exome sequencing reveals SYCE1 mutation associated with autosomal recessive primary ovarian insufficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, E2129–E2132 (2014).
42. E. P. Mimitou, L. S. Symington, Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 264–272 (2009).
43. S. K. Mahadevaiah, J. M. A. Turner, F. Baudat, E. P. Rogakou, P. de Boer, J. Blanco-Rodríguez, M. Jasin, S. Keeney, W. M. Bonner, P. S. Burgoyne, Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat. Genet.* **27**, 271–276 (2001).
44. A. N. Lupas, M. Gruber, The structure of α -Helical coiled coils. *Adv. Protein Chem.* **70**, 37–78 (2005).
45. J. Peranen, M. Rikonen, M. Hyvonen, L. Kaariainen, T7 vectors with modified T7lac promoter for expression of proteins in Escherichia coli. *Anal. Biochem.* **236**, 371–373 (1996).
46. D. Franke, D. I. Svergun, DAMMIF, a program for rapid-iterative determination in small-angle scattering. *J. Appl. Cryst.* **42**, 342–346 (2009).
47. P. Singh, J. C. Schimenti, E. Bolcun-Filas, A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications. *Genetics* **199**, 1–15 (2015).

Acknowledgments: We thank Diamond Light Source and the staff of beamline B21 (proposals sm15836, sm21777, and sm23510). We thank H. Waller for assistance with CD data collection.

Funding: O.R.D. is a Sir Henry Dale Fellow jointly funded by the Wellcome Trust and Royal Society (grant number 104158/Z/14/Z). This work was supported by MINECO (BFU2017-89408-R) and by Junta de Castilla y León (CSI239P18). F.S.-S., L.G.-H., and N.F.-M. are supported by European Social Fund/JCyLe grants (EDU/556/2019, EDU/1083/2013, and EDU/310/2015). CIC-IBMCC is supported by the Programa de Apoyo a Planes Estratégicos de Investigación de Estructuras de Investigación de Excelencia cofunded by the Castilla-León autonomous government and the European Regional Development Fund (CLC–2017–01). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. **Ethics statement:** Mice were housed in a temperature-controlled facility (specific pathogen free) using individually ventilated cages, standard diet, and a 12-hour light/dark cycle, according to European Union laws at the “Servicio de Experimentación Animal, SEA.” Mouse protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the University of Salamanca (USAL). We made every effort to minimize suffering and to improve animal welfare. Blinded experiments were not possible since the phenotype was obvious between WT and mutant mice for all of the experimental procedures used. No randomization methods were applied since the animals were not divided in groups or treatments. The minimum size used for each analysis was two animals per genotype. **Author contributions:** F.S.-S., L.G.-H., O.M.D., N.F.-M., C.G.-P., M.S.-M., and O.R.D. performed experiments. O.R.D. and A.M.P. designed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. A.M.P., E.L., and O.R.D. supervised and designed the work. **Competing financial interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper and/or the Supplementary Materials. Additional data related to this paper may be requested from the authors.

Submitted 4 February 2020

Accepted 17 July 2020

Published 2 September 2020

10.1126/sciadv.abb1660

Citation: F. Sánchez-Sáez, L. Gómez-H, O. M. Dunne, C. Gallego-Páramo, N. Felipe-Medina, M. Sánchez-Martín, E. Llano, A. M. Pendas, O. R. Davies, Meiotic chromosome synapsis depends on multivalent SYCE1-SIX6OS1 interactions that are disrupted in cases of human infertility. *Sci. Adv.* **6**, eabb1660 (2020).

Supplementary Materials for

Meiotic chromosome synapsis depends on multivalent SYCE1-SIX6OS1 interactions that are disrupted in cases of human infertility

Fernando Sánchez-Sáez, Laura Gómez-H, Orla M. Dunne, Cristina Gallego-Páramo, Natalia Felipe-Medina, Manuel Sánchez-Martín, Elena Llano, Alberto M. Pendas*, Owen R. Davies*

*Corresponding author. Email: owen.davies@newcastle.ac.uk (O.R.D.); amp@usal.es (A.M.P.)

Published 2 September 2020, *Sci. Adv.* **6**, eabb1660 (2020)
DOI: 10.1126/sciadv.abb1660

This PDF file includes:

Figs. S1 to S11
Table S1

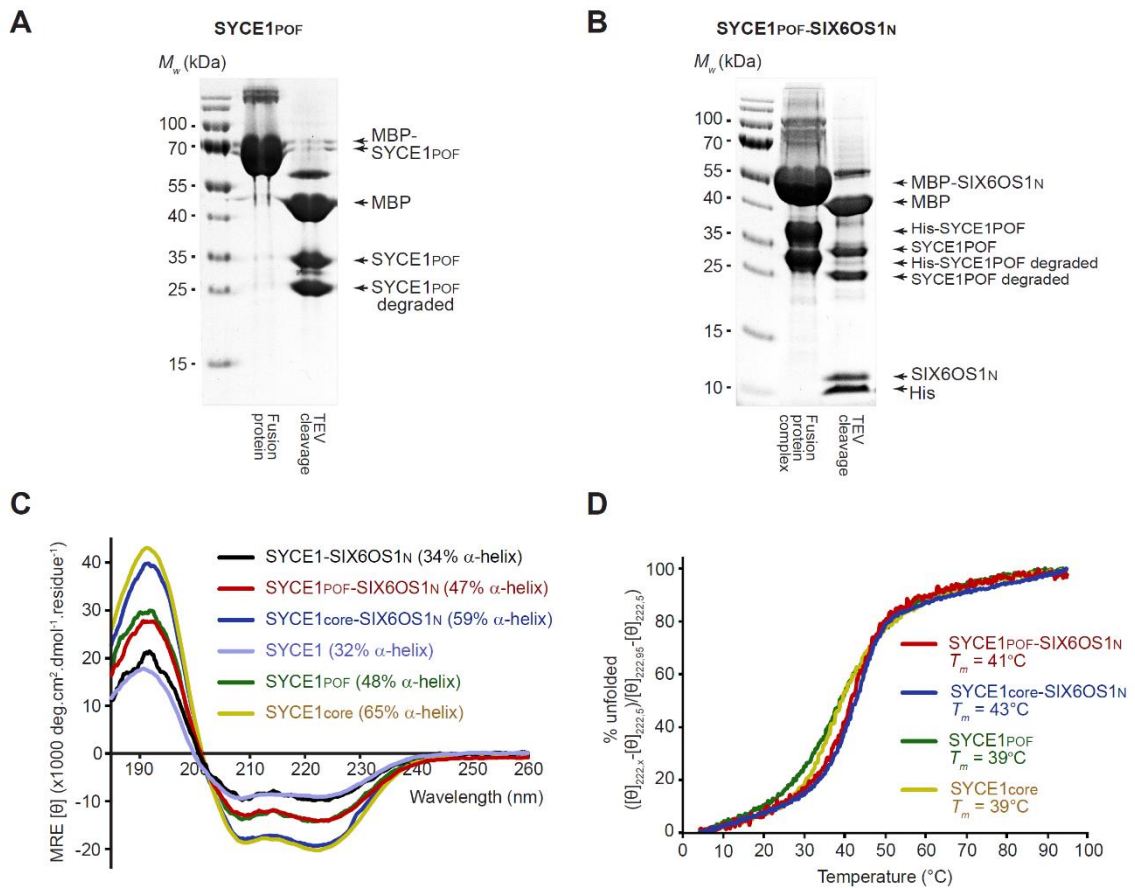


Fig. S1. Analysis of recombinant proteins and complexes.

(A,B) SDS-PAGE of purified fusion proteins and subsequent cleavage through incubation with TEV protease. (A) MBP-SYCE1POF consists of two bands of similar MW, which both undergo cleavage by TEV protease to liberate two dominant products labelled SYCE1POF and SYCE1POF degraded. (B) The His-SYCE1POF component of its complex with MBP-SIX6OS1N consists of two bands of equal intensity, which undergo cleavage by TEV protease to liberate two dominant products labelled SYCE1POF and SYCE1POF degraded. The TEV cleaved products of both proteins/complexes exhibit the same apparent molecular weights, which are consistent with them representing the full SYCE1POF protein and its C-terminal degradation down to the structural core of SYCE1. (C) Far UV circular dichroism (CD) spectra recorded between 260 nm and 185 nm in mean residue ellipticity, MRE ($[\theta]$) ($\times 1000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}.\text{residue}^{-1}$). Data were deconvoluted using the CDSSTR algorithm

revealing the helical contents indicated. **(D)** CD thermal denaturation recording the CD helical signature at 222 nm between 5°C and 95°C, as % unfolded; estimated melting temperatures (T_m) are indicated.

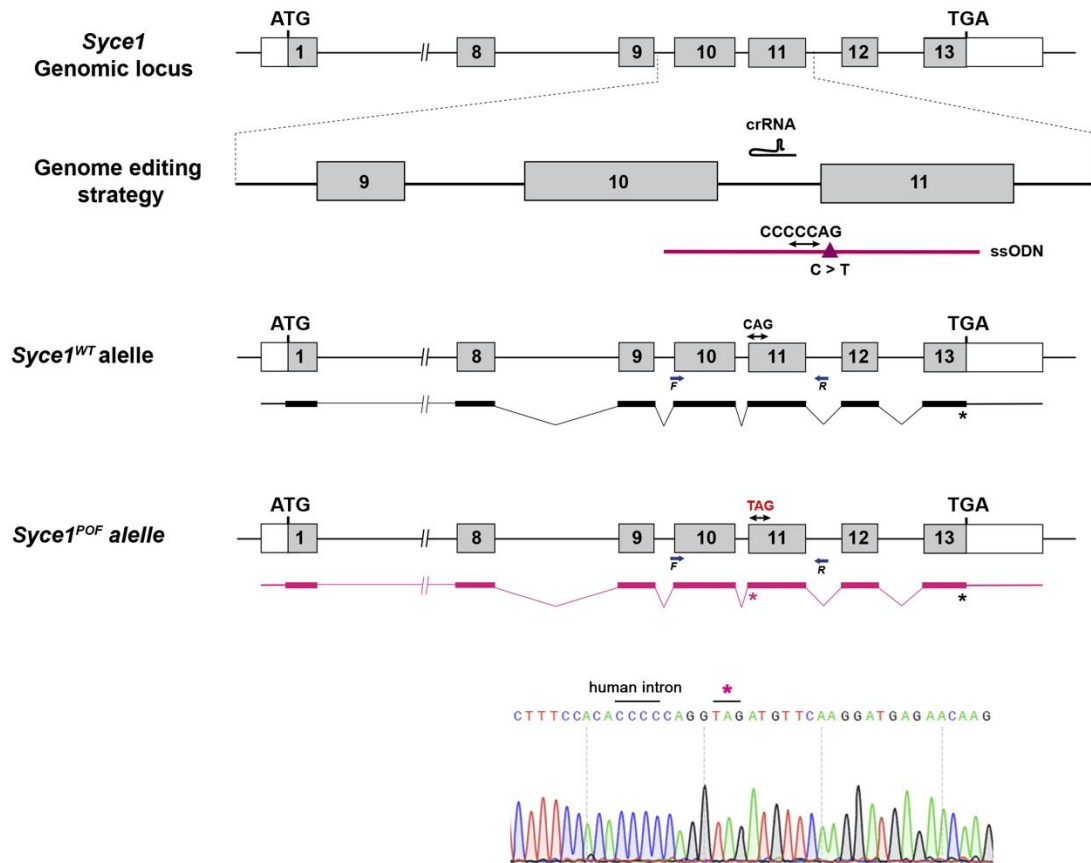


Fig. S2. Generation of *Syce1*^{POF/POF} mouse model.

Diagrammatic representation of the mouse *Syce1* locus (WT) and the genome editing strategy showing the crRNA located on intron 10 and the ssODN targeting a region between exon 10 and 11 carrying the point mutation (c.613C>T, p.Gln241*) in addition to the PAM substituted by the human intron sequence (see methods, the mouse sequence caCTATcag was mutated to the human sequence caCCCCcag). The corresponding coding exons (grey boxes) and non-coding exons (open boxes) are represented. Thin (non-coding) and thick (coding sequences) lines under exons represent the expected transcript derived from WT (black) and *Syce1*^{POF} edited allele (pink). ATG, initiation codon; TGA and *, stop codon. The newly generated stop codon in the edited transcript is indicated (*pink). Primers for PCR genotyping (F and R) are

represented by arrows. The nucleotide sequence of the edited region derived from PCR amplification of DNA from the *Syce1*^{POF/POF} is indicated.

```

SP|Q8N0S2|SYCE1_HUMAN          MAGRSLTSKA--EPTAGAVDRAEKAGGQDTSSQKIEDLMEMVQKLQKVGSLPEPRVEVLINR 59
SP|Q9D495|SYCE1_MOUSE          MATRPQPLGMEPEGSADLLHGPEGARGQYVSTQKIEDLMDMVKLQKVGSLPEPRIEVLINR 61
TR|A0A2I3SHS9|A0A2I3SHS9_PANTR MAGRSLTSKA--EATAGAMDRAEKAGGQDTSSQKIEDLMEMVQKLQKVGSLPEPRVEVLINR 59
SP|Q32LK9|SYCE1_BOVIN          MAGRPGSS-N--AEAAGAVGPTDEARGQAESSQKIEDLMEMVQKLQKVGSLPEPRVEVLINR 58
TR|F1SCT5|F1SCT5_PIG          MAGRPPGS-S---EESAGALGRAGEAGGQAKSSQKIEDLMEMVQKLQKAGSLEPKVEVLINR 58
TR|F1PG50|F1PG50_CANLF        -----MEPAEKAGGQAKSSQKIEDLLEMVQKLQKAGSLEPRVEVLINR 43
TR|F7BBC0|F7BBC0_ORNAN        ME-----KNQDQDRSGLGMREKAMEHTEYKVEAEDLVMLVEKLQKAGTLEPRIEDLIK 54
TR|G3W340|G3W340_SARHA        -----KMEEMISI 8
TR|H3ALY1|H3ALY1_LATCH        FELARVPLGGKAAAVGLLFHPSGVIRGNEESRLELEDLLKIVKELKQAGKTVPRIEELVKK 61
TR|K7FPR7|K7FPR7_PELSI        -----GTLPEPRMDDLVRGR 13
                                     :::

SP|Q8N0S2|SYCE1_HUMAN          INEVQQAkkKANKDLGEARTICEALQKELDSLHGKVLHKEILSKKQETLRILRLHQCQEKE 120
SP|Q9D495|SYCE1_MOUSE          INEVQQAkkKASEELGEAQTVDNLQKELDLLREKVRKLDILNRKEETLRIMQLHQCQEKE 122
TR|A0A2I3SHS9|A0A2I3SHS9_PANTR INEVQQAkkKANKDLGEAWTICEALQKELDSLCKRGPVA-----LPTETLRILRLHQCQEKE 114
SP|Q32LK9|SYCE1_BOVIN          INEVQQAkkKASEELGDARTVWETLQKELDSLGSGEKVRKLEILSKKQETLRVLRHQCQDKE 119
TR|F1SCT5|F1SCT5_PIG          INEVQQAkkKASEELGEARTVWETLQKELDSLGSGEKVRKLEILSKKQETLRILRLHQCQEKE 119
TR|F1PG50|F1PG50_CANLF        INEVQQAkkKASEELGEARTVWEALQKEMDSLGSGEKVRKLEILNKKQETLRILRLHQCQEKE 104
TR|F7BBC0|F7BBC0_ORNAN        IKDLQVRKRNANEELKTRAHSEALQRELDLNAEKAHLEELLNQKQETLMLRLQCEEKQ 115
TR|G3W340|G3W340_SARHA        ISQLQQAQRCTNEELQRNQLKMETLKEELEDKLNLEMTQLEETLNMKQGTLLLLQERRREEE 69
TR|H3ALY1|H3ALY1_LATCH        LKQLQGGKNAVDEELCEARKCREALQKELDKLSAESFHLEELYNKKKETLQLLQFYKERE 122
TR|K7FPR7|K7FPR7_PELSI        LRKLRQAKQALSQELQDSQARSKELQEELEERCFFHPPSWEEICSQKQELRLTLQLRSQETE 74
                                     : .:* : . : : * . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
                                     : .:* : . : : * . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

SP|Q8N0S2|SYCE1_HUMAN          SEHRKH--TMLQECCKERISALNLQIEEEKNKQRQLRLAFEEQLEDLMGQHKDLWDFHMPPE 179
SP|Q9D495|SYCE1_MOUSE          SEAQRKH--SMLQECCKERISALNSQIDKEKAKLRKRLDFEEHLEFLMSQHKDLTEFHKPE 181
TR|A0A2I3SHS9|A0A2I3SHS9_PANTR SEHRKH--TMLQECCKERISALNLQIEEEKNKQRQLRLAFEEQLEDLMGQHKDLWDFHRPE 173
SP|Q32LK9|SYCE1_BOVIN          NEAQRKQ--TMLQECCKERISALNSQIEEKNKQRQLRLDFEEQLEDLMGQYKDLWEFHKPE 178
TR|F1SCT5|F1SCT5_PIG          SEAQRKQ--TMLQECCKERISALNSQIEEKNKQRKRLDFEEQLEDLMGQHKDLWEFHKPE 178
TR|F1PG50|F1PG50_CANLF        SEAQRKH--TMLQECCKERISALNSQIEEKNKQRQLRLDFEEQLEDLMGQHKDLWKFHKPE 163
TR|F7BBC0|F7BBC0_ORNAN        AEAQRQ--EVSQCGKQRIEELTSKIQEEKLRKQRKQRMFQDQLEEMMEKHKSLWEFHTSE 174
TR|G3W340|G3W340_SARHA        KKALRQ--TTSMECLQNVATLNAKIQEEKLRKRLRKEFEQLEELMQHKHELMEFHTPQ 128
TR|H3ALY1|H3ALY1_LATCH        NEIKRQL--NHSEGCKQRVEQITSIQEEKLRKQRKQRMFEMQLEELMEKHKSWEFHNTSE 181
TR|K7FPR7|K7FPR7_PELSI        AEGQRLGCSGLTQERKQHIIEELAAKIQEEKLRKQRKRLRLEFEQLLQELGELMHQSL-----E 131
                                     : * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
                                     : * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

SP|Q8N0S2|SYCE1_HUMAN          RLAKEICALDSSKEQLLKEEKLKVKATLEDVVKHQLCSLCSG----EGPSTLDEGLFLRSQEA 236
SP|Q9D495|SYCE1_MOUSE          HLTKEMCVLDSSKEQLLKEEKLKMKVLELDVQRQLCALGGP----EGSSSLIEGLFLRSHEA 238
TR|A0A2I3SHS9|A0A2I3SHS9_PANTR RLAREICALDSSKEQLLKEEKLKVKATLEDMMKHQLCSLCSG----EGPSTLDEGLFLRSQEA 230
SP|Q32LK9|SYCE1_BOVIN          RLALISTLDSSKEQLLKEEKLVEAKLEDVVKHRLCSQFGA----KGTINEGLFLRSPEA 234
TR|F1SCT5|F1SCT5_PIG          QLALEIDALDSSKEQLLKEEKLVEAKLEDVVKHRLCSQFGA----KGCSTITEGLFLRSQEA 235
TR|F1PG50|F1PG50_CANLF        QMAREIDTLDSSKEHLKKEEKLVEAKLEDVVKHRLCSQFGA----DGCSTIAEGLFLRSQEA 220
TR|F7BBC0|F7BBC0_ORNAN        SLAREISNIEDSKHLLNEEKVVKQKIDIMKQLETLSQ----PGAADFSEGLFLRSPEA 230
TR|G3W340|G3W340_SARHA        RLLKEISNLMLTKEQLLEEKAVQEKLDALEKQIADLPAMTKEMMDEGTESVFLHSKEA 189
TR|H3ALY1|H3ALY1_LATCH        SLKKEICNIENAKQQFLSEEKMLQKQLQLEKEINSLRH----AGVAFNEEDVFLRSQEA 237
TR|K7FPR7|K7FPR7_PELSI        KLAAEIHSMAESKEHLLEDRLIQASLAQVEKQLDLSLPQ----ARAALSQERMFLKSQEA 185
                                     : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
                                     : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

SP|Q8N0S2|SYCE1_HUMAN          AATVQLFQEEHRAEELAAAAQRHQQLQKQKQQQQK--RQLKKEELEKHKGMQVPAQAQS 295
SP|Q9D495|SYCE1_MOUSE          AAAMQMFKDENKKAEEFLEAAAQQHEQLQQRCHQLQK--RQLKKEELEKHKGVQILAHSTQ 297
TR|A0A2I3SHS9|A0A2I3SHS9_PANTR AATVQLFQEEHRAEELAAAAQRHQQLQKQKQQQQK--RQLKKEELEKHKGMQVPAQAQS 289
SP|Q32LK9|SYCE1_BOVIN          AAVVHLFEEENRKAQELLEAAAQRQEQQLQKQKQQQLQK--RQLKKEELEKLGQVLAQAQS 293
TR|F1SCT5|F1SCT5_PIG          AAVVHLFEEENRKAQELLEAAAQRQEQQLQKQKQQQLQK--RQLKKEELEKLGQVPAQSQR 294
TR|F1PG50|F1PG50_CANLF        AAVVHLFEEENRKAQGLLDAATHHHEQLQKQKQQQLQK--RQLKKEELEKLGMIIPVQAQS 279
TR|F7BBC0|F7BBC0_ORNAN        IAAVHLFEEENEKATEFLEAASRHHLELQKQYQR----- 269
TR|G3W340|G3W340_SARHA        AATMHLFEEENKAMEFLEAASQKYMVKQKSL----- 227
TR|H3ALY1|H3ALY1_LATCH        AVTKQLFEEENSQVKSFLQASQRHFELELQKCN----- 275
TR|K7FPR7|K7FPR7_PELSI        STALQLFQQENKSAHELEAASLRHSELQKQYKQQLFQQENKSAHELE----- 239
                                     .. :* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
                                     .. :* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

SP|Q8N0S2|SYCE1_HUMAN          TQEEEAGPGDVASPKPLKGERPGAA---HQAGPDVLIGQEDTLHPDLSPRGFQEIKELF 351
SP|Q9D495|SYCE1_MOUSE          --NEEDSSWRMASPKPVEVHEETAQDQERPSRT----- 329
TR|A0A2I3SHS9|A0A2I3SHS9_PANTR TQEEEAGPGDVASPKPLKGERPGAA---LQAGPDVLIGQEDTLHPDLSPRGFQEIKELF 345
SP|Q32LK9|SYCE1_BOVIN          KQEEEAGLGEAANPKPLGVSEEKDQEPSTK----- 323
TR|F1SCT5|F1SCT5_PIG          KQEEGASPGEAANPKTLGVSEEKDPELPIKQGLMSS----- 330
TR|F1PG50|F1PG50_CANLF        KQEEGAGPGEANPKPLGLVIQEKDPEMPTEKGPMP----- 315
TR|F7BBC0|F7BBC0_ORNAN        -----
TR|G3W340|G3W340_SARHA        -----
TR|H3ALY1|H3ALY1_LATCH        -----
TR|K7FPR7|K7FPR7_PELSI        -----

```

Fig. S3. Sequence alignment of SYCE1.

Sequence alignment of SYCE1 homologues in vertebrates. Amino acid sequences of *H. sapiens* (human, Q8N0S2), *M. musculus* (mouse, Q9D495), *P. troglodytes* (Chimp,

A0A2I3SHS9), *B. taurus* (Bovine, Q32LK9), *S. scrofa* (Pig, F1SCT5), *C. lupus familiaris* (dog, F1PG50), *O. anatinus* (Platypus, F7BBC0), *S. harrisii* (*Tasmanian devil*, G3W340), *L. chalumnae* (West india coelacanth, H3ALY1) and *P. sinensis* (Chinese turtle, K7FPR7) are derived from the UniProt database. Human and mouse SYCE1 have an overall sequence identity of 65% (78% similarity), with their structural cores exhibiting 74% sequence identity (87% similarity). The residue affected by the POF mutation c.613C>T (p.Gln241*) is conserved between human and mouse, and is indicated in red.

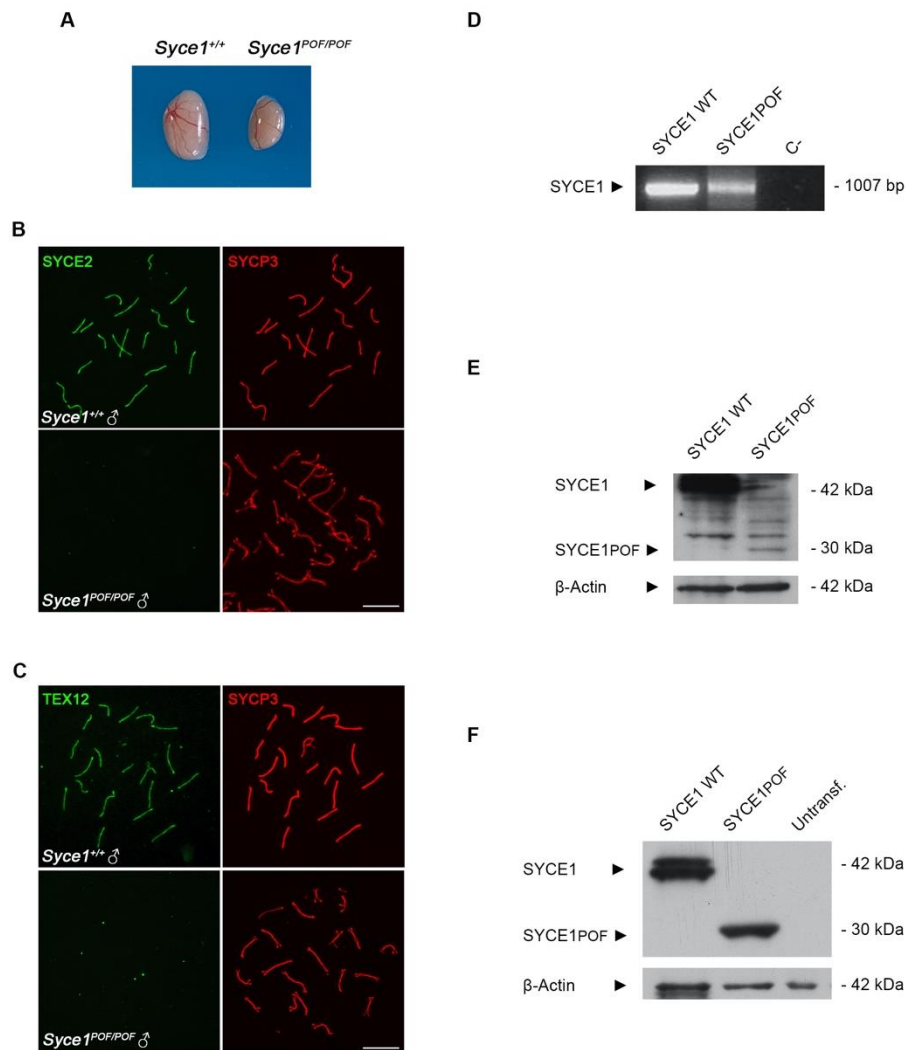


Fig. S4. Characterization of *Syce1*^{POF/POF} male mice whose spermatocytes failed to assemble the CE.

(A) Testis from WT and *Syce1*^{POF/POF} mice showing reduced testis size. (B-C) Double immunolabeling of spermatocyte spreads with SYCP3 (red) and the CE proteins SYCE2 and TEX12 (green). *Syce1*^{POF/POF} zygotene-like spermatocytes show absence of both (B) SYCE2 and (C) TEX12 from the AEs. (D) RT-PCR analysis of *Syce1* and *Syce1*^{POF} cDNA from mouse testis. C- lane shows a negative control without cDNA template. Testis RNA was extracted from mice of 13 dpp for the WT and 3 months for the *Syce1*^{POF} in order to have a similar cell content. (E) Western blot analysis of protein

extracts from wild type and *Syce1*^{POF/POF} mice testis P13 with a specific antibody against SYCE1. β -Actin was used as loading control. The corresponding bands to SYCE1 and SYCE1^{POF} are indicated in the left of the panel. **(F)** HEK293T cells were transfected with a plasmid encoding mSYCE1 or mSYCE^{POF}. The whole extracts were analyzed by western blot using rabbit α -SYCE1. Immunodetection of β -actin was used as loading control. The rabbit α -SYCE1 antibody detected both mSYCE1 and mSYCE^{POF}. Photo credit (A): Laura Gómez-H, Instituto de Biología Celular y Molecular del Cáncer.

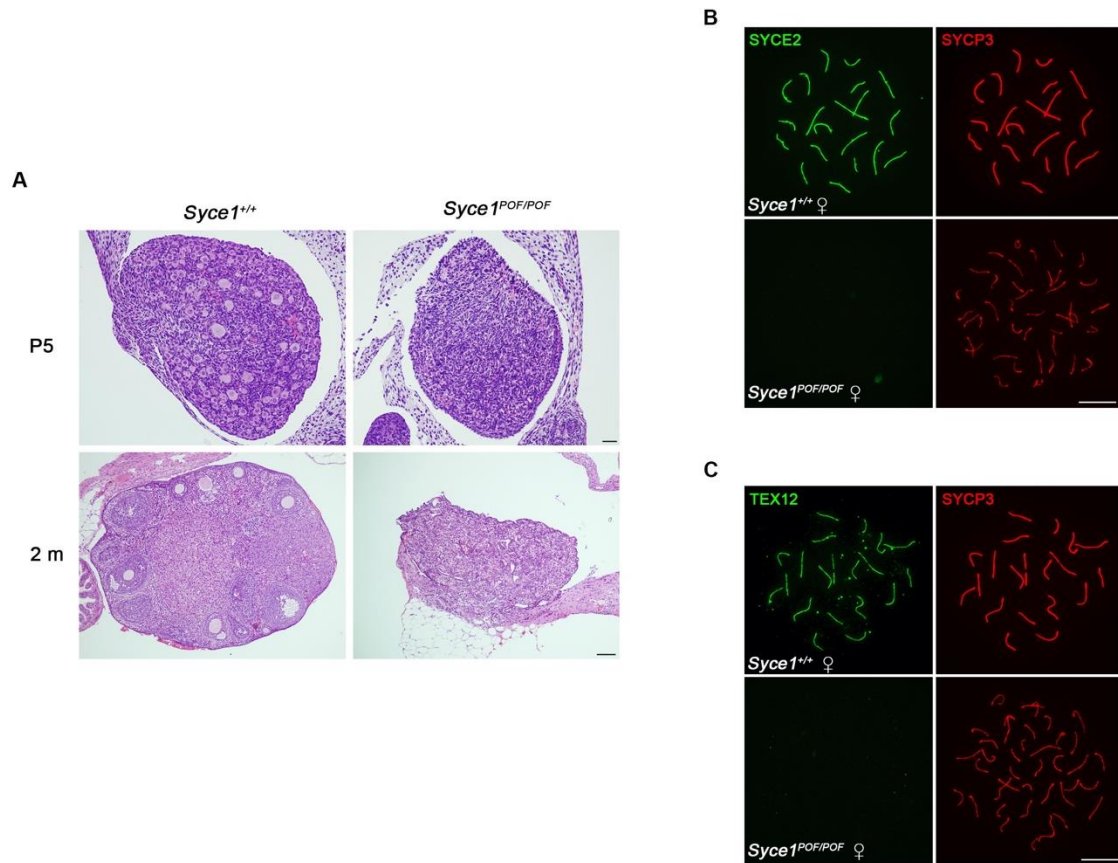


Fig. S5. *Syce1*^{POF/POF} oocytes are not able to assemble the CE.

(A) Hematoxylin-eosin staining of sections of ovaries from WT and *Syce1*^{POF/POF} female mice showing depletion of follicles at 5 days (P5) and 2 months of age (2m). Scale bars represent 20 μm in P5 and 50 μm at 2m ovaries. (B-C) Double immunolabeling of oocyte spreads with SYCP3 (red) and the CE proteins (B) SYCE2 and (C) TEX12 (green), showing the absence of both CE proteins from the AEs in the *Syce1*^{POF/POF} zygotene-like oocytes. Scale bars represent 10 μm .

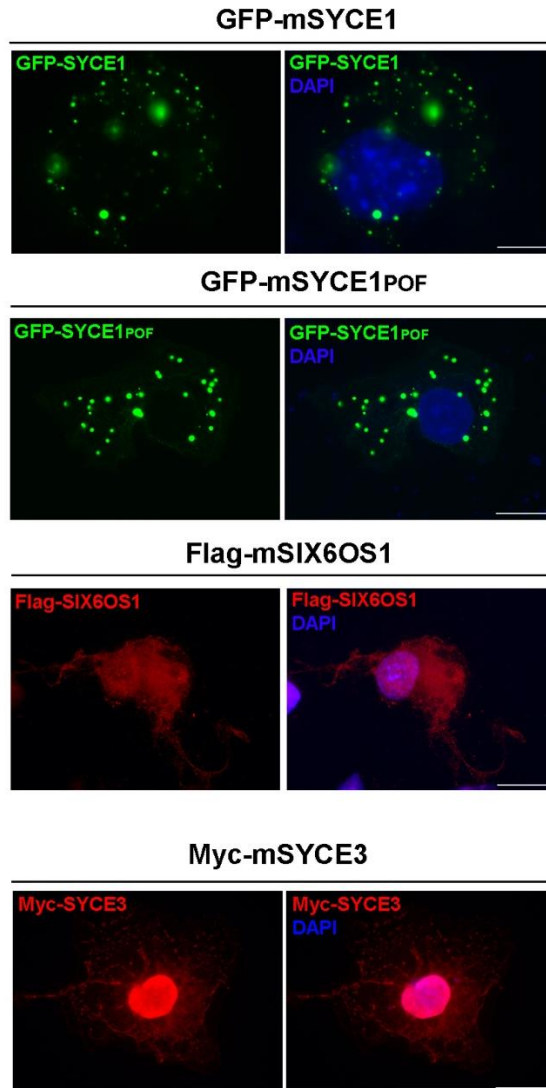


Fig. S6. Cellular localization of CEs overexpressed in COS7 cells.

COS7 cells were transfected with mouse *Syce1*, *Syce1POF*, *Six6os1* and *Syce3* individually as indicated. SYCE1 and SYCE1POF show a speckled pattern in the cytoplasm, while SIX6OS1 has a cytoplasmic distribution. *Syce3* is highly expressed in the nucleus with a widespread low signal in the cytoplasm. Scale bars represent 20 μm .

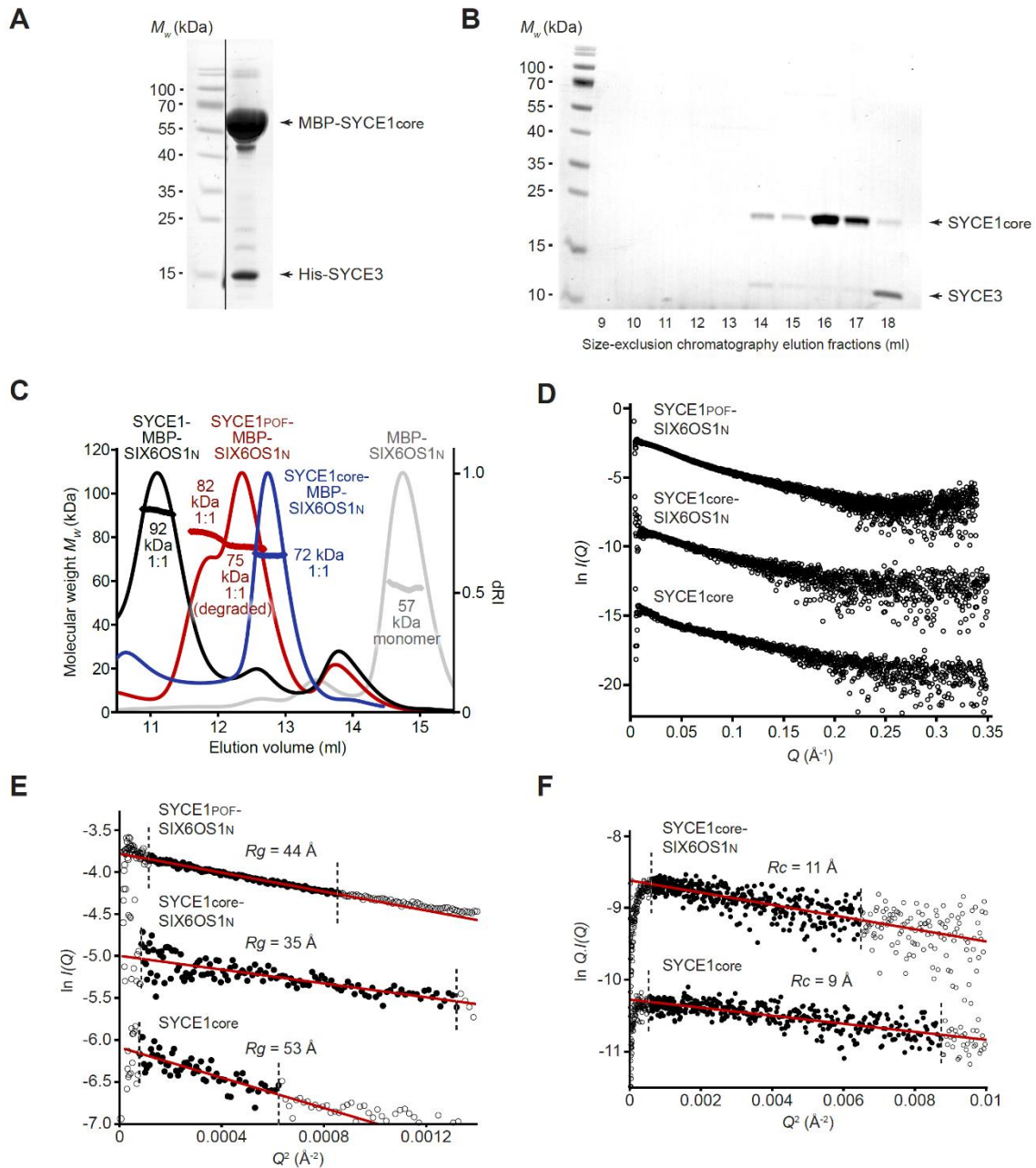


Fig. S7. Biochemical and biophysical analyses of SYCE1 complexes.

(A) Amylose pull-down following co-expression of MBP-SYCE1core and His-SYCE3, demonstrating a direct interaction. (B) Size-exclusion chromatography demonstrating the dissociation of SYCE1core and SYCE3 that were purified following co-expression. (C) SEC-MALS analysis of His- and MBP-tagged SYCE1-SIX6OS1 complexes. SYCE1core-SIX6OS1N (blue), SYCE1POF-SIX6OS1N (red) and full-length SYCE1-

SIX6OS1N (black) are 1:1 complexes of 72 kDa, 82 kDa (75 kDa for the degradation product complex) and 92 kDa, respectively (theoretical 1:1 – 75 kDa, 83 kDa and 95 kDa). **(D-F)** SEC-SAXS analysis of SYCE1core-SIX6OS1N, SYCE1POF-SIX6OS1N and SYCE1core. **(D)** SEC-SAXS scattering curves. **(E)** SEC-SAXS Guinier analysis to determine the radius of gyration (R_g). The linear fits are highlighted in black and are demarcated by dashed lines. The $Q.R_g$ values were < 1.3 . **(F)** SEC-SAXS Guinier analysis to determine the radius of gyration of the cross-section (R_c). The linear fits are highlighted in black and are demarcated by dashed lines. The $Q.R_c$ values were < 1.3 .

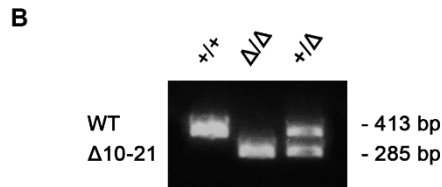
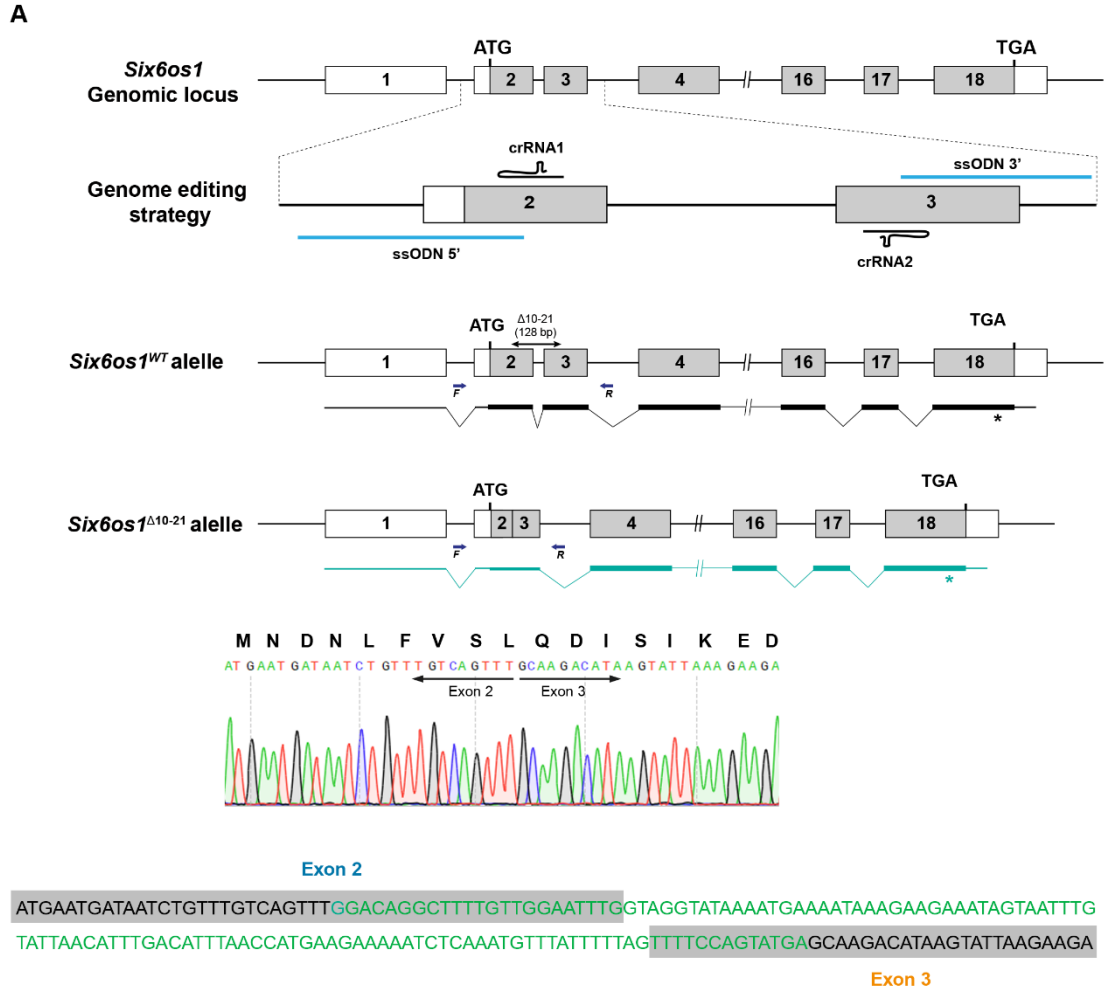


Fig. S8. Generation of *Six6os1*^{Δ10-21/Δ10-21} mutant mice.

(A) Schematic representation of the genome editing strategy for the generation of the *Six6os1* Δ10-21 mutant mouse model showing the crRNAs located on exons 2 and 3. The ssODN comprises the ssODN 5' and the ssODN 3' sequences, targeting the 5' of exon 2 and the 3' of exon 3 respectively (see methods). The corresponding coding exons (grey boxes) and non-coding exons (open boxes) are represented. Thin (non-coding) and thick (coding sequences) lines under exons represent the expected transcript

derived from wild-type (black) and *Six6os1* Δ 10-21 edited allele (green). ATG, initiation codon; TGA and *, stop codon. Primers for PCR genotyping (F and R) are represented by arrows. The nucleotide sequence of the edited region shows the deletion of 128 bp derived from PCR amplification of DNA from the *Six6os1* ^{Δ 10-21/ Δ 10-21} (named in the figures *Six6os1* ^{Δ Δ}), in addition to the corresponding amino-acids sequence. The sequence of the edited region of *Six6os1* is indicated below labelling the deleted region in green letters. **(B)** PCR analysis of genomic DNA from three littermate progeny of *Six6os1* ^{Δ 10-21/*WT*} crosses. The PCR amplification with primers F and R revealed 413 and 285 bp fragments for wild-type and edited alleles respectively. Wild-type (+/+), Δ 10-21 homozygous (Δ/Δ) and heterozygous ($\Delta/+$) animals.

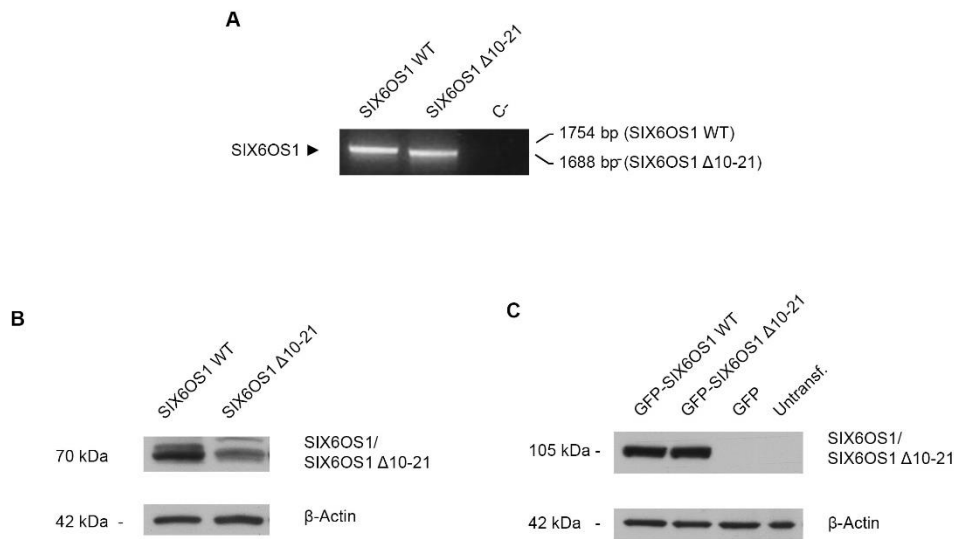


Fig. S9. Analysis of the expression of *Six6os1*^{Δ10-21}

(A) RT-PCR analysis of *Six6os1* and *Six6os1*^{Δ10-21} cDNA from mouse testis. C- lane shows a negative control without cDNA template. RNA was extracted from mice of 13 dpp for the WT and 3 months for the *Six6os1*^{Δ10-21} in order to have a similar cell content. (B) Western blot analysis of protein testis extracts from *Six6os1*^{Δ10-21/Δ10-21} and wild type adult mice with a specific antibody against SIX6OS1. β-Actin was used as loading control. The corresponding bands to SIX6OS1 and SIX6OS1 Δ10-21 are indicated in the left of the panel. (C) HEK293T cells were transfected with a plasmid encoding GFP-mSIX6OS1 or GFP-mSIX6OS1 Δ10-21. The whole extracts were analyzed by western blot using rabbit α-SIX6OS1. Immunodetection of β-actin was used as loading control.

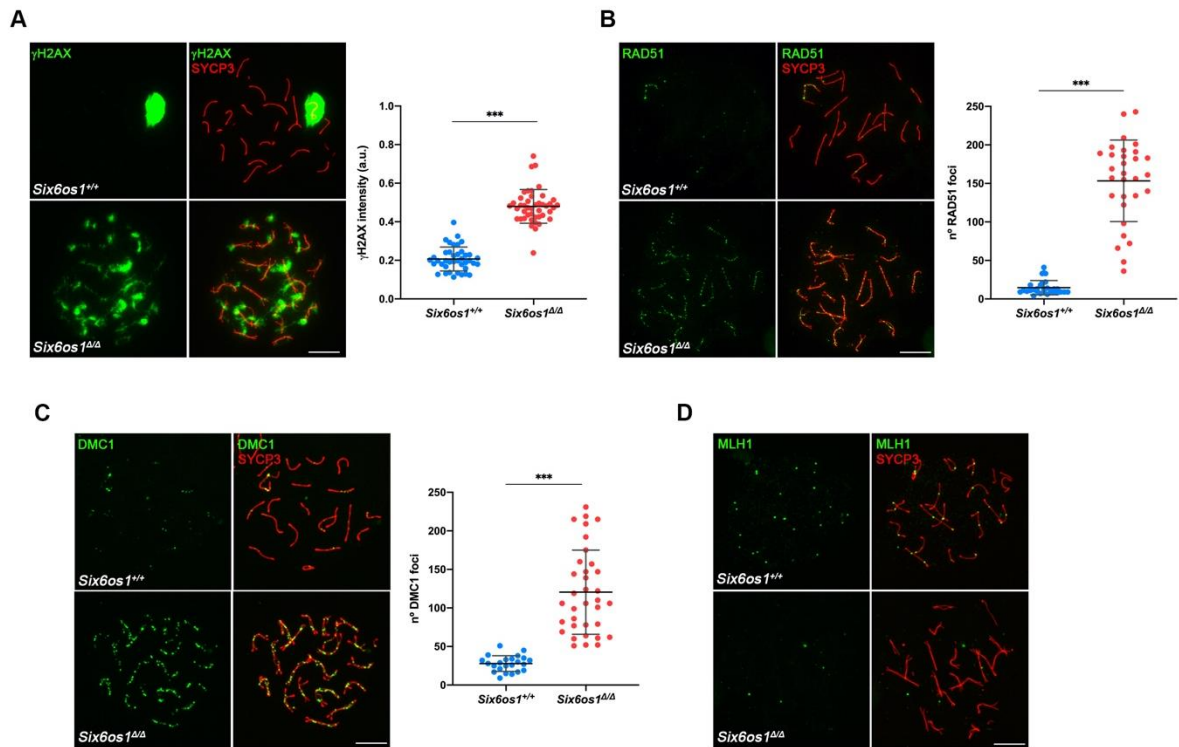


Fig. S10. DSBs are generated but defectively repaired in *Six6os1*^{Δ10-21/Δ10-21} spermatocytes.

(A) Double immunofluorescence of γ -H2AX (green) and SYCP3 (red) in spermatocyte spreads from WT and *Six6os1*^{ΔΔ} mice. In WT pachytenes γ -H2AX intensely labels the chromatin of the sex bivalent, while in the *Six6os1*^{ΔΔ} arrested zygotene-like γ -H2AX labeling remains in the chromatin. (B-C) Double immunolabeling of (B) RAD51 or (C) DMC1 (green) and SYCP3 (red). Both RAD51 and DMC1 remain associated to the AEs in the *Six6os1*^{ΔΔ} zygotene-like spermatocytes, showing increased number of foci than the WT. (D) Double immunolabeling of MLH1 (green) and SYCP3 (red). MLH1 is absent from the AEs in the *Six6os1*^{ΔΔ} arrested spermatocytes. Scale bars represent 10 μ m. Plots under the image panels represent the quantification of fluorescence intensity (A) or number of foci (B-C) from WT and zygotene-like arrested spermatocytes. Welch's *t*-test analysis: * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

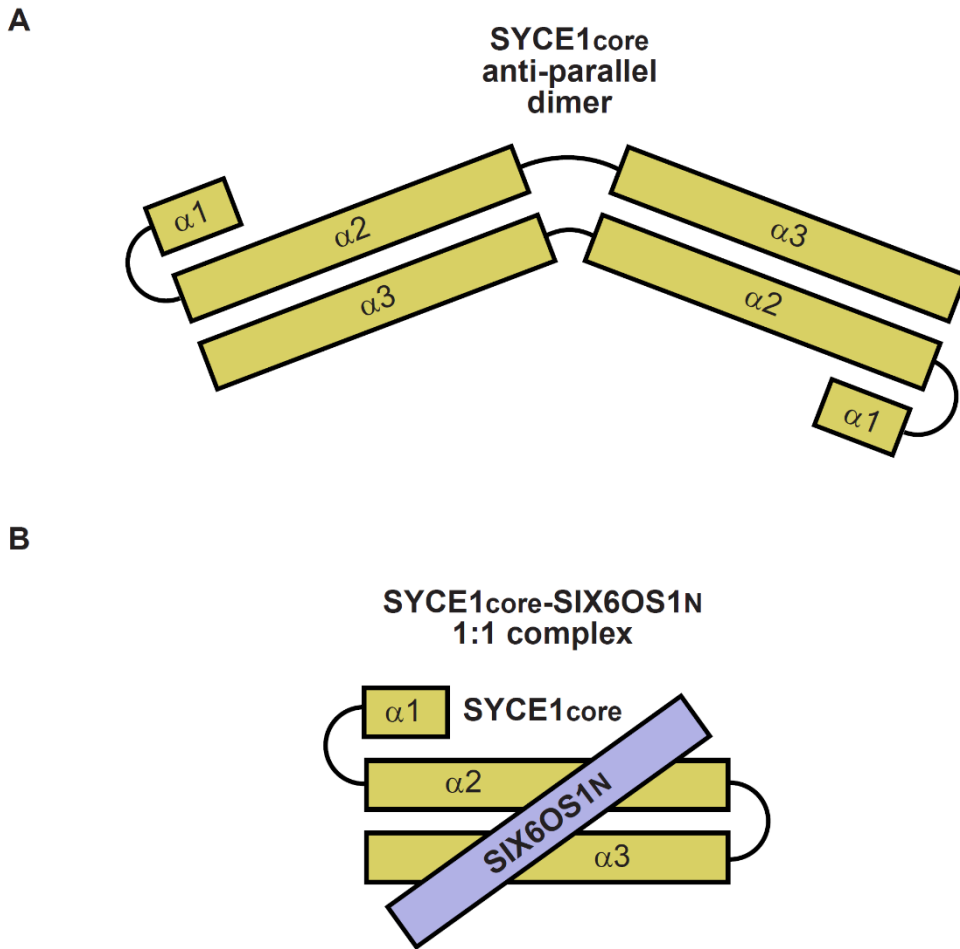


Fig. S11. Structural models of SYCE1_{core} and SYCE1_{core}-SIX6OS1N.

(**A,B**) Theoretical structural models of (**A**) the SYCE1_{core} anti-parallel dimer and (**B**) the SYCE1_{core}-SIX6OS1N 1:1 complex. The SYCE1_{core} helices labelled α 1-3 correspond to approximate amino-acid boundaries of 25-50, 52-113 and 118-179, respectively. The models presented are compatible with the biophysical data presented herein and our previously reported structure of SYCE1_{core} (28). We propose that SIX6OS1N-binding may occur through a single SYCE1_{core} chain undergoing helix-turn-loop formation between helices α 2 and α 2, to create a structure that resembles one half of the SYCE1_{core} dimer and interacts with SIX6OS1N as a 1:1 complex.

A

	Condition					<i>β-Actin</i>					Normalized 2 ^{-Ct}	WT/POF Ratio
	Ct ₁	Ct ₂	Ct ₃	Ct _{mean}	2 ^{-Ct}	Ct ₁	Ct ₂	Ct ₃	Ct _{mean}	2 ^{-Ct}		
<i>Syce1</i> ^{+/+}	25.09	25.58	24.60	25.09	2.80·10 ⁻⁸	16.55	16.65	16.87	16.69	9.46·10 ⁻⁶	2.96·10 ⁻³	46.96
<i>Syce1</i> ^{POF/POF}	29.27	29.20	30.00	29.49	1.33·10 ⁻⁹	15.17	15.40	16.04	15.54	0.10·10 ⁻⁵	6.30·10 ⁻⁵	

B

	Condition				<i>β-Actin</i>				Normalized 2 ^{-Ct}	WT/Δ Ratio
	Ct ₁	Ct ₂	Ct _{mean}	2 ^{-Ct}	Ct ₁	Ct ₂	Ct _{mean}	2 ^{-Ct}		
<i>Six6os1</i> ^{+/+}	24.96	23.02	23.99	6.00·10 ⁻⁸	11.97	15.75	13.86	6.73·10 ⁻⁵	8.92·10 ⁻⁴	0.29
<i>Six6os1</i> ^{Δ/Δ}	21.28	22.08	21.68	2.98·10 ⁻⁷	13.09	13.58	13.34	9.68·10 ⁻⁵	3.08·10 ⁻³	

Table S1. Analysis of the relative expression of *Syce1*^{POF} and *Six6os1*^{Δ10-21} in testis from mutant mice.

(A) Relative transcription of *Syce1* and *Syce1*^{POF} mRNA by RT-qPCR in testis from WT and *Syce1*^{POF/POF} mice. (B) Relative transcription of *Six6os1* and *Six6os1*^{Δ10-21} mRNA by RT-qPCR in testis from WT and *Six6os1*^{Δ10-21/Δ10-21} mice. *β-Actin* transcription was used to normalize the expression in both (A) and (B). RNA was extracted from testis at 13 dpp for the WT and 3 months of age for the mutant mice in order to have similar germ cell content, showing zygotenes as the most developed cell type.

Article

The Oocyte-Specific Linker Histone H1FOO Is Not Essential for Mouse Oogenesis and Fertility

Fernando Sánchez-Sáez ^{1,†} , Raquel Sainz-Urruela ^{1,†} , Natalia Felipe-Medina ¹, Yazmine B. Condezo ¹ , Manuel Sánchez-Martín ² , Elena Llano ^{1,3} and Alberto M. Pendás ^{1,*}

¹ Molecular Mechanisms Program, Centro de Investigación del Cáncer, Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

² Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

³ Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

* Correspondence: amp@usal.es

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Meiosis is a highly conserved specialized cell division process that generates haploid gametes. Many of its events are associated with dynamically regulated chromosomal structures and chromatin remodeling, which are mainly modulated by histone modifications. Histone H1 is a linker histone essential for packing the nucleosome into higher-order structures, and H1FOO (H1 histone family, member O, oocyte-specific) is a H1 variant whose expression pattern is restricted to growing oocytes and zygotes. To further explore the function of H1FOO, we generated mice lacking the *H1foo* gene by the CRISPR/Cas9 technique. Herein, we combine mouse genetics and cellular studies to show that *H1foo*-null mutants have no overt phenotype, with both males and females being fertile and presenting no gross defects in meiosis progression nor in synapsis dynamics. Accordingly, the histological sections show a normal development of gametes in both male and female mice. Considering the important role of oocyte constituents in enhancing mammalian somatic cell reprogramming, we analyzed iPSCs generation in *H1foo* mutant MEFs and observed no differences in the absence of H1FOO. Taken all together, in this work we present the first in vivo evidence of H1FOO dispensability for mouse fertility, clarifying the debate in the field surrounding its essentiality in meiosis.

Keywords: fertility; oogenesis; meiosis; linker histone H1FOO



Citation: Sánchez-Sáez, F.; Sainz-Urruela, R.; Felipe-Medina, N.; Condezo, Y.B.; Sánchez-Martín, M.; Llano, E.; Pendás, A.M. The Oocyte-Specific Linker Histone H1FOO Is Not Essential for Mouse Oogenesis and Fertility. *Cells* **2022**, *11*, 3706. <https://doi.org/10.3390/cells11223706>

Academic Editor: Fernando Monje-Casas

Received: 2 November 2022

Accepted: 18 November 2022

Published: 21 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Gametogenesis is defined by a unique and highly dynamic program of events that results in the generation of haploid gametes [1]. This reduction in the genetic content requires the precise regulation of several processes including homologous chromosome synapsis, crossover (CO) formation, subsequent homolog segregation, and chromatin remodeling [2].

Oocyte meiotic maturation is a complex and vital process necessary to attain full oocyte competence, as well as for a proper early embryonic development [3]. In contrast to most of the other meiotic processes, female mammalian meiosis undergoes two different arrests during oocyte maturation. First, the developing oocytes arrest before birth at the diplotene stage with a germinal vesicle (GV) in their nucleus. This state is maintained until meiosis resumption at puberty in response to luteinizing hormones (LHs). Meiosis resumes after GV breakdown (GVBD), completing prophase I and progressing until the second arrest at metaphase II. Finally, female meiosis is completed after fertilization [4].

In the nucleus, DNA is packaged in fundamental subunits named nucleosomes. Histones are basic nuclear proteins that play a fundamental role in the generation of the nucleosome structure of the chromosomal fiber in eukaryotes. Nucleosomes consist of approximately 146 bp of DNA wrapped around a histone octamer composed of pairs of

each of the four core histones (H2A, H2B, H3, and H4) [5]. In eukaryotes, a fifth class of histones termed H1 acts as a linker histone, binding to the DNA between nucleosomes and promoting a higher order of chromatin organization [6]. This is the most heterogeneous family of histones, consisting of eleven different variants in mammals: seven somatic H1s (H1⁰, H1a, H1b, H1c, H1d, H1e, and H1x) and four germ-specific H1s (the testis-specific H1t, H1T2, and H1LS1 and the oocyte-specific H1FOO) [7–9]. Largely, H1 molecules consist of a highly conserved central globular domain with more variable tail regions at both their N- and C-terminal ends [10]. In addition to their structural role, H1 histones may be involved in gene expression regulation. Nonetheless, the aforementioned existence of multiple H1 subtypes and post-translational modifications hampers the study of the roles that this protein family might play in heterochromatin formation, transcriptional regulation, and embryogenesis.

H1FOO (H1 histone family, member O, oocyte-specific) is a replication-independent histone that is a member of the histone H1 family, a mammalian homolog of the oocyte-specific linker histone B4 of the frog, and of the cs-H1 linker histone of the sea urchin [11]. Unlike most intronless histone's genes, the single-copy *H1foo* gene contains five exons and is highly expressed in oocytes and early embryos [12]. H1FOO presents a N-terminal domain containing multiple potential phosphorylation sites, and a long C-terminal tail rich in acidic amino acids [11]. Both its N-terminal and globular domains are required for the correct association with chromatin in the oocyte nucleus [13]. Functionally, it has been suggested to play a role in the regulation of the chromosomal fiber. *H1foo* knockdown in one-cell-stage embryos leads to a tighter state of the chromatin structure in the pronucleus and to an increase in the deposition of the histone H3 variant H3.1/3.2 in the peripheral region of the pronucleus [14]. In addition to this, the implication of H1FOO in oocyte maturation is still under strong debate [15–17]. Due to this, the *in vivo* analysis of H1FOO deficiency could shine light on the molecular mechanisms that regulate the early steps in gametogenesis [18].

After fertilization, and in order to generate a totipotent embryonic genome, maternal and paternal chromatins are required to be comparably ordered. To do so, paternal chromatin undergo an extensive decondensation whilst protamines are replaced by maternal core histones and H1FOO [13,19], facilitating nuclear reprogramming. Eventually, the two pronuclei fuse, and by the end of the two-cell stage, H1FOO is replaced by somatic H1s to meet the requirements of the embryonic transcriptional program.

Histones are also involved in epigenetic modifications that occur during induced cellular reprogramming, since it may either promote or inhibit gene transcription by altering chromatin folding [20]. As a response to ectopic expression of the reprogramming factors, chromatin remodeling takes place [21] and, although the dynamics of somatic H1s differentiation and reprogramming are described [22], H1FOO involvement *in vivo* in these processes is still to be assessed in detail.

Given the absence of functional studies, we address the first *in vivo* functional analysis of H1FOO-deficient mice. Homozygous mutant mice show no overt phenotype, with both males and females being completely fertile. Accordingly, the histological sections reveal a normal development of gametes in female mutant mice and the fertility assessment is similar to the wild-type one. Analyzed in greater detail, oogenesis shows no defects in synapsis nor in reaching the first meiotic arrest. Moreover, the absence of H1FOO in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) does not reduce the reprogramming efficiency of somatic cells to induced pluripotent stem cells (iPSCs). Taken all together, our results represent the first *in vivo* evidence of the lack of essentiality of H1FOO for mouse gametogenesis.

2. Materials and Methods

2.1. Mice

In order to develop the mutant mouse model (*H1foo*^{-/-}), making use of CRISPR/Cas9 genome editing technique, crRNAs were predicted at the website https://eu.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM (accessed on 20 September 2017). The

crRNAs, the tracrRNA, and the single single-stranded oligodeoxynucleotides (ssODNs) were produced by chemical synthesis at IDT (crRNAs and ssODN sequences are listed in Table S1). The crRNAs and tracrRNA were annealed to obtain the mature sgRNA. A mixture containing the sgRNAs, recombinant Cas9 protein (IDT), and the ssODN was microinjected into F2 zygotes (hybrids between strains C57BL/6J and CBA/J) at the Transgenic Facility of the University of Salamanca. Edited founders were identified by polymerase chain reaction (PCR) amplification (Taq polymerase, NZYTech) with primers listed in Table S2, producing amplicons of 272 or 268 base pairs (bp) for either wild-type (WT) or edited alleles, respectively. These amplicons were subcloned into pBlueScript (Stratagene), followed by Sanger sequencing for a verification in detail of the editing. Selected founders, carrying the desired alleles, were crossed with wild-type mice to eliminate possible unwanted off-targets. Heterozygous mice were re-sequenced and crossed to generate the edited homozygotes.

2.2. Fertility Assessment

For the experiment, 8 week old $H1foo^{+/-}$ males were mated with $H1foo^{+/-}$ females over the course of 4–12 months, and similarly, distinct matings of $H1foo^{-/-}$ males with $H1foo^{-/-}$ females were set. In order to further evaluate the existence of a delay phenotype in successive generations, a $H1foo^{-/-}$ F2 male was mated with two $H1foo^{-/-}$ F2 females for five months. The presence of copulatory plug was examined daily, and the number of pups per litter was recorded.

2.3. Histology

For the histological analysis, adult ovaries were fixed in 10% formol during 24 h at room temperature. After that, they were processed into serial paraffin sections, and stained with hematoxylin–eosin. The samples were analyzed using a microscope OLYMPUS BX51 and images were taken with a digital camera OLYMPUS DP70.

2.4. Immunocytology and Antibodies

Testes were detunicated and processed for spreading using a conventional “dry-down” technique [23]. Oocytes from 16.5 days post coitum (dpc) fetal ovaries were digested with collagenase, incubated in hypotonic buffer, disaggregated, and fixed in 40 μ L of fixative buffer (1% (*w/v*) paraformaldehyde, 5 mM sodium borate, 0.15% Triton X-100, 3 mM DTT, pH 9.2). The meicyte preparations were incubated with the following primary antibodies, diluted in 1x phosphate-buffered saline (PBS), for immunofluorescence (IF): rabbit α H1FOO serum (kindly provided by Dr. J. D. Hennebold, 1:20), mouse α SYCP3 IgG sc-74569 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, 1:1000), rabbit α SYCP1 IgG ab15090 (Abcam, Cambridge, United Kingdom, 1:200), rabbit anti- γ H2AX (ser139) IgG #07–164 (Millipore, Burlington, MA, USA, 1:200), ACA or purified human α -centromere proteins IgG 15–235 (Antibodies Incorporated, Davis, CA, USA, 1:5), rabbit α SUN1 M-300 sc-135075 (Santa Cruz, 1:25). The secondary antibodies used were goat Alexa 555 α -mouse A-32727, goat Alexa 488 α -mouse A-11001, donkey Alexa 555 α -rabbit A-31572, (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA, 1:200), goat Alexa 488-Fab α -rabbit 111-547-003, and donkey TRITC α -human 709-025-149 (Jackson ImmunoResearch, Cambridge, United Kingdom, 1:100). Slides were mounted with Vectashield mounting medium supplemented with DAPI and visualized at room temperature using a Leica DM6000b microscope with an 63x objective. Images were taken with a digital camera (ORCA-ER C4742-80; Hamamatsu) and processed with Leica LAS X Life Science Software and Adobe Photoshop CS6 (Adobe, San José, CA, USA). Quantification of fluorescent signaling was performed using ImageJ 1.52a software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

2.5. Unfertilized Oocyte Collection for Metaphase II Analysis

Ovaries from 53 day old unstimulated females were removed and oocytes were subsequently released by puncturing ovaries using 30-gauge needles. Primary oocytes were cultured in KSOM medium (Millipore, Burlington, MA, USA) and covered with a drop

of mineral oil for 18 h at 37 °C in order to let them reach the metaphase II stage. Afterwards, cell suspension was fixated in a slide with the fixative buffer previously described in Materials and Methods (Section 2.4.), and the corresponding α H1FOO IF was performed.

2.6. Cell Culture

Primary MEFs were derived from embryonic day 13.5 (E13.5) embryos following standard procedures. MEFs and HEK293T (obtained from the American Type Culture Collection, ATCC) cell lines were cultured at atmospheric oxygen pressure in Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO, Thermo Fisher) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO, Thermo Fisher), and 2 mM glutamine. HEK293T cells were transfected with Jetpei (PolyPlus) according to the manufacturer's protocol. Cell lines were tested for mycoplasma contamination using the Mycoplasma PCR ELISA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

2.7. iPSCs Generation from MEFs

For iPSCs generation, 2.5×10^5 MEFs were infected with retroviral particles produced by HEK293T transfected with constitutive retroviral expression vectors pMXs KLF4, OCT4, and SOX2. The iPSC media (DMEM, GIBCO; 15% KSR, Invitrogen, Thermo Fisher; 1% non-essential amino acids, MEM NEE 100X GIBCO; 1% PSG; 0.002% β -mercaptoethanol 50 mM, GIBCO; 1000 units/mL LIF, Merck, Darmstadt, Germany) was changed every 24 h until iPSC colonies appeared (after \sim 14 days of treatment). Three weeks after plating the MEFs, reprogramming plates were stained for alkaline phosphatase activity (AP detection kit, Merck).

2.8. Statistics

In order to compare counts between genotypes, we used the Welch's *t*-test (unequal variances *t*-test), which was appropriate as the count data were not highly skewed (i.e., were reasonably approximated by a normal distribution) and, in most cases, showed unequal variance. We applied a two-sided test in all the cases. N.s. (not significant): *p*-value \geq 0.05.

2.9. Ethics Statement

All the experiments were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the University of Salamanca (USAL) and the Ethics Committee of the Spanish Research Council (CSIC) under protocol #00–245. Accordingly, all the mouse protocols used in this work were approved by the Animal Experimentation committees mentioned above. Specifically, mice were always housed in a temperature-controlled facility (specific pathogen free, SPF) using individually ventilated cages, standard diet, and a 12 h light/dark cycle, according to EU law (63/2010/UE) and the Spanish royal law (53/2013) at the "Servicio de Experimentación Animal", SEA. In addition, animal suffering was always minimized, and we made every effort to improve animal welfare during the life of the animals.

3. Results

3.1. Generation of H1FOO Knockout Mice

Murine *H1foo* gene is encoded by five exons at chromosome 6, with the ATG codon located in the first exon and the STOP codon in the fifth. To gain further insight into H1FOO function, we generated a mouse model by CRISPR–Cas9 genome editing harboring a deletion of exons 2 and 3, which expectedly gives rise to a null allele (deletion of 70% of the coding sequence) (Figure 1a). A selected founder carrying the desired edition was crossed with WT C57BL/6J mice, and the heterozygous offspring were intercrossed to obtain the homozygous mutant mice, which were identified by PCR (Figure 1a).

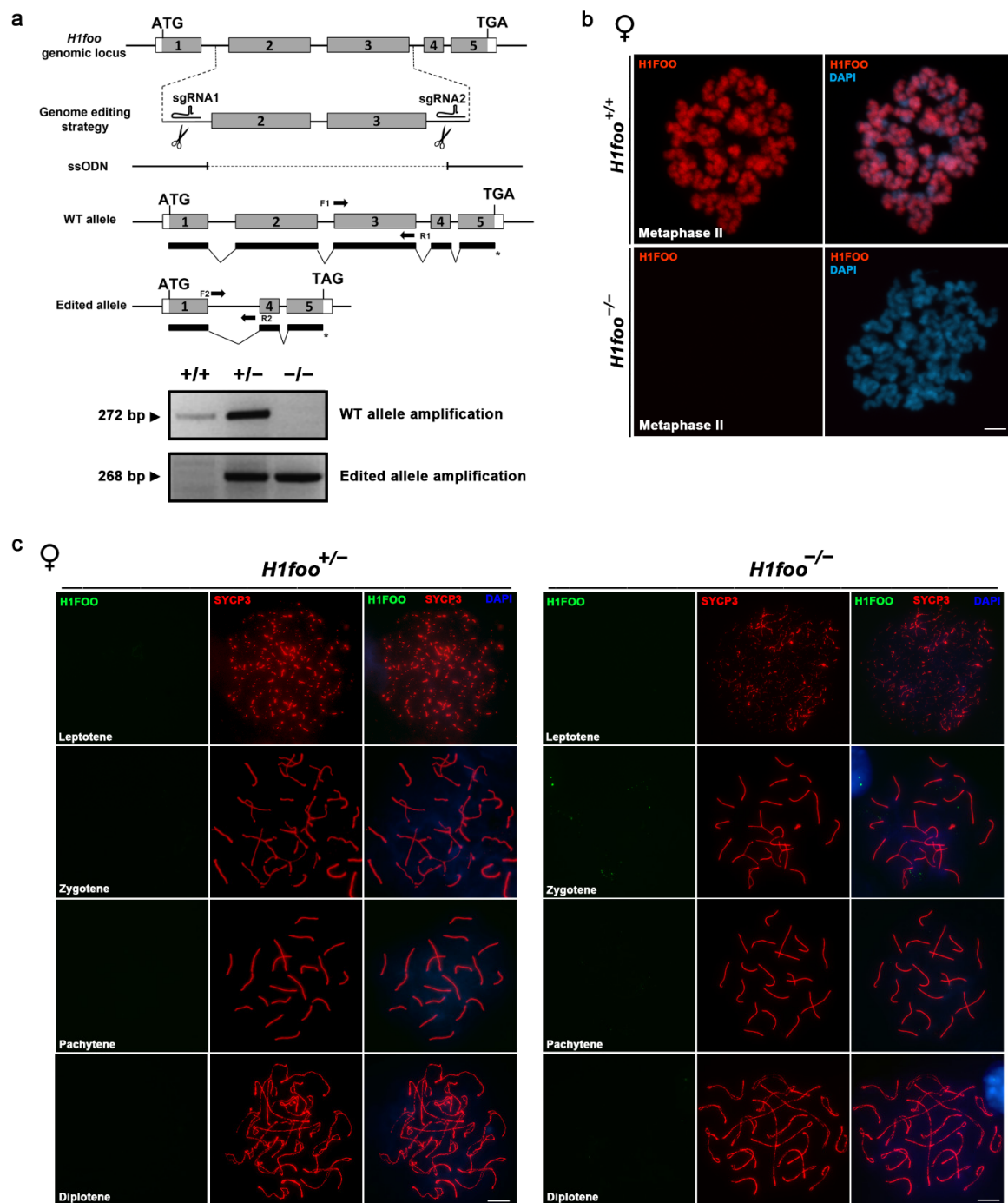


Figure 1. (a) Schematic representation of *H1foo* KO generation by CRISPR–Cas9 genome editing. Two sgRNAs flanking coding exons 2 and 3, respectively, of the *H1foo* genomic locus are represented. Coding (grey) and non-coding (open box) regions are indicated. Thick lines under the exons represent the expected transcripts derived from WT and *H1foo* edited alleles, with the * symbol pointing the translation termination. ATG, start codon; TGA, stop codon. Oligonucleotide sequences employed for the amplification of both WT (F1 and R1) and edited alleles (F2 and R2) are also pointed out. PCR analysis of genomic DNA from three *H1foo*^{+/+}, *H1foo*^{+/-} and *H1foo*^{-/-} pups is shown (lower panel). (b) H1FOO immunolabeling in cultured unfertilized metaphase II oocytes from both *H1foo*^{+/+} and *H1foo*^{-/-} females showing H1FOO signal (red) decorating the chromosomes of WT, but not mutant oocytes. (c) Double immunolabeling of H1FOO (green) and SYCP3 (red) in fetal 16.5 dpc oocytes showing a complete absence of H1FOO signal along meiotic prophase I in both heterozygous and KO oocytes. Bars in panels (b,c), 10 μ m.

To confirm whether the generated mutation was in fact a null allele, we analyzed the expression of H1FOO in unfertilized oocytes using an anti-H1FOO antibody. We observe H1FOO signal decorating the chromatin in WT unfertilized metaphase II (MII) oocytes (Figure 1b). The total absence of this signal in the knockout (KO) MII oocytes (Figure 1b) led us to validate our murine model. Taking into account the fact that basal *H1foo* transcription is observed in primary spermatocytes and oocytes [24], we first tried to immunolocalize H1FOO during prophase I using 16.5 dpc oocytes. Remarkably, a total absence of H1FOO labeling is detected in prophase I oocytes (Figure 1c). Considering H1FOO expression in human and mouse testes (www.proteinatlas.org accessed on 20 September 2017, [24]), and its load to sperm chromatin after fertilization, we sought to further explore its function in male gametogenesis, for which we carried out an immunofluorescence in surface-spread nuclei from mouse spermatocytes. However, we do not detect H1FOO labeling at any meiotic stage in spermatocytes (Figure S1).

3.2. H1FOO-Deficient Mice Are Fertile

Both male and female lacking H1FOO develop normally and show no overt phenotype. As H1FOO is known to be involved in meiotic maturation of mouse oocytes, we perform an evaluation of histological sections of both WT and KO ovaries. Adult *H1foo*-deficient ovaries appear to be normal, with no remarkable alteration in the distribution of follicles nor aberrant appearance of the stroma (Figure 2a). Additionally, adult male KO testis size and weight is similar to their WT counterparts (Figure 2b). To determine the potential effect of H1FOO absence on mice fertility, we performed a fertility assay. The presence of the copulatory plug was monitored daily to discard behavioral defects, and the number of pups per litter was recorded. Homozygous *H1foo* KO mice breeding shows similar litters in size and number to heterozygous mice mating (Figure 2c), which led us to discard an unusual mortality rate or any developmental defect in mutant embryos. Moreover, results from F2 KO breeding show an absence of a delayed phenotype in the next generations (Table S3).

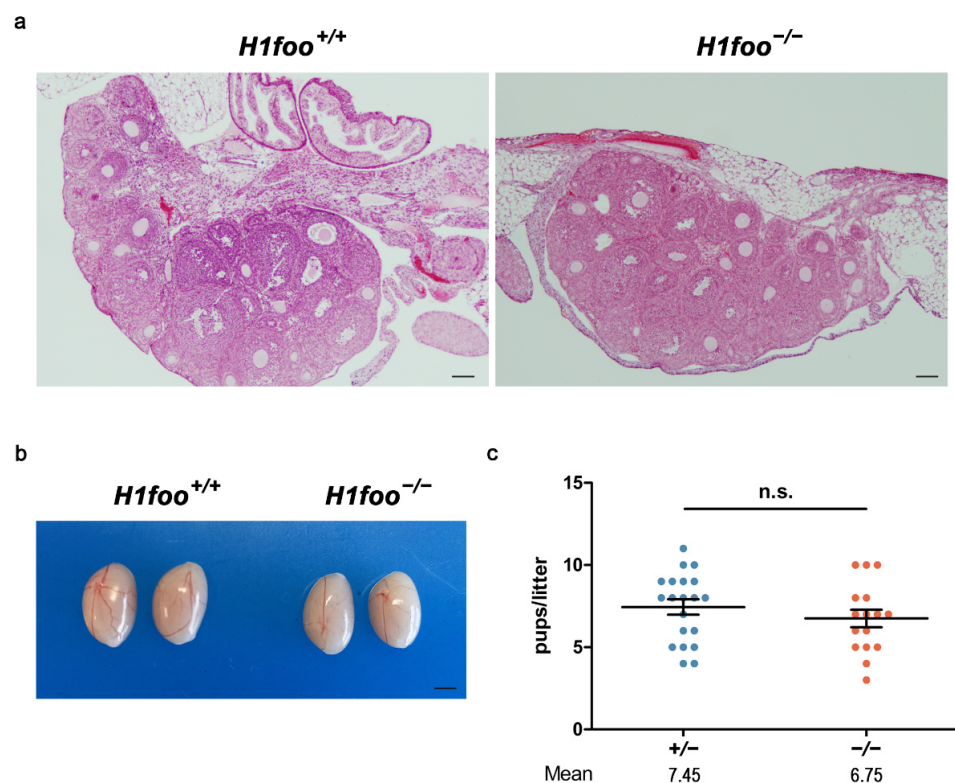


Figure 2. (a) Histopathological analysis of hematoxylin-eosin-stained ovaries sections does not show defects in H1FOO-deficient adult mice. Bars in panel, 20 μ m. (b) Genetic deletion of *H1foo* entails no

differences in testis size when compared to their WT counterparts (mice of 3 months of age). Bar in panel, 30 μm . (c) Fertility assessment of heterozygous (+/–, blue) and homozygous mutant mice (–/–, red) showing the number of pups per litter. Mean value displayed under the plot. Two-tailed Welch’s *t*-test analysis: n.s., no significant differences.

3.3. H1FOO-Deficient Meioocytes Show Normal Synapsis, Double-Strand Breaks (DSBs) Generation, and Telomere Dynamics

Given the transcription of *H1foo* in mouse spermatogonia and pachynema [24], and despite our negative immunolabeling of H1FOO in mouse spermatocytes and spermatogonia from chromosome spreads preparation, we analyzed meiotic progression in order to discard technical reasons (e.g., fixation) responsible for our inability to detect H1FOO in prophase I. To do so, we monitored the distribution of the central element protein SYCP1 and the lateral element SYCP3 labeling. We did not detect significant alteration in the synapsis/desynapsis dynamics of the synaptonemal complex (SC) in spermatocytes (Figure S2).

To further characterize the involvement of H1FOO in female meiotic progression, we analyzed the dynamics of assembly and disassembly of the SC in 16.5 dpc oocytes. An effective synapsis and desynapsis of the SC are observed in mutant oocytes (Figure S3), although a faint, yet not significant, delay at the zygotene stage is detected in *H1foo*-deficient oocytes (Figure S3, lower plot).

One of the major events occurring in early prophase I is the formation and repair of double-strand breaks (DSBs). Their generation relies on an ATM-dependent phosphorylation of histone H2AX at serine 139 (γ -H2AX), which activates the DSBs repair response at early meiotic prophase I. To thoroughly analyze a potential deregulation of DSBs generation that could be responsible for the subtle zygotene delay observed in the mutant oocytes, we immunostained γ -H2AX in 16.5 dpc oocytes. No significant differences are observed between genotypes (Figure S4a).

In the search of any other mechanism underlying the narrow phenotype observed at the zygotene stage, and in order to discard any non-homologous telomeres fusion, we labelled oocytes telomeres by SUN1 and centromeres by anti-centromere antibodies (ACA). We do not detect any disturbance in telomere or centromere dynamics in *H1foo*-deficient oocytes at the zygotene or the pachytene stage (Figure S4b,c). Taken all together, these observations suggest that H1FOO has no critical role in the progression of either male or female meiosis.

3.4. The Absence of H1FOO Does Not Impair MEFs Reprogramming

Somatic cells can be reprogrammed to iPSCs by ectopic expression of OCT4, SOX2, KLF4, and MYC (OSKM) [25], launching a cascade of events that includes a rearrangement of the epigenetic profile [26]. Oocyte constituents are involved in enhancing mammalian somatic cell reprogramming by somatic cell nuclear transfer (SCNT), as several candidate oocyte reprogramming factors (CORFs), including H1FOO, have been previously identified based on global transcriptional analysis [27]. Considering the increased efficiency of reprogramming after H1FOO overexpression [28], we evaluated the consequences of the loss of H1FOO expression in cell reprogramming using *H1foo*^{+/+}, *H1foo*^{+/-}, and *H1foo*^{-/-} MEFs. The number of alkaline phosphatase (AP) positive colonies, typically used as a marker of undifferentiated cells, is similar in the three genotypes (Figure 3). In the light of this, and although increased *H1foo* expression contributes to the generation of higher quality iPSCs [28], its absence does not represent a significant hindrance to MEFs reprogramming to iPSCs.

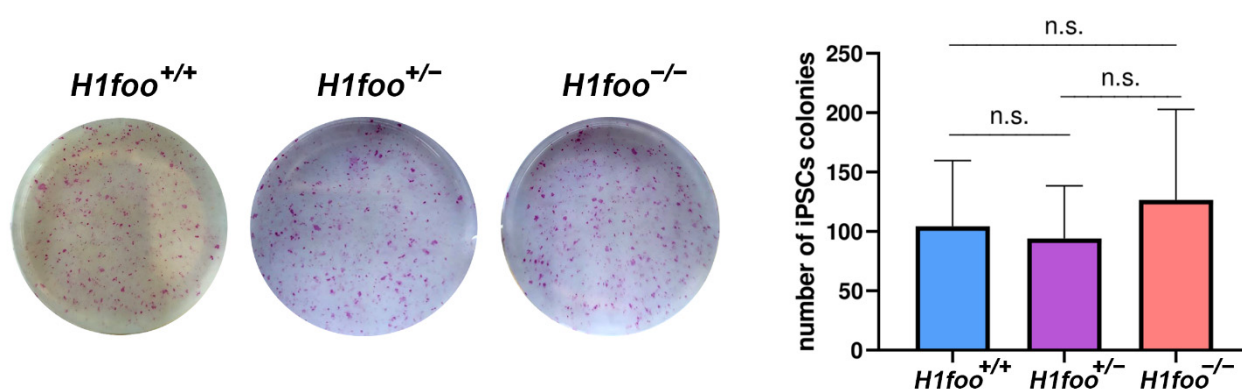


Figure 3. MEFs from the indicated genotypes are infected with the 3 reprogramming factors and the number of alkaline phosphatase positive colonies are counted (plot in the right), showing that the absence of *H1foo* does not significantly affect iPSCs generation. $n = 12$. Welch's t -test analysis: n.s., no significant differences.

4. Discussion

In the present study, we determined, for the first time, the lack of essentiality of the linker histone H1FOO for mouse fertility and development, using null mutant mice as a model. By carrying out a comprehensive biological analysis, here we show that the loss of this linker histone can be tolerated *in vivo* during oogenesis, as no significant obstacle for its progression occurs in homozygous mutant mice.

In order to analyze the expression pattern of H1FOO in mouse oocytes, we performed several immunolabeling experiments in oocytes at different stages. By doing so, we described H1FOO decorating the chromatin in WT metaphase II oocytes. The absence of signal in *H1foo*-deficient chromosomes led us to validate our murine model. Despite the fact that *H1foo* is transcribed during prophase I, our inability to stain H1FOO at any point during these stages and the absence of any subtle meiotic phenotype (see below) point towards an uncoupling of transcription and translation during the second meiotic division in females and during later stages in males. This translational repression is a cellular mechanism largely studied in mouse, essential for proper gametogenesis and embryo development [29,30]. This is in concordance with the very first description of mammalian H1FOO [11], with this histone being detected from the germinal vesicle stage to two-cell-stage embryos as a consequence of a highly regulated expression program that includes DNA methylation upstream of the *H1foo* gene [31].

Growing oocytes present a characteristic and strictly regulated loosened chromatin structure, which is needed for the acquisition of totipotency after fertilization. *H1foo*, among other factors such as the helicase *Chd9*, is believed to play a fundamental role in maintaining this structural regulation of the chromatin [28,32]. The change from loose to tight chromatin structure occurring in the one-cell to two-cell stage transition is responsible for the loss of totipotency of the embryo [33]. For this reason, it has been hypothesized that *H1foo* reaches a high expression level at the one-cell stage and it is dramatically reduced in two-cell stage embryos [14]. At this point, *H1foo* knockdown decreases the looseness of the chromatin structure and delays the completion of DNA synthesis in one-cell stage embryos [14]. Nevertheless, and according to our results, none of these alterations seem to be a major disturbance for the progression of murine preimplantation embryos *in vivo*, as no differences in either the histological analysis or in the number and size of litters are observed in homozygous mutant mice. This is in contrast with previous *in vitro* studies contemplating the essentiality of H1FOO for meiotic maturation of mouse oocytes, as its inhibition via antisense morpholino oligonucleotides (microinjected into germinal vesicle stage oocytes) led to failed first polar body extrusion and metaphase I arrest [15]. In a similar way, bovine oocyte maturation was also demonstrated to be hampered *in vitro* after siRNA-mediated *H1foo* inhibition [17]. In contrast, a recent study showed that *H1foo*

knockdown using siRNAs had no effect on oocyte growth, maturation, and fertilization [18]. Taken together, we can conclude that, in opposition to some previous *in vitro* assays and in concordance with the most recent research lines, the absence of H1FOO can be tolerated *in vivo* with the specific underlying compensatory mechanisms still to be further elucidated.

Meiotic prophase I is the longest and most complex stage of the gametogenic program, as it encompasses a thoroughly regulated sequence of events, including homologous pairing, and DSB generation and their processing to COs. According to its later expression pattern, *H1foo* deficiency should not be a hindrance to early meiosis progression, as our observations reveal normal synapsis and telomere dynamics along prophase I. Bearing in mind that human H1FOO is transcribed in testes during spermatogenesis, and that H1FOO is quickly assembled into the introduced paternal genome after fertilization replacing the sperm-specific histone-like proteins [34,35], we sought to evaluate spermatogenesis progression under *H1foo* absence in order to discard a potential sexual dimorphism in this mutant. As expected, a male lacking H1FOO successfully reached the spermatozoa stage without any disturbance, being completely fertile.

The oocyte has the capacity to give rise to undifferentiated embryonic cells although it is a differentiated cell. This reprogramming implies a switch from somatic to oocyte transcriptional components. *Xenopus* histone B4 (the homolog of murine H1FOO) was demonstrated to be required for successful transcriptional reprogramming, probably by making somatic chromatin accessible to the oocyte machinery and subsequently enabling high amounts of Pol II loading [36]. It has been previously hypothesized that the absence of *H1foo* might reduce the efficiency of chromatin reprogramming in zygotes [7], even though the surviving *H1foo*^{-/-} embryos and mice are completely viable. This fact could be explained by the activation of a compensatory mechanism that increases protein synthesis of other H1 variants to face the lack of H1FOO. Oocyte constituents play a crucial role in reprogramming in somatic cell nuclear transfer (SCNT), a procedure similar to iPSCs generation. Moreover, a rapid exchange of somatic linker histone with H1FOO in the chromatin of an injected somatic nucleus occurs during SCNT, a process analogous to the histone replacement occurring after fertilization. In this regard, *H1foo* exogenous expression was proven to enhance the number and quality of mouse iPSCs when co-expressed with *Oct4*, *Sox2*, and *Klf4* [28]. Both *in vitro* and *in vivo* differentiation potential of the iPSCs is enhanced after *H1foo* overexpression. In addition, ectopic expression of *H1foo* has been demonstrated to prevent normal differentiation into embryoid bodies, illustrating the impact of this histone on the epigenetic status [37]. This is in contrast to our observations, as MEFs lacking *H1foo* do not significantly affect iPSCs generation, with the number of AP colonies being even higher in the mutant than in the WT condition. This surprising result could be explained by a countervailing mechanism driven by other constituents that cope with the loss of this linker histone during reprogramming, as not only H1FOO but also somatic histones are able to associate with chromatin in the nuclei of somatic cells [13,38]. Pooling all these observations, we can conclude that H1FOO is a dispensable factor for iPSCs reprogramming.

Taken all together, in this study we gained further insights in H1FOO function and dispensability for mouse fertility and iPSCs reprogramming, contributing to elucidating processes and regulatory mechanisms of chromatin remodeling during mammalian oogenesis and enlightening the still open debate about H1FOO essentiality in meiosis.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells11223706/s1>, Table S1: crRNAs and ssODN employed for the generation of the *H1foo* edited mouse model; Table S2: Oligonucleotides employed for genotyping the mutant *H1foo* mice; Table S3: F2 breeding of a *H1foo*^{-/-} male and two different *H1foo*^{-/-} females showing an absence of a delayed phenotype; Figure S1: Double immunofluorescence of H1FOO and SYCP3 in spermatocytes; Figure S2: Double immunofluorescence of SYCP1 and SYCP3 in spermatocytes; Figure S3: Double immunofluorescence of SYCP1 and SYCP3 in 16.5 dpc oocytes and stage distribution analysis; Figure S4: Double immunofluorescence of either γ -H2AX (a), SUN1 (b) or ACA (c) and SYCP3 in 16.5 dpc oocytes.

Author Contributions: Conceptualization, A.M.P. and E.L.; methodology, F.S.-S., R.S.-U., N.F.-M., Y.B.C. and M.S.-M.; formal analysis, A.M.P. and E.L.; investigation, F.S.-S., R.S.-U., N.F.-M. and Y.B.C.; data curation, F.S.-S. and R.S.-U.; writing—original draft preparation, F.S.-S., R.S.-U., E.L. and A.M.P.; writing—review and editing, A.M.P. and E.L.; supervision, A.M.P. and E.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by MINECO, grant number PID2020-120326RB-I00 and by *Junta de Castilla y León*, grant numbers CSI239P18 and CSI148P20. F.S.-S. and N.F.-M. received funding from *Junta de Castilla y León* fellowships (EDU/556/2019 and EDU/310/2015, respectively). R.S.-U. and Y.B.-C. received funding from MINECO (BFU2017-89408-R and BS-2015-073993). CIC-IBMCC is supported by the Programa de Apoyo a Planes Estratégicos de Investigación de Estructuras de Investigación de Excelencia cofunded by the Castilla–León autonomous government and the European Regional Development Fund (CLC-2017-01).

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the University of Salamanca (USAL) and the Ethics Committee of the Spanish Research Council (CSIC) under protocol #00-245.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Acknowledgments: The authors thank Isabel Ramos and Marina Jiménez-Ruiz (Molecular Mechanisms Program, Centro de Investigación del Cáncer) for their technical assistance, as well as Roberta Palmitessa and Linda Senaoui for their contribution to the project. We thank Jon D. Hennebold for providing the antibody against H1FOO.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Hillers, K.J.; Jantsch, V.; Martinez-Perez, E.; Yanowitz, J.L. Meiosis. *WormBook* **2017**, *2017*, 433–434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Zickler, D.; Kleckner, N. Recombination, Pairing, and Synapsis of Homologs during Meiosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2015**, *7*, 1–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. He, M.; Zhang, T.; Yang, Y.; Wang, C. Mechanisms of Oocyte Maturation and Related Epigenetic Regulation. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 654028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Wang, L.; Xu, Z.; Khawar, M.B.; Liu, C.; Li, W. The Histone Codes for Meiosis. *Reproduction* **2017**, *154*, R65–R79. [[CrossRef](#)]
5. Workman, J.L.; Kingston, R.E. Alteration of Nucleosome Structure as a Mechanism of Transcriptional Regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *67*, 545–579. [[CrossRef](#)]
6. Hergeth, S.P.; Schneider, R. The H1 Linker Histones: Multifunctional Proteins beyond the Nucleosomal Core Particle. *EMBO Rep.* **2015**, *16*, 1439. [[CrossRef](#)]
7. Pan, C.; Fan, Y. Role of H1 Linker Histones in Mammalian Development and Stem Cell Differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1859*, 496. [[CrossRef](#)]
8. Prendergast, L.; Reinberg, D. The Missing Linker: Emerging Trends for H1 Variant-Specific Functions. *Genes Dev.* **2021**, *35*, 40–58. [[CrossRef](#)]
9. Fyodorov, D.V.; Zhou, B.R.; Skoultchi, A.I.; Bai, Y. Emerging Roles of Linker Histones in Regulating Chromatin Structure and Function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 192. [[CrossRef](#)]
10. Doenecke, D.; Albig, W.; Bode, C.; Drabent, B.; Franke, K.; Gavenis, K.; Witt, O. Histones: Genetic Diversity and Tissue-Specific Gene Expression. *Histochem. Cell Biol.* **1997**, *107*, 1–10. [[CrossRef](#)]
11. Tanaka, M.; Hennebold, J.D.; Macfarlane, J.; Adashi, E.Y. A Mammalian Oocyte-Specific Linker Histone Gene *H1oo*: Homology with the Genes for the Oocyte-Specific Cleavage Stage Histone (*cs-H1*) of Sea Urchin and the *B4/H1M* Histone of the Frog. *Development* **2001**, *128*, 655–664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Tanaka, M.; Kihara, M.; Hennebold, J.D.; Eppig, J.J.; Viveiros, M.M.; Emery, B.R.; Carrell, D.T.; Kirkman, N.J.; Meczekalski, B.; Zhou, J.; et al. H1FOO Is Coupled to the Initiation of Oocytic Growth. *Biol. Reprod.* **2005**, *72*, 135–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Becker, M.; Becker, A.; Miyara, F.; Han, Z.; Kihara, M.; Brown, D.T.; Hager, G.L.; Latham, K.; Adashi, E.Y.; Misteli, T. Differential *in Vivo* Binding Dynamics of Somatic and Oocyte-Specific Linker Histones in Oocytes and during ES Cell Nuclear Transfer. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 3887–3895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Funaya, S.; Ooga, M.; Suzuki, M.G.; Aoki, F. Linker Histone H1FOO Regulates the Chromatin Structure in Mouse Zygotes. *FEBS Lett.* **2018**, *592*, 2414–2424. [[CrossRef](#)]

15. Furuya, M.; Tanaka, M.; Teranishi, T.; Matsumoto, K.; Hosoi, Y.; Saeki, K.; Ishimoto, H.; Minegishi, K.; Iritani, A.; Yoshimura, Y. *H1foo* Is Indispensable for Meiotic Maturation of the Mouse Oocyte. *J. Reprod. Dev.* **2007**, *53*, 895–902. [[CrossRef](#)]
16. Li, S.; Shi, Y.; Dang, Y.; Hu, B.; Xiao, L.; Zhao, P.; Wang, S.; Zhang, K. Linker Histone H1FOO Is Required for Bovine Preimplantation Development by Regulating Lineage Specification and Chromatin Structure. *Biol. Reprod.* **2022**, ioac167. [[CrossRef](#)]
17. Yun, Y.; An, P.; Ning, J.; Zhao, G.M.; Yang, W.L.; Lei, A.M. *H1foo* Is Essential for *in Vitro* Meiotic Maturation of Bovine Oocytes. *Zygote* **2015**, *23*, 416–425. [[CrossRef](#)]
18. Funaya, S.; Kawabata, Y.; Sugie, K.; Abe, K.I.; Suzuki, Y.; Suzuki, M.G.; Aoki, F. Involvement of the Linker Histone *H1Foo* in the Regulation of Oogenesis. *Reproduction* **2022**, *164*, 19–29. [[CrossRef](#)]
19. Gao, S.; Chung, Y.G.; Parseghian, M.H.; King, G.J.; Adashi, E.Y.; Latham, K.E. Rapid H1 Linker Histone Transitions Following Fertilization or Somatic Cell Nuclear Transfer: Evidence for a Uniform Developmental Program in Mice. *Dev. Biol.* **2004**, *266*, 62–75. [[CrossRef](#)]
20. Gomes, K.M.S.; Costa, I.C.; dos Santos, J.F.; Dourado, P.M.M.; Forni, M.F.; Ferreira, J.C.B. Induced Pluripotent Stem Cells Reprogramming: Epigenetics and Applications in the Regenerative Medicine. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **2017**, *63*, 180–189. [[CrossRef](#)]
21. Papp, B.; Plath, K. Epigenetics of Reprogramming to Induced Pluripotency. *Cell* **2013**, *152*, 1324–1343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Terme, J.M.; Sesé, B.; Millán-Ariño, L.; Mayor, R.; Belmonte, J.C.I.; Barrero, M.J.; Jordan, A. Histone H1 Variants Are Differentially Expressed and Incorporated into Chromatin during Differentiation and Reprogramming to Pluripotency. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 35347–35357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Peters, A.H.F.M.; Plug, A.W.; van Vugt, M.J.; de Boer, P.; Peters, A.H.F.M.; Plug, A.W.; van Vugt, M.J.; De, P. A Drying-down Technique for the Spreading of Mammalian Meioocytes from the Male and Female Germline. *Chromosome Res.* **1997**, *5*, 66–71. [[CrossRef](#)]
24. da Cruz, I.; Rodríguez-Casuriaga, R.; Santiñaque, F.F.; Farías, J.; Curti, G.; Capoano, C.A.; Folle, G.A.; Benavente, R.; Sotelo-Silveira, J.R.; Geisinger, A. Transcriptome Analysis of Highly Purified Mouse Spermatogenic Cell Populations: Gene Expression Signatures Switch from Meiotic-to Postmeiotic-Related Processes at Pachytene Stage. *BMC Genom.* **2016**, *17*, 294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **2006**, *126*, 663–676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Watanabe, A.; Yamada, Y.; Yamanaka, S. Epigenetic Regulation in Pluripotent Stem Cells: A Key to Breaking the Epigenetic Barrier. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2013**, *368*, 292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Awe, J.P.; Byrne, J.A. Identifying Candidate Oocyte Reprogramming Factors Using Cross-Species Global Transcriptional Analysis. *Cell Reprogram* **2013**, *15*, 126–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Kunitomi, A.; Yuasa, S.; Sugiyama, F.; Saito, Y.; Seki, T.; Kusumoto, D.; Kashimura, S.; Takei, M.; Tohyama, S.; Hashimoto, H.; et al. *H1foo* Has a Pivotal Role in Qualifying Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rep.* **2016**, *6*, 825–833. [[CrossRef](#)]
29. Guo, M.; Luo, C.; Wang, Z.; Chen, S.; Morris, D.; Ruan, F.; Chen, Z.; Yang, L.; Wei, X.; Wu, C.; et al. Uncoupling Transcription and Translation through MiRNA-Dependent Poly(A) Length Control in Haploid Male Germ Cells. *Development* **2022**, *149*, 199573. [[CrossRef](#)]
30. Nothias, J.Y.; Miranda, M.; DePamphilis, M.L. Uncoupling of Transcription and Translation during Zygotic Gene Activation in the Mouse. *EMBO J.* **1996**, *15*, 5715–5725. [[CrossRef](#)]
31. Maeda, C.; Sato, S.; Hattori, N.; Tanaka, S.; Yagi, S.; Shiota, K. DNA Hypomethylation Circuit of the Mouse Oocyte-Specific Histone *H1foo* Gene in Female Germ Cell Lineage. *Biol. Reprod.* **2008**, *78*, 816–821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ooga, M.; Funaya, S.; Hashioka, Y.; Fujii, W.; Naito, K.; Suzuki, M.G.; Aoki, F. Chd9 Mediates Highly Loosened Chromatin Structure in Growing Mouse Oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *500*, 583–588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ooga, M.; Fulka, H.; Hashimoto, S.; Suzuki, M.G.; Aoki, F. Analysis of Chromatin Structure in Mouse Preimplantation Embryos by Fluorescent Recovery after Photobleaching. *Epigenetics* **2016**, *11*, 85–94. [[CrossRef](#)]
34. de Macedo, M.P.; Glanzner, W.G.; Gutierrez, K.; Bordignon, V. Chromatin Role in Early Programming of Embryos. *Anim. Front.* **2021**, *11*, 57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mizusawa, Y.; Kuji, N.; Tanaka, Y.; Tanaka, M.; Ikeda, E.; Komatsu, S.; Kato, S.; Yoshimura, Y. Expression of Human Oocyte-Specific Linker Histone Protein and Its Incorporation into Sperm Chromatin during Fertilization. *Fertil. Steril.* **2010**, *93*, 1134–1141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Jullien, J.; Miyamoto, K.; Pasque, V.; Allen, G.E.; Bradshaw, C.R.; Garrett, N.J.; Halley-Stott, R.P.; Kimura, H.; Ohsumi, K.; Gurdon, J.B. Hierarchical Molecular Events Driven by Oocyte-Specific Factors Lead to Rapid and Extensive Reprogramming. *Mol. Cell* **2014**, *55*, 524–536. [[CrossRef](#)]
37. Hayakawa, K.; Ohgane, J.; Tanaka, S.; Yagi, S.; Shiota, K. Oocyte-Specific Linker Histone *H1foo* Is an Epigenomic Modulator That Decondenses Chromatin and Impairs Pluripotency. *Epigenetics* **2012**, *7*, 1029. [[CrossRef](#)]
38. Teranishi, T.; Tanaka, M.; Kimoto, S.; Ono, Y.; Miyakoshi, K.; Kono, T.; Yoshimura, Y. Rapid Replacement of Somatic Linker Histones with the Oocyte-Specific Linker Histone *H1foo* in Nuclear Transfer. *Dev. Biol.* **2004**, *266*, 76–86. [[CrossRef](#)]

ARTICLE



A truncating variant of RAD51B associated with primary ovarian insufficiency provides insights into its meiotic and somatic functions

Monica M. Franca^{1,2,11}, Yazmine B. Condezo^{3,11}, Maëva Elzaïat^{4,11}, Natalia Felipe-Medina³, Fernando Sánchez-Sáez³, Sergio Muñoz⁵, Raquel Sainz-Urruela³, M. Rosario Martín-Hervás³, Rodrigo García-Valiente³, Manuel A. Sánchez-Martín^{6,7}, Aurora Astudillo⁸, Juan Mendez⁵, Elena Llano^{3,9}, Reiner A. Veitia^{4,10}, Berenice B. Mendonça¹ and Alberto M. Pendás³

© The Author(s), under exclusive licence to ADMC Associazione Differenziamento e Morte Cellulare 2022

Primary ovarian insufficiency (POI) causes female infertility by abolishing normal ovarian function. Although its genetic etiology has been extensively investigated, most POI cases remain unexplained. Using whole-exome sequencing, we identified a homozygous variant in RAD51B $-(c.92delT)$ in two sisters with POI. In vitro studies revealed that this variant leads to translation reinitiation at methionine 64. Here, we show that this is a pathogenic hypomorphic variant in a mouse model. *Rad51b^{c.92delT/c.92delT}* mice exhibited meiotic DNA repair defects due to RAD51 and HSF2BP/BMRE1 accumulation in the chromosome axes leading to a reduction in the number of crossovers. Interestingly, the interaction of RAD51B-c.92delT with RAD51C and with its newly identified interactors RAD51 and HELQ was abrogated or diminished. Repair of mitomycin-C-induced chromosomal aberrations was impaired in RAD51B/Rad51b-c.92delT human and mouse somatic cells in vitro and in explanted mouse bone marrow cells. Accordingly, Rad51b-c.92delT variant reduced replication fork progression of patient-derived lymphoblastoid cell lines and pluripotent reprogramming efficiency of primary mouse embryonic fibroblasts. Finally, *Rad51b^{c.92delT/c.92delT}* mice displayed increased incidence of pituitary gland hyperplasia. These results provide new mechanistic insights into the role of RAD51B not only in meiosis but in the maintenance of somatic genome stability.

Cell Death & Differentiation; <https://doi.org/10.1038/s41418-022-01021-z>

INTRODUCTION

Meiosis is a sexual division that halves the diploid somatic chromosomal complement to a haploid state. During this process, each chromosome associates with its corresponding homologue (pairing) whose ultimate physical hallmark is a chiasma. In mammals, this process relies on the repair of DNA double-strand breaks (DSBs) by homologous recombination (HR) that generates crossover recombination events (COs) [1].

In molecular terms, the nuclease SPO11 generates DSBs throughout the genome. After DNA resection of 5' termini [2], the generated 3' ssDNA ends recruit the recombinases RAD51 and DMC1. The resulting recombinase-coated ssDNA filaments can invade the homologous chromosome dsDNA, searching for a complementary sequence (chromosome pairing), which will foster genetic material exchange. The nucleation of RAD51 is mediated by its direct interaction with BRCA2. This supramolecular complex promotes the initial binding of RPA to the resected DNA and,

importantly, fosters the displacement of RPA from ssDNA by RAD51 nucleofilaments [3, 4]. However, the presence of many paralogues of RAD51 in most taxa including vertebrates (RAD51B, RAD51C, XRCC3, XRCC2, RAD51D, and the meiotic factor DMC1) and the lethality of the constitutional mutant mice has hampered the study of the physiological role of each RAD51 paralogue to somatic and meiotic HR [5–10].

In mammals, functional analysis of the individual RAD51 paralogues in cell lines has shown similar but non-redundant contributions in DNA repair processes such as HR efficiency, RAD51 nuclear focus formation, sensitization to mitomycin C (MMC) and protection of perturbed replications forks [11]. Accordingly, mutations in genes on this pathway can lead to genome instability, which can result in both cancer- and infertility-associated genetic syndromes [12, 13].

Infertility is defined as a failure of a couple to conceive and affects 10–15% of couples [14]. POI is a disorder associated with

¹Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42 and SELA, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, Brasil. ²Section of Endocrinology Diabetes and Metabolism, Department of Medicine, The University of Chicago, Chicago, IL, USA. ³Molecular Mechanisms Program, Centro de Investigación del Cáncer and Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (CSIC-Universidad de Salamanca), Salamanca, Spain. ⁴Université Paris Cité, CNRS, Institut Jacques Monod, F-75013 Paris, France. ⁵DNA Replication Group, Molecular Oncology Programme, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Melchor Fernández Almagro 3, E-28029 Madrid, Spain. ⁶Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain. ⁷Transgenic Facility, Nucleus platform, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain. ⁸Biobanco del principado de Asturias, 33011 Oviedo, Spain. ⁹Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain. ¹⁰Université Paris-Saclay and Institut François Jacob, Commissariat à l'Energie Atomique, Gif-sur-Yvette, France. ¹¹These authors contributed equally: Monica M. Franca, Yazmine B. Condezo, Maëva Elzaïat. ✉email: reiner.veitia@ijm.fr; beremen@usp.br; amp@usal.es
Edited by D. Aberdam

Received: 28 October 2021 Revised: 12 May 2022 Accepted: 13 May 2022

Published online: 27 May 2022

female infertility that affects about 1% of women before the age of 40 years. The genetic etiology of isolated POI is highly heterogeneous. In fact, over 75 genes associated with POI have been implicated in ovarian development and meiosis [15]. Particularly, pathogenic variants in genes involved in meiotic recombination, such as *STAG3*, *SYCE1*, *HFM1*, *MSH4*, *MSH5*, *DMC1*, *MEIOB*, *BRCA2* and *HSF2BP*, have been associated with this disorder [15–24]. Nevertheless, the presence of genetic defects in the majority of POI patients remains to be established [15].

Here, we report the identification of a homozygous variant in *RAD51B*-c.92delT in two sisters with POI. This *RAD51B* variant leads to a premature termination codon (PTC) resulting in translation reinitiation at codon AUG in position 64. The “humanized” knock-in (KI; *Rad51b*^{c.92delT/c.92delT}) mouse shows meiotic DNA repair defects due to *RAD51* and *HSF2BP/BRME1* accumulation in the meiotic chromosome axes leading to a significant reduction in the number of COs. Interestingly, *RAD51*, *RAD51C* and *HELQ* interaction with *RAD51B* was diminished with the N-terminally truncated *RAD51B* protein. Moreover, *RAD51B*-c.92delT human lymphoblastoid cells, humanized MEFs and explanted bone marrow cells from mutant mice displayed an increased sensitivity to MMC-induced chromosome instability (CIN). The *RAD51B*-c.92delT variant was also found to decrease replication fork progression of lymphoblastoid cell lines and the reprogramming efficiency of primary mouse embryonic fibroblasts (MEFs) to produce induced pluripotent stem cells (iPSCs). Finally, *Rad51b*^{c.92delT/c.92delT} mice exhibited an increased incidence of hyperplasia of the pituitary gland. These results provide new mechanistic insights into *RAD51B* role in human ovarian insufficiency and in the maintenance of genome stability in the soma.

RESULTS

Genetic analysis

Whole-exome sequencing was performed in two sisters presenting with POI (II-1 and II-4) and in one unaffected sister (II-2). The mean coverage of the capture regions was $\geq 150\times$ in all samples with at least 99.38% of the targeted positions being sequenced at $\geq 10\times$ (Supplementary Table 1). Consistent with an autosomal recessive inheritance, homozygous candidate variants were selected in both affected sisters and a minor allele frequency cut-off of 0.01% was applied. After an in-depth assessment of coding (missense, nonsense and frameshift) and splice-site variants, a homozygous frameshift pathogenic variant in the *RAD51B* gene was identified in the two affected sisters and retained as the best candidate (Supplementary Table 2). *RAD51B* is located in chromosome 14, position 14q23-q24.2, and the c.92delT variant is located in exon 3. As predicted by Mutalyzer, the *RAD51B*-c.92delT variant creates a PTC at amino acid #39 (predicted alteration: p.Leu31Trfs*9). The variant c.92delT (i.e., 14-68292183-CT-C) is reported in gnomAD with an extremely low allele frequency of 4.05×10^{-6} , which represents one allele count of 1 in 247,158 alleles and has not been reported to exist in a homozygous state [25, 26]. The presence of this variant was screened by Sanger sequencing in other members of this family (Fig. 1A). The father (I-1) and unaffected siblings (II-2, II-3, II-6, and II-8) were heterozygous. DNA of mother (I-2) and one brother (II-5) were unavailable (Fig. S1A). Furthermore, the *RAD51B*-c.92delT variant was not found in 235 fertile Brazilian women controls screened by Sanger sequencing. In order to rule out any additional pathogenic variants, we evaluated 107 genes already associated with POI [27]. No other clearly pathogenic variant, which could underlie the phenotype, could be identified in this family (Supplementary Table 9).

The c.92delT variant in *RAD51B* leads to translation re-initiation at AUG64

In silico analyses predict that the c.92delT variant would provoke the appearance of a PTC leading to a truncated protein of 39 residues

lacking functional motifs (Fig. S1B) [28]. Given that the depletion of *Rad51b* in the mice is embryonic lethal [8] and that three close downstream in-frame AUG codons (AUG39, AUG55 and AUG64) exist, we hypothesized that the translation might restart at one of them. To test this, HEK293 cells were transfected with constructs encoding *RAD51B*: wild-type (WT), c.92delT and a mutant or WT *RAD51B* in which the three secondary Methionine codons were replaced by GCN encoding Alanines (individual and double Met to Ala substitutions) and protein expression was analyzed by Western blot (Fig. 1B). This experiment showed the production of a band in the c.92delT that was smaller than the main product resulting from the expression of the WT construct. This band disappeared only when replacing the codons underlying M64 to A64 but not when the M39 or M55 were replaced by Alanines (individually or double mutated; Fig. 1B). To demonstrate the translation of the *RAD51B*-c.92delT endogenous protein and given that we failed to detect by Western blot and immunofluorescence (IF) endogenous *RAD51B* protein with commercial or even home-made antibodies, we analyzed by IP-coupled with Mass spectrometry (MS) human lymphoblastoid cell extracts from *RAD51B*^{WT/c.92delT} and *RAD51B*^{c.92delT/c.92delT}. Our results clearly show the presence of peptides corresponding to the C-Term of the protein, demonstrating that translation is indeed taking place (Supplementary Table 3). Altogether, these results reveal that the variant c.92delT leads translation re-initiation at M64. To assess the impact of the *RAD51B*-c.92delT variant on its subcellular localization, the human and murine *RAD51B* variant and the WT forms (fused to GFP and untagged) were expressed in Cos7 cells. *RAD51B*-c.92delT displayed lower ratio of nuclear to cytoplasmic labelling in comparison to the WT (Figs. 1C and S1C).

Rad51b^{c.92delT/c.92delT} mice have no obvious ovarian and testis morphological abnormalities

In order to evaluate the physiological relevance of the *RAD51B*-c.92delT variant, we generated a humanized KI mouse *Rad51b*^{c.92delT/c.92delT} by CRISPR/Cas9 editing (Fig. S2A). Although *RAD51B* is essential for mouse development [8], humanized KI mice showed no somatic phenotype and were born with the expected Mendelian ratios (Supplementary Table 4), which strongly suggests that the reinitiation of the translation is also operating in the mouse model. RT-PCR analysis using testis cDNA derived from *Rad51b*^{c.92delT/c.92delT} mice confirmed transcription of the mutated and WT alleles (Fig. S2B).

Rad51b^{c.92delT/c.92delT} male and female mice were able to reproduce. Accordingly, the histological analysis of adult *Rad51b*^{c.92delT/c.92delT} testes revealed no apparent abnormalities in the seminiferous tubules (Fig. S2C). Ovaries from *Rad51b*^{c.92delT/c.92delT} exhibited no differences in the number of follicles in comparison to WT mice (Fig. S2D). Haematoxylin-eosin staining patterns of mouse ovaries were similar at two time-points explored (5 dpp, in which primordial oocytes are expected to be found, and 3-months). The quantification of the primordial oocyte pool was also similar between genotypes (Fig. S2D). Fertility assessment in females also showed no statistical differences in litters per month and in pups per litter between mutant and WT mice, though a trend towards a reduction in the number of pups per litter is observed in the former (Fig. 1D).

Rad51b^{c.92delT/c.92delT} mice show several defects in the DNA repair process

RAD51B is ubiquitously expressed (see www.uniprot.org) in somatic and reproductive tissues including meicytes, though its meiotic function has not been established. To further characterize the involvement of *RAD51B* in meiosis, we analyzed *Rad51b*^{c.92delT/c.92delT} meicytes for the assembly of the synaptonemal complex by monitoring the distribution of SYCP1 and SYCP3. Even though, no defects in synapsis and desynapsis from leptotene to diakinesis were observed (Fig. S3A, B), a reduced number of pachynemas accompanied by an elevated number of diplonemas were found in both *Rad51b*^{c.92delT/c.92delT} males and females. These results

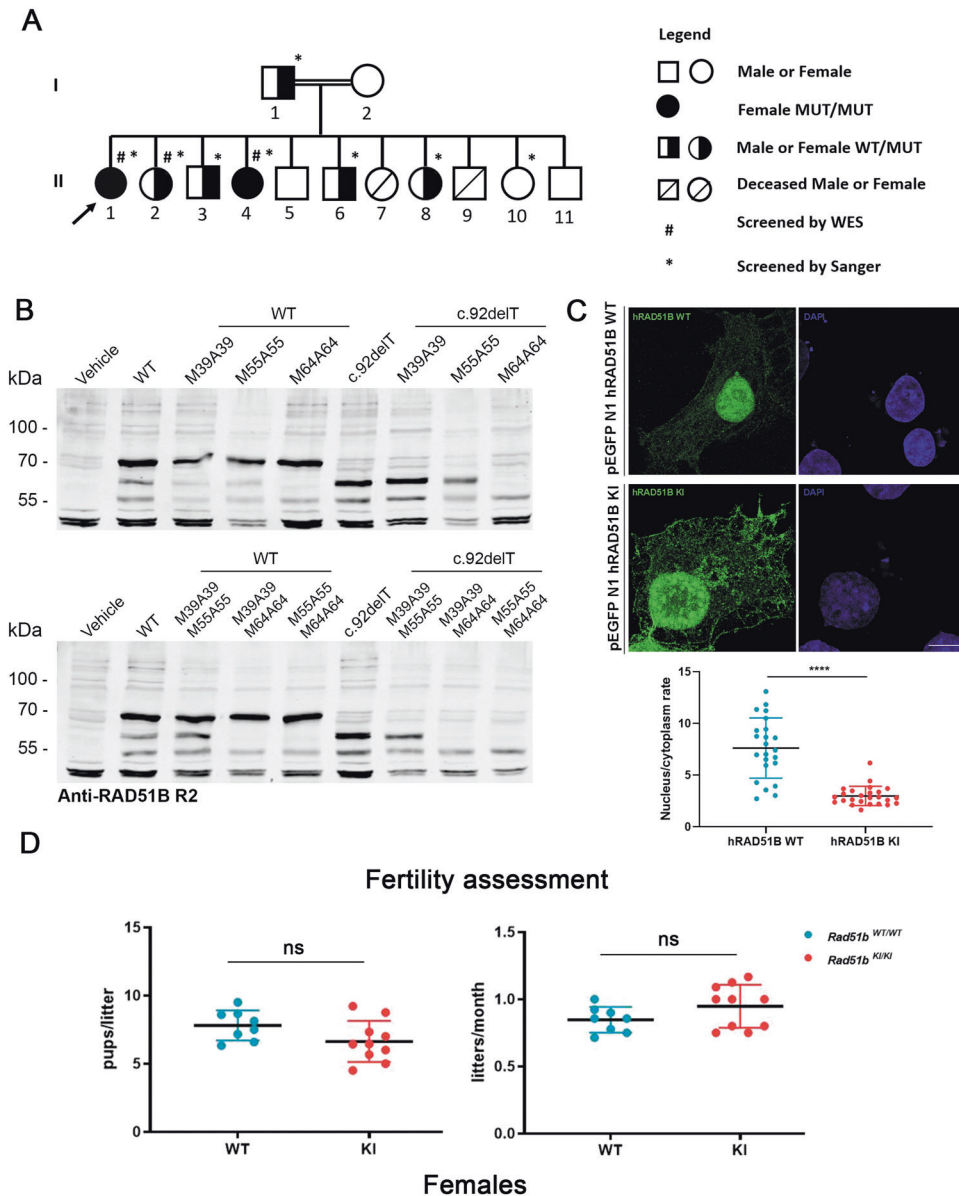


Fig. 1 The variant *c.92delT* leads to translation re-initiation at AUG 64 and to altered nuclear localization. **A** Family Pedigree. A homozygous recessive variant in *RAD51B* was shown to be present in two sisters from Brazil affected with POI. The black arrow indicates proband (II-1). Pedigree numbers of individuals are indicated below the symbols. Samples sent for whole-exome sequencing (WES) are indicated by a hash and samples sent for Sanger sequencing are indicated by an asterisk. Sanger electropherograms confirmed the presence of the homozygous variant in both affected sisters II-1 and II-4. **B** HEK293T cells were transfected or not (Vehicle) with the different variants of *RAD51B*: the WT form (WT), the *c.92delT* form and both the WT and *c.92delT* forms in which the three secondary Methionines were mutated into Alanines (individual Met to Ala substituting the M39 to A39, the M55 to A55 and the M64 to A64; double Met to Ala substitutions following the above argument, both M39A39 and M55A55, both M39A39 and M64A64 and both M55A55 and M64A64). Of note, the bigger size of the *RAD51B* products is due to the presence of GFP tag (27 kDa). **C** COS7 cells were transfected to express human WT or mutant *RAD51B* fused to GFP tag. The WT construct showed a robust nuclear signal in addition to a faint cytoplasmic pattern. In contrast, the mutant variant displayed a partial delocalization of the nuclear signal to the cytoplasm. Quantification of the nucleus/cytoplasm signal rate is shown in the lower plot. Scale bars: 20 μ m. **D** Fertility assessment in female mice of WT and mutant *Rad51b*. The plots show the number of pups per litter and the litters per month. *Rad51b^{c.92delT/c.92delT}* variant is referred as *Rad51b^{KI/KI}* for simplicity. Welch's *t*-test analysis: ns, non-significant differences; *****p* < 0.0001.

display subtle alteration of normal prophase I progression (Fig. S3C, D).

We assessed DSBs generation and repair by detecting phosphorylated histone γ H2AX in *Rad51b^{c.92delT/c.92delT}* meiotic cells (Quantifications at Supplementary Table 5) [29, 30]. We observed similar labelling of γ H2AX from leptotene to zygotene spermatocytes (Fig. S4A), but increased levels of labelling were detected in

meiocytes at pachytene. This accumulation was also observed in oocytes at diplotene (Fig. 2A).

Meiotic DSB repair is orchestrated by a BRCA2-containing supramolecular complex that dictates the sequential recruitment of proteins to the DSBs, such as the binding of RPA for end resection, exchange of RPA by RAD51/DMC1 and loading of the complex MEIOB-SPATA22 to the RPA complexes with the interplay

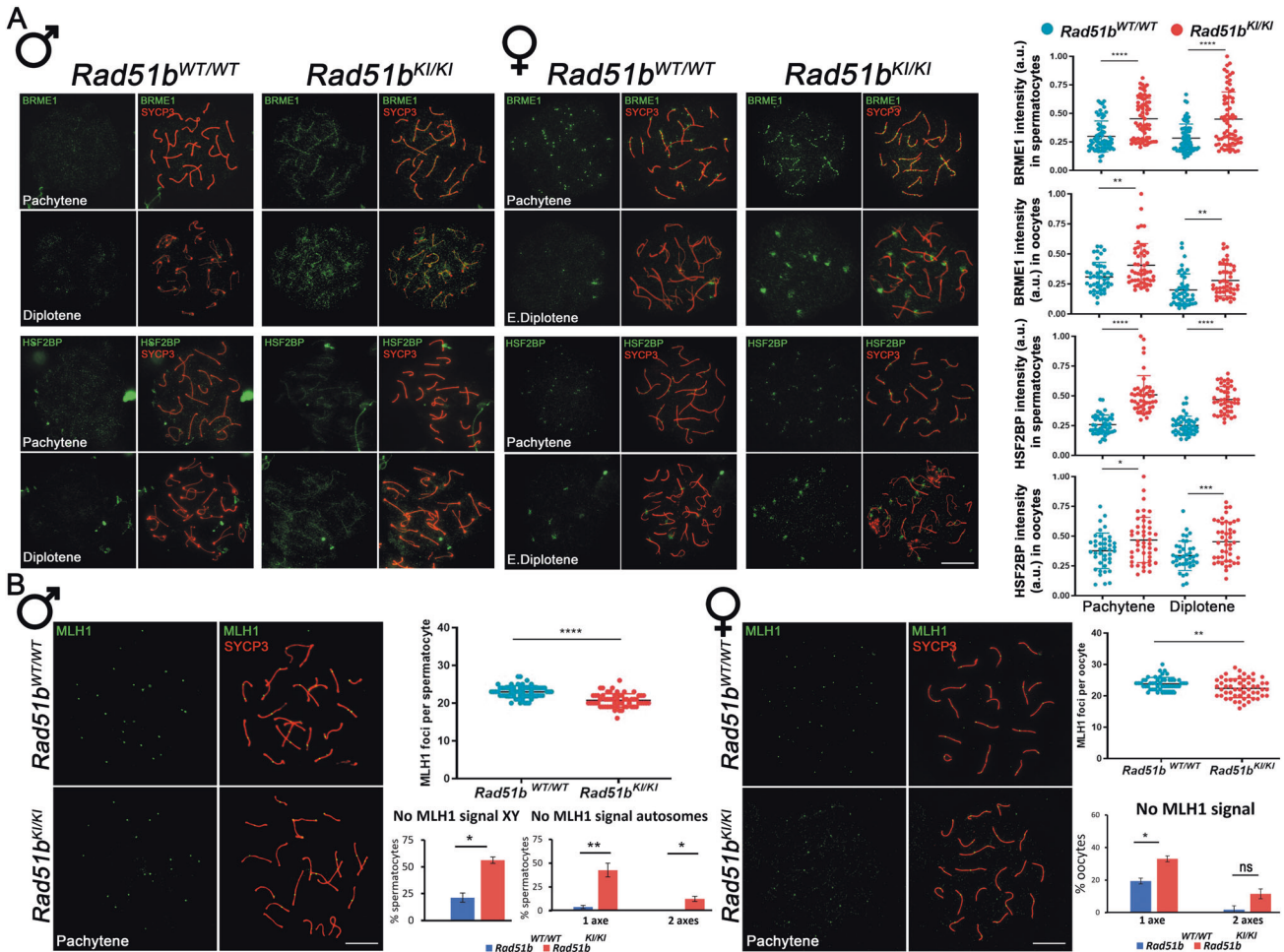


Fig. 3 *Rad51b* mutant mice show an accumulation of BRME1 and HSF2BP and an abnormal CO formation. **A** Double labelling of BRME1 (green) and SYCP3 (red) of spermatocyte and oocyte spreads from WT and KI mice showing the accumulation of BRME1 in mutant late pachynemas and diplotenemas. Double labelling of HSF2BP (green) and SYCP3 (red) of meiotic spreads from *Rad51b^{WT/WT}* and *Rad51b^{KI/KI}* mice showing the accumulation of HSF2BP foci in mutant late pachynemas and diplotenemas. Plots on the right side of the panels represent the quantification of BRME1 and HSF2BP foci and intensity. **B** Double immunolabelling of MLH1 (green) and SYCP3 (red) of spermatocyte and oocyte spreads from *Rad51b^{WT/WT}* and *Rad51b^{KI/KI}*. MLH1 foci are significantly reduced in mutant *Rad51b* meiotic spreads. The plots on the right of the panels represent the quantification of MLH1 foci at pachytene in both male and female meiotic spreads. Quantification of the % of spermatocytes with any autosome or the sexual bivalent without MLH1 foci. $n = 108\text{--}114$ (autosomes), $n = 66\text{--}96$ (X-Y bivalent). Quantification of the % of oocytes with any autosome without MLH1 foci. $n = 51\text{--}54$ (autosomes). *Rad51b^{c.92delIT/c.92delIT}* variant is referred as *Rad51b^{KI/KI}* for simplicity. Welch's *t*-test analysis: ns, non-significant differences; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Bar in panels, 10 μm . See Supplementary Table 5 for raw data quantification.

identified protein RAD51C. We detected positive co-immunoprecipitations between RAD51B and the paralogues, RAD51C, RAD51, HELQ and DMC1 (Fig. 4A–D).

Given that the N-term part of RAD51B (residues 1–75) interacts with RAD51C [34], we analyzed the ability of mutant RAD51B to maintain its interaction with the identified partners. RAD51C immunoprecipitated WT RAD51B but not mutant RAD51B indicating that the *c.92delIT* variant drastically diminishes or abrogates their interaction (Fig. 4A). This loss of interaction was also verified by Co-IP coupled with MS of *RAD51B^{c.92delIT/c.92delIT}* lymphoblastoid cells (Supplementary Table 3). Similarly, RAD51B-*c.92delIT* interaction was weaker with RAD51 and with the helicase HELQ, but not with DMC1 (Fig. 4B–D). These results suggest that RAD51B acts in concert with DMC1/RAD51/RAD51C recombinases to promote/mediate meiotic recombination.

RAD51B-*c.92delIT* human and mouse cells are sensitive to MMC-induced DNA damage

Typically, RAD51-deficient cells are hyper-sensitive to DNA interstrand crosslinking (ICL) agents such as MMC. Accordingly,

Rad51b^{c.92delIT/c.92delIT} MEFs showed a relatively lower growth rate in the presence of MMC (Fig. 5A). Clonogenic survival assays of MMC-treated MEFs *c.92delIT/c.92delIT* also showed a reduced number of colonies (Fig. 5B). We next monitored the efficiency of DNA repair. MEFs were treated with MMC and analyzed at different time points. The results of this experiment showed a delay in the disappearance of γH2AX foci even at 72 h after MMC treatment, indicating the presence of unrepaired DNA (Fig. 5C). In addition, MMC-treated MEFs from *Rad51b^{c.92delIT/c.92delIT}* showed more chromosome break events (passage 2 and passage 4) (Fig. 6A). The assessment of the impact of the variant affected on genome stability in vivo showed that bone marrow-derived metaphase plates from *Rad51b^{c.92delIT/c.92delIT}* MMC-treated mice had a significantly increased number of chromosomal breaks events per cell compared to WT mice (Fig. 6B).

Rad51b^{c.92delIT/c.92delIT} immortalized lymphoblastoid cells from the affected patient (II-4) also displayed more chromosome breaks events in comparison with the heterozygous *RAD51B^{WT/c.92delIT}* cells from the unaffected sister (II-2) in the presence of MMC and even in their absence (Fig. 6C). Taken together, these results

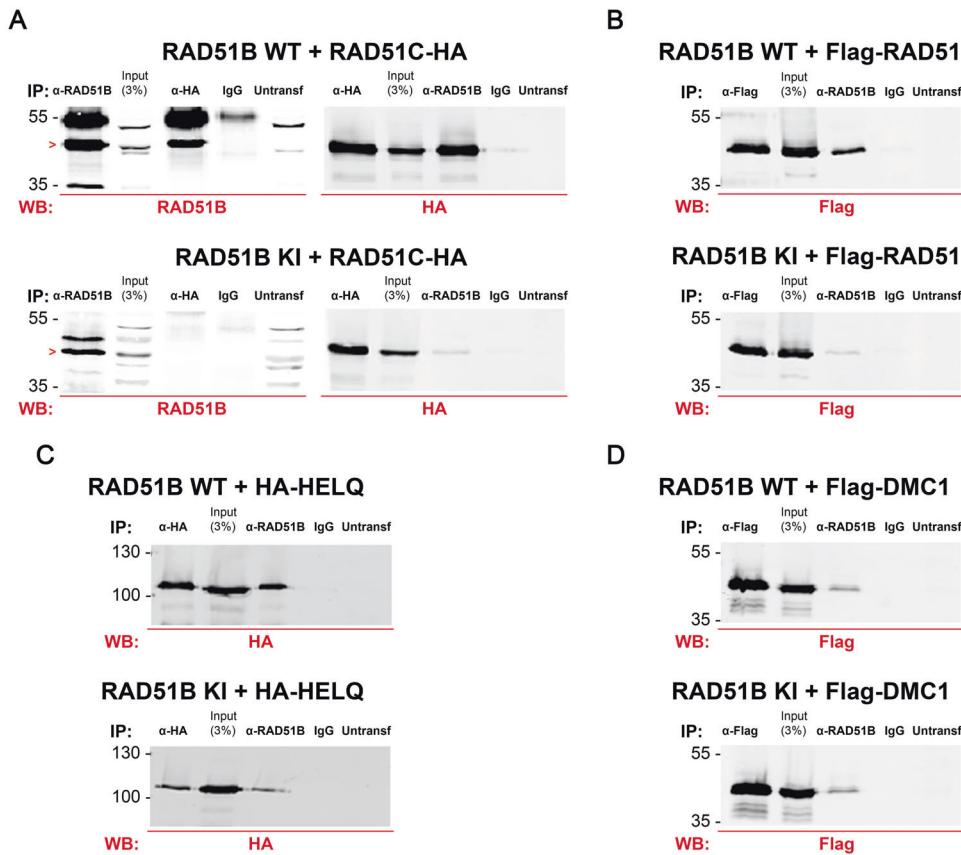


Fig. 4 Loss of interaction between RAD51B-c.92delT and RAD51C as well as a reduction of the interaction between RAD51B-c.92delT and HR-specific interactors as revealed by co-immunoprecipitation. HEK293T cells were co-transfected with either RAD51B-WT or RAD51B-c.92delT and **A** RAD51C-HA, **B** Flag-RAD51, **C** HA-HELQ or **D** Flag-DMC1. Protein complexes were immunoprecipitated with either an anti-RAD51B, anti-Flag, anti-HA or IgGs (negative control), and analyzed by immunoblotting with the indicated antibody. The red > indicates the band corresponding to RAD51B.

confirm that the homozygous *RAD51B*-c.92delT variant leads to an impaired repair of MMC-induced DNA damage and as a consequence increase the levels of CIN in vitro and in vivo.

MMC stress leads to ICL lesions that inhibits the unwinding of DNA strands and blocks the progression of replicative DNA helicases. To further assess the involvement of *Rad51b*-c.92delT in this phenotype, we also analyzed its susceptibility to hydroxyurea (HU) and the specific DNA polymerase inhibitor Aphidicolin, two inducers of replication fork DNA damage [36]. Our results show that both drugs produce a lower percentage of surveillance in the c.92delT MEFs (Fig. 7A).

Given these observations and that RAD51 paralogues participate in the response to replication stress [37, 38], we used stretched DNA fibers to monitor fork speed in *RAD51B*^{c.92delT/c.92delT} and *RAD51B*^{WT/c.92delT} in immortalized lymphoblastoid cells treated with MMC. In these conditions, cells derived from the affected patient displayed shorter tracks and reduced fork progression rate (Fig. 7B), which likely reflect a high frequency of fork stalling events and/or impaired fork restart [38, 39]. This observation suggests that *Rad51b*-c.92delT mutant protein is defective in the DNA damage tolerance pathways that restart DNA synthesis at stalled forks, impairing their subsequent repair and potentially increasing the frequency of DNA breaks.

Given the involvement of the Rad51 family of paralogues in the canonical pathway of HR between sister chromatids [40], we analyzed this parameter in *RAD51B*-c.92delT lymphoblastoid cells by the classical 5BrdU incorporation procedure. We observed no differences between the WT and mutant *RAD51B* even in presence

of MMC indicating that the canonical HR pathway remains unaffected (Fig. 7C).

***Rad51b*-c.92delT decreases reprogramming efficiency in mouse embryonic fibroblasts**

The expression of the Yamanaka factors [41] induce genome instability providing a plausible explanation for the requirement of an intact HR pathway and low replication stress to achieve efficient reprogramming [42, 43]. In the light of this, we evaluated the role of RAD51B during reprogramming using homozygous *Rad51b*^{c.92delT-c.92delT} MEFs. The numbers of alkaline phosphatase positive colonies were significantly reduced (up to ~2 fold) in *Rad51b*-c.92delT homozygous mutant MEFs in comparison with the WT (Fig. 8A). By picking colonies with iPS-like morphology (3D shape, defined borders and refringence), we were able to establish *Rad51b*-c.92delT mutant iPS cell lines with comparable efficiency (~30%) to WT controls, suggesting they are similarly functional bona fide iPS clones.

***Rad51b*^{c.92delT/c.92delT} mice show increased incidence of pituitary hyperplasia**

The somatic phenotypes observed are all hallmarks of genome instability. Thus, we evaluated the incidence of spontaneous neoplasia in aged mice (from 18 to 22 months). We observed a pituitary hyperplasia and frequent adenomas of the pituitary gland in mutant homozygous mice (9 out of 14 *Rad51b*^{c.92delT/c.92delT} mice vs 1 out of 12 in wild type controls) (Fig. 8B). These benign tumors ranged from micro- to macroadenomas (Fig. 8C–H) and showed

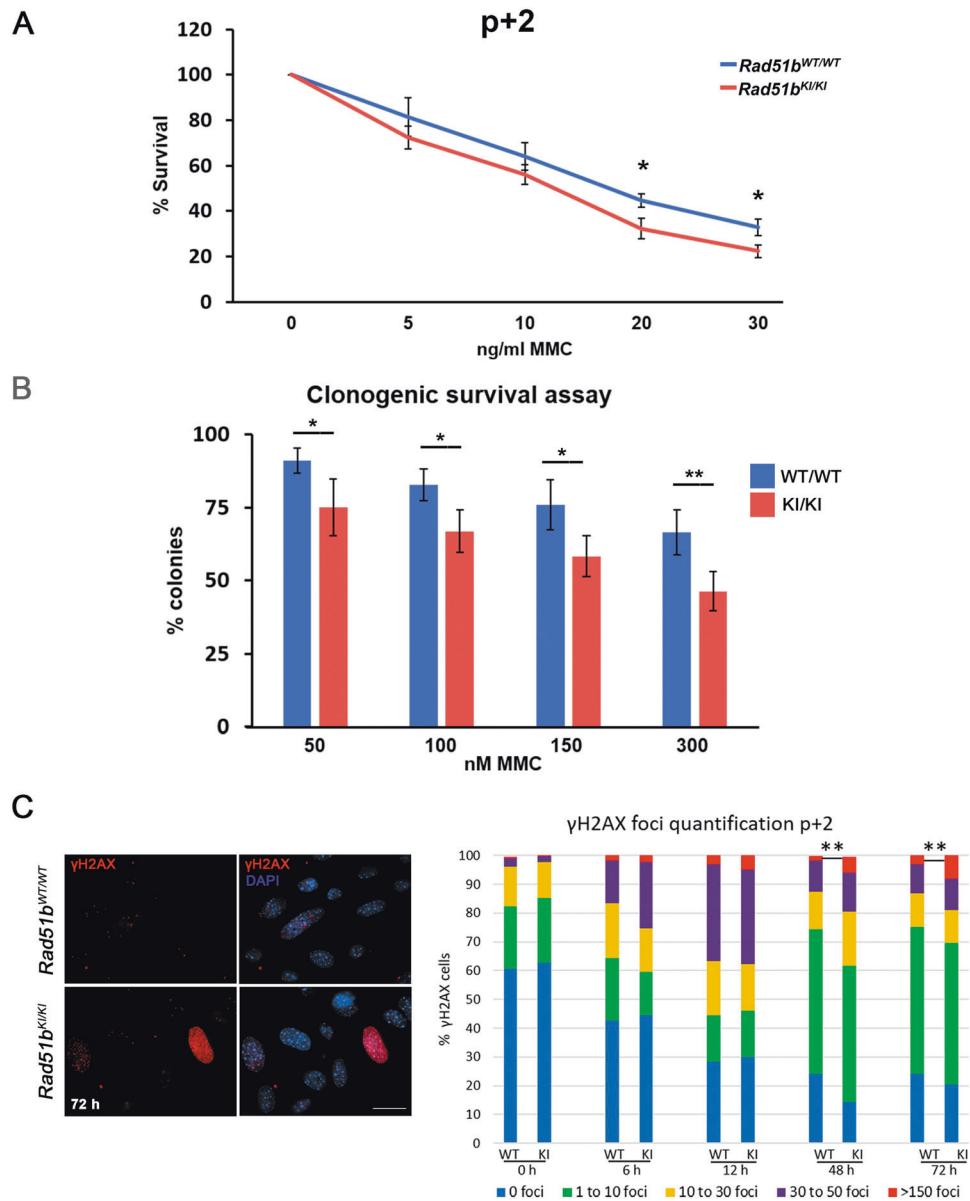


Fig. 5 *Rad51b* mutant MEFs show an increased susceptibility to MMC-induced DNA damage. **A** Cell proliferation assay of WT and mutant *Rad51b* primary MEFs at passage 2 (p + 2) incubated in presence of a continuous treatment with MMC. The results are expressed as a percentage relative to the control (not treated with MMC). Each point on the graph represents the mean \pm SD. **B** Percentage of colonies obtained by clonogenic cell survival assays after treatment with MMC. The results are expressed as a percentage relative to the control (untreated) of *Rad51b*^{WT/WT} and *Rad51b*^{KI/KI} immortalized cells. **C** Representative γ H2AX immunolabelling of WT and mutant *Rad51b* at 72 h. Quantification of γ H2AX foci in *Rad51b* WT and mutant MEFs. *Rad51b*^{WT/WT} and *Rad51b*^{KI/KI} MEFs at p + 2 were incubated in presence of MMC at 1 μ g/ml for 1 h and then supplemented with fresh medium without MMC. The quantification was performed at different time points: 0 h: 0 h, 6 h: 6 h, 24 h: 24 h, 48 h: 48 h and 72 h: 72 h. Cells were classified in 5 groups: 0 foci, 1 to 10 foci, 10 to 30 foci, 30 to 150 foci and >150 foci. *n* = 3. *Rad51b*^{c.92delT/c.92delT} variant is referred as *Rad51b*^{KI/KI} for simplicity. Welch's *t*-test analysis: **p* < 0.05; ***p* < 0.01. Bar in panel, 10 μ m.

immuno-histochemical overexpression of prolactin (Fig. 8I, J) in the cytoplasm of tumor cells (but not of ACTH, GH, FSH and LH shown in Fig. S7). Overall, the mice developed pituitary hyperplasia and frequent adenomas, with typical features of prolactinomas. Interestingly, a genetic variant in human RAD51B has been recently associated with pituitary tumors [44].

DISCUSSION

We describe for the first time a homozygous variant in *RAD51B* (c.92delT) found in two sisters affected with isolated POI. *RAD51B* seems to be involved in the assembly of RAD51 nucleoprotein

filaments during HR and in replication fork remodeling and restart [10, 38, 45]. Thus, RAD51B has been associated with CIN and cancer predisposition [44, 46, 47]. However, its role on female fertility and meiotic DSB repair has not been reported yet. Herein, a perfect segregation of *RAD51B*-c.92delT and female infertility was found in a family. Specifically, all affected subjects were homozygous for the variant, while heterozygosity or absence of this variant was observed in unaffected members.

The variant was predicted to lead to a PTC leading to the expression of a short N-term protein of only 39 residues lacking the two walker motifs essential for its ATPase activity [28], which would result in null allele known to be lethal in the mouse [8]. Such a PTC

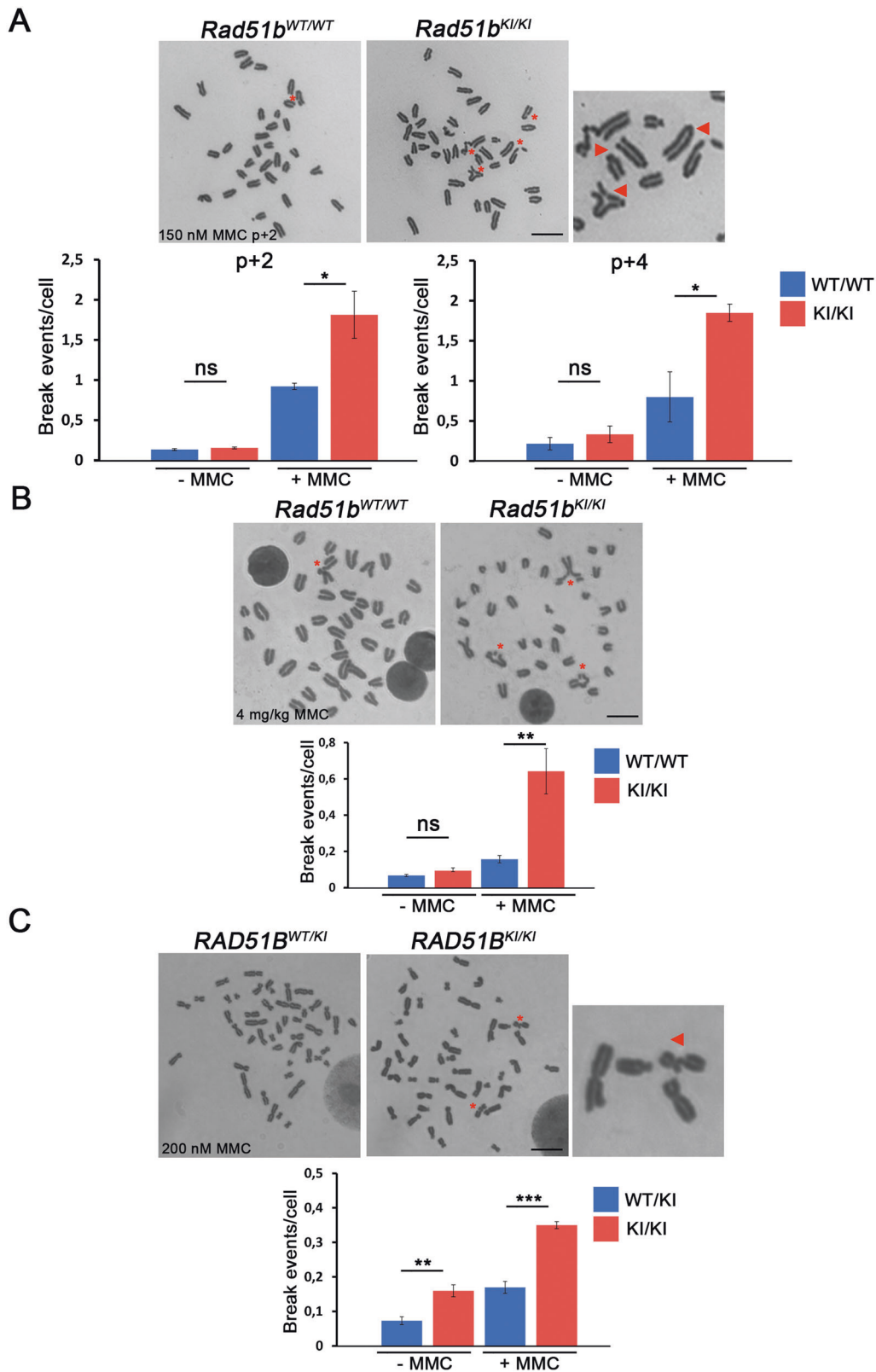


Fig. 6 MMC-induced CIN in mouse and human *RAD51B-c.92delT* cells. **A** Evaluation of metaphase chromosome breaks/gaps from *Rad51^{WT/WT}* and *Rad51b^{KI/KI}* MEFs after MMC treatment (150 nM). Lower panel (graphs) shows the quantification of breaks/gaps at passage 2 (p + 2) and passage 4 (p + 4). **B** Evaluation of metaphase chromosome aberrations from bone marrow of *Rad51b^{WT/WT}* and *Rad51b^{KI/KI}* after intraperitoneal injection of MMC (4 mg/kg). In addition, to breaks/gaps, triradial chromosomes were observed only in the mutant mice (shown by red asterisks). **C** Homozygous *RAD51B-c.92delT* human-derived lymphoblastoid cells showed more chromosome alterations with and without MMC treatment (200 nM) in comparison with the corresponding heterozygous sister. $n = 3$. *Rad51b^{c.92delT/c.92delT}* variant is referred to as *Rad51b^{KI/KI}* for simplicity. Welch's *t*-test analysis: ns, non-significant differences; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Bar in panels, 10 μm .

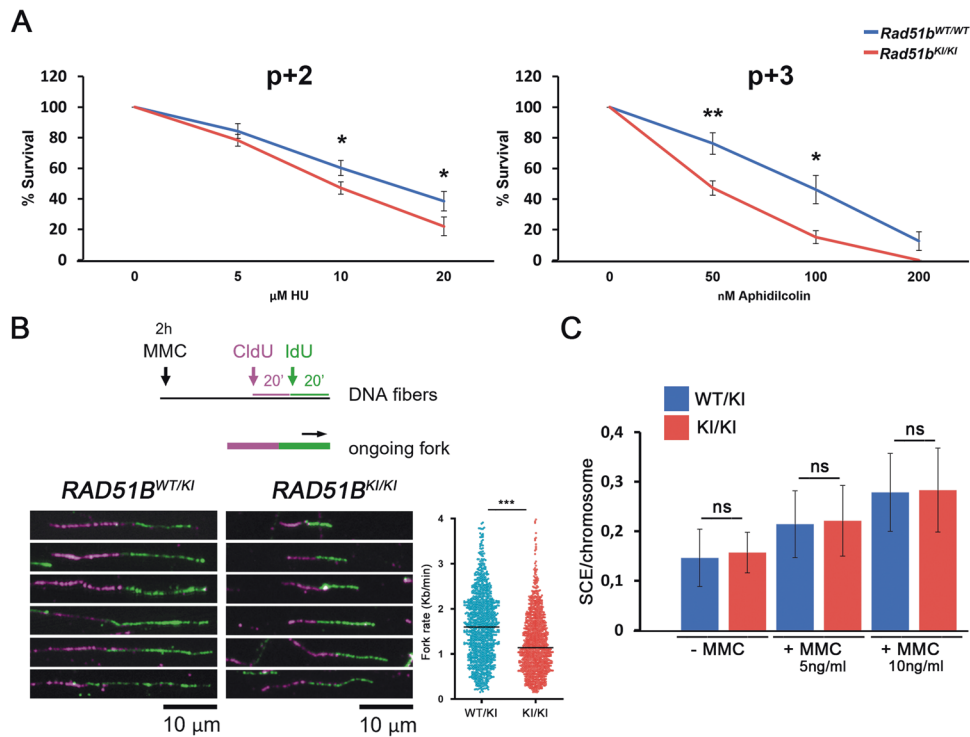


Fig. 7 *RAD51B-c.92delT* have a role in replication fork homeostasis but not in SCE. **A** Cell proliferation assay of WT and mutant *Rad51b* primary MEFs at passage 2 (p + 2) and 3 (p + 3) incubated in presence of a continuous treatment with hydroxyurea (HU) and in presence of a continuous treatment with Aphidicolin. The results are expressed as a percentage relative to the control (not treated). Each point on the graph represents the mean \pm SD. **B** Top: Schematic of the stretched DNA fiber assay. Bottom: Examples of DNA fiber images from the indicated cells. Bar in panels, 10 μ m. Histogram shows the fork progression rate (median and distribution) in each experimental condition. $n = 3$ experimental replicates (data pooled together). >400 structures scored per condition and replica. *** $p < 0.001$; in Mann-Whitney test. **C** Sister chromatid exchange (SCE) per chromosome after treatment with MMC. *RAD51B^{WT/KI}* and *RAD51B^{KI/KI}* variants are referred to as *RAD51B^{WT/KI}* and *RAD51B^{KI/KI}* for simplicity. Welch's t -test analysis: ns, non-significant differences, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

might also generate a null allele by activating the nonsense mediated decay (NMD), a surveillance pathway that reduces the production of truncated proteins translated from mRNAs bearing PTCs. NMD is more likely to be triggered when a PTC is located at least 50 nucleotides upstream of the last exon-junction [48]. This rule fits well for the location of the *RAD51B-c.92delT* variant. However, the observed expression of the *RAD51B* mRNA in *Rad51b^{c.92delT/c.92delT}* mice and *RAD51B-c.92delT* human-derived lymphoblastoid cells indicates that NMD is not operating, probably abrogated by the restart of translation according to a recent model based on truncating mutations in tumors [49]. This model would explain the absence of NMD in the *RAD51B-c.92delT* variant because translation reinitiation at AUG64 would abrogate NMD and consequently allow the expression of a truncated *RAD51B* protein lacking its N-terminal domain. This domain is involved in protein-protein interactions with its paralogues, such as *RAD51C* and in nuclear localization through a NLS [34]. This is consistent with the observed altered nuclear localization of the *RAD51B-c.92delT* in comparison to the WT in transfected cells and would suggest a similar dysfunction of the endogenous protein in vivo.

The pathogenicity of the human *RAD51B* variant is supported by the observed meiotic DNA repair defects during mouse prophase I, the increased incidence of pituitary adenomas, and the defects of MMC-induced damage repair in *c.92delT* human and mouse cells. In addition, *RAD51B-c.92delT* variant reduced the reprogramming efficiency of primary MEFs into iPSCs.

Similar to its *Rad51* paralogues [6, 35], the disruption of *Rad51b* in mice has shown early embryonic lethality [8]. The *Rad51b* hypomorphic allele analyzed in this study causes a loss of *RAD51B-c.92delT* interaction with *RAD51C* and a partial loss of interaction with *RAD51* and *HELQ*. In vivo, *Rad51b-c.92delT* mice did not show any effect on *DMC1* loading, but revealed accumulation of foci

containing γ H2AX, *RAD51* and the *BRCA2*-associated proteins *HSF2BP/BRME1* on the chromosome axes from pachytene onward [24, 31, 33, 35]. The accumulation of these non-meiotic specific repair proteins could be explained by the reactivation of a somatic-like HR DNA-repair pathway at pachytene as a consequence of the persistence of unrepaired meiotic DSBs [32]. Regarding *HELQ*, this helicase promotes efficient HR at damaged replication forks by interacting directly with the *RAD51*-containing *BCDX2* complex. This complex and *HELQ* act together in the resolution of DNA ICLs upon exposure to MMC [50]. The diminished interaction between the mutant *RAD51B-c.92delT* variant and *HELQ* sheds light into the presence of unrepaired DNA in MEFs, bone marrow and human lymphoblastoid cells but also into the persistence of unrepaired meiotic DSBs and reduced number of COs. Interestingly, mice lacking *HELQ* exhibit MMC sensitivity, pituitary adenomas as well as germ cell attrition with subfertility [50] and worms lacking both *HELQ* and the *RAD51* paralogue *RFS1* results in a block to meiotic DSB repair after strand invasion [51]. These inefficient interactions of *RAD51B-c.92delT* together with the altered nuclear localization of the *RAD51B* variant synergistically lead to a reduction of COs in both spermatocytes and oocytes.

A recent study carried by our laboratory evaluating a POI-inducing variant in the gene *HSF2BP* showed a comparable reduction in the number of COs in comparison with the *Rad51b-c.92delT* mice, which led to a very slight reduced female fertility [24]. This trend of the reduction of litter size in the *RAD51B-c.92delT*, albeit not statistically significant, could be due to non-identical genetic backgrounds between both mouse models and would support the idea of a slight impact on fertility.

RAD51 and its paralogues have been also associated with cancer predisposition and Fanconi anemia [52]. *RAD51B* has been involved

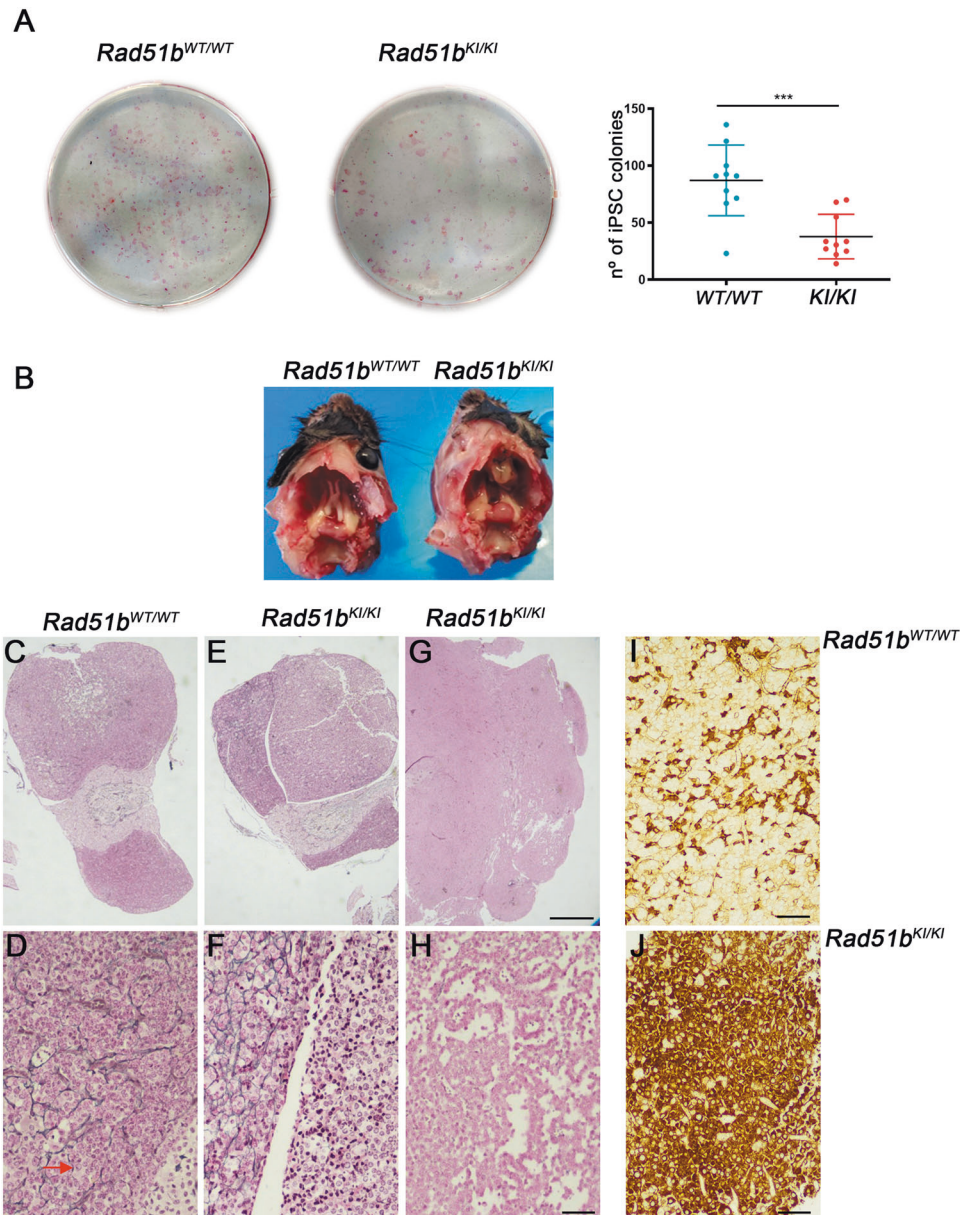


Fig. 8 *RAD51B-c.92delT* leads to a reduced reprogramming efficiency of MEFs and humanized *Rad51b*^{KI/KI} mice show an increased incidence of hyperplasia of the pituitary gland. **A** MEFs from the indicated genotypes were infected with the 3 reprogramming factors and the numbers of alkaline phosphatase positive colonies were counted showing a significantly reduction (up to ~2 fold) in *Rad51b-c.92delT* homozygous mutant MEFs in comparison with the wild-type control. $n = 9$. Welch's *t*-test analysis: *** $p < 0.001$. **B** Macroscopic image of adenohypophysis from *Rad51b*^{WT/WT} and adenohypophysis from *Rad51b*^{KI/KI} mice. Reticulin staining (**C–H**) and Prolactin IHC (**I, J**) of pituitary adenohypophysis from *Rad51b*^{WT/WT} and *Rad51b*^{KI/KI}. **C, D** Normal adenohypophysis from *Rad51b*^{WT/WT} show a reticulin staining pattern that is partially lost in zones of hyperplasia where the cell size is increased (magnified in **D**, indicated by an arrow). **E, F** Microadenoma from a *Rad51b*^{KI/KI} showing a complete loss of reticulin staining pattern and complete absence of normal adenohypophysis tissue. **G, H** Macroadenoma from a *Rad51b*^{KI/KI} showing total loss of reticulin staining pattern and complete absence of normal adenohypophysis tissue. The neoplasm shows different adenoid and pseudopapillary growing patterns (magnified in **H**). **I, J** IHC of prolactin in normal pituitary glands from *Rad51b*^{WT/WT} showing labelled cells unevenly distributed whereas adenomas from *Rad51b*^{KI/KI} revealed a high density of prolactin expressing cells. Bar in panels, 250 μm (**C, E, G**) and 50 μm (**D, F, H, I, J**). *Rad51b*^{c.92delT/c.92delT} variant is referred as *Rad51b*^{KI/KI} for simplicity.

in male and female breast cancer, ovary cancer, prostate cancer, and pituitary adenoma [44, 46, 47, 53–57]. Consistently, *RAD51B-c.92delT* somatic human-derived lymphoblastoid cells, as well as MEFs and explanted bone marrow cells from humanized mice are sensitive to MMC-induced CIN. Moreover, *Rad51b*^{c.92delT/c.92delT} and HELQ-deficient mice display an increased incidence of pituitary hyperplasia suggesting a common pathological mechanism of action. Of note, patient II-4 was diagnosed with a duodenal tubulovillous adenoma with high-grade dysplasia (details in case

report section). Altogether, these data provide evidence for a critical role of *RAD51B* in somatic genome instability and tumorigenesis.

Previous studies have shown that efficient reprogramming of MEFs to a pluripotent stage requires a proficient HR pathway. Accordingly, efficient reprogramming requires key HR genes [42]. Interestingly, the expression of the 3 F reprogramming factors in MEFs induces replication stress, and genetic reduction of stress (overexpressing *Chk1*) increases the efficiency of iPSC generation

[43]. Besides, it is known that replication forks may be stalled at DNA lesions generated by cellular metabolism (aldehydes) or DNA damaging agents including MMC [58]. One pathway to resume DNA synthesis involves fork remodeling events mediated in part by RAD51 paralogues [38]. Our *in vivo* and *in vitro* observations of the effects caused by *Rad51b-c.92delT* in reprogramming, fork progression, chromosomal breakage and clonogenic survival suggest also a somatic function of this paralogue in assisting fork progression through certain DNA lesions, as part of the DNA damage tolerance response.

In summary, we describe for the first time two sisters with an isolated POI phenotype caused by a novel homozygous variant in RAD51B (*c.92delT*). Humanized mice reveal that the RAD51B pathogenic variant evades NMD probably owing to the reinitiation of the translation at a secondary downstream AUG. The resulting truncated protein lacks most of the N-term domain involved in protein-protein interactions and proper nuclear localization. As a result, homozygous *Rad51b-c.92delT* mice shows meiotic DNA repair defects with RAD51 and HSF2BP/BRME1 accumulation in the chromosome axes which leads to a significant reduction in COs. In addition, *RAD51B-c.92delT* human-derived lymphoblastoid cells and mutant MEFs are sensitive to MMC-induced CIN and revealed a reduced reprogramming efficiency to iPSCs as well as a decrease in replication fork progression. Of interest, humanized mice exhibit an increased incidence of hyperplasia of the pituitary gland likely as a consequence of the *RAD51B-c.92delT*-induced genome instability.

METHODS

Case report

Written informed consent was obtained from all subjects before sample collection for DNA analysis. This study was approved by the Ethics Committee of Hospital das Clínicas, Sao Paulo University School of Medicine, Brazil (protocol number 2015/12837/1.015.223). The proposita (II-1) and her younger sister (II-4) were born from first-degree cousins from Northeastern of Brazil (Fig. 1A). On examination at 23 and 21 years of age respectively, they were diagnosed with POI presenting with primary amenorrhea. These siblings had no menarche and physical examination revealed Tanner stage 1 for breast development (II-1 and II-4) and Tanner stage IV pubic hair. Consistent with the diagnosis of hypergonadotropic hypogonadism, basal gonadotropin levels were elevated in the proband and her affected sister (FSH = 44 and 31 U/L, LH = 21 and 17 U/L, respectively) while estradiol levels were undetectable. At first appointments, physical examination showed normal height (149 and 156 cm respectively), and body weight (60 and 47 kg, respectively). Pelvic ultrasound scans showed an infantile uterus, and the ovaries could not be visualized. Thyroid, adrenal or ovarian autoimmune disorders had been excluded in these patients. On karyotyping analysis performed in 30 metaphases, both sisters were 46,XX. Treatment with conjugated estrogens followed by progesterone replacement resulted in complete breast development and menstrual bleeding. However, the proband and her affected sister developed hypertension, insulin resistance, primary hypothyroidism with absence of thyroid antibodies, and obesity over the years, being current BMI = 41 and 34 kg/m², respectively. During the course of this investigation, the affected sister was also diagnosed with a duodenal tubulovillous adenoma with high-grade dysplasia and underwent surgery. Thereafter, she was found to have an indeterminate hepatic nodule and hepatic steatosis. She has been followed and no additional radiotherapy or chemotherapy has been done. The proband has not been diagnosed with any neoplasia. Regarding their family's history, one first-degree cousin and three-second degree cousins were found to have 46,XY DSD due to 5- α -reductase type 2 deficiency.

Genetic analysis

DNA extraction: Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes from all patients using standard procedures. **Whole-exome sequencing:** Libraries were prepared on both sisters (II-1 and II-4) and her unaffected sister (II-2, as shown in Fig. 1A). Briefly, genomic DNA was sheared to 200–300 bp using the Covaris acoustic adaptor. Exons were captured using SureSelect Human All exons kit (Agilent Technologies) and

sequenced by Illumina platform (HiSeq2500, Illumina). Alignment of raw data and variant calling were performed following the steps described by Franca and collaborators [59]. Briefly, the reads were aligned to the human reference genome GRCh37/hg19 using Burrows-Wheeler aligner [60]. Variant calling was performed with FreeBayes and annotated ANNOVAR. SNVs were run through independent protein pathogenicity predictors: PolyPhen-2, SIFT, Mutation Taster, Mutation Assessor, FATHMM, Radial SVN, and LRT. **Sanger sequencing:** Sanger sequencing was done to validate only the primary variant of interest in all subjects. Primers flanking the *RAD51B* variant (ENSG00000182185/NM_133509: exon3:c.92delT:p.Leu31Tyrf9) were used for PCR amplification. Sanger sequencing was performed to validate only the primary variant of interest in all family subjects for whom DNA was available. Primers flanking the *RAD51B* variant (ENSG00000182185/NM_133509: exon3:c.92delT:p.Leu31Tyrf9) were used for PCR amplification. Moreover, Sanger sequencing was used to screen 235 fertile Brazilian control women for the presence of the putative damaging variant. All PCR products were sequenced using BigDye terminator v1.1 followed by automated sequencing at the ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

RNA extraction from patient blood samples

Blood samples were centrifuged at 400 \times g for 10 min at room temperature with the brake off for leukocyte isolation. The buffy coats were removed, and RNA extractions were performed by adding TRI-reagent according to the manufacturer's recommendation (Sigma). Total RNA was reverse-transcribed using MMLV RT enzyme (Takara) and standard procedures. The expression and integrity of patients *RAD51B* transcript were studied by RT-PCR using the high-fidelity Herculase II fusion DNA polymerase (Agilent) and the couple of primers RAD51B-Fext: 5'-GCATGGGTAGCAAGAACT AAAA-3' and RAD51B-Rext: 5'-GATCCACAAGCCACACCAC-3' encompassing the *c.92delT* variant. The oligo RAD51B-Fint: 5'-GAGCTGTGTGACCGTCTG AG-3' was used to verify the PCR product by Sanger sequencing (Eurofins genomics).

Generation of CRISPR/Cas9-edited mice

For developing the *Rad51b*^{K1/K1} model, *Rad51b*-sgRNA1 5'-CTAGAAGT-TATGAAAGTGAC-3' and sgRNA2 5'-GAGACTTAAAAAGTGCTAAA-3' targeting the exon 3 were predicted at https://eu.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_SEQUENCE. The designed ssODN contains the muted base (*c.92delT*) and mutations that humanize the locus (TTTAAGTCTCTCCCACTAGAACTTATGAAA > TTTATGTCTCTCCCACTG-GAGCTTATGAAG). The crRNAs, the tracrRNAs and the ssODNs (Supplementary Table 7) were produced by chemical synthesis by IDT. The crRNA and tracrRNA were annealed to obtain the mature sgRNA. A mixture containing the sgRNAs (20 ng/ μ l of each annealed sgRNA), 30 ng/ μ l of recombinant Cas9 protein (IDT) and 10 ng/ μ l of the ssODN were microinjected into B6/CBA F2 zygotes (hybrids between strains C57BL/6 J and CBA/J) [61] at the Transgenic Facility of the University of Salamanca. Edited founders were identified by PCR amplification (Taq polymerase, NZYtech) with primers flanking the edited region (Supplementary Table 7). PCR products were directly sequenced or subcloned into pBlueScript (Stratagene) followed by Sanger sequencing. Selected founders, carrying the desired alleles, were crossed with wild-type C57BL/6 J to eliminate possible unwanted off-targets. Heterozygous mice were re-sequenced and crossed to generate the edited homozygotes. Genotyping was performed by agarose gels analysis or Sanger sequencing (in *Rad51b* humanized mutant) of PCR products from genomic DNA extracted from tail biopsies.

Histology

For histological analysis, after the necropsy of the mice their testes were fixed in Bouin's fixative, ovaries and pituitary glands were fixed in 10% formol. Tissues were processed into serial paraffin sections and stained with haematoxylin-eosin (ovaries) or Periodic acid-Schiff (PAS) and haematoxylin (testes). Jones' reticulin staining was performed automatically on the ArtisanTM Link Pro Special Staining System (Dako). Prolactin and ACTH detection by IHC was carried out in an Artisan Link Pro (DAKO) at pH6 using a polyclonal rabbit against prolactin (A0569) and a mouse monoclonal against ACTH (clone O2A3; 1:100), respectively. GH, FSH, and LH detection was carried out in an ultra-view BenchMark (Roche) using a rabbit polyclonal antibody against ACTH (206A-74), a rabbit polyclonal against GH (208A-74), a rabbit polyclonal against SH (EP257), and a rabbit polyclonal against LH (209A-14). All the immunohistochemical stainings for

pituitary hormones ACTH, TSH, GH, LH, FSH were negative, using normal pituitary as a control. The samples were analyzed using a microscope OLYMPUS BX51 and images were taken with a digital camera OLYMPUS DP70. Primordial cell evaluation was carried out by serially slicing into 5 μ thick sections the inner third of each ovary.

Fertility assessment

Rad51b^{WT/WT} and *Rad51b*^{KI/KI} females (8 weeks old) were mated with wild type males, respectively, over the course of 4–12 months. 8 mice per the wild type and 10 mice in the case of *Rad51b*^{KI/KI} were crossed. The presence of copulatory plug was examined daily and the number of pups per litter was recorded.

RAD51B localization in Cos7 cells

Localization of RAD51B variants was studied in COS7 cells transfected with Jetpei (PolyPlus) according to the manufacturer's protocol. 5×10^4 cells were plated on 0.5% fish gelatin-treated (Sigma-Aldrich) 35 mm culture dishes and were subsequently transfected the day after with 0.2 μ g of GFP-fused expression vectors. The culture media was replaced after 24 h. COS7 cells were fixed 48 h post-transfection with 4% formaldehyde solution (ThermoFisher) for 7 min at 4 °C. They were washed three times in 1X PBS before a permeabilization with 0.2% Triton X-100 in KB buffer (0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% BSA). Cells were then washed again and blocked in 7% FBS-supplemented 1X PBS for 30 min at RT. After that, they were incubated with a rabbit anti-GFP antibody (Invitrogen) 1:300-diluted in 7% FBS in PBS for 1 h in a wet chamber at RT. After three washes in 1X PBS, the cells were incubated with a secondary FITC anti-rabbit antibody (Jackson ImmunoResearch) diluted 1:100 in 7% FBS in PBS for 1 h. The slides were rinsed 3 times in PBS and finally mounted with Vectashield® and DAPI. Images were taken at 63X magnification with the Laser Scan Confocal Microscopy Leica SP8 (Leica).

Immunocytology and antibodies

Testes were detunicated and processed for spreading using a conventional “dry-down” technique. Oocytes from fetal ovaries (E18 and E18.5 embryos) were digested with collagenase, incubated in a hypotonic buffer, disaggregated, and fixed in paraformaldehyde. Rabbit polyclonal antibodies (R1 and R2 generated from two different host rabbits) against HSF2BP and BRME1 were developed by ProteintechTM against a fusion protein of poly-His with full length HSF2BP or BRME1 (pUC57 vector) of mouse origin. Rabbit polyclonal antibody against DMC1 was developed by ProteintechTM against a DMC1 peptide (EESGFQDDEESLFDIDLLQKHGIN-MADIKKLSVGICTIKG). Both meiotic testes were incubated with the following primary antibodies for IF: rabbit anti- γ H2AX (ser139) IgG #07–164 (1:500, Millipore), mouse anti- γ H2AX (ser139) IgG #05–636 (1:400, Millipore), rabbit α RAD51 PC130 (1:100, Calbiochem), rabbit α BRME1 R2 (1:200, ProteintechTM), rabbit α HSF2BP R2 (1:30, ProteintechTM), mouse α MLH1 51-1327GR (1:30, BD Biosciences), rabbit α RPA serum “Molly” (1:30, provided by Dr. Edyta Marcon, Medical Research University of Toronto, Canada), rat RPA2 2208 S (1:100, Cell Signaling), rabbit α SPTA22 16989-1-AP (1:60, Proteintech), rabbit α DMC1 (1:500, ProteintechTM), mouse α SYCP3 IgG sc-74569 (1:1000, Santa Cruz), rabbit serum α SYCP3 K921 (1:500), rabbit α SYCP1 IgG ab15090 (1:200, Abcam). We could not find any reliable antibody that detect endogenous mouse HELQ in chromosome spreads, squashes or cytospin preps. The secondary antibodies used were goat Alexa 555 α -mouse A-32727, goat Alexa 488 α -mouse A-11001, donkey Alexa 555 α -rabbit A-31572, goat Alexa 488 α -rat A-11006 (1:200, ThermoFisher), goat Alexa 488- Fab α -rabbit 111-547-003 (1:100, Jackson ImmunoResearch). Slides were mounted with DAPI and visualized at room temperature using a microscope (Axioplan2; Carl Zeiss, Inc.) with 63x objectives with an aperture of 1.4 (Carl Zeiss, Inc.). Images were taken with a digital camera (ORCA-ER C4742-80; Hamamatsu) and processed with Leica LAS X Life Science Software and Adobe Photoshop CS6 (Adobe). Quantification of fluorescence signals was performed using Fiji (ImageJ) software.

Generation of plasmids

The cDNAs encoding RAD51B (full length and truncated constructs) were RT-PCR amplified from lymphoblastoid cells (derived from patients) RNA. Full-length cDNAs encoding RAD51B (WT and mutant constructs), RPA1, BRCA2 (N, M and C constructs), PALB2, RAD51, BRME1, RAD21, DMC1, HELQ, RAD51C, MEIOB and HSF2BP were RT-PCR amplified from murine testis RNA using the primers listed in Supplementary Table 7. The cDNAs

were cloned into the EcoRV pcDNA3, EcoRV pcDNA3-2XFlag, Smal pcDNA3-2XHA, Smal pEGFP-C1 or Smal pEGFP-N1 expression vectors under the CMV promoter. In frame cloning was verified by Sanger sequencing.

Site-directed mutagenesis analysis

Point-mutations were introduced to hRAD51B cloned in pEGFP-N1 using primers listed in Supplementary Table 8 (with the desired mutation) in which the three secondary methionine codons were PCR replaced by CGN encoding alanine codons (individual and double Met to Ala substitutions). The parent template was removed using a methylation-dependent endonuclease DpnI. Plasmids are isolated from the resulting colonies and screened for the desired modification. Positive clones are verified by Sanger sequencing.

Immunoprecipitation

HEK293T cells were transiently transfected with WT or KI constructs of RAD51B in combination with full-length cDNAs encoding RPA1, BRCA2 (N, M and C constructs), PALB2, RAD51, BRME1, RAD21, DMC1, HELQ, RAD51C, MEIOB and HSF2BP. Whole cell extracts were prepared in a 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 buffer supplemented with protease inhibitors. Those extracts were cleared with protein G Sepharose beads (GE Healthcare) for 1 h. Immunoprecipitations were performed using rabbit α Flag IgG (3.2 μ g; F7425, Sigma-Aldrich), rabbit α Rad51b R2 IgG (3 μ g; ProteintechTM), ChromPure rabbit IgG (3.4 μ g/1 mg prot; 011-000-003). These were incubated with the extracts for 2 h and immunocomplexes were isolated by adsorption to protein G-Sepharose beads overnight. After washing, the proteins were eluted from the beads with 2xSDS gel-loading buffer 100 mM Tris-HCl (pH 7.0), 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 200 mM β -mercaptoethanol and 20% glycerol, and loaded onto reducing polyacrylamide SDS gels.

Western blot

HEK293T cells were transfected with WT and mutated constructs encoding human RAD51B generated with the site-directed mutagenesis. They were cultured for 48 h before lysis in RIPA buffer (50 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100) supplemented with protease inhibitors. Cell lysates were sonicated to disrupt cell membranes and shear DNA. After total protein quantification using Bradford assay, 5 μ g of protein extracts were loaded onto reducing polyacrylamide SDS gels. Primary antibodies used for western blotting were mouse α Flag IgG (1:3000; F1804, Sigma-Aldrich), mouse α HA IgG (1:3000; 11 101 R, Covance), rabbit α RAD51B R2 (1:2000, ProteintechTM), rabbit α GFP IgG (1:3000; A11122, Invitrogen), rabbit α HSF2BP R2 (1:2000, ProteintechTM). Secondary fluorochrome-conjugated α -mouse DyLight™ 680 (35518, ThermoFisher), α -rabbit DyLight™ 800 (35571, ThermoFisher) antibodies were used at 1:10000 dilution and incubated in dark. The fluorescent signal of the antibodies was obtained through Odyssey Infrared Imaging system. Full length original western blots for these results are provided in Supplementary information.

Immunoprecipitation coupled to Mass spectrometry analysis

Testis extracts and human lymphoblastoid cells were prepared in 50 mM Tris-HCl (pH8), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton-X100 and 10 mg of extracts were incubated 2 h with 30 μ g of antibody against mouse RAD51B (residues 122 to 350, ProteintechTM) or IgG from rabbit. The corresponding immunocomplexes were incubated with 60 μ l of sepharose beads overnight. After washing, beads were eluted in 100 mM glycine pH 2.5–3 and analyzed by LC-MS/MS shotgun in LTQ Velos Orbitrap at the Proteomics facility of Centro de Investigación del Cáncer (CSIC/University of Salamanca). Raw data were analyzed using MaxQuant v 1.6.2.6 (Cox and Mann, 2008) against SwissProt Mouse database (UP000000589, Oct, 2019) and MaxQuant contaminants. All FDRs were of 1%. Variable modifications considered were oxidation of M and acetylation of the N-term, while fixed modifications included only carbamidomethylation of C. The maximum number of modifications allowed per peptide was 5. The proteins related with DNA repair were quantified using iBAQ [62].

Cell culture

Primary MEFs were derived from embryonic day 13.5 (E13.5) embryos following standard procedures. MEFs, HEK 293 T and Cos7 cell lines were

cultured at atmospheric oxygen pressure in Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO), and 2 mM Glutamine. MEFs were immortalized at passage 2 using SV40 and hTERT for clonogenic survival assay. Lymphoblast cell lines were derived from donor B-lymphocytes by Epstein Bar virus transformation according to standard procedures and cultured in RPMI medium (GIBCO) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (GIBCO), and 2 mM Glutamine. Cell lines were tested for mycoplasma contamination using the Mycoplasma PCR ELISA (Sigma).

Cell proliferation assay and DNA damage recuperation

For cell proliferation assays, 2.5×10^4 cells/well were seeded in 12-well plates in duplicates in complete media. Continuous treatment was started in 18 h at the following doses: 0, 5, 10, 20, and 30 ng/ml for MMC; 0, 5, 10 and 20 μ M for HU; 0, 50, 100, 500 nM for Aphidicolin. Cells from one plate were trypsinized and counted as a "before treatment" day1 reference. Three days later (4th day after seeding) the remaining cells were counted the same way. Day1 reference numbers were subtracted from day 3 cell numbers to evaluate growth of each cell line. The resulting cell counts were expressed as percentages from the untreated wells. For monitoring the efficiency of DNA repair, 1.4×10^4 MEFs cells/well were treated with 1 μ g/ml for one hour and the recuperation of the DNA was measured by quantification of γ H2AX foci at 0, 6, 12, 48 and 72 h.

Clonogenic survival assay

Clonogenic survival following an exposure to MMC was assessed in immortalized wild-type and mutant *Rad51b* MEFs. 700 cells were plated per well in 60 mm plates. The day after plating, cells were treated with 0, 50, 100, 150 and 300 nM of MMC and allowed to incubate for 2 h. After drug treatment, media was removed, cells were washed several times with phosphate buffered saline (PBS), and fresh media was added. Once colonies were detectable by the naked eye (7–12 days), media was removed, and cells were washed with PBS and incubated for 30 min at room temperature in a fixation solution (8% paraformaldehyde in cell media). The fixation solution was removed, and colonies were stained with Giemsa (0.02% Giemsa solution in PBS) for 30 min at room temperature. Plates were then rinsed with water and allowed to dry. Colonies were counted by hand.

Karyotyping of mice bone marrow, lymphoblastoid cells and MEFs

Mice between 6–12 weeks old were injected intraperitoneally with a single dose of 4 mg of MMC per kilogram of body weight. After 24 h were injected with 0.1 ml of 0.5% colchicine solution intraperitoneally and the karyotyping derived from bone marrow was realized following standard procedures protocol [63]. Metaphases were obtained after MMC treatment, 150 nM for MEFs at passage 2–5 and 200 nM for lymphoblastoid cells by standard procedures. Active growing cultures were arrested using colcemide (1 μ g/mL) for 4 h for MEFs and 3 h for lymphoblastoid cells, trypsinized, treated with hypotonic solution (0.75 mM KCl), and fixed with Methanol/Acetic. Metaphase spreads were Giemsa-stained and analyzed for microscopically visible chromosomal aberrations. Chromatid gap, chromatid break and triradial/quadriradial chromosomes were classified as previously described [64]. At least 100 metaphases were counted from three independent mice and embryos of each genotype.

Single-molecule analysis of DNA replication

Lymphoblastoid cells were treated with 1 μ g/ml MMC for 2 h. In the last 40 min, cells were pulse-labelled sequentially with 50 μ M CldU (20 min) and 250 μ M IdU (20 min). Labelled cells were resuspended in PBS and lysed in 0.2 M Tris pH 7.4, 50 mM EDTA, 0.5% SDS (6 min/ RT). DNA fibers were prepared and stained as described [65] with the following modification: slides were incubated in stringency buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4; 0.1 M NaCl; 0.2% Triton X-100) for 6 min at RT, washed and incubated in blocking solution for 15 min at RT prior to secondary antibodies incubation. Images were obtained in a DM6000 B Leica microscope with an HCX PL APO 40x, 0.75 NA objective. Conversion factor $1 \mu\text{m} = 2.59 \text{ kb}$ was used [66]. Fork rate values were obtained by dividing the length of green tracks in ongoing forks by the time of the IdU pulse. Primary antibodies and dilutions used: CldU (rat monoclonal anti-BrdU, 1:100, ab6326, Abcam), IdU (mouse monoclonal anti-BrdU, 1:100, BD 347580), ssDNA (1:100, MAB3034,

Millipore). Secondary antibodies and dilutions used: goat anti-rat IgG AF-594 (1:300, A11007, Molecular Probes); goat anti-mouse IgG AF-488 (1:300, A121121, Molecular Probes), goat anti-mouse IgG2a AF-647 (1:300, A21241, Molecular Probes).

Sister chromatid exchange analysis

Exponentially growing lymphoblastoid cells were inoculated at a density of 3×10^5 and were treated with 10 μ M of BrdU (5-bromodeoxyuridine, Sigma) for 48 h (approximately two cell divisions). 5 and 10 ng/ml of MMC was added 24 h after BrdU treatment followed by a 3 h incubation with 1 μ g/ml of colcemide. Metaphase spreads were stained with 0.1 mg/ml of acridine orange (ThermoFisher) in dH₂O for 5 min at RT. Slides were washed for 2 min under running dH₂O tap water, incubated 1 min in Sorenson Buffer (0.1 M Na₂HPO₄, 0.1 M NaH₂PO₄, pH 6.8) and mounted in Sorenson Buffer. Slides were immediately visualized under FITC filter and at least 30 reciprocal exchange events were counted of each genotype.

iPSC generation from MEFs

For iPSC generation, 2.5×10^5 MEFs were infected with retroviral particles produced by HEK293T transfected with constitutive retroviral expression vectors pMXs KLF4, OCT4 and SOX2. The iPSC media (DMEM, GIBCO; 15% KSR, Invitrogen; 1% Non-essential aminoacids, MEM NEE 100X GIBCO; 1% PSG; 0,002% β -mercaptoethanol 50 mM, GIBCO; 1000 units/mL LIF, Merck) was changed every 24 h until iPSC cell colonies appeared (after ~14 days of treatment). Three weeks after plating the MEFs, reprogramming plates were stained for alkaline phosphatase activity (AP detection kit, MERCK).

Statistics

In order to compare counts between genotypes, we used the Welch's *t*-test (unequal variances *t*-test), which was appropriate as the count data were not highly skewed (i.e., were reasonably approximated by a normal distribution) and in most cases showed unequal variance. We applied a two-sided test in all the cases. Asterisks denote statistical significance: **p*-value < 0.05, ***p*-value < 0.01, ****p*-value < 0.001 and *****p*-value < 0.0001.

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

DATA AVAILABILITY

Genomic DNA sequences of *H. sapiens* (human, 317761), *M. musculus* (mouse, 75801) are available on GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Amino acid sequences of *H. sapiens* (Q8N1H7), *M. musculus* (NP_083381) were obtained from the UniProt database (<http://www.uniprot.org/>). All remaining data generated during this study are included in this Article and its Supplementary Information files or available from the authors upon request from the authors.

REFERENCES

- Handel MA, Schimenti JC. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet.* 2010;11:124–36.
- Paiano J, Wu W, Yamada S, Sciascia N, Callen E, Paola Cotrim A, et al. ATM and PRDM9 regulate SPO11-bound recombination intermediates during meiosis. *Nat Commun.* 2020;11:857.
- Zhao W, Vaithiyalingam S, San Filippo J, Maranon DG, Jimenez-Sainz J, Fontenay GV, et al. Promotion of BRCA2-Dependent Homologous Recombination by DSS1 via RPA Targeting and DNA Mimicry. *Mol Cell.* 2015;59:176–87.
- Martinez JS, von Nicolai C, Kim T, Ehlen A, Mazin AV, Kowalczykowski SC, et al. BRCA2 regulates DMC1-mediated recombination through the BRC repeats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113:3515–20.
- Chun J, Buechelmaier ES, Powell SN. Rad51 paralogs BCDX2 and CX3 act at different stages in the BRCA1-BRCA2-dependent homologous recombination pathway. *Mol Cell Biol.* 2013;33:387–95.
- Dai J, Voloshin O, Potapova S, Camerini-Otero RD. Meiotic Knockdown and Complementation Reveals Essential Role of RAD51 in Mouse Spermatogenesis. *Cell Rep.* 2017;18:1383–94.
- Pittman DL, Schimenti JC. Midgestation lethality in mice deficient for the RecA-related gene, *Rad51d/Rad51l3*. *Genesis* 2000;26:167–73.
- Shu Z, Smith S, Wang L, Rice MC, Kmiec EB. Disruption of *muREC2/RAD51L1* in mice results in early embryonic lethality which can be partially rescued in a *p53* (-/-) background. *Mol Cell Biol.* 1999;19:8686–93.

9. Sullivan MR, Bernstein KA. RAD-ical New Insights into RAD51 Regulation. *Genes (Basel)*. 2018;9:629. <https://doi.org/10.3390/genes9120629>.
10. Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Fukushima T, Morrison C, Albalá JS, et al. The Rad51 paralog Rad51B promotes homologous recombinational repair. *Mol Cell Biol*. 2000;20:6476–82.
11. Garcin EB, Gon S, Sullivan MR, Brunette GJ, Cian A, Concordet JP, et al. Differential Requirements for the RAD51 Paralogs in Genome Repair and Maintenance in Human Cells. *PLoS Genet*. 2019;15:e1008355.
12. Huhtaniemi I, Hovatta O, La Marca A, Livera G, Monniaux D, Persani L, et al. Advances in the Molecular Pathophysiology, Genetics, and Treatment of Primary Ovarian Insufficiency. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29:400–19.
13. Tsui V, Crismani W. The Fanconi Anemia Pathway and Fertility. *Trends Genet*. 2019;35:199–214.
14. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988–1989). *Hum Reprod*. 1991;6:811–6.
15. Franca MM, Mendonça BB. Genetics of Primary Ovarian Insufficiency in the Next-Generation Sequencing Era. *J Endocr Soc*. 2020;4:bvz037.
16. Caburet S, Todeschini AL, Petrillo C, Martini E, Farran ND, Legois B, et al. A truncating MEIOB mutation responsible for familial primary ovarian insufficiency abolishes its interaction with its partner SPATA22 and their recruitment to DNA double-strand breaks. *EBioMedicine*. 2019;42:524–31.
17. de Vries L, Behar DM, Smirin-Yosef P, Lagovsky I, Tzur S, Basel-Vanagaite L. Exome sequencing reveals SYCE1 mutation associated with autosomal recessive primary ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99:E2129–32.
18. Wang J, Zhang W, Jiang H, Wu BL. Primary Ovarian Insufficiency C. Mutations in HFM1 in recessive primary ovarian insufficiency. *N. Engl J Med*. 2014;370:972–4.
19. Guo T, Zhao S, Zhao S, Chen M, Li G, Jiao X, et al. Mutations in MSH5 in primary ovarian insufficiency. *Hum Mol Genet*. 2017;26:1452–7.
20. Mandon-Pepin B, Touraine P, Kuttent F, Derbois C, Rouxel A, Matsuda F, et al. Genetic investigation of four meiotic genes in women with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol*. 2008;158:107–15.
21. Caburet S, Arboleda VA, Llano E, Overbeek PA, Barbero JL, Oka K, et al. Mutant cohesin in premature ovarian failure. *N. Engl J Med*. 2014;370:943–9.
22. Carlosama C, Elzaïat M, Patino LC, Mateus HE, Veitia RA, Laissue P. A homozygous donor splice-site mutation in the meiotic gene MSH4 causes primary ovarian insufficiency. *Hum Mol Genet*. 2017;26:3161–6.
23. Franca MM, Funari MFA, Lerario AM, Santos MG, Nishi MY, Domenice S, et al. Screening of targeted panel genes in Brazilian patients with primary ovarian insufficiency. *PLoS One*. 2020;15:e0240795.
24. Felipe-Medina N, Caburet S, Sanchez-Saez F, Condezo YB, de Rooij DG, Gomez HL, et al. A missense in HSF2BP causing primary ovarian insufficiency affects meiotic recombination by its novel interactor C19ORF57/BRME1. *Elife*. 2020;9:e56996.
25. Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho N, et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABRaOM database. *Hum Mutat*. 2017;38:751–63.
26. Lerario AM, Mohan DR, Montenegro LR, Funari MFA, Nishi MY, Narcizo AM, et al. SELAdb: A database of exonic variants in a Brazilian population referred to a quaternary medical center in Sao Paulo. *Clinics*. 2020;75:e1913.
27. Franca MM, Mendonça BB. Genetics of ovarian insufficiency and defects of folliculogenesis. *Best Pr Res Clin Endocrinol Metab*. 2022;36:101594.
28. Wiese C, Hinz JM, Tebbs RS, Nham PB, Urbin SS, Collins DW, et al. Disparate requirements for the Walker A and B ATPase motifs of human RAD51D in homologous recombination. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:2833–43.
29. Niu W, Spradling AC. Two distinct pathways of pregranulosa cell differentiation support follicle formation in the mouse ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020;117:20015–26.
30. da Cruz I, Rodriguez-Casuriaga R, Santinaque FF, Farias J, Curti G, Capoano CA, et al. Transcriptome analysis of highly purified mouse spermatogenic cell populations: gene expression signatures switch from meiotic-to postmeiotic-related processes at pachytene stage. *BMC Genomics*. 2016;17:294.
31. Brandsma I, Sato K, van Rossum-Fikkert SE, van Vliet N, Sleddens E, Reuter M, et al. HSF2BP Interacts with a Conserved Domain of BRCA2 and Is Required for Mouse Spermatogenesis. *Cell Rep*. 2019;27:3790–8. e7
32. Enguita-Marruedo A, Martín-Ruiz M, García E, Gil-Fernández A, Parra MT, Viera A, et al. Transition from a meiotic to a somatic-like DNA damage response during the pachytene stage in mouse meiosis. *PLoS Genet*. 2019;15:e1007439.
33. Zhang J, Fujiwara Y, Yamamoto S, Shibuya H. A meiosis-specific BRCA2 binding protein recruits recombinases to DNA double-strand breaks to ensure homologous recombination. *Nat Commun*. 2019;10:722.
34. Miller KA, Sawicka D, Barsky D, Albalá JS. Domain mapping of the Rad51 paralog protein complexes. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:169–78.
35. Kuznetsov S, Pellegrini M, Shuda K, Fernandez-Capetillo O, Liu Y, Martin BK, et al. RAD51C deficiency in mice results in early prophase I arrest in males and sister chromatid separation at metaphase II in females. *J Cell Biol*. 2007;176:581–92.
36. Howlett NG, Taniguchi T, Durkin SG, D'Andrea AD, Glover TW. The Fanconi anemia pathway is required for the DNA replication stress response and for the regulation of common fragile site stability. *Hum Mol Genet*. 2005;14:693–701.
37. Somyajit K, Saxena S, Babu S, Mishra A, Nagaraju G. Mammalian RAD51 paralogs protect nascent DNA at stalled forks and mediate replication restart. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:9835–55.
38. Berti M, Teloni F, Mijic S, Ursich S, Fuchs J, Palumbieri MD, et al. Sequential role of RAD51 paralog complexes in replication fork remodeling and restart. *Nat Commun*. 2020;11:3531.
39. Mouron S, Rodriguez-Acebes S, Martinez-Jimenez MI, Garcia-Gomez S, Chocron S, Blanco L, et al. Repriming of DNA synthesis at stalled replication forks by human PrimPol. *Nat Struct Mol Biol*. 2013;20:1383–9.
40. Takata M, Sasaki MS, Tachiiri S, Fukushima T, Sonoda E, Schild D, et al. Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol Cell Biol*. 2001;21:2858–66.
41. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126:663–76.
42. Gonzalez F, Georgieva D, Vanoli F, Shi ZD, Stadtfeld M, Ludwig T, et al. Homologous recombination DNA repair genes play a critical role in reprogramming to a pluripotent state. *Cell Rep*. 2013;3:651–60.
43. Ruiz S, Lopez-Conteras AJ, Gabut M, Marion RM, Gutierrez-Martinez P, Bua S, et al. Limiting replication stress during somatic cell reprogramming reduces genomic instability in induced pluripotent stem cells. *Nat Commun*. 2015;6:8036.
44. Juknyt EG, Laurinaitytė EI, Vilkevičiūtė EA, Gedvilaitė EG, Glebauskienė EB, Kriaučiūnienė EL, et al. TBX15 rs98422, DNMT3 rs1011731, RAD51B rs8017304, and rs2588809 Gene Polymorphisms and Associations With Pituitary Adenoma. *Vivo*. 2021;35:815–26.
45. Havre PA, Rice M, Ramos R, Kmiec EB. HsRec2/Rad51L1, a protein influencing cell cycle progression, has protein kinase activity. *Exp Cell Res*. 2000;254:33–44.
46. Orr N, Lemnrau A, Cooke R, Fletcher O, Tomczyk K, Jones M, et al. Genome-wide association study identifies a common variant in RAD51B associated with male breast cancer risk. *Nat Genet*. 2012;44:1182–4.
47. Song H, Dicks E, Ramus SJ, Tyrer JP, Intermaggio MP, Hayward J, et al. Contribution of Germline Mutations in the RAD51B, RAD51C, and RAD51D Genes to Ovarian Cancer in the Population. *J Clin Oncol*. 2015;33:2901–7.
48. Thermann R, Neu-Yilik G, Deters A, Frede U, Wehr K, Hagemeyer C, et al. Binary specification of nonsense codons by splicing and cytoplasmic translation. *EMBO J*. 1998;17:3484–94.
49. Lindeboom RG, Supek F, Lehner B. The rules and impact of nonsense-mediated mRNA decay in human cancers. *Nat Genet*. 2016;48:1112–8.
50. Adelman CA, Lolo RL, Birkbak NJ, Murina O, Matsuzaki K, Horejsi Z, et al. HELQ promotes RAD51 paralogue-dependent repair to avert germ cell loss and tumorigenesis. *Nature*. 2013;502:381–4.
51. Ward JD, Muzzini DM, Petalcorin MI, Martinez-Perez E, Martin JS, Plevani P, et al. Overlapping mechanisms promote postsynaptic RAD-51 filament disassembly during meiotic double-strand break repair. *Mol Cell*. 2010;37:259–72.
52. Vaz F, Hanenberg H, Schuster B, Barker K, Wiek C, Erven V, et al. Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nat Genet*. 2010;42:406–9.
53. Thomas G, Jacobs KB, Kraft P, Yeager M, Wacholder S, Cox DG, et al. A multistage genome-wide association study in breast cancer identifies two new risk alleles at 1p11.2 and 14q24.1 (RAD51L1). *Nat Genet*. 2009;41:579–84.
54. Date O, Katsura M, Ishida M, Yoshihara T, Kinomura A, Sueda T, et al. Haploinsufficiency of RAD51B causes centrosome fragmentation and aneuploidy in human cells. *Cancer Res*. 2006;66:6018–24.
55. Qin HD, Shugart YY, Bei JX, Pan QH, Chen L, Feng QS, et al. Comprehensive pathway-based association study of DNA repair gene variants and the risk of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*. 2011;71:3000–8.
56. Schoenmakers EF, Huysmans C, Van de Ven WJ. Allelic knockout of novel splice variants of human recombination repair gene RAD51B in t(12;14) uterine leiomyomas. *Cancer Res*. 1999;59:19–23.
57. Nowacka-Zawisza M, Wisnik E, Wasilewski A, Skowronska M, Forma E, Brys M, et al. Polymorphisms of homologous recombination RAD51, RAD51B, XRCC2, and XRCC3 genes and the risk of prostate cancer. *Anal Cell Pathol*. 2015;2015:828646.
58. Cortez D. Replication-Coupled DNA Repair. *Mol Cell*. 2019;74:866–76.
59. Franca MM, Lerario AM, Funari MFA, Nishi MY, Narcizo AM, de Mello MP, et al. A Novel Homozygous Missense FSHR Variant Associated with Hypergonadotropic Hypogonadism in Two Siblings from a Brazilian Family. *Sex Dev*. 2017;11:137–42.
60. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2010;26:589–95.
61. Singh P, Schimenti JC, Bolcun-Filas E. A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications. *Genetics*. 2015;199:1–15.
62. Schwanhauser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, et al. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. 2011;473:337–42.

63. Akeson EC, Davissou MT. Mitotic chromosome preparations from mouse cells for karyotyping. *Curr Protoc Hum Genet*. 2001;Chapter 4:Unit4 10.
64. Li N, Ding L, Li B, Wang J, D'Andrea AD, Chen J. Functional analysis of Fanconi anemia mutations in China. *Exp Hematol*. 2018;66:32–41.
65. Rodriguez-Acebes S, Mouron S, Mendez J. Uncoupling fork speed and origin activity to identify the primary cause of replicative stress phenotypes. *J Biol Chem*. 2018;293:12855–61.
66. Jackson DA, Pombo A. Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. *J Cell Biol*. 1998;140:1285–95.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the patients and their family for participating in this study. The authors are grateful to LIM42 and SELA teams for providing technical assistance. We thank also to Dr. Alex N. Zelensky for his useful comments and to Isabel Ramos and Marina Jiménez-Ruiz (Molecular Mechanisms Program, Centro de Investigación del Cáncer) for their help in genotyping and intraperitoneal injections of the mice used in this study. We also are indebted to Maria Daniela Corte Torres (Biobanco of the Principado de Asturias/Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias) for her technical assistance. This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grant 2014/14231-0 (to MMF); FAPESP Grant 2013/02162-8, Nucleo de Estudos e Terapia Celular e Molecular (NETCEM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Grant 303002/2016-6 (to BBM); and FAPESP Grant 2014/50137-5 (to SELA). This work was supported by MINECO (PID2020-120326RB-I00) and by Junta de Castilla y León (CSI239P18 and CSI148P20). NFM, FSS, and MRMH are supported by European Social Fund/JCyLe grants (EDU/310/2015, EDU/556/2019 and EDU/1992/2020). YBC and RSU are funded by a grant from MINECO (BS-2015–073993 and BFU2017-89408-R). Experiments performed at CNIO were supported by grant PID2019-106707-RB to JM, co-sponsored by EU ERDF funds. SM was supported by an international postdoctoral contract “CNIO Friends”. The proteomic analysis was performed in the Proteomics Facility of Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca, Grant PRB3(IPT17/0019 -ISCIII-SGEFI/ERDF). CIC-IBMCC is supported by the Programa de Apoyo a Planes Estratégicos de Investigación de Estructuras de Investigación de Excelencia cofunded by the Castilla-León autonomous government and the European Regional Development Fund (CLC-2017–01). Veitia's Lab is supported by the University of Paris and the Centre National de la Recherche Scientifique.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MMF and ME contributed with the identification of the human variant of RAD51B. YBC, performed the validation of the truncating variant in vitro and characterization of the mutant mice including the cytological and biochemical analysis with the help of NFM, FSS, RSU, and MRMH, which contributed also with the formal analysis. SM and JM performed the stretched DNA fiber experiments. RGV contributed with the MS data analysis. MSM carried out the Cas9 injections. AA performed pituitary immunohistochemistry. EL, RV, BBM and AMP designed the experiments and wrote the paper with the input of the remaining authors.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ETHICS STATEMENT

Mice were housed in a temperature-controlled facility (specific pathogen free, spf) using individually ventilated cages, standard diet and a 12 h light/dark cycle, according to EU laws at the “Servicio de Experimentación Animal, SEA”. Mouse protocols have been approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the University of Salamanca (USAL). We made every effort to minimize suffering and to improve animal welfare. Blinded experiments were applied when possible. No randomization methods were applied since the animals were not divided in groups/treatments. The minimum size used for each analysis was two animals/genotype. The mice analyzed were between 2 and 4 months of age, except in those experiments where it is indicated.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41418-022-01021-z>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Reiner A. Veitia, Berenice B. Mendonca or Alberto M. Pendás.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

A missense in HSF2BP causing primary ovarian insufficiency affects meiotic recombination by its novel interactor C19ORF57/BRME1

Natalia Felipe-Medina^{1†}, Sandrine Caburet^{2,3†}, Fernando Sánchez-Sáez¹, Yazmine B Condezo¹, Dirk G de Rooij⁴, Laura Gómez-H¹, Rodrigo Garcia-Valiente¹, Anne Laure Todeschini^{2,3}, Paloma Duque¹, Manuel Adolfo Sánchez-Martin^{5,6}, Stavit A Shalev^{7,8}, Elena Llano^{1,9}, Reiner A Veitia^{2,3,10*}, Alberto M Pendás^{1*}

¹Molecular Mechanisms Program, Centro de Investigación del Cáncer and Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (CSIC-Universidad de Salamanca), Salamanca, Spain; ²Université de Paris, Paris Cedex, France; ³Institut Jacques Monod, Université de Paris, Paris, France; ⁴Reproductive Biology Group, Division of Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Utrecht University, Utrecht, Netherlands; ⁵Transgenic Facility, Nucleus platform, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain; ⁶Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain; ⁷The Genetic Institute, "Emek" Medical Center, Afula, Israel; ⁸Bruce and Ruth Rappaport Faculty of Medicine, Technion, Haifa, Israel; ⁹Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain; ¹⁰Université Paris-Saclay, Institut de Biologie F. Jacob, Commissariat à l'Énergie Atomique, Fontenay aux Roses, France

***For correspondence:**

reiner.veitia@ijm.fr (RAV);
amp@usal.es (AMP)

†These authors contributed equally to this work

Competing interests: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 26

Received: 17 March 2020

Accepted: 26 August 2020

Published: 26 August 2020

Reviewing editor: Bernard de Massy, CNRS UM, France

© Copyright Felipe-Medina et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Abstract Primary Ovarian Insufficiency (POI) is a major cause of infertility, but its etiology remains poorly understood. Using whole-exome sequencing in a family with three cases of POI, we identified the candidate missense variant S167L in *HSF2BP*, an essential meiotic gene. Functional analysis of the HSF2BP-S167L variant in mouse showed that it behaves as a hypomorphic allele compared to a new loss-of-function (knock-out) mouse model. *Hsf2bp*^{S167L/S167L} females show reduced fertility with smaller litter sizes. To obtain mechanistic insights, we identified C19ORF57/BRME1 as a strong interactor and stabilizer of HSF2BP and showed that the BRME1/HSF2BP protein complex co-immunoprecipitates with BRCA2, RAD51, RPA and PALB2. Meioocytes bearing the HSF2BP-S167L variant showed a strongly decreased staining of both HSF2BP and BRME1 at the recombination nodules and a reduced number of the foci formed by the recombinases RAD51/DMC1, thus leading to a lower frequency of crossovers. Our results provide insights into the molecular mechanism of HSF2BP-S167L in human ovarian insufficiency and sub(in)fertility.

Introduction

The process of gametogenesis is one of the most complex and highly regulated differentiation programs. It involves a unique reductional cell division, known as meiosis, to generate highly specialized cells: the gametes. Indeed, the outcome of meiosis is the production of oocytes and spermatozoa, which are the most distinctive cells of an adult organism and are essential for the faithful transmission of the genome across generations.

The meiotic division is an orderly process that results in the pairing and synapsis of homologous chromosomes and crossover (CO) formation, which ultimately enable homologous chromosomes segregation (Hunter, 2015; Loidl, 2016; Zickler and Kleckner, 2015). In mammals, pairing of homologs is dependent on the repair of self-induced double-strand breaks (DSBs) during prophase I by homologous recombination (Handel and Schimenti, 2010) and it leads to the intimate alignment of homologous chromosomes (synapsis) through the zipper-like synaptonemal complex (SC) (Cahoon and Hawley, 2016). The SC is a proteinaceous tripartite structure that provides the structural framework for DSBs repair (Baudat et al., 2013), as epitomized by the tight association of the recombination nodules (RNs, multicomponent recombinogenic factories) and the axial elements of the SC (Zickler and Kleckner, 2015).

Meiotic DSBs repair is an evolutionarily conserved pathway that is highly regulated to promote the formation of at least one CO per bivalent. This chromosome connection between bivalents through chiasmata is required for a correct reductional division. As other DNA repair processes, proper meiotic recombination is essential for genome stability and alterations can result in infertility, miscarriage and birth defects (Geisinger and Benavente, 2017; Handel and Schimenti, 2010; Webster and Schuh, 2017).

Infertility refers to failure of a couple to reproduce and affects 10–15% of couples (Isaksson and Tiitinen, 2004). Infertility can be due to female factors, male factors, a combination of both or to unknown causes, each category representing approximately 25% of cases (Isaksson and Tiitinen, 2004; Matzuk and Lamb, 2008). There are several underlying causes and physiological, genetic and even environmental and social factors can play a role. Forward and reverse genetic analyses in model organisms have identified multiple molecular pathways that regulate fertility and have allowed to infer reasonable estimates of the number of protein-coding genes essential for fertility (de Rooij and de Boer, 2003; Schimenti and Handel, 2018).

Primary ovarian insufficiency (POI) is a major cause of female infertility and affects about 1–3% of women under 40 years of age. It is characterized by cessation of ovarian function before the age of 40 years. POI results from a depletion of the ovarian follicle pool and can be isolated or syndromic. Genetic causes of POI account for approximately 20% of cases (Rossetti et al., 2017). Although infertility-causing pathogenic variants are inherently unlikely to spread in a population, they can be observed within families, especially when there is consanguinity. Such cases provide crucial insights into the function of the genes and molecular mechanisms that they disrupt. Over the last decade, causative variants in several genes have been found using whole exome sequencing in ‘POI pedigrees’. In particular, pathogenic variants in genes involved in DNA replication, recombination or repair, such as *STAG3*, *SYCE1*, *HFM1*, *MSH5* and *MEIOB* have been formally implicated in this condition by ourselves and others (Caburet et al., 2014; Caburet et al., 2019a; de Vries et al., 2014; Guo et al., 2017; Primary Ovarian Insufficiency Collaboration et al., 2014).

In this study, we have identified in a consanguineous family with POI the candidate S167L missense variant in *HSF2BP*, an essential yet poorly studied meiotic gene. *HSF2BP* encodes an interactor of the heat-shock response transcription factor HSF2 (Yoshima et al., 1998). During the course of this work and, in agreement with our results, two independent groups showed that HSF2BP is essential for meiotic recombination through its ability to interact with BRCA2 (Brandsma et al., 2019; Zhang et al., 2019). Here, we report that the introduction of the missense variant HSF2BP-S167L in mouse leads to subfertility and DNA repair defects during prophase I. In addition, we identified a protein complex composed of BRCA2, HSF2BP, and the as yet unexplored C19ORF57/BRME1 (meiotic double-stranded break BRCA2/HSF2BP complex associated protein) as a key component of the meiotic recombination machinery. Our studies show that a single substitution (S167L) in HSF2BP leads to a reduced loading of both BRME1 and HSF2BP at the RNs. Furthermore, our results suggest that meiotic progression requires a critical threshold level of HSF2BP/BRME1 for the ulterior loading of the recombinases to the RNs.

Results

Clinical cases

The parents are first-degree cousins of Israeli Arab origin. Of the five daughters, three are affected with POI and presented with early secondary amenorrhea. They had menarche at normal age (at 13–

14) but with irregular menses that stopped around 25. Only one of the patients affected by POI could have a child with the help of a fertility treatment (see pedigree in **Figure 1**). In order to identify the genetic basis of this familial POI case, we performed whole exome sequencing on genomic DNA from two POI patients, III-2 and III-3, and their fertile sister III-10 (**Supplementary file 1a**). Variants were filtered on the basis of (i) their homozygosity in the patients, (ii) their heterozygosity or absence in the fertile sister, (iii) their absence in unrelated fertile in-house controls and (iv) a minor allele frequency (MAF) below 0.01 in all available databases (**Supplementary file 1b**). This filtering process led to the identification of a missense substitution located in the *HSF2BP* gene: rs200655253 (21:43630396 G > A, GRCh38). The variant lies within the sixth exon of the reference transcript ENST00000291560.7 (NM_007031.2:c.500C > T) and changes a TCG codon into a TTG (NP_008962.1:p.Ser167Leu). It is very rare (Variant Allele Frequency/VAF 0.0001845 in the GnomAD database and 0.0005 in the GME Variome dedicated to Middle-East populations) and absent in a

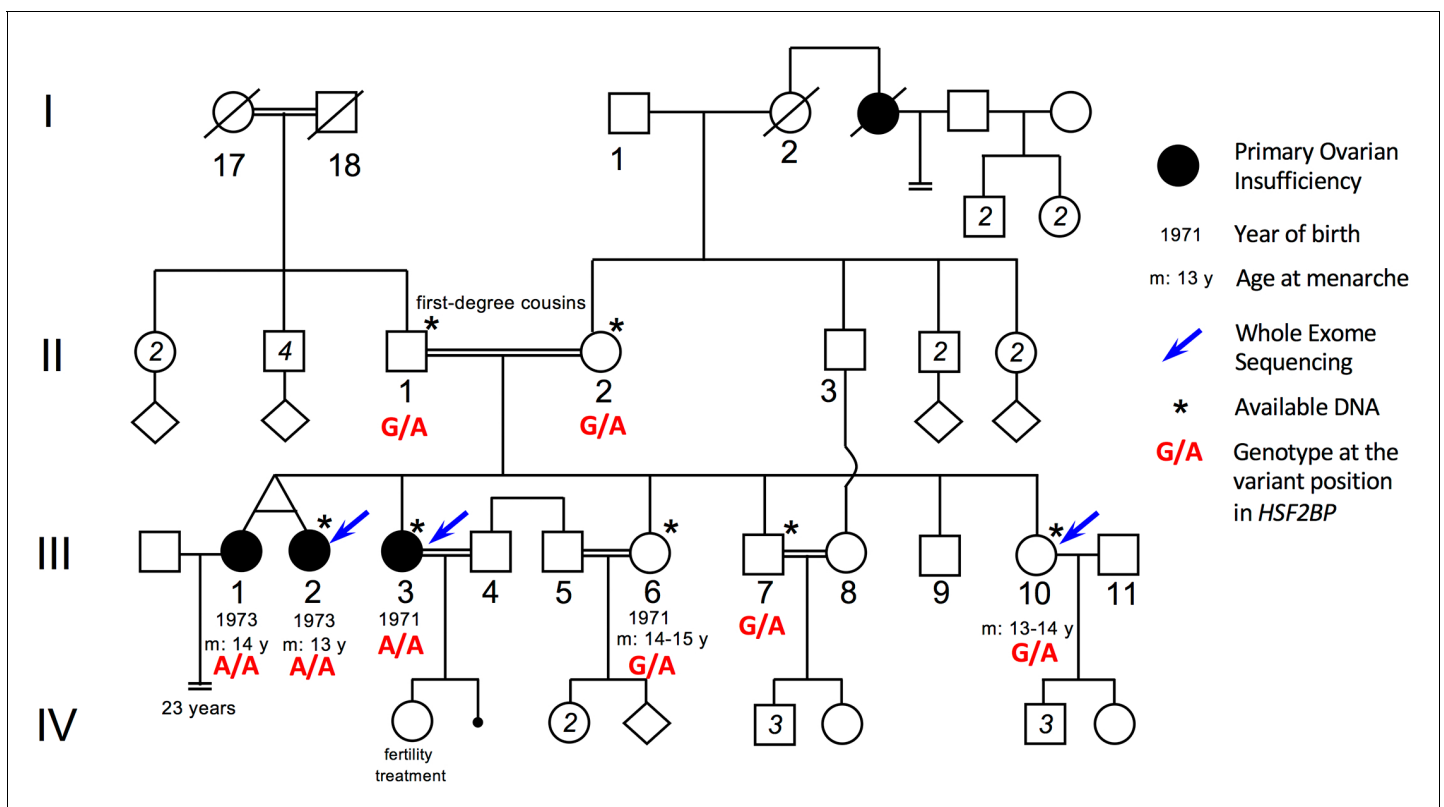


Figure 1. Pedigree of the consanguineous family with the variant *HSF2BP*-S167L. III-1 and III-2 are monozygotic twins, who appear phenotypically dizygotic. Clinical investigation confirmed POI, with normal 46, XX karyotype (500 bands and SKY spectral karyotyping). Year of birth and age of menarche are indicated when known. III-1 became amenorrheic at age 24 and III-2 at age 25, both after irregular menstruations since menarche. III-1 presents with a short stature (152 cm, within the 3–5 percentile), a normal neck, cubitus valgus and metacarpal shortening of 4–5. Ultrasound investigation showed normal uterus and ovaries. Her g-banding karyotyping was normal 46, XX (500 bands) and variants in *FMR1* gene were ruled out. III-2 displays a normal secondary sexual development with no dysmorphic sign. Clinical investigation confirmed POI, with normal 46, XX karyotype (500 bands and SKY spectral karyotyping). The elder sister III-3 was also diagnosed with POI, with no further clinical information. She is 160.5 cm. She had one normal pregnancy with the help of ‘fertility treatment’, and a second unsuccessful attempt. The two fertile sisters, III-6 and III-10 had their menarche at 14–15 and 13–14 respectively, with regular menstruations ever since. They are respectively 150 cm and 151 cm, with no clinical sign, and each one had several children without difficulties. The fertile brother III-7 is 171 cm and shows no health or fertility problem. He developed frontal baldness since the age of 30. The genotype of each individual at the variant genomic position in *HSF2BP* is shown in red, as determined by Sanger sequencing for available DNAs (See **Figure 1—figure supplement 1**).

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 1:

Figure supplement 1. Segregation of the S167L Variant in *HSF2BP* in the consanguineous family shows the chromatograms obtained by Sanger sequencing of the *HSF2BP*-S167L variant in the family.

Figure supplement 2. Strong conservation of the Ser167 residue in *HSF2BP* protein in 99 mammals.

Figure supplement 3. Strong conservation of the Ser167 residue in *HSF2BP* in 48 birds and reptiles and 64 fish species.

homozygous state from all available databases. The variant was verified by Sanger sequencing and was found to segregate in a Mendelian fashion within the family: the affected twin III-1 was homozygous for the variant and both parents and fertile siblings were heterozygous carriers (**Figure 1—figure supplement 1**). Therefore, there was no homozygous males identified in this family, preventing the analysis of the impact of this variant on male fertility. Serine 167 is a highly conserved position and the S167L variant is predicted to be pathogenic or deleterious by 11 out of the 18 pathogenicity predictors available in dbNSFP 3.5. (**Supplementary file 1c, Figure 1—figure supplement 2 and Figure 1—figure supplement 3**).

Mice with the HSF2BP S167L variant show a partial reduction of fertility

During the course of this work, two independent groups showed that HSF2BP is essential for meiotic recombination through its ability to interact with the armadillo repeats of BRCA2 (**Zhang et al., 2019**). Both groups showed that genetic disruption of *Hsf2bp* in mouse leads to the accumulation in the chromosomes axes of DNA repair proteins such as γ H2AX (ATR-dependent phosphorylation of H2AX marks DSBs) and the single stranded-DNA binding protein RPA, a strong reduction of the recombinases DMC1 and RAD51 at the RNs and a lack of COs as labelled by MLH1 (**Baker et al., 1996**). The end result is male sterility (**Brandtsma, 2006; Brandtsma et al., 2019; Zhang et al., 2019**). However, loss of HSF2BP in female mice showed a milder meiotic phenotype (**Zhang et al., 2019** and our own data, see below) and a weak albeit non-statistical significant reduction of fertility (**Brandtsma et al., 2019**) despite all of the mutants are nulls though in different genetic backgrounds.

In order to confirm the causality of the S167L variant in this POI family, we generated a knock-in mouse *Hsf2bp*^{S167L/S167L} by genome editing (**Figure 2—figure supplement 1a**). We also generated a loss-of-function model (*Hsf2bp*^{-/-}) for direct comparison (**Figure 2—figure supplement 1b–d**). *Hsf2bp*^{S167L/S167L} male and female mice were able to reproduce but females showed a significant reduction in the number of litters (**Figure 2a**), whilst males only showed a slight non-significant reduction in fertility (**Figure 2a**), suggesting that the S167L variant impacts murine fertility.

Histological analysis of *Hsf2bp*^{S167L/S167L} ovaries revealed no apparent differences in the number of follicles in comparison to wild-type (WT) animals (**Figure 2b–c and Figure 2—figure supplement 2a**), in contrast with the drastic reduction of the follicle pool in *Hsf2bp*^{-/-} ovaries (**Figure 2b–c**). Testes from *Hsf2bp*^{S167L/S167L} mice displayed a reduced size (21% reduction compared to WT mice; testis/body weight ratio: S167L 0.26% \pm 0.07 (n = 12) vs 0.33% \pm 0.05 for WT controls (n = 14), **p<0,01, **Figure 2d and Figure 2—figure supplement 2b**) and this reduction was stronger in *Hsf2bp*^{-/-} testes (70% reduction compared to WT, testis/body weight ratio: *Hsf2bp*^{-/-} 0.10% \pm 0.005 (n = 6) vs 0.33% \pm 0.05 for WT controls (n = 14) ****p<0,001, **Figure 2d and Figure 2—figure supplement 2b**). Histological analysis of adult *Hsf2bp*^{S167L/S167L} testes revealed seminiferous tubules with a partial arrest with apoptotic spermatocytes (meiotic divisions) and their epididymis exhibited scarcer spermatozoa (**Figure 2e**). Consistent with these results, *Hsf2bp*^{S167L/S167L} males showed increased numbers of meiotic divisions positive for TUNEL staining (**Figure 2f**) and a reduction in the number of spermatozoa in the epididymis (3.3×10^6 in the *Hsf2bp*^{S167L/S167L} mutant vs 4.3×10^6 in the WT; **Figure 2g**). During mouse spermatogenesis, the 12 stages of the epithelial cycle can be distinguished in seminiferous tubule sections by identifying groups of associated germ cell types (**Ahmed and de Rooij, 2009**). Following these criteria, the seminiferous epithelium of *Hsf2bp*^{-/-} mice showed a stage IV arrest, characterized by a massive apoptosis of zygotene-like spermatocytes occurring at the same time that In spermatogonia divide into B spermatogonia (**Figure 2e**). The presence of spermatogonia, spermatocytes, Sertoli and Leydig cells was not altered in any of the mutants (**Figure 2e**). These results suggest that mice bearing the POI-causing variant only partially phenocopy the human disease.

Hsf2bp^{S167L/S167L} meocytes show an altered meiotic homologous recombination

To further characterize meiotic defects, *Hsf2bp*^{S167L/S167L} meocytes were first analyzed for the assembly/disassembly of the SC by monitoring the distribution of SYCP1 and SYCP3. We did not observe any difference in synapsis and desynapsis from leptotene to diplotene in both oocytes and

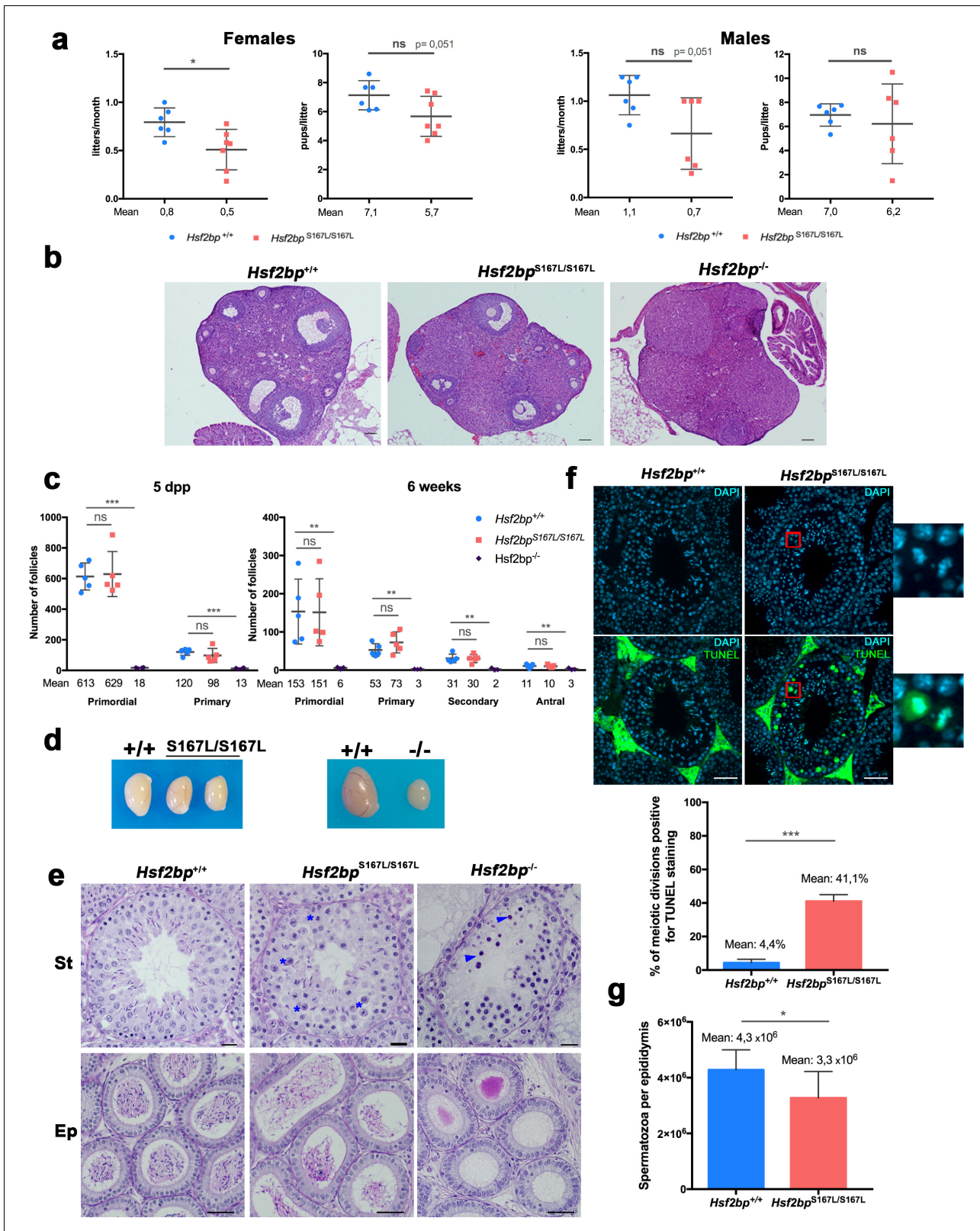


Figure 2. Mice carrying the HSF2BP S167L variant show a partial reduction of fertility. (a) Fertility assessment of males and female *Hsf2bp*^{S167L/S167L} and WT mice showing the number of litters per month and the number of pups per litter (see Materials and methods). Mice: *Hsf2bp*^{+/+} n = 6 females/6 males, *Hsf2bp*^{S167L/S167L} n = 7 females/6 males. Two-tailed Welch's t-test analysis: *p<0.05. (b) Hematoxylin and eosin stained sections of ovaries from adult (8 weeks) *Hsf2bp*^{+/+}, *Hsf2bp*^{S167L/S167L} and *Hsf2bp*^{-/-} females. *Hsf2bp*^{-/-} ovaries but not *Hsf2bp*^{+/+} and *Hsf2bp*^{S167L/S167L} showed a strong depletion

Figure 2 continued on next page

Figure 2 continued

of follicles. Bar in panels 100 μm . (c) Quantification of the number of follicles (primordial, primary, secondary and antral follicles) per ovary in *Hsf2bp*^{+/+}, *Hsf2bp*^{S167L/S167L} and *Hsf2bp*^{-/-} females at 5 dpp and 6 weeks of age showing no differences between *Hsf2bp*^{+/+} and *Hsf2bp*^{S167L/S167L} but a strong reduction in the oocyte pool in *Hsf2bp*^{-/-} females. Ovaries: five dpp/6 weeks = 5/5 ovaries from *Hsf2bp*^{+/+} and *Hsf2bp*^{S167L/S167L} and 4/3 from *Hsf2bp*^{-/-}. Two-tailed Welch's t-test analysis: ns, no significant differences, **p<0.01, ***p<0.001. (d) Testis size of *Hsf2bp*^{S167L/S167L} (left, 21% reduction) and *Hsf2bp*^{-/-} mice (right, 70% reduction) in comparison with their WT counterparts. See **Figure 2—figure supplement 2b** for the quantification. (e) PAS and Hematoxylin stained testis sections. The S167L variant leads to a partial spermatogenic arrest with an elevated number of apoptotic meiotic divisions (blue asterisks) and a reduction of the number of spermatozoa in the epididymides in comparison with the WT control (*Hsf2bp*^{+/+}). The null allele (*Hsf2bp*^{-/-}) showed a complete spermatogenic arrest at epithelial stage IV and absence of spermatozoa. Massive apoptosis of spermatocytes is indicated (blue arrowheads). Bar: upper panels 10 μm , lower panels 20 μm . (St) Seminiferous tubules, (Ep) Epididymides. (f) Immunohistochemical detection of apoptotic cells by TUNEL staining showing an increase of apoptotic meiotic divisions in stage XII tubules from *Hsf2bp*^{S167L/S167L} males (magnified panel). Plot under the panel represents the quantification. Mice: n = 3 adult mice for each genotype. Two-tailed Welch's t-test analysis: ***p<0.001. Bar in panel, 25 μm . (g) Quantification of epididymal sperm in *Hsf2bp*^{+/+} and *Hsf2bp*^{S167L/S167L} adult mice. Epididymides: n = 8 for each genotype. Two-tailed Welch's t-test analysis: *p<0.05.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 2:

Figure supplement 1. Generation and genetic characterization of *Hsf2bp* S167L and *Hsf2bp*-deficient mice.

Figure supplement 2. Fertility defects in *Hsf2bp*^{S167L/S167L} mice.

spermatocytes (**Figure 3—figure supplement 1a–b**). However, we observed an elevated number of apoptotic meiotic divisions in *Hsf2bp*^{S167L/S167L} males (**Figure 2—figure supplement 2c**). These results are consistent with the partial arrest observed in the histological analysis (**Figure 2e**). As expected, this phenotype was exacerbated in *Hsf2bp*^{-/-} spermatocytes that were arrested at a zygotene-like stage (**Figure 3—figure supplement 1c**). *Hsf2bp*^{-/-} oocytes showed a delay in prophase I progression with the majority of cells at zygotene stage in 17.5 days post-coitum (dpc) females, whilst the WT oocytes were mainly at pachytene stage. Additionally, we observed increased numbers of oocytes showing synapsis defects in the *Hsf2bp*^{-/-} oocytes (*Hsf2bp*^{-/-}: 45,5% \pm 1,5 vs WT: 7,5% \pm 1,5; n = 2 (both genotypes), **p<0,01, **Figure 3—figure supplement 1d**). These results strongly suggest that the POI variant S167L is a hypomorphic allele.

Next, we analyzed whether the POI-inducing variant affects the loading/stability of HSF2BP by immunolabeling meioocytes from *Hsf2bp*^{S167L/S167L} mice. We observed a striking reduction of HSF2BP staining at the axes during prophase I in both spermatocytes and oocytes (**Figure 3a–b**). Western blot analysis of WT, *Hsf2bp*^{S167L/S167L} and *Hsf2bp*^{-/-} in whole testis extracts from 13 days post-partum (dpp) animals (**Figure 3c**) revealed that the reduced labeling observed by immunofluorescence correlated with a reduced protein expression level, suggesting that the mutation leads to a reduced expression and/or stability.

Given that HSF2BP is essential for DNA repair, we carried out a comparative staining analysis of γ H2AX, the ssDNA-binding protein RPA, the recombinases RAD51 and DMC1, the ssDNA-binding protein SPATA22 (complexed to RPA during resection) and CO formation in meioocytes from *Hsf2bp*^{S167L/S167L}, *Hsf2bp*^{-/-} and WT animals (**Figures 4, 5 and 6, Figure 4—figure supplement 1, Figure 5—figure supplement 1 and Figure 6—figure supplement 1**). Our results revealed that *Hsf2bp*^{S167L/S167L} spermatocytes showed an increased labeling of γ H2AX at pachytene (**Figure 4a**), an accumulation of RPA at the chromosome axis (**Figure 4b and Figure 4—figure supplement 1a**), a reduction of the recombinases DMC1 and RAD51 staining (**Figure 5a–b and Figure 5—figure supplement 1a–b**), an accumulation of SPATA22 (**Figure 6a and Figure 6—figure supplement 1a**), and a decreased number of COs (measured as MLH1, **Figure 6b and Figure 6—figure supplement 1b**). In accordance with the reduction of COs, we observed the presence of univalents in the XY pair at pachynema as well as univalents in metaphase I spermatocytes from *Hsf2bp*^{S167L/S167L} mice (**Figure 6d and Figure 6—figure supplement 1c**). These results would explain the elevated number of apoptotic metaphases observed (**Figure 2e–f and Figure 2—figure supplement 2c**).

Our analysis in females showed accumulation of γ H2AX staining (**Figure 4c**) but no accumulation in RPA labeling in *Hsf2bp*^{S167L/S167L} and *Hsf2bp*^{-/-} oocytes (**Figure 4d and Figure 4—figure supplement 1b**). Similar to the spermatocytes, DMC1 and RAD51 staining showed a reduction in both *Hsf2bp*^{S167L/S167L} and *Hsf2bp*^{-/-} oocytes (**Figure 5c–d and Figure 5—figure supplement 1c–d**). SPATA22 labeling in females showed a clear accumulation in *Hsf2bp*^{-/-} but only a trend towards accumulation in *Hsf2bp*^{S167L/S167L} oocytes (**Figure 6a and Figure 6—figure supplement 1a**). In

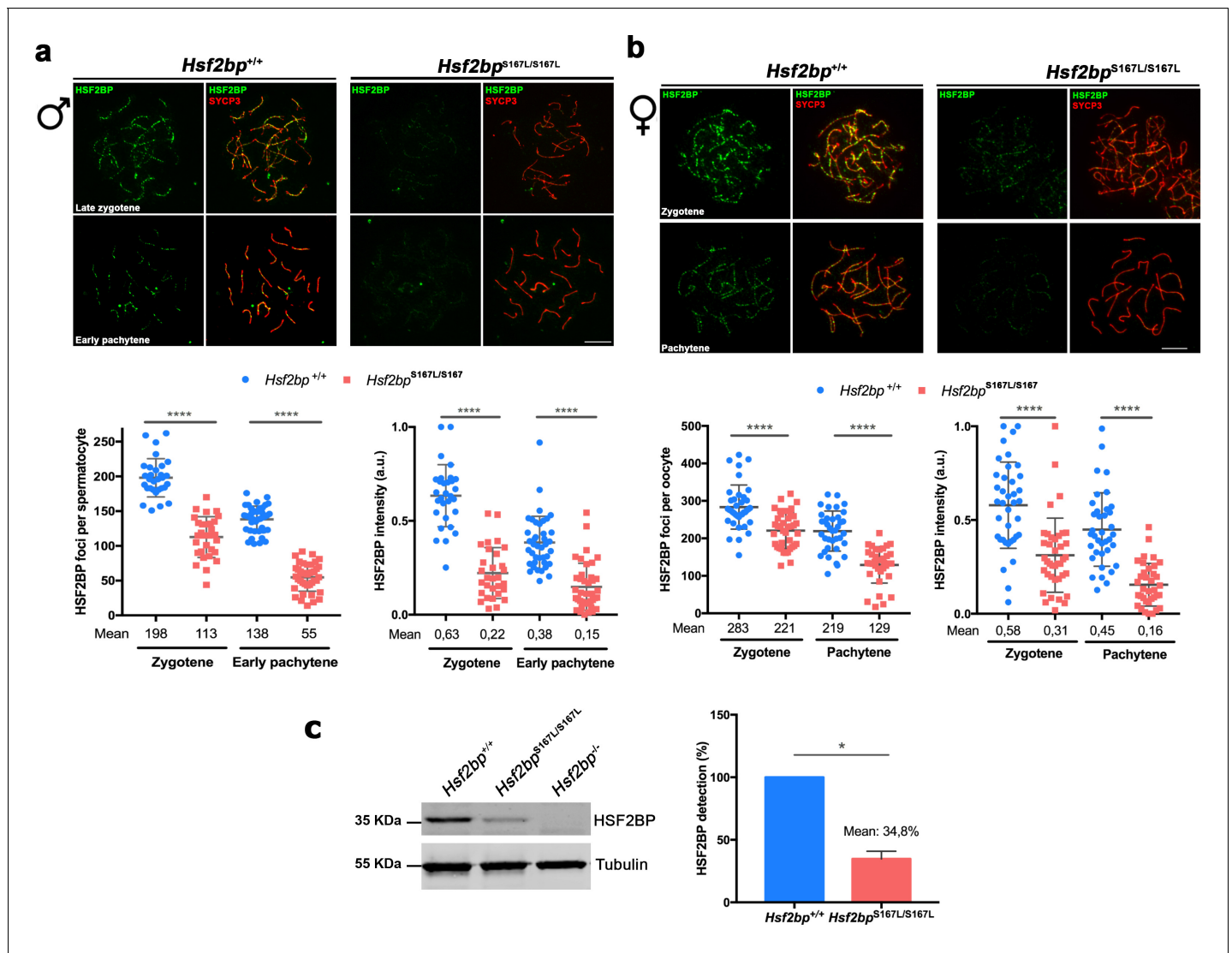


Figure 3. Meioocytes from *Hsf2bp*^{S167L/S167L} mice show a decrease in the expression of HSF2BP. (a–b) Double immunofluorescence of HSF2BP (green) and SYCP3 (red) in *Hsf2bp*^{+/+} and *Hsf2bp*^{S167L/S167L} (a) spermatocyte and (b) oocyte spreads showing a strong reduction in the labeling of HSF2BP at the chromosome axis. Plots under the panels show the quantification. Nuclei analyzed: 30 zygonemas and 40 pachynemas from two adult male mice of each genotype. In females 38/39 zygonemas and 37/35 pachynemas from two 17.5 dpc embryos of *Hsf2bp*^{+/+} and *Hsf2bp*^{S167L/S167L}, respectively. Two-tailed Welch's t-test analysis: ****p<0.0001. (c) Western blot analysis of protein extracts from 13 dpp WT, *Hsf2bp*^{S167L/S167L} and *Hsf2bp*^{-/-} testes using polyclonal antibodies against HSF2BP. Tubulin was used as loading control. Graph on the right represents the relative quantification of the immunoblotting. Mice: n = 2 *Hsf2bp*^{+/+}, *Hsf2bp*^{S167L/S167L} and *Hsf2bp*^{-/-}. Two-tailed Welch's t-test analysis: *p<0.05. Bar in panels a-c, 10 μ m. The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 3:

Figure supplement 1. *Hsf2bp*^{S167L/S167L} mice do not show synapsis defects.

agreement with the lower presence of recombinases, the number of COs (measured as interstitial CDK2 foci) was also reduced in *Hsf2bp*^{S167L/S167L} oocytes, and a stronger reduction was observed in *Hsf2bp*^{-/-} oocytes (Figure 6c and Figure 6—figure supplement 1d). Overall, male and female *Hsf2bp*^{S167L/S167L} mice share alterations in the meiotic recombination pathway although with different reproductive outcome.

We next sought to understand how the HSF2BP pathogenic variant was mediating the observed meiotic alteration. HSF2BP has been shown to bind BRCA2, an essential protein for meiotic homologous recombination (Martinez et al., 2016; Sharan et al., 2004), by a direct interaction that involves Arg200 in HSF2BP and the Gly2270-Thr2337 region within the C-terminal fragment of BRCA2

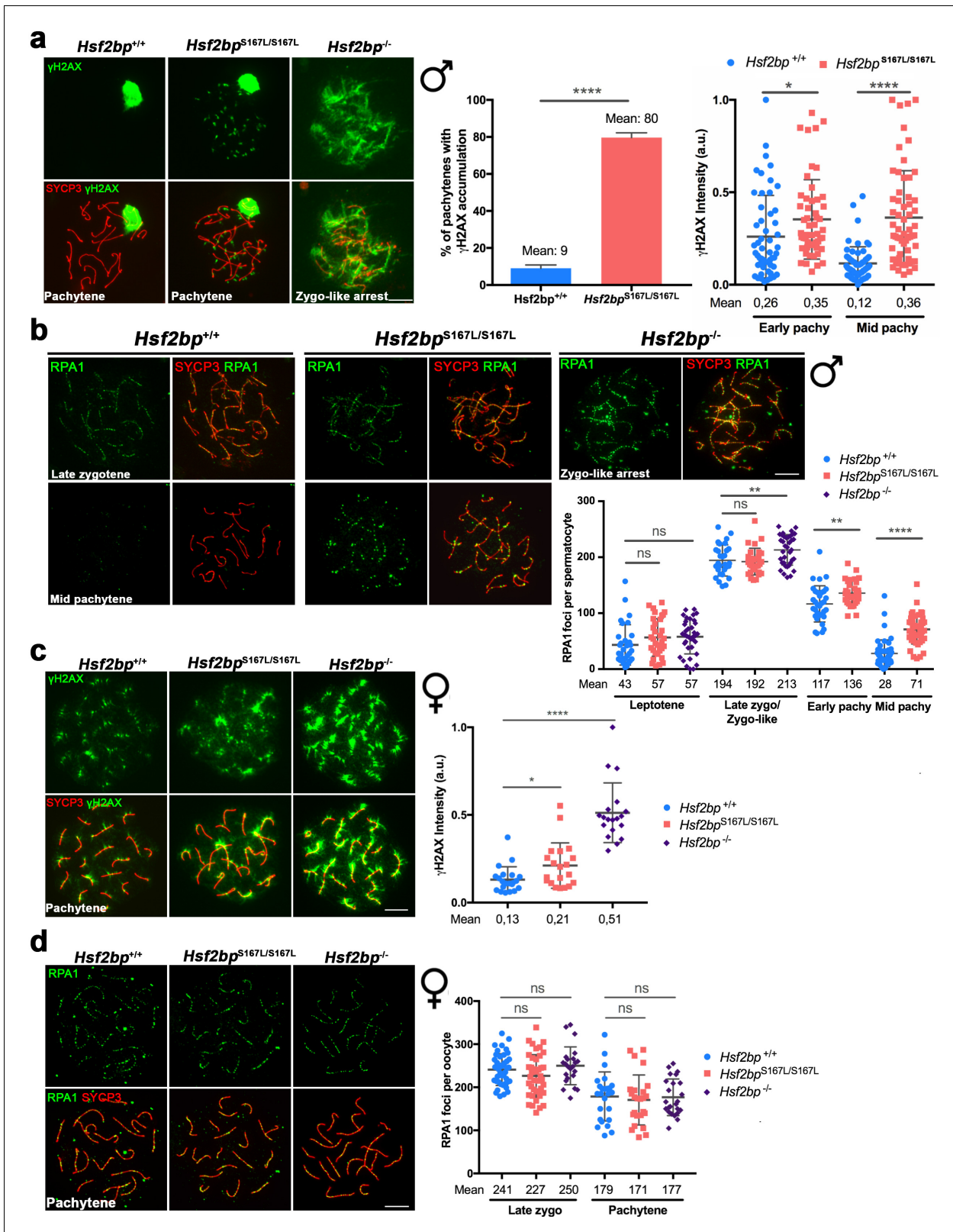


Figure 4. DNA repair in *Hsf2bp*^{S167L/S167L} mice. (a, c) Double labeling of γH2AX (green) and SYCP3 (red) in (a) spermatocyte and (c) oocyte spreads from WT, *Hsf2bp*^{S167L/S167L} and *Hsf2bp*^{-/-} mice. (a) Males display an accumulation of γH2AX patches in *Hsf2bp*^{S167L/S167L} pachynemas and a strong accumulation in the whole nucleus in *Hsf2bp*^{-/-} zygotene-like arrested cells. Plots on the right of the panel represent the percentage of pachynemas with γH2AX labeling (Nuclei: 364 *Hsf2bp*^{+/+} and 376 *Hsf2bp*^{S167L/S167L} from three adult mice) and the quantification of γH2AX intensity on autosomes at Figure 4 continued on next page

Figure 4 continued

early and mid-pachytene stages (Nuclei: 53 early and 60 mid pachynemas from three adult mice of each genotype). Two-tailed Welch's t-test analysis: $*p < 0.05$, $****p < 0.0001$. (c) In females there is an accumulation of γ H2AX in $Hsf2bp^{S167L/S167L}$ pachynemas that is stronger in those from $Hsf2bp^{-/-}$ females. Nuclei: $n = 21/20/19$ pachynemas from 2 $Hsf2bp^{+/+}/Hsf2bp^{S167L/S167L}/Hsf2bp^{-/-}$ embryos (17.5 dpc). Two-tailed Welch's t-test analysis: $*p < 0.05$, $****p < 0.0001$. (b, d) Double immunolabeling of RPA1 (green) and SYCP3 (red) in (b) spermatocyte and (d) oocyte spreads from $Hsf2bp^{+/+}$, $Hsf2bp^{S167L/S167L}$ and $Hsf2bp^{-/-}$. (b) In males, RPA1 accumulates at early and mid-pachytene in $S167L$ spermatocytes and in the zygotene-like arrested cells from $Hsf2bp^{-/-}$. Plot on the right of the panel represents the quantification. Nuclei: $n = 31/34/37$ leptoneas, $n = 29/29/37$ zygonemas/zygonemas-like from three adult $Hsf2bp^{+/+}$, $Hsf2bp^{S167L/S167L}$ and $Hsf2bp^{-/-}$ mice respectively, $n = 33$ early and 46 mid pachynemas from three adult $Hsf2bp^{+/+}$ and $Hsf2bp^{S167L/S167L}$ mice. Two-tailed Welch's t-test analysis: ns, no significant differences; $**p < 0.01$, $****p < 0.0001$. (d) In females, RPA1 labeling is similar in $Hsf2bp^{+/+}$, $Hsf2bp^{S167L/S167L}$ and $Hsf2bp^{-/-}$ oocytes at zygotene and pachytene. Plot on the right of the panel represents the quantification. Nuclei: $Hsf2bp^{+/+}/Hsf2bp^{S167L/S167L}/Hsf2bp^{-/-}$ $n = 42/41/23$ zygonemas from two embryos (16.5 dpc) and $n = 25/25/24$ pachynemas from two embryos (17.5 dpc). Two-tailed Welch's t-test analysis: ns, no significant differences. Bar in all panels, 10 μ m. Extended panels for RPA1 figures in **Figure 4—figure supplement 1**.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 4:

Figure supplement 1. RPA localization in *Hsf2bp* mutants.

(Brandsma et al., 2019). Given the impossibility to detect endogenous BRCA2 by immunofluorescence in mouse spermatocytes, we carried out co-localization/interaction assays in a heterologous system by transfecting BRCA2-C (i.e. its C-term) and HSF2BP in U2OS/HEK293T. Our results showed that BRCA2-C co-immunoprecipitates with both HSF2BP-WT and HSF2BP-S167L in similar ways (**Figure 6—figure supplement 2a**). In single transfections, HSF2BP localized in the nucleus and cytoplasm whereas BRCA2-C showed nuclear localization. This pattern changed drastically to a nuclear dotted pattern when co-transfected (**Figure 6—figure supplement 2b**). This re-localization was independent of the HSF2BP variant, suggesting that the HSF2BP variant effects are not directly mediated by BRCA2 delocalization.

BRME1, a novel interactor of HSF2BP

In order to further understand the mechanism underlying the pathogenicity of the HSF2BP-S167L variant, we searched for proteins that interact with the murine HSF2BP through a yeast two hybrid (Y2H) screening. The analysis of the clones with putative interactors revealed that 19 out of 98 analyzed clones matched the uncharacterized gene 4930432K21Rik, which corresponds to human C19ORF57, hereby dubbed BRME1 for Break Repair Meiotic recombinase recruitment factor 1. This HSF2BP interactor consists of 600 amino acids with a high content of acidic residues, has no recognizable functional domains and is intrinsically disordered. The interaction was validated by transiently transfecting plasmids driving the expression of HSF2BP and BRME1. Both HSF2BP-S167L and WT interacted with BRME1 (**Figure 7a**). We further validated this interaction in vivo by co-immunoprecipitation (co-IP) of both proteins from mouse whole testis extracts (**Figure 7b**). To identify the regions required for this interaction, we split the BRME1 protein into three fragments (N-terminal, central region and C-terminal). We mapped the HSF2BP/BRME1-interacting domain to the C-term fragment of BRME1 (spanning residues 475–600 of the murine protein, **Figure 7c**). In line with this, the *Brme1* $\Delta^{142-472}/\Delta^{142-472}$ mutant mice, expressing the BRME1 protein devoid of its central part, were fertile and did not show defects in chromosome synapsis or an alteration of HSF2BP loading to axes, further indicating that a large fraction of the coding protein of BRME1 is not essential for BRME1/HSF2BP function in vivo (**Figure 7—figure supplement 1**).

We also sought to characterize the involvement of BRME1 in meiosis through immunofluorescence. BRME1 localized to the chromosome axes of WT meocytes from zygotene to pachytene with a pattern of discrete foci that mimics the RNs (**Figure 7—figure supplement 2a–b**). In agreement with the yeast two hybrid and co-IP results, BRME1 perfectly co-localized with HSF2BP on the chromosome axes (**Figure 7d** and **Supplementary file 1d** for quantification). This co-localization was verified by super-resolution microscopy (**Figure 7e**). In accordance with the tight association of BRME1 with HSF2BP and with a role in DSB repair, both HSF2BP and BRME1 colocalized with RPA and DMC1 foci. During prophase I, HSF2BP and BRME1 showed higher levels of spatio-temporal colocalization at the RNs with RPA than with DMC1 (**Figure 7—figure supplement 3a–b** and **Supplementary files 1d–e** for quantification). We also analyzed the HSF2BP-dependent localization of BRME1 in $Hsf2bp^{-/-}$ and $Hsf2bp^{S167L/S167L}$ mutants. Immunofluorescence analysis of meocytes

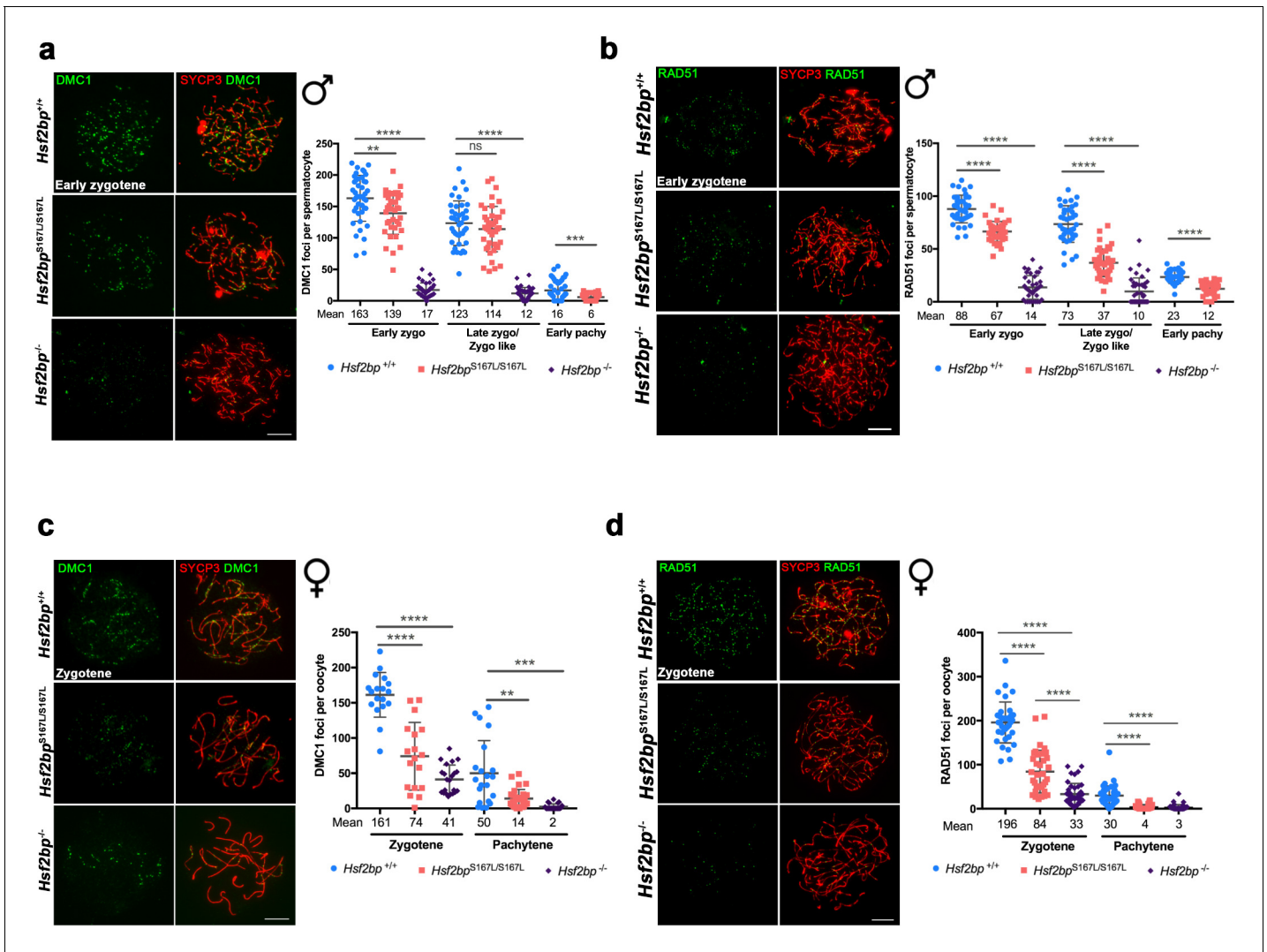


Figure 5. The loading of recombinases is compromised in *Hsf2bp*^{S167L/S167L} mice. Double immunolabeling of (a, c) DMC1 or (b, d) RAD51 (green) and SYCP3 (red) in *Hsf2bp*^{+/+}, *Hsf2bp*^{S167L/S167L} and *Hsf2bp*^{-/-} (a, b) spermatocytes and (c, d) oocytes showing a strong reduction (*Hsf2bp*^{-/-}) and mild reduction (*Hsf2bp*^{S167L/S167L}) in the number of foci in comparison with their WT counterparts. Plots on the right of the panels represent the quantification of foci on each genotype and stage. Male nuclei DMC1: *Hsf2bp*^{+/+}/*Hsf2bp*^{S167L/S167L}/*Hsf2bp*^{-/-}, respectively, n = 43/38/37 early zygonemas, 41/43/37 late zygonemas/zygonemas-like and 44/37 early pachynemas from two adult mice of each genotype. Male nuclei RAD51: *Hsf2bp*^{+/+}/*Hsf2bp*^{S167L/S167L}/*Hsf2bp*^{-/-}, respectively n = 39 early zygonemas from all genotypes, 37/40/43 late zygonemas/zygonemas-like and 37/39 early pachynemas from two adult mice of each genotype. Oocyte nuclei DMC1: *Hsf2bp*^{+/+}/*Hsf2bp*^{S167L/S167L}/*Hsf2bp*^{-/-} n = 18/18/22 zygonemas from two embryos and n = 21/30/23 pachynemas from two embryos (17.5 dpc). Oocyte nuclei RAD51: *Hsf2bp*^{+/+}/*Hsf2bp*^{S167L/S167L}/*Hsf2bp*^{-/-} n = 35/35/42 zygonemas and n = 42/42/40 pachynemas from two embryos (17.5 dpc). Two-tailed Welch's t-test analysis: ns, no significant differences, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. Bar in all panels, 10 μm. Extended panels for these figures in **Figure 5—figure supplement 1**.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 5:

Figure supplement 1. Defective loading of recombinases in *Hsf2bp*^{S167L/S167L} mice.

showed a complete lack of BRME1 staining in the absence of HSF2BP and a significant reduction of foci number in the presence of HSF2BP-S167L variant (35% reduction in males and 72% in females at pachytene; **Figure 7f–g** and **Figure 7—figure supplement 4a**). Western blot analysis also revealed a drastic reduction of BRME1 expression in *Hsf2bp*^{S167L/S167L} and *Hsf2bp*^{-/-} spermatocytes, suggesting an HSF2BP-dependent stabilization of BRME1 (**Figure 7h**).

To assess if HSF2BP and/or BRME1 had DNA-binding activity (targeting to DSBs), we carried out an in vitro binding assay using HSF2BP and BRME1 proteins expressed in a transcription and translation coupled reticulocyte system (TNT; **Loregian et al., 2004; Souquet et al., 2013**) in which there

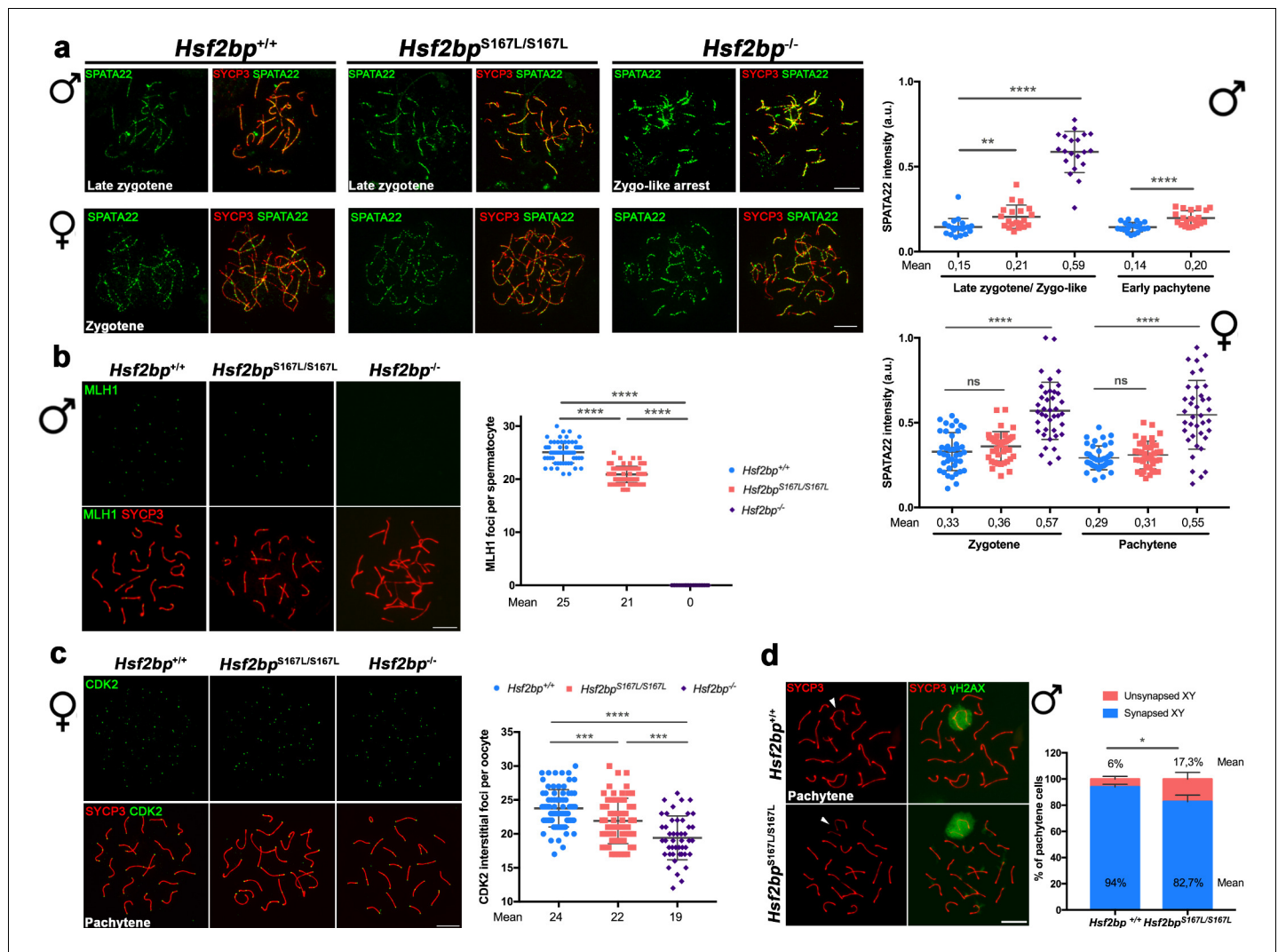


Figure 6. Recombination proficiency is decreased in *Hsf2bp*^{S167L/S167L} mice. (a) Double labeling of SPATA22 (green) and SYCP3 (red) in spermatocyte (upper panel) and oocyte (lower panel) spreads from WT, *Hsf2bp*^{-/-} and *Hsf2bp*^{S167L/S167L} mice. SPATA22 is accumulated in knock-out spermatocytes and oocytes and shows a milder accumulation in the *Hsf2bp*^{S167L/S167L} spermatocytes. *Hsf2bp*^{S167L/S167L} oocytes show a slight but not significant accumulation. Plots on the right of the panel represents the quantification of SPATA22 labeling. Males nuclei: n = 20 cells for each stage from two adult mice of each genotype. Females nuclei: *Hsf2bp*^{+/+}/*Hsf2bp*^{S167L/S167L}/*Hsf2bp*^{-/-} n = 41/40/40 zygonemas from two embryos and n = 40/39/38 pachynemas from two embryos (17.5 dpc). Two-tailed Welch's t-test analysis: ns, no significant differences, **p<0.01, ****p<0.0001. (b) Double immunofluorescence of MLH1 (green) and SYCP3 (red) in spermatocyte spreads from WT, *Hsf2bp*^{S167L/S167L} and *Hsf2bp*^{-/-}. MLH1 foci are significantly reduced in the *Hsf2bp*^{S167L/S167L} spermatocytes and absent in the knock-out. The plot on the right shows the quantification. See also **Figure 6—figure supplement 1b** for the plot showing the percentage of bivalents without CO. Nuclei: n = 61 for *Hsf2bp*^{+/+}, 89 for *Hsf2bp*^{S167L/S167L} and 60 for *Hsf2bp*^{-/-} from three adult mice of each genotype. Two-tailed Welch's t-test analysis: ****p<0.0001. (c) Double labeling of CDK2 (green) and SYCP3 (red) in oocyte spreads from 17.5 dpc *Hsf2bp*^{+/+}, *Hsf2bp*^{S167L/S167L} and *Hsf2bp*^{-/-} embryos. During meiotic prophase I, CDK2 localizes to the telomeres of chromosomes from leptotene to diplotene. However, around mid-pachytene additional interstitial CDK2 signals appear at CO sites, colocalizing with MLH1. As a measure of COs, just interstitial CDK2 foci (non-telomeric) have been counted. *Hsf2bp*^{-/-} and *Hsf2bp*^{S167L/S167L} females show a high and moderate reduction in the number of COs, respectively. Plot on the right of the panel show the quantification. See also **Figure 6—figure supplement 1d** for the plot showing the percentage of bivalents without CO. Nuclei: *Hsf2bp*^{+/+}/*Hsf2bp*^{S167L/S167L}/*Hsf2bp*^{-/-} n = 79/67/46 from three embryos (17.5 dpc). Two-tailed Welch's t-test analysis: ***p<0.0001, ****p<0.0001. (d) Double immunofluorescence of gammaH2AX (green) and SYCP3 (red) in spermatocyte spreads from WT and *Hsf2bp*^{S167L/S167L} mice. At pachytene, gammaH2AX allows the identification of the XY bivalent. Diagram on the right represents the quantification of the pachynemas with unsynapsed sex chromosomes from *Hsf2bp*^{S167L/S167L} and WT mice. Nuclei: n = 150 pachynemas from three adult mice of each genotype. Two-tailed Welch's t-test analysis: *p<0.05. Bar in all panels, 10 μm.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 6:

Figure supplement 1. Meiotic recombination is affected in *Hsf2bp*^{S167L/S167L} mice.

Figure supplement 2. Comparative interaction of HSF2BP-S167L and HSF2BP-WT with BRCA2.

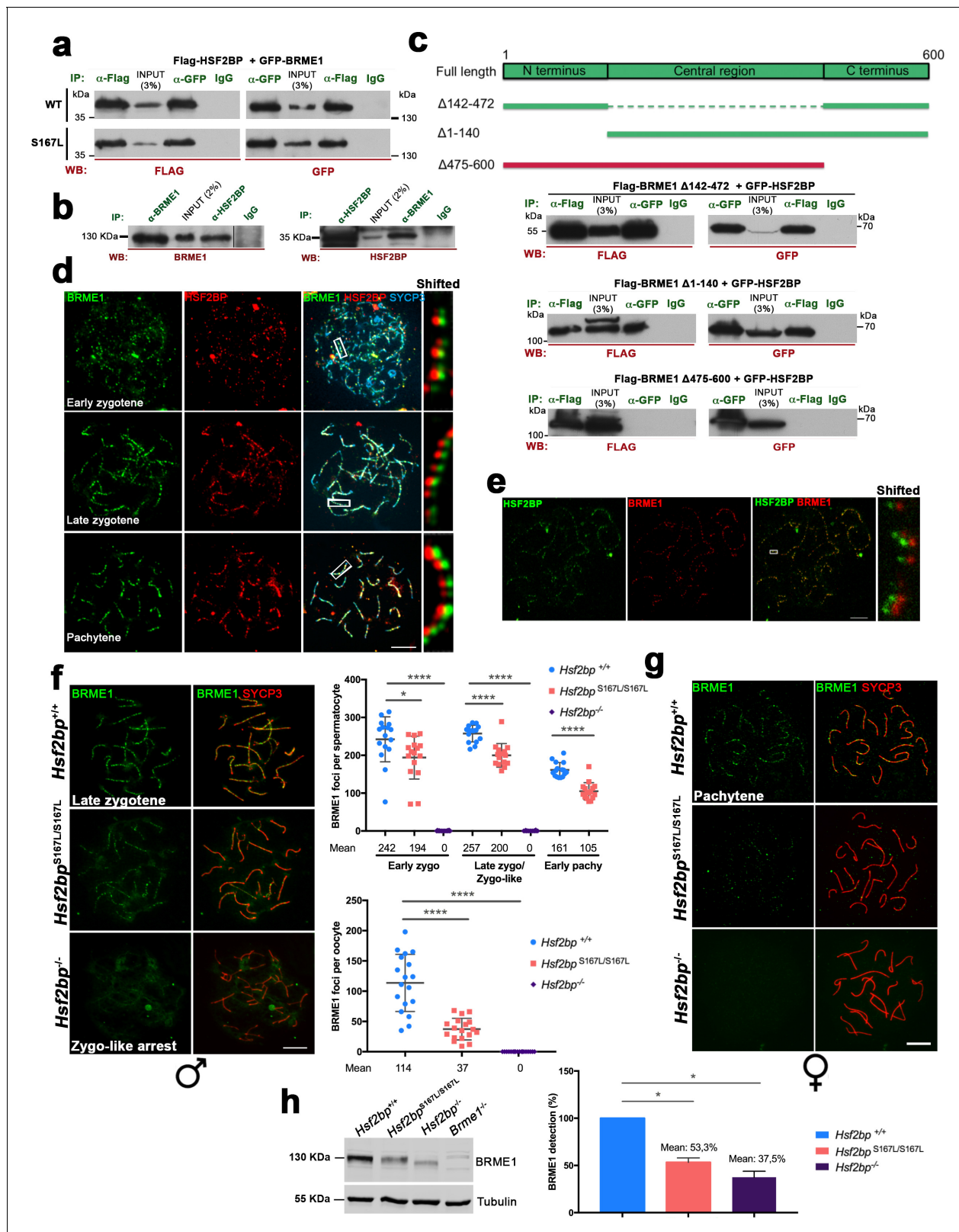


Figure 7. BRME1, a novel HSF2BP interactor that colocalizes to the recombination nodules. (a) HEK293T cells were transfected with Flag-HSF2BP (WT, upper panel; S167L, lower panel) and its novel interactor GFP-BRME1. Protein complexes were immunoprecipitated (IP: green text) with either anti-Flag or anti-EGFP or IgGs (negative control) and analysed by immunoblotting with the indicated antibody (WB: red text). Both HSF2BP variants (WT and S167L) co-immunoprecipitated similarly with BRME1. (b) IP of testis extracts with antibodies against BRME1, HSF2BP and IgGs as a negative control (IP: Figure 7 continued on next page

Figure 7 continued

green text) and western blot with the indicated antibodies (WB: red text) (c) Schematic representation of full-length BRME1 protein and the corresponding deletion (Δ) constructs (filled boxes) generated to decipher the essential BRME1 region for interacting with HSF2BP (green positive interaction and red no interaction). Western blots under the scheme show the Co-IP experiments. HEK293T cells were transfected with GFP-HSF2BP and the different delta constructs of Flag-BRME1. The $\Delta 475$ –600 abolishes the interaction, indicating that the C terminus of BRME1 is the essential region of interaction with HSF2BP. (d) Triple immunofluorescence of BRME1 (green), HSF2BP (red) and SYCP3 (blue) in WT spermatocyte spreads showing high colocalization between BRME1 and HSF2BP at late zygotene and pachytene (See **Supplementary file 1d** for quantification). Bar in panel, 10 μm . (e) Double immunolabeling of spermatocyte spread preparations with HSF2BP (green) and BRME1 (red) analyzed by Stimulated emission depletion (STED) microscopy. Bar in panel, 5 μm . (f–g) Double immunofluorescence of BRME1 (green) and SYCP3 (red) in (f) spermatocytes and (g) oocyte spreads from *Hsf2bp*^{+/+}, *Hsf2bp*^{S167L/S167L} and *Hsf2bp*^{-/-} showing a strong reduction of BRME1 staining in the S167L mutant and absence in the *Hsf2bp* knock-out. Plots next to the panel represent the quantification. See also extended **Figure 7—figure supplement 4a**. Male nuclei: *Hsf2bp*^{+/+}/*Hsf2bp*^{S167L/S167L}/*Hsf2bp*^{-/-}: n = 16/16/20 early and 15/15/16 late zygonemas, 16/16/- pachynemas from two adult mice. Female nuclei: n = 18 pachynemas from two embryos (17.5 dpc) of each genotype. Two-tailed Welch's t-test analysis: *p<0.05, ****p<0.0001. Bar in panels, 10 μm . (h) Western blot analysis of protein extracts from 13 dpp WT, *Hsf2bp*^{S167L/S167L} and *Hsf2bp*^{-/-} testes using an antibody against BRME1. Tubulin was used as loading control. Graph on the right represents the relative quantification of the immunoblotting. Mice: n = 2 *Hsf2bp*^{+/+}, *Hsf2bp*^{S167L/S167L} and *Hsf2bp*^{-/-}. Two-tailed Welch's t-test analysis: *p<0.05.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 7:

Figure supplement 1. *Brme1* $\Delta 142$ –472 mutants do not show meiotic defects.

Figure supplement 2. C19ORF57/BRME1 localizes at meiotic RNs.

Figure supplement 3. Colocalization analysis of BRME1 and HSF2BP with RPA and DMC1.

Figure supplement 4. BRME1 localization depends on HSF2BP and none of them has DNA-binding abilities.

Figure supplement 5. Generation and genetic characterization of *Rnf212*^{-/-} and *Hei10*^{-/-} mice.

Figure supplement 6. BRME1 loading depends on DSBs generation but not on synapsis.

are no nuclear proteins and chromatin (**Melton et al., 1984**) and used RPA as positive control. Our results show that both proteins lacked direct DNA-binding abilities, in contrast to the strong activity of RPA (**Figure 7—figure supplement 4b–c**).

To determine the role of BRME1 in recombination and DNA repair, we analyzed its cytological distribution pattern in different mutants lacking synapsis/recombination-related proteins. These mutants were the meiotic cohesin REC8 (**Bannister et al., 2004**), the central element protein of the SC SIX6OS1 (**Gómez-H et al., 2016**), the E3 ligases involved in the stabilization of recombinogenic proteins RNF212 and HEI10 (**Qiao et al., 2014**), the spermatoproteasomal subunit PSMA8 (**Gómez-H et al., 2019**), and the nuclease SPO11 required for DSBs generation (*Rnf212*^{-/-}, *Hei10*^{-/-} and *Spo11*^{-/-} mouse mutants are described in this work, see Materials and methods and **Figure 7—figure supplement 5** and **Figure 7—figure supplement 6a**, **Baudat et al., 2000**). HSF2BP staining was also carried out for a direct comparison. We were able to show that none of the recombination-deficient mutants abrogate BRME1 labeling at zygotene (or the corresponding meiotic stage at which the mutant spermatocytes are arrested), in contrast to its absence of loading in SPO11-deficient mice (**Figure 7—figure supplement 6b**, left). These results are very similar to those obtained for HSF2BP in these mutants (**Figure 7—figure supplement 6b**, right) and indicate that SPO11-dependent DSBs are essential for targeting HSF2BP/BRME1 to the RNs, and that the heterocomplex can be positioned at early events soon after DSBs generation.

To functionally analyze the role of BRME1 in mouse fertility, we generated a *Brme1*^{-/-} null mutant by genome editing (**Figure 8—figure supplement 1a–d**). *Brme1*^{-/-} females, despite being fertile, showed a strong reduction of the follicle pool (**Figure 8a**). Male *Brme1*^{-/-} mice were infertile, the average size of their testes was severely reduced (76% reduction compared to WT; testis weight/body weight ratio: *Brme1*^{-/-} 0,08% \pm 0004 (n = 6) vs 0,33% \pm 0,05 for WT controls (n = 14), ****p<0.0001, **Figure 8b** and **Figure 2—figure supplement 2b**), and lacked spermatozoa (**Figure 8c**). Histological analysis showed a meiotic arrest at epithelial stage IV with apoptotic spermatocytes (**Figure 8c**). Double immunolabeling of SYCP3 and SYCP1 revealed that spermatocytes were partially synapsed and showed a partner-switch phenotype in which synapsis is not restricted to homologous pairs (**Figure 8d**). The arrest corresponds to a zygotene-like stage though a small fraction of cells (3,7% \pm 1,9; n = 3) were able to escape this blockage reaching early pachytene. *Brme1*^{-/-} oocyte spread analysis revealed the presence of a subset of fully synapsed pachynemas but an increased number of cells with different degree of asynapsis (47,9% \pm 2,2 vs 12% \pm 5,7 in the WT; n = 2 (both genotypes), *p<0,05 **Figure 8e** and **Figure 8—figure supplement 1e**). Given the

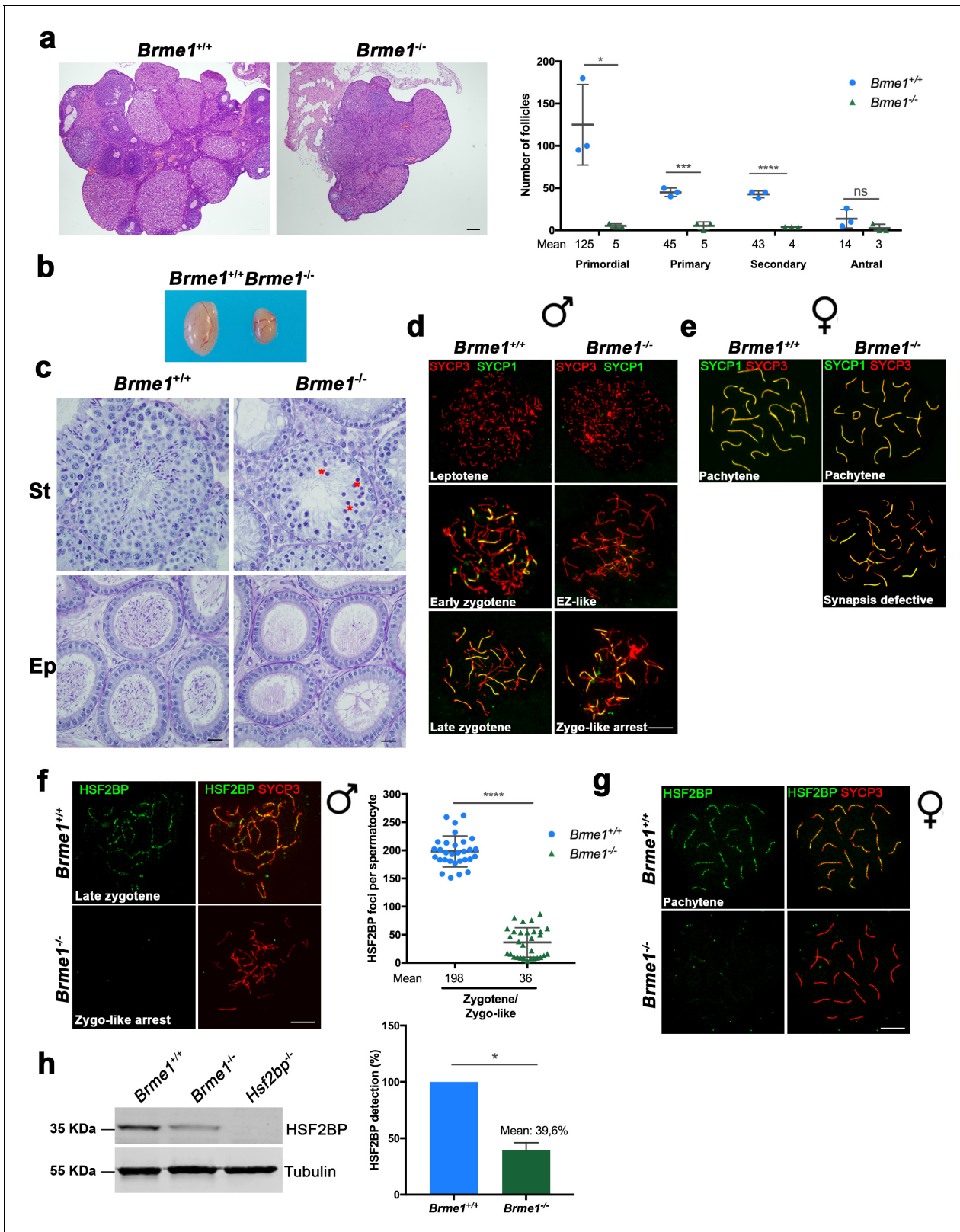


Figure 8. *Brme1*^{-/-} mice show severe fertility defects. (a) Hematoxylin+eosin stained sections of ovaries from adult *Brme1*^{-/-} females showing a strong depletion of follicles. Plot on the right represents the quantification in 3 months-old females. Ovaries: n = 3 ovaries for each genotype. Two-tailed Welch's t-test analysis: *p < 0.05, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. Bar in panels, 50 μm. (b) Testes from adult *Brme1*^{-/-} males show a strong reduction of the testis size. See quantification of testis weight/body weight at **Figure 2—figure supplement 2b**. (c) Spermatogenesis is arrested at epithelial stage IV in *Figure 8 continued on next page*

Figure 8 continued

Brme1^{-/-} as shown in PAS+hematoxylin stained testis sections. Massive apoptosis of spermatocytes is indicated (red asterisks). The spermatogenic arrest leads to empty epididymides and non-obstructive azoospermia. (St) Seminiferous tubules. (Ep) Epididymides. Bar in panels, 10 μm. (d–e) Double labeling of (d) spermatocyte and (e) oocyte spreads from WT and *Brme1*^{-/-} mice with SYCP3 (red) and SYCP1 (green). *Brme1*^{-/-} spermatocytes arrest in a zygotene-like stage and show synapsis between non-homologous chromosomes. (e) *Brme1*^{-/-} females showed a subset of fully-synapsed pachynemas (18.5 dpc) but increased numbers of synapsis-defective cells. See extended panel for females at **Figure 8—figure supplement 1e**. Bar in panels, 10 μm. (f–g) Double labeling with HSF2BP (green) and SYCP3 (red) of (f) spermatocyte and (g) oocyte spreads from *Brme1*^{-/-} mice showing faint HSF2BP labeling in spermatocytes and total absence of labeling in oocytes. Plot on the right of (f) panel represents de quantification of HSF2BP foci in *Brme1*^{-/-} spermatocytes. Nuclei: n = 30 zygonemas/zygonemas-like from two adult mice of each genotype (*Brme1*^{+/+} values from **Figure 3a**) Two-tailed Welch's t-test analysis: ****p<0.0001. Bar in panels, 10 μm. (h) Western blot analysis of protein extracts from 13 dpp WT, *Brme1*^{-/-} and *Hsf2bp*^{-/-} testes with a specific antibody against HSF2BP. Tubulin was used as loading control. Graph on the right represents the relative quantification of the immunoblotting. Mice: n = 2 *Brme1*^{+/+}, *Brme1*^{-/-} and *Hsf2bp*^{-/-}. Two-tailed Welch's t-test analysis: *p<0.05. The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 8:

Figure supplement 1. Generation and genetic characterization of *Brme1* knock-out mice.

interaction between HSF2BP and BRME1, we tested whether HSF2BP localization depended on BRME1 by immunolabeling of HSF2BP in *Brme1*^{-/-} spermatocytes and oocytes. Our results showed a strong reduction of HSF2BP staining in BRME1-null spermatocytes (**Figure 8f**) and a total absence in oocytes (**Figure 8g**). Western blot analysis of HSF2BP in 13 dpp testis extracts from *Brme1*^{-/-} mice showed a strong reduction in comparison with the WT control (**Figure 8h**), suggesting again that BRME1 is necessary for HSF2BP protein stabilization.

Immunostaining of *Brme1*^{-/-} spermatocytes for γH2AX, RPA, the recombinases RAD51 and DMC1 or SPATA22 revealed an accumulation of γH2AX and RPA on zygonema-like spermatocytes (**Figure 9—figure supplement 1a–b**), a drastic reduction of RAD51/DMC1 foci in early and late zygonema (**Figure 9a and c**, **Figure 9—figure supplement 2a and c**) and a strong accumulation of SPATA22 (**Figure 9e** and **Figure 9—figure supplement 2e**). According to the meiotic arrest at the zygotene-like stage, MLH1 staining revealed a total absence of COs (**Figure 9g**). As in males, *Brme1*^{-/-} oocytes showed an accumulation of γH2AX (**Figure 9—figure supplement 1c**) and SPATA22 (**Figure 9f** and **Figure 9—figure supplement 2f**) and a reduced staining of DMC1 and RAD51 leading to a reduced number of COs (measured as interstitial CDK2; **Figure 9b, d and h**, **Figure 9—figure supplement 2b and d**). However, *Brme1*^{-/-} oocytes did not show RPA accumulation (**Figure 9—figure supplement 1d**). These results are similar to the phenotypes described for HSF2BP mutants (**Figures 4, 5 and 6**, **Figure 4—figure supplement 1**, **Figure 5—figure supplement 1**, **Figure 6—figure supplement 1** and (Brandtsma et al., 2019) see **Supplementary file 1f** for a complete comparison among mutants and their meiotic alterations). Thus, both HSF2BP and BRME1 mutant mice show a highly similar phenotype including sexual dimorphism.

BRME1 and HSF2BP form a multimeric complex with PALB2 and BRCA2

To further delineate the interactome of BRME1, we immuno-precipitated BRME1 from testis extracts coupled to mass-spectrometry. We identified as expected HSF2BP as the main interactor, but also BRCA2, PALB2, RAD51 and RPA, strongly suggesting that they form a large multimeric complex (**Supplementary files 1g–1h**). For validation, we transfected the corresponding expression plasmids in HEK293T cells for co-IP analysis. BRME1 co-immunoprecipitated with BRCA2 and HSF2BP when they were all co-transfected, but importantly BRME1 alone did not co-immunoprecipitate with BRCA2 (**Figure 10a–b**). The reciprocal co-IP of BRCA2 with HSF2BP and BRME1 was also positive. We also observed modest but positive co-IP of HSF2BP with RPA, PALB2 and RAD51; and of BRME1 with RAD51 and RPA but not with PALB2 (**Figure 10—figure supplement 1a**). These interactions were further analyzed in a cell-free TNT system coupled to co-immunoprecipitation assays. We observed an absence of direct interaction between any of them, with the exception of BRME1 and HSF2BP, as expected from the Y2H analysis (**Figure 10—figure supplement 1b**). These results suggest that these proteins belong to a complex (or complexes) in vivo (likely through BRCA2) and that the HSF2BP-S167L variant could be altering BRME1 interaction with partners of major BRCA2-containing recombination complexes.

Finally, given the interaction of BRME1 and HSF2BP, we analysed their interdependence in U2OS cells. Transfected HSF2BP was localized diffusely in the cytoplasm and the nucleus (**Figure 10c**).

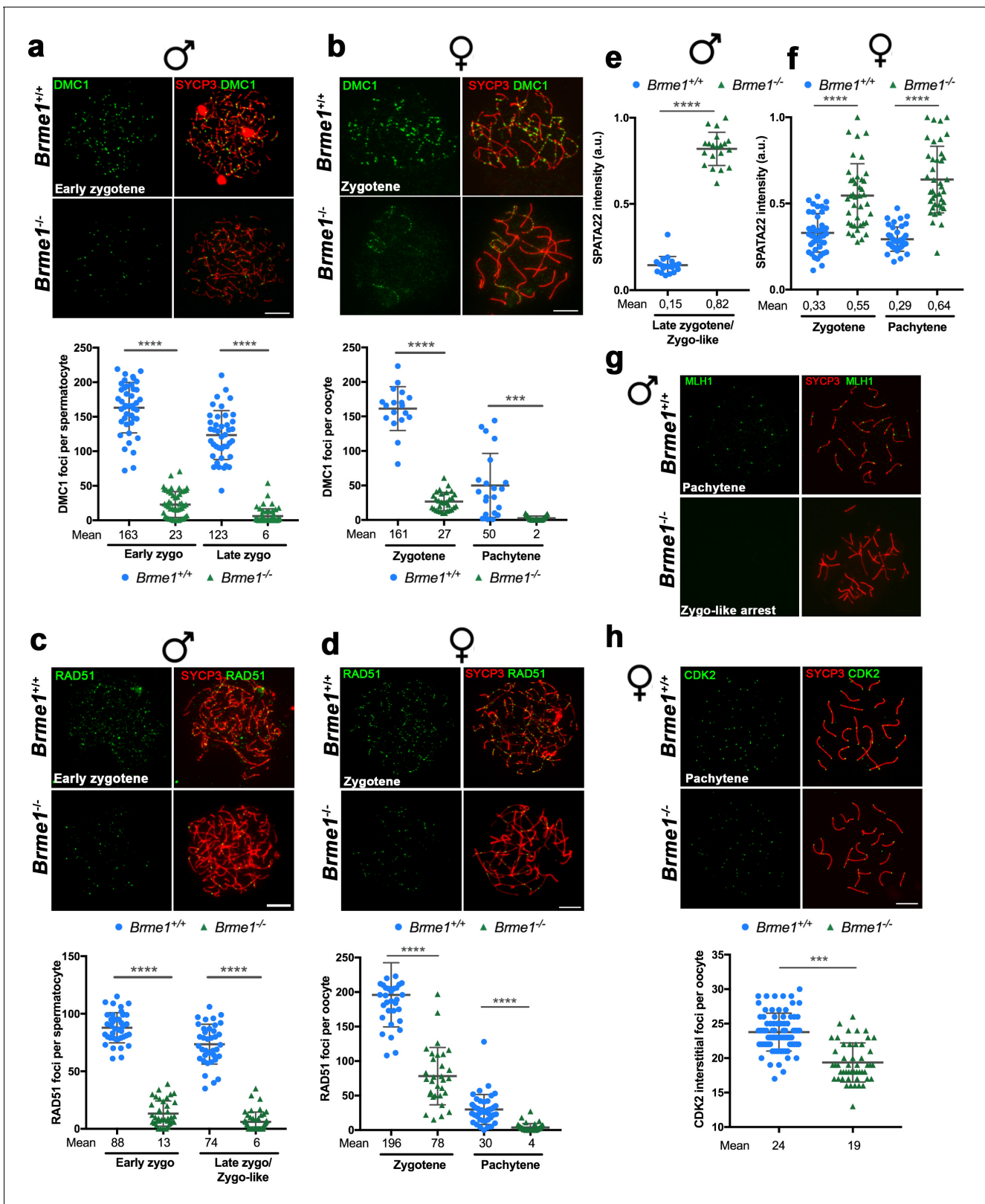


Figure 9. BRME1 is essential for meiotic recombination. (a–b) Double immunofluorescence of DMC1 (green) and SYCP3 (red) in *Brme1*^{+/+} and *Brme1*^{-/-} (a) spermatocytes and (b) oocytes showing a reduction in the number of DMC1 foci. Plots under each panel represent the quantification. See also extended panels on **Figure 9—figure supplement 2a–b**. Male nuclei for DMC1: *Brme1*^{+/+}/*Brme1*^{-/-} n = 43/50 early and 41/52 late zygonemas/zygonemas like from two adult mice of each genotype (*Brme1*^{+/+} values from **Figure 5a**). Female nuclei for DMC1: *Brme1*^{+/+}/*Brme1*^{-/-} n = 18/30 *Figure 9 continued on next page*

Figure 9 continued

zygonemas and 21/31 pachynemas from two embryos (17.5 dpc) of each genotype (*Brme1*^{+/+} values from **Figure 5c**). Two-tailed Welch's t-test analysis: ****p*<0.001, *****p*<0.0001. Bar in panels, 10 μm. (c–d) Double immunofluorescence of RAD51 (green) and SYCP3 (red) in *Brme1*^{+/+} and *Brme1*^{-/-} (c) spermatocytes and (d) oocytes showing a reduction in the number of RAD51 foci in the *Brme1*^{-/-} in comparison to the WT. Plots under each panel represent the quantification. See also extended panels on **Figure 9—figure supplement 2c–d**. Male nuclei for RAD51: *Brme1*^{+/+}/*Brme1*^{-/-} *n* = 39/39 early and 37/45 late zygonemas/zygonemas like from two adult mice of each genotype (*Brme1*^{+/+} values from **Figure 5b**). Female nuclei for RAD51: *Brme1*^{+/+}/*Brme1*^{-/-} *n* = 35/31 zygonemas and 42/40 pachynemas from two embryos (17.5 dpc) of each genotype (*Brme1*^{+/+} values from **Figure 5d**). Two-tailed Welch's t-test analysis: *****p*<0.0001. (e–f) Quantification of SPATA22 intensity in (e) spermatocytes and (f) oocyte spreads from *Brme1*^{+/+} and *Brme1*^{-/-}. See immunofluorescences in **Figure 9—figure supplement 2e–f**. Nuclei: Males, *n* = 20 cells from two adult mice of each genotype (*Brme1*^{+/+} from **Figure 6a**). Females, *Brme1*^{+/+}/*Brme1*^{-/-} *n* = 41/40 zygonemas and 40/40 pachynemas from two embryos of each genotype (17.5 dpc) (*Brme1*^{+/+} from **Figure 6a**). Two-tailed Welch's t-test analysis: *****p*<0.0001. (g) Double immunofluorescence of MLH1 (green) and SYCP3 (red) in *Brme1*^{+/+} and *Brme1*^{-/-} spermatocytes showing the absence of MLH1 labeling in the knock-out. (h) Double labeling of CDK2 (green) and SYCP3 (red) in oocyte spreads from 17.5 dpc *Brme1*^{+/+} and *Brme1*^{-/-} embryos. During meiotic prophase I, CDK2 localizes to the telomeres of chromosomes from leptotene to diplotene. However, around mid-pachytene additional interstitial CDK2 signals appear at CO sites, colocalizing with MLH1. As a measure of COs, just interstitial CDK2 foci (non-telomeric) have been counted. *Brme1*^{-/-} females show a strong reduction in the number of COs. Plot under the panel show the quantification. Nuclei: *Brme1*^{+/+}/*Brme1*^{-/-} *n* = 79/49 from three embryos (17.5 dpc) in WT and two embryos in *Brme1*^{-/-} (*Brme1*^{+/+} from **Figure 6c**). Two-tailed Welch's t-test analysis: *****p*<0.0001. Bar in all panels, 10 μm.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 9:

Figure supplement 1. DSBs are formed but not properly repaired in *Brme1*-deficient mice and mimic the phenotype of *Hsf2bp*-deficient mice.

Figure supplement 2. Altered dynamic of recombinational proteins in the absence of BRME1.

However, when HSF2BP was co-overexpressed with BRME1, its pattern changed to an intense nucleoplasm staining with nuclear invaginations that resemble nucleoplasmic reticulum (**Figure 10c**; Malhas et al., 2011). Interestingly, such invaginations were reduced when BRME1 was co-transfected with HSF2BP-S167L (**Figure 10c**). In addition, the intensity of the fluorescence signal of HSF2BP-S167L was lower than for HSF2BP-WT and both intensities increased when HSF2BP was co-expressed with BRME1 (**Figure 10c**). Western blot analysis indicated a reduced protein stability of the S167L variant (**Figure 10d**), in agreement with the results observed in vivo (*Hsf2bp*^{S167L/S167L} mutant, **Figure 3**). Interestingly, the protein expression level of transfected HSF2BP increased when co-transfected with BRME1 and was partially dependent on proteasome degradation (**Figure 10d**), indicating a role of BRME1 in stabilizing HSF2BP. Taken altogether and given the low protein expression of BRME1 in the *Hsf2bp*^{S167L/S167L}, these results suggest a functional interdependence between BRME1 and HSF2BP that leads to their lower protein stability/expression in mutant meiotic cells, which might induce recombination defects.

Discussion

Using exome sequencing, we identified the S167L missense variant in *HSF2BP* in a consanguineous family with three cases of POI with secondary amenorrhea. All affected family members are homozygous for the variant, and the healthy relatives are heterozygous carriers. The causality of the HSF2BP-S167L variant is supported by the meiotic phenotype and the subfertility observed in *Hsf2bp*^{S167L/S167L} female mice. Furthermore, the DNA repair defects in murine *Hsf2bp*^{S167L/S167L} meiotic cells, displayed by the reduced number of RAD51/DMC1 foci on DSBs and the subsequent reduction in the number of COs, provide evidence that this missense variant alters meiotic recombination. This conclusion was further supported by the comparative analysis of the S167L allele with the *Hsf2bp* null allele, which revealed that the missense variant can be considered as a hypomorphic allele. This is in agreement with the secondary amenorrhea observed in the patients, and the residual (medically-assisted) fertility in one of the affected sisters. Our identification of *HSF2BP* as a gene implicated in POI is in line with recent reports of POI-causing variants in genes that are required for DNA repair and recombination, such as *MCM8*, *MCM9*, *SYCE1*, *MSH4*, *PSMC3IP*, *FANCM* or *NBN* (AlAsiri et al., 2015; Carlosama et al., 2017; de Vries et al., 2014; Fouquet et al., 2017; He et al., 2018; Tenenbaum-Rakover et al., 2015; Tucker et al., 2018; Wood-Trageser et al., 2014; Zangen et al., 2011).

Meiotic mouse mutants often exhibit sexually dimorphic phenotypes (Cahoon and Libuda, 2019). These differences can have a structural basis, given that the organization of the axial elements is known to be different between sexes. This is supported by the difference in length of the axes and

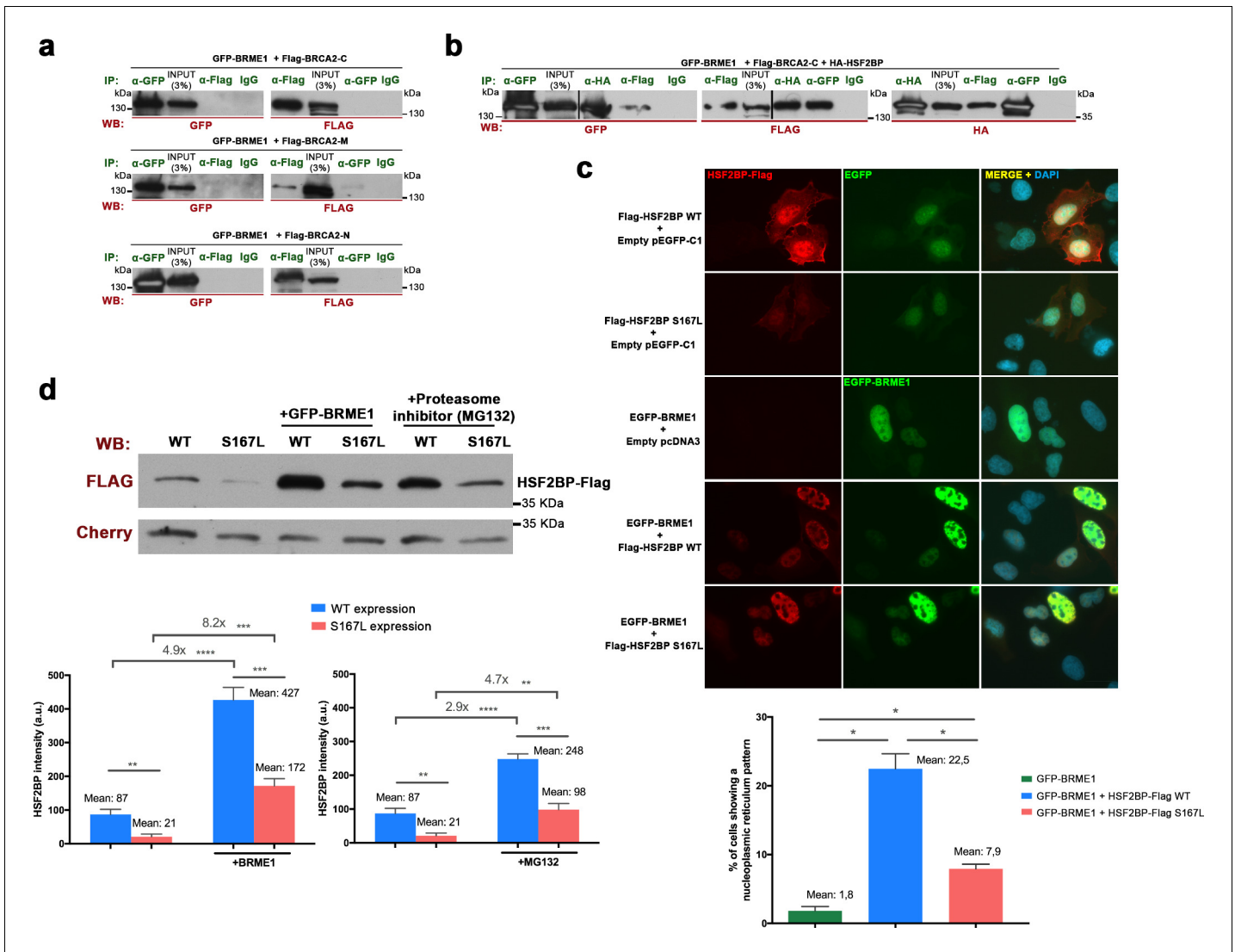


Figure 10. BRME1 forms a complex with BRCA2 and HSF2BP and stabilizes HSF2BP. (a–b) HEK293T cells were co-transfected with GFP-BRME1, Flag-BRCA2-C and HA-HSF2BP. Protein complexes were immunoprecipitated (IP: green text) with either an anti-Flag, anti-EGFP, anti-HA or IgGs, and analyzed by western blot with the indicated antibody (WB: red text). (a) BRME1 does not co-immunoprecipitate with BRCA2-N, BRCA2-M or BRCA2-C. (b) In the presence of HA-HSF2BP (triple co-transfection) BRCA2-C and BRME1 coimmunoprecipitate (co-IPs between HSF2BP and BRCA2-C are shown in **Figure 6—figure supplement 2a**). (c) Transfected U2OS cells with plasmids encoding Flag-HSF2BP (WT or S167L) and EGFP-BRME1 alone or together were immuno-detected with antibodies against Flag (red) and EGFP (green). Transfected HSF2BP (WT and S167L) labels the whole cell (S167L less intense) whereas BRME1 shows nuclear localization. When co-expressed, BRME1 and HSF2BP change their patterns and form nuclear invaginations that resemble nucleoplasmic reticulum. This phenotype is milder in the presence of HSF2BP-S167L than with the WT (graph under the panel: quantification of the number of cells showing a nucleoplasmic reticulum pattern). $n > 400$ cells from two independent transfections of each condition. Two-tailed Welch’s t-test analysis: * $p < 0.05$. Bar in panel, 20 μ m. (d) HEK293T cells were transfected with Flag-HSF2BP (WT and S167L) alone or with GFP-BRME1. Additionally, cells transfected with Flag-HSF2BP were treated with the proteasome inhibitor (MG132, 10 μ M) and analyzed by western blot. Cherry was used as transfection efficiency control. HSF2BP-WT was expressed at higher levels than HSF2BP-S167L and their detection (both the WT and the S167L variant) was increased when co-transfected with BRME1. The increase was greater for the HSF2BP-S167L variant in comparison with the WT. Incubation with MG132 increased the detection levels of transfected HSF2BP mimicking the effect of co-transfecting BRME1. $n = 3$ independent transfections for each condition. Two-tailed Welch’s t-test analysis: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 10:

Figure supplement 1. Co-immunoprecipitations of BRME1, HSF2BP, RPA, RAD51 and PALB2 expressed from transfected HEK293 cells and from TNT assays.

by the essential role that the meiotic cohesin subunit RAD21L plays in males but not in females (Herrán *et al.*, 2011). In general, meiotic recombination mutants appear to proceed further in female than in male, because in males the asynapsis of the sex bivalent leads to a loss of silencing of the Y chromosome, and perhaps also because of the presence of less stringent checkpoints in oogenesis (Hunt and Hassold, 2002). A sexually dimorphic phenotype is also observed here in our HSF2BP-S167L mutant mice. Both sexes show a significant decrease in the number of COs and consequently an increase in the frequency of meiocytes showing bivalents without CO. This leads to a significant reduction of spermatozoa in the epididymis, while the number of oocytes and their distribution in the follicular pool are not affected in females. Our failure to detect any significant impact of the variant on male fertility could be due to the high variability in litter frequency and size in our study. However, it is known that a strong reduction of the spermatozoa count (up to 60%) does not affect male mouse fertility (Schürmann *et al.*, 2002), which would explain the normal fertility of male mice bearing the HSF2BP-S167L variant despite the presence of overt meiotic alterations. By contrast, female mice with the HSF2BP-S167L variant show a mild sub-fertility phenotype with a reduction of litter frequency. This can be due to the very much fewer gametes available for fertilization in females in comparison to males but also to molecular differences in the meiotic recombination process in both sexes (Cahoon and Libuda, 2019), as displayed by the absence of RPA accumulation or the more pronounced decrease in DMC1 foci observed in HSF2BP-S167L oocytes.

Although we cannot exclude that a POI-like phenotype would appear over time in HSF2BP-S167L female mice, the sub-fertility observed in HSF2BP-S167L females appears to be milder in comparison to the phenotype of the human patients. This could be explained by a lower sensitivity of mice to hypomorphic alleles compared to humans, in a similar manner to the known lower gene dosage sensitivity of the former in the context of genes that are haploinsufficient in human (Veitia, 2003). In addition, the initial events of human female meiosis appear to be more error-prone than in mice, or even than human males, as evidenced by the increased incidence of synaptic defects in the human oocytes or the fact that MLH1 foci appear much earlier in prophase I (Hassold *et al.*, 2007). Furthermore, it has recently been shown that human oocytes exhibit a specific CO maturation inefficiency (Wang *et al.*, 2017). Indeed, despite a higher total number of COs in women, the frequency of bivalents without CO is paradoxically higher in women than in men. Altogether, these observations could explain the stronger phenotype of the human POI patients compared to the *Hsf2bp*^{S167L/S167L} female mice.

The absence of homozygous male carriers in the consanguineous family studied here prevents the direct comparison of the impact of the HSF2BP-S167L variant on fertility phenotypes between human and mouse males. Although future studies might identify infertile men homozygous for the S167L variant, it is interesting to note that another variant of HSF2BP (G224*) was shown to affect recombination rate in males and that two siblings homozygous for this HSF2BP variant in the analyzed Icelandic population were healthy but without descendants, suggesting they were infertile (Halldorsson *et al.*, 2019). This reinforces a conserved function of HSF2BP in human male fertility.

We have shown through a biochemical analysis that BRME1 immunoprecipitates mainly with its partner HSF2BP (constituting or belonging to a complex) but also with PALB2, RAD51, RPA and BRCA2 (in testis extracts). These interactions could possibly be mediated by the multidomain hub protein BRCA2 (Siaud *et al.*, 2011) as HSF2BP interacts directly with BRCA2 (Brandtsma *et al.*, 2019) and with BRME1 (this work). In addition, BRCA2 also directly interacts with the DSBs recruiter PALB2, with the recombinases RAD51 and DMC1 (through different specific domains), and with DNA (Siaud *et al.*, 2011). This BRCA2-containing complex participates in the orderly orchestration of events at DSBs such as the initial binding of RPA to the resected DNA, the exchange of RPA by RAD51/DMC1, and the loading of the MEIOB-SPATA22 complex to the RPA complexes (Martinez *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2015). Interestingly, genes with recently identified variants in POI patients are implicated in the repair of induced DSBs at the early stages of meiosis and encode BRCA2-interacting factors, such as MEIOB, DMC1 or BRCA2 itself (Caburet *et al.*, 2019a; Caburet *et al.*, 2020; Caburet *et al.*, 2019b; He *et al.*, 2018). This highlights the crucial importance and the high sensitivity of this particular meiotic step, and the hub role of BRCA2 as a tightly regulated platform for correct meiotic recombination.

We have also shown by several complementary approaches that the proteins HSF2BP/BRME1 constitute in vivo a functional complex in which both subunits are essential for meiotic recombination and for their mutual protein expression and/or stability in vivo. Accordingly, the genetic depletion of

BRME1 or HSF2BP leads to similar if not identical phenotypes in which oogenesis is altered with severe defects in chromosome synapsis that promotes premature loss of ovarian follicles and spermatogenesis is arrested at zygotene-like stage resulting in a lack of spermatozoa. These meicytes are not able to load the recombinases RAD51/DMC1, impairing the proper repair of DSBs leading to the generation of no COs or very few in males and females, respectively. As a consequence, zygona-like spermatocytes accumulate the single strand binding proteins SPATA22 and RPA, whereas oocytes accumulates only SPATA22. During the course of the reviewing of this work, three *Brme1* knockouts have been described (Zhang et al., 2020; Shang et al., 2020; Takemoto et al., 2020). All the described male mutants show strong fertility defects and similar molecular alterations although with different severity. In females, the two works that address their analysis (Shang et al. and Takemoto et al.), describe normal fertility which is in contrast with the strong reduction in the follicle pool and meiotic defects observed in our *Brme1*^{-/-} females. The higher severity of our male and female mutants could be explained on the basis of the different genetic background of the mice given that all of them are apparently similar.

The S167L human recessive POI variant behave as a hypomorphic allele in mice, which results in a reduction of the protein expression/stability of itself and of its partner BRME1 in vivo and in transfected cells. As a consequence, both male and female *Hsf2bp*^{S167L/S167} mice show a similar but milder phenotype than that of the *Hsf2bp*^{-/-} or *Brme1*^{-/-}, consisting in a reduction in the spermatozoa count while being fertile and a subtle reduction in female fertility. Molecularly, the reduction observed in the meicytes of the mutant *Hsf2bp*^{S167L/S167L} mice of RAD51/DMC1, the reduction of COs (both in males and females), the accumulation of RPA (only in males) and SPATA22 (in males and females) are also weaker than in the null mutant. The observed accumulation of RPA in males is likely to occur at the early stages of recombination because SPATA22 loading to the DSBs is also increased in the mutants of HSF2BP and BRME1. RPA, as part of a trimeric replication protein complex (RPA1-RPA2-RPA3), binds and stabilizes ssDNA intermediates that form during DNA repair. In meiosis, RPA is also forming a complex with two other essential meiotic players MEIOB (homologue of RPA) and SPATA22. However, the loading of this complex to DSBs is RPA-independent (Shi et al., 2019). It has been postulated that RPA functions in meiosis at two different stages; (i) during the early recombination stages when the DSBs ends are resected by the MRN complex and (ii) during the strand invasion into the homologous duplex that is carried out by RAD51/DMC1 and ssDNA is generated at the displacement loops (Shi et al., 2019). The observed lack of DNA-binding ability of HSF2BP/BRME1 points towards a model in which the absence of the complex HSF2BP/BRME1 through a direct interaction with BRCA2 impairs the replacement of RPA by RAD51/DMC1 in the foci that form on the DSBs of the spermatocytes. Similarly, the reduced expression at the protein level of HSF2BP/BRME1 as a consequence of the POI variant, which does not affect their heterodimerization, would make them less proficient in replacing RPA in the spermatocytes by the recombinases RAD51/DMC1 leading to a lower frequency of COs. Given the unknown function that RPA plays in vivo during oogenesis (Shi et al., 2019), it is tempting to speculate that the role of RPA in mediating the replacement of RAD51/DMC1 in female meiosis would be carried out by another protein complex such as SPATA22/MEIOB in a HSF2BP/BRME1-dependent manner.

Very recently, a high-resolution genome-wide recombination map revealed novel loci involved in the control of meiotic recombination and highlighted genes involved in the formation of the SC (SYCE2, RAD21L, SYCP3, SIX6OS1) and the meiotic machinery itself as determinants of COs (Halldorsson et al., 2019). Within the second category, variants of the SUMO ligase RNF212 and the ubiquitin ligase HEI10 have been largely documented as genetic determinants of the recombination rate in humans and, importantly, so were variants of HSF2BP. Consequently, gene dosage of RNF212 and HEI10 affects CO frequency through their activity in CO designation and maturation (Lake and Hawley, 2013; Reynolds et al., 2013). We found that both BRME1 and HSF2BP localization are unaffected in the loss-of-function mouse mutants of *Rnf212* and *Hei10* (*Ccnb1ip1*). This observation together with the proper co-localization of BRME1/HSF2BP with RPA allows us to map these proteins upstream in the recombination pathway.

It is worth noting that some of the genes affecting the recombination rate have also been described as 'fertility genes', such as SYCP3, HFM1 and HSF2BP (Geisinger and Benavente, 2017; Primary Ovarian Insufficiency Collaboration et al., 2014 and this work). Altogether, we propose that different variants of the same meiotic gene (alleles responsible for mild or strong phenotypes) can give rise to either an altered genome-wide recombination rate with no detrimental effect, or

cause infertility when the decreased recombination rate falls below the lower limit of one COs per bivalent. In the present POI family, the S167L variant in HSF2BP seems to be below that limit. To our knowledge, HSF2BP is one of the very few human genes with variants known to affect both the genome-wide recombination rate in the human population and meiotic chromosome missegregation (fertility) through a reduction of the recombination rate (*Halldorsson et al., 2019*). Along similar lines, it is conceivable that variants with additive effects (*Schimenti and Handel, 2018*) can lead to a genome-wide reduction of the recombination rate and thus to aneuploidy and infertility. Specifically, variants in genes involved in meiotic recombination and SC constituents could be responsible for a large fraction of genetic infertilities. These variants should be under purifying selection and would be removed or substantially reduced from the population. However, this is not the case for genes with sexual phenotypic dimorphism (*Gershoni and Pietrokovski, 2014*) as is apparent for a wide number of meiotic genes (*Cahoon and Libuda, 2019*), including HSF2BP and BRME1, where individuals of one of the sexes are fertile carriers.

In summary, we describe for the first time a human family where POI co-segregates with a genetic variant in HSF2BP (S167L) in a Mendelian fashion. Humanized mice reveal that the HSF2BP variant is a hypomorphic allele that promotes the lower protein expression and/or stability of the HSF2BP/BRME1 complex and phenocopy in a milder manner the meiotic defects observed in mice lacking either HSF2BP or its direct interactor BRME1.

Materials and methods

Whole exome sequencing

Written informed consent was received from participants prior to inclusion in the study and the institutions involved. Genomic DNA was extracted from blood samples by standard protocols.

For individuals III-3 and III-10, library preparation, exome capture, sequencing and initial data processing were performed by Beckman Coulter Genomics (Danvers, USA). Exon capture was performed using the hsV5UTR kit target enrichment kit. Libraries were sequenced on an Illumina HiSeq instrument as paired-end 100 bp reads. For individual III-2, library preparation, exome capture, sequencing and data processing were performed by IntegraGen SA (Evry, France) according to their in-house procedures. Target capture, enrichment and elution were performed according to manufacturer's instructions and protocols (SureSelect Human All Exon Kits Version CRE, Agilent). The library was sequenced on an Illumina HiSeq 2500 as paired-end 75 bp reads. Image analysis and base calling was performed using Illumina Real Time Analysis (RTA 1.18.64) with default parameters.

Bioinformatic analysis

For the three individuals, sequence reads were mapped onto the human genome build (hg38/GRCh38) using the Burrows-Wheeler Aligner (BWA) tool. Duplicated reads were removed using sambamba tools. Whole exome sequencing metrics are provided in **Supplementary file 1a**. Variant calling, allowing the identification of SNV (Single Nucleotide Variations) and small insertions/deletions (up to 20 bp) was performed via the Broad Institute GATK Haplotype Caller GVCF tool (3.7). Ensembl VEP (Variant Effect Predictor, release 87) program was used for initial variant annotation. This tool considers data available in dbSNP (dbSNP147), the 1000 Genomes Project (1000G_phase3), the Exome Variant Server (ESP6500SI-V2-SSA137), the Exome Aggregation Consortium (ExAC r3.0), and IntegraGen in-house databases. Additional annotation data was retrieved using dbNSFP (version 3.5, <https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP>) and Varsome (<https://varsome.com/>). Minor allele frequencies were manually verified on GnomAD (<http://gnomad.broad-institute.org>), ISB Kaviar (<http://db.systemsbiology.net/kaviar/>), and Great Middle Eastern variant database GME Variome (<http://igm.ucsd.edu/gme/>).

Variant filtering was performed on the following criteria:

- minimum depth at variant position of 10,
- correct segregation in the family, on the basis of homozygosity by descent: variants should be homozygous in both affected sisters III-2 and III-3, and heterozygous or homozygous for Reference allele in the fertile sister III-10,
- absence in unrelated in-house fertile controls,

- Minor Allele Frequency (MAF) below 1% in global and in each population in the GnomAD database,
- presence in the coding sequence (i.e not in UTRs, introns, intergenic,.)
- high predicted functional impact on the protein. Impact was evaluated based on the predictors included in dbNSFP3.5 (Cahoon and Libuda, 2019; Carlosama et al., 2017; Cox and Mann, 2008) (considered as pathogenic when the majority of the predictors agreed).

The number of variants fulfilling those criteria is provided in **Supplementary file 1b**. Visual inspection of the variant was performed using the IGV viewer.

Sanger sequencing analysis

To confirm the presence and segregation of the variant, direct genomic Sanger DNA sequencing of *HSF2BP* was performed in the patients, the parents and non-affected siblings using specific primers: HSF2BP-ex6F: 5'-ctagaatcttctgtatcctgca-3' and HSF2BP-ex6R2: 5'-ggctctggaagcaaacaggcaa-3'. The resulting chromatograms are shown in **Figure 1—figure supplement 1**.

Predictions of pathogenicity and sequence conservation

The S167L variant was predicted to be pathogenic or deleterious and highly conserved by 11 out of the 18 pathogenicity predictors available in dbNSFP 3.5 (**Supplementary file 1c**). Upon verification, it appears that the conflicting interpretation of this variant might stem from the single occurrence of a Leu at this position in zebrafish. As the change in zebrafish is the variant that we have in the human family, we checked all the available sequences (Ensembl Release 99, January 2020, removing the one-to-many relationships). Ser167 is very highly conserved in mammals, birds and reptiles and fish and is present in 208 of 212 orthologous sequences (**Figure 1—figure supplement 2** and **Figure 1—figure supplement 3**).

Generation of CRISPR/Cas9-edited mice

For developing all the mutant mice models (*Hsf2bp*^{-/-}, *Hsf2bp*^{S167L/S167L}, *Brme1*^{Δ142-472/Δ Δ142-472}, *Brme1*^{-/-}, *Spo11*^{-/-}, *Rnf212*^{-/-} and *Hei10*^{-/-}) the different crRNAs were predicted at https://eu.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM. The crRNAs, the tracrRNA and the ssODNs were produced by chemical synthesis at IDT (crRNAs and ssODNs sequences are listed in **Supplementary files 1i-1j**). For the *Hsf2bp*^{S167L} we introduced a mutation in the mouse counterpart residue (p.Ser171Leu) of the POI mutation found in the clinical case (p.Ser167Leu). However, for the sake of simplicity, on this manuscript we refer to the mutant allele by the acronym of the human mutation (S167L). The ssODN contains the mutation on the corresponding position of the mouse sequence (c.512C > T, p.Ser171Leu, see character in red in **Supplementary file 1j**) and the PAM mutations avoiding amino acid changes (see characters in bold in the **Supplementary file 1j**). For the *Spo11*^{-/-} mice generation, the ssODN contains the mutations in the active site (TACTAC > TTCTTC p.YY137-138FF, see **Supplementary file 1j**) and the PAM mutations (bold characters in **Supplementary file 1j**). In all cases the crRNA and tracrRNA were annealed to obtain the mature sgRNA. A mixture containing the sgRNAs, recombinant Cas9 protein (IDT) and the ssODN (30 ng/μl Cas9, 20 ng/μl of each annealed sgRNA and 10 ng/μl ssODN) were microinjected into B6/CBA F2 zygotes (hybrids between strains C57BL/6J and CBA/J) (Singh et al., 2015) at the Transgenic Facility of the University of Salamanca. Edited founders were identified by PCR amplification (Taq polymerase, NZYtech) with primers flanking the edited region (see **Supplementary file 1k** for primer sequences). The PCR products were direct sequenced or subcloned into pBlueScript (Stratagene) followed by Sanger sequencing, selecting the founders carrying the desired alleles. The selected founders were crossed with wild-type mice to eliminate possible unwanted off-targets. Heterozygous mice were re-sequenced and crossed to give rise to edited homozygous. Genotyping was performed by analysis of the PCR products produced from genomic DNA extracted from tail biopsies. The primers and the expected amplicon sizes are listed in the **Supplementary file 1k**. Mouse mutants for *Rec8*, *Six6os1* and *Psmα8* have been previously described (Bannister et al., 2004; Gómez-H et al., 2019; Gómez-H et al., 2016).

Ethics statement

All the experiments were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the University of Salamanca (USAL) and the Ethics committee of the Spanish Research Council (CSIC) under protocol #00–245. Accordingly, all the mouse protocols used in this work have been approved by the Animal Experimentation committees mentioned above. Specifically, mice were always housed in a temperature-controlled facility (specific pathogen free, spf) using individually ventilated cages, standard diet and a 12 hr light/dark cycle, according to EU law (63/2010/UE) and the Spanish royal law (53/2013) at the “Servicio de Experimentación Animal, SEA. In addition, animal suffering was always minimized, and we made every effort to improve animal welfare during the life of the animals. The mice analysed were between 2 and 4 months of age, except in those experiments where the age is indicated.

Histology

For histological analysis, after the necropsy of the mice their testes or ovaries were removed and fixed in Bouin’s fixative or formol 10%, respectively. They were processed into serial paraffin sections and stained with haematoxylin-eosin (ovaries) or Periodic acid–Schiff (PAS) and hematoxylin (testes). The samples were analysed using a microscope OLYMPUS BX51 and images were taken with a digital camera OLYMPUS DP70. For TUNEL assay, sections were deparaffinized and apoptotic cells were detected with the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche) and counterstained with DAPI.

Follicle counting

The inner third of each ovary was serially sliced into 5 μm thick sections and follicles were counted every five sections and classified into four stages (primordial, primary, secondary and antral). Only those follicles in which the nucleus of the oocyte was clearly visible were counted.

Epididymal sperm count

The epididymides were removed, minced and incubated in 1,5 ml of KSOM for 30 min at 37°C to release sperm into the medium. The suspension was incubated for 10 min at 60°C and the total sperm count was quantified by using a hemacytometer.

Fertility assessment

Hsf2bp^{+/+} and *Hsf2bp*^{S167L/S167L} males and females (8 weeks old) were mated with WT females and males, respectively, over the course of 4–12 months. six mice per genotype (seven mice for *Hsf2bp*^{S167L/S167L} females) were crossed. The presence of copulatory plug was examined daily and the number of pups per litter was recorded.

Immunocytology and antibodies

Testes were detunicated and processed for spreading using a conventional ‘dry-down’ technique or for squashing (Gómez-H et al., 2016). Oocytes from fetal ovaries (E16.5, E17.5 and E19.5 embryos) were digested with collagenase, incubated in hypotonic buffer, disaggregated and fixed in paraformaldehyde. Rabbit polyclonal antibodies against HSF2BP and BRME1 were developed by ProteintechTM against a fusion protein of poly-His with full length HSF2BP or BRME1 (pUC57 vector) of mouse origin. Two antibodies (named R1 and R2) were generated against each protein (HSF2BP or BRME1) by immunization of two different host rabbits. Rabbit polyclonal antibody against DMC1 was developed by ProteintechTM against a DMC1 peptide (EESGFQDDEESLFQDIDLLQKHGINMA-DIKKLKSVGICTIKG). The primary antibodies used for immunofluorescence were rabbit α HSF2BP R2 (1:30, ProteintechTM), rabbit α BRME1 R2 (1:100, ProteintechTM), mouse α SYCP3 IgG sc-74569 (1:100, Santa Cruz), rabbit α SYCP3 serum K921 (provided by Dr. José Luis Barbero, Centro de Investigaciones Biológicas, Spain), rabbit α SYCP1 IgG ab15090 (1:200, Abcam), rabbit anti- γ H2AX (ser139) IgG #07–164 (1:500, Millipore), mouse α MLH1 51-1327GR (1:20, BD Biosciences), mouse α CDK2 (1:20; Santa Cruz Sc-6248) rabbit α RAD51 PC130 (1:50, Calbiochem), rabbit α RPA1 serum ‘Molly’ (1:30, provided by Dr. Edyta Marcon, Medical Research University of Toronto, Canada), rat α RPA2 2208S (1:100, Cell Signaling), rabbit α DMC1 (1:500, ProteintechTM), rabbit α SPATA22 16989–1-AP (1:60, Proteintech), mouse α Flag IgG (1:100; F1804, Sigma-Aldrich).

Image acquisition and analysis

Slides were visualized at room temperature using a microscope (Axioplan 2; Carl Zeiss, Inc) with 63 × objectives with an aperture of 1.4 (Carl Zeiss, Inc). Images were taken with a digital camera (ORCA-ER; Hamamatsu) and processed with OPENLAB 4.0.3 and Photoshop (Adobe). The slides from the different genotypes used for comparative analyses were all freshly prepared in parallel and immunofluorescence were also carried out in parallel with the same freshly prepared cocktail of antibodies. Slides were not frozen to avoid differences in the background and antigen reactivity. All the images acquired were taken with constant exposure times for comparison. Quantification of foci and fluorescence intensity were performed using Image J software. Only the axis-associated foci were counted. For colocalization analysis, the same nucleus was quantified without rotation (experiment) and after rotating 90 degrees one of the images. This condition allows to determine non-specific colocalization (random). Background was subtracted for intensity quantification. Squashed preparations were visualized with a Delta vision microscopy station. Stimulated emission depletion (STED) microscopy (SP8, Leica) was used to generate the super-resolution images. Secondary antibodies for STED imaging were conjugated to Alexa 555 and 488 (Invitrogen) and the slides were mounted in Prolong Antifade Gold without DAPI.

Generation of plasmids

Full-length cDNAs encoding HSF2BP, BRME1 (full length and delta constructs), RPA1, BRCA2 (N, M and C constructs), PALB2, RAD51, and PSMA8 were RT-PCR amplified from murine testis RNA. The cDNAs were cloned into the EcoRV pcDNA3-2XFlag, SmaI pcDNA3-2XHA or SmaI pEGFP-C1 expression vectors under the CMV promoter. In frame cloning was verified by Sanger sequencing.

Y2H assay and screening

Y2H assay was performed using the Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech) according to the manufacturers' instructions. Mouse *Hsf2bp* cDNA was subcloned into the vector pGBKT7 and was used as bait to screen a mouse testis Mate and Plate cDNA library (Clontech Laboratories Inc). Positive clones were initially identified on double dropout SD (synthetic dropout)/-Leu /- Trp/X- α -Gal/Aureobasidin A plates before further selection on higher stringency quadruple dropout SD /- Ade /- His /- Leu /- Trp/X- α -Gal/Aureobasidin A plates. Pray plasmids were extracted from the candidate yeast clones and transformed into *Escherichia coli*. The plasmids from two independent bacteria colonies were independently grown, extracted and Sanger sequenced.

DNA pull-down assay

ssDNA/dsDNA pull down assays were performed using the protocol previously described by [Souquet et al., 2013](#). A HPLC-purified biotinylated oligonucleotide was used for the DNA pull down assays: ss60-mer F: 5'-GAT CTG CACGACGCACACCGGACGTATCTGCTATCGCTCATG TCAACCGCTCAAGCTGC/3'BiotinTEG/ (IDT) and ss60-mer R (No biotinylated): 5'- GCAGC TTGAGCGGTTGACATGAGCGATAGCAGATACGTCCGGTGTGCGTCGTGCAGATC-3'. Double-stranded DNA annealing was carried out in 50 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5 buffer with complementary sequences at molecular equivalence by a denaturing step (5 min at 95°C) and a slow return to room temperature. DNA was immobilized onto Dynabeads M-280 Streptavidin (Dyna) following the manufacturer instructions (0.2 pmol per 1 μ g of beads). Protein extracts were obtained from in vitro coupled transcription/translation systems (TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate Systems, Promega) according to manufacturer's protocol. 15 μ l of Flag-tagged proteins from TNT assays were pre-incubated on ice for 10 min in modified DBB (DBB: 50 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 10% (w/v) glycerol, Complete Protease inhibitor, 1 mM 2-mercaptoethanol pH 7,4 modified with 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA plus 5 mg/ml BSA). After this preincubation 500 μ g Dynabeads with immobilized ss- or ds-DNA were added and incubated for 1 hr at 4°C under agitation. Then the beads were washed three times (5 min rotating at RT) in 700 μ l of modified DBB without BSA, before being washed once in 700 μ l of rinsing buffer (modified DBB with 150 mM NaCl). Finally, DNA-binding proteins were eluted by resuspending the beads in 30 μ l of Laemmli buffer boiling the samples for 5 min. The samples were analyzed by western blot.

Cell lines and transfections

HEK293T and U2OS cell lines were obtained from the ATCC and transfected with Jetpei (PolyPlus) according to the manufacturer protocol. Cell lines were tested for mycoplasma contamination using the Mycoplasma PCR ELISA (Sigma).

Immunoprecipitation and western blotting

HEK293T cells were transiently transfected and whole cell extracts were prepared in a 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 buffer supplemented with protease inhibitors. Those extracts were cleared with protein G Sepharose beads (GE Healthcare) for 1 hr. The corresponding antibodies were incubated with the extracts for 2 hr and immunocomplexes were isolated by adsorption to protein G-Sepharose beads o/n. After washing, the proteins were eluted from the beads with 2xSDS gel-loading buffer 100 mM Tris-HCl (pH 7), 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 200 mM β -mercaptoethanol and 20% glycerol, and loaded onto reducing polyacrylamide SDS gels. The proteins were detected by western blotting with the indicated antibodies. Immunoprecipitations were performed using mouse α Flag IgG (5 μ g; F1804, Sigma-Aldrich), mouse α GFP IgG (4 μ g; CSB-MA000051M0m, Cusabio), ChromPure mouse IgG (5 μ g/1 mg prot; 015-000-003). Primary antibodies used for western blotting were rabbit α Flag IgG (1:2000; F7425 Sigma-Aldrich), goat α GFP IgG (sc-5385, Santa Cruz) (1:3000), rabbit α Myc Tag IgG (1:3000; #06-549, Millipore), rabbit α HSF2BP R2 (1:2000, ProteintechTM), rabbit α BRME1 R1 (1:3000, ProteintechTM), rat α RPA2 (1:1000, Cell Signaling (Cat 2208S)). Secondary horseradish peroxidase-conjugated α -mouse (715-035-150, Jackson ImmunoResearch), α -rabbit (711-035-152, Jackson ImmunoResearch), α -goat (705-035-147, Jackson ImmunoResearch) or α -rat (712-035-150, Jackson ImmunoResearch) antibodies were used at 1:5000 dilution. Antibodies were detected by using Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate from Millipore. Secondary DyLight conjugated α -mouse (DyLight 680, 35518 Thermo-Scientific) and α -rabbit (DyLight 800, 35571 Thermo-Scientific) were used at 1:10,000 dilution. Antibodies were detected using a LI-COR Odyssey fluorescent imager.

Testis immunoprecipitation

Testis extracts were prepared in 50 mM Tris-HCl (pH8), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA 1% Triton X100. 4 mg of protein were incubated with 10 μ g of the specific antibody against the protein to be immunoprecipitated for 2 hr at 4°C rotating. Then 50 μ l of sepharose beads (GE Healthcare) were added to the protein-Ab mixture and incubated overnight at 4°C with rotation. After that, the protein-bound beads were washed four times with 500 μ l of the extraction buffer by centrifugating 1 min at 10,000 rpm and 4°C. Finally, the co-immunoprecipitated proteins were eluted from the beads by resuspending the beads in 50 μ l Laemmli buffer and boiling for 5 min. The samples were analyzed by western blot.

Testis immunoprecipitation coupled to mass spectrometry analysis

200 μ g of antibodies R1 and R2 against BRME1 (two independent IPs) and IgG from rabbit (negative control) were crosslinked to 100 μ l of sepharose beads slurry (GE Healthcare). Testis extracts were prepared in 50 mM Tris-HCl (pH8), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA 1% Triton X100. 20 mg of protein extracts were incubated o/n with the sepharose beads. Protein-bound beads were packed into columns and washed in extracting buffer for three times. Proteins were eluted in 100 mM glycine pH3 and analysed by Lc-MS/MS shotgun in LTQ Velos Orbitrap at the Proteomics facility of Centro de Investigación del Cáncer (CSIC/University of Salamanca).

Mass spectrometry data analysis

Raw data were analysed using MaxQuant v 1.6.2.6 (Cox and Mann, 2008) against SwissProt Mouse database (UP000000589, Oct, 2019) and MaxQuant contaminants. All FDRs were of 1%. Variable modifications taken into account were oxidation of M and acetylation of the N-term, while fixed modifications included considered only carbamidomethylation of C. The maximum number of modifications allowed per peptide was of 5. Proteins were quantified using iBAQ (Schwanhäusser et al., 2011). Potential contaminants, reverse decoy sequences and proteins identified by site were removed. Proteins with less than two unique peptides in the R1 and R2 groups were not considered for ulterior analysis. Proteins with less than two unique peptides in the control group and more than

two in both groups R1 and R2 were selected as high-confidence candidates (group R1 and R2 only). An additional group of putative candidates was selected for those proteins with two or more unique peptides in one of the R1 or R2 groups and no unique peptides in the control sample (groups R1 only and R2 only, respectively).

Statistics

In order to compare counts between genotypes, we used the Two-tailed Welch's t-test (unequal variances t-test), which was appropriate as the count data were not highly skewed (i.e., were reasonably approximated by a normal distribution) and in most cases showed unequal variance. We applied a two-sided test in all the cases. Asterisks denote statistical significance: *p-value<0.05, **p-value<0.01, ***p-value<0.001 and ****p-value<0.0001.

Acknowledgements

We thank Dr. Barbero and Dr. Edyta Marcon, for providing antibodies against SYCP3 and RPA, respectively, Dr. Emmanuelle Martini for helpful advice with the DNA binding assay, Dr. Fabien Fauchereau for the genetic analysis of the family and Dr. Alex N Zelensky for helpful discussion. This study was supported by Université Paris Diderot and the Fondation pour la Recherche Médicale (Labelisation Equipes DEQ20150331757, SC, A-LT and RAV). This work was supported by MINECO (BFU2017-89408-R) and by Junta de Castilla y León (CSI239P18). NFM, FSS and LGH are supported by European Social Fund/JCyLe grants (EDU/310/2015, EDU/556/2019 and EDU/1083/2013). YBC is funded by a grant from MINECO (BS-2015-073993). The proteomic analysis was performed in the Proteomics Facility of Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca, Grant PRB3(IPT17/0019 - ISCI-III-SGEFI/ERDF). CIC-IBMCC is supported by the Programa de Apoyo a Planes Estratégicos de Investigación de Estructuras de Investigación de Excelencia cofunded by the Castilla-León autonomous government and the European Regional Development Fund (CLC-2017-01). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Additional information

Funding

Funder	Author
Ministerio de Economía y Competitividad	Alberto M Pendás

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

Natalia Felipe-Medina, Resources, Formal analysis, Supervision, Investigation, Methodology, Writing - review and editing; Sandrine Caburet, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing - original draft, Writing - review and editing; Fernando Sánchez-Sáez, Yazmine B Condezo, Laura Gómez-H, Paloma Duque, Formal analysis, Methodology; Dirk G de Rooij, Anne Laure Todeschini, Formal analysis, Investigation; Rodrigo Garcia-Valiente, Formal analysis; Manuel Adolfo Sánchez-Martin, Resources, Methodology; Stavit A Shalev, Resources; Elena Llano, Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft, Writing - review and editing; Reiner A Veitia, Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Writing - original draft, Writing - review and editing; Alberto M Pendás, Conceptualization, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Writing - original draft, Writing - review and editing

Author ORCIDs

Natalia Felipe-Medina  <https://orcid.org/0000-0001-6975-2524>

Sandrine Caburet  <http://orcid.org/0000-0002-7404-8213>

Rodrigo Garcia-Valiente  <http://orcid.org/0000-0003-0444-5587>

Reiner A Veitia  <https://orcid.org/0000-0002-4100-2681>

Alberto M Pendás  <https://orcid.org/0000-0001-9264-3721>

Ethics

Animal experimentation: All the experiments were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the University of Salamanca (USAL) and the Ethics committee of the Spanish Research Council (CSIC) under protocol #00-245. Accordingly, all the mouse protocols used in this work have been approved by the above mentioned Animal Experimentation committees. Specifically, mice were always housed in a temperature-controlled facility (specific pathogen free, spf) using individually ventilated cages, standard diet and a 12 h light/dark cycle, according to EU law (63/2010/UE) and the Spanish royal law (53/2013) at the "Servicio de Experimentación Animal, SEA. In addition, animal suffering was always minimized and we made every effort to improve animal welfare during the life of the animals.

Decision letter and Author response

Decision letter <https://doi.org/10.7554/eLife.56996.sa1>

Author response <https://doi.org/10.7554/eLife.56996.sa2>

Additional files

Supplementary files

- Source data 1. Raw data for all figures and figure supplements.
- Supplementary file 1. Supplementary data and tables including quantification data. Supplementary file 1a. shows the whole exome sequencing and mapping metrics for the three genomic samples. Supplementary file 1b. shows the numbers of variants from the WES analysis and passing the various filters. Supplementary file 1c. shows the predictions of pathogenicity and conservations by 18 computational predictors. Supplementary files 1d and 1e. show the quantification of the colocalization between HSF2BP, BRME1, RPA1 and DMC1. Supplementary file 1f. shows the comparative alterations between all the mutants. Associated to **Figures 4, 5, 6** and **9**. Supplementary files 1g and 1h. show the putative BRME1 interactors identified by mass spectrometry. Supplementary files 1i and 1j. show respectively the crRNAs and the ssODN employed in the generation of the different mouse models. Supplementary file 1k. shows the primers and expected product sizes for genotyping mouse models. Supplementary file 1l. shows a summary of all the main and supplementary figures and their relationship.
- Transparent reporting form

Data availability

All data generated or analysed during this study are included in the manuscript and supporting files.

References

- Ahmed EA, de Rooij DG. 2009. Staging of mouse seminiferous tubule cross-sections. *Methods in Molecular Biology* **558**:263–277. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-60761-103-5_16, PMID: 19685330
- AlAsiri S, Basit S, Wood-Trageser MA, Yatsenko SA, Jeffries EP, Surti U, Ketterer DM, Afzal S, Ramzan K, Faiyaz-UI Haque M, Jiang H, Trakselis MA, Rajkovic A. 2015. Exome sequencing reveals MCM8 mutation underlies ovarian failure and chromosomal instability. *Journal of Clinical Investigation* **125**:258–262. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI78473>, PMID: 25437880
- 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. *Nature Genetics* **13**:336–342. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng0796-336>, PMID: 8673133
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1002/gene.20085>, PMID: 15515002
- Baudat F, Manova K, Yuen JP, Jasin M, Keeney S. 2000. Chromosome Synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Molecular Cell* **6**:989–998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00098-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00098-8), PMID: 11106739

- Baudat F**, Imai Y, de Massy B. 2013. Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nature Reviews Genetics* **14**:794–806. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg3573>, PMID: 24136506
- Brandtsma I**. 2006. *Balancing Pathways in DNA Double Strand Break Repair*. Erasmus Rotterdam University.
- Brandtsma I**, Sato K, van Rossum-Fikkert SE, van Vliet N, Sleddens E, Reuter M, Odijk H, van den Tempel N, Dekkers DHW, Bezstarosti K, Demmers JAA, Maas A, Lebbink J, Wyman C, Essers J, van Gent DC, Baarends WM, Knipscheer P, Kanaar R, Zelensky AN. 2019. HSF2BP interacts with a conserved domain of BRCA2 and is required for mouse spermatogenesis. *Cell Reports* **27**:3790–3798. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.096>
- Caburet S**, Arboleda VA, Llano E, Overbeek PA, Barbero JL, Oka K, Harrison W, Vaiman D, Ben-Neriah Z, García-Tuñón I, Fellous M, Pendás AM, Veitia RA, Vilain E. 2014. Mutant cohesin in premature ovarian failure. *New England Journal of Medicine* **370**:943–949. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1309635>, PMID: 24597867
- Caburet S**, Heddar A, Dardillac E, Creux H, Lambert M, Messiaen S, Misrahi M. 2019a. A homozygous hypomorphic *BRCA2* variant causes primary ovarian insufficiency without cancer or Fanconi anemia traits. *bioRxiv*. DOI: <https://doi.org/10.1101/751644>
- Caburet S**, Todeschini AL, Petrillo C, Martini E, Farran ND, Legois B, Livera G, Younis JS, Shalev S, Veitia RA. 2019b. A truncating MEIOB mutation responsible for familial primary ovarian insufficiency abolishes its interaction with its partner SPATA22 and their recruitment to DNA double-strand breaks. *EBioMedicine* **42**:524–531. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.075>, PMID: 31000419
- Caburet S**, Heddar A, Dardillac E, Creux H, Lambert M, Messiaen S, Misrahi M. 2020. Homozygous hypomorphic. *Journal of Medical Genetics* **43**:909–912. DOI: <https://doi.org/10.2337/dc19-1843>
- Cahoon CK**, Hawley RS. 2016. Regulating the construction and demolition of the synaptonemal complex. *Nature Structural & Molecular Biology* **23**:369–377. DOI: <https://doi.org/10.1038/nsmb.3208>, PMID: 27142324
- Cahoon CK**, Libuda DE. 2019. Leagues of their own: sexually dimorphic features of meiotic prophase I. *Chromosoma* **131**:199–214. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00412-019-00692-x>
- Carlosama C**, Elzaïat M, Patiño LC, Mateus HE, Veitia RA, Laissue P. 2017. A homozygous donor splice-site mutation in the meiotic gene MSH4 causes primary ovarian insufficiency. *Human Molecular Genetics* **26**:3161–3166. DOI: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx199>, PMID: 28541421
- Cox J**, Mann M. 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology* **26**:1367–1372. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>, PMID: 19029910
- de Rooij DG**, de Boer P. 2003. Specific arrests of spermatogenesis in genetically modified and mutant mice. *Cytogenetic and Genome Research* **103**:267–276. DOI: <https://doi.org/10.1159/000076812>, PMID: 15051947
- de Vries L**, Behar DM, Smirin-Yosef P, Lagovsky I, Tzur S, Basel-Vanagaite L. 2014. Exome sequencing reveals SYCE1 mutation associated with autosomal recessive primary ovarian insufficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **99**:E2129–E2132. DOI: <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1268>, PMID: 25062452
- Fouquet B**, Pawlikowska P, Caburet S, Guigon C, Mäkinen M, Tanner L, Hietala M, Urbanska K, Bellutti L, Legois B, Bessieres B, Gougeon A, Benachi A, Livera G, Rosselli F, Veitia RA, Misrahi M. 2017. A homozygous FANCM mutation underlies a familial case of non-syndromic primary ovarian insufficiency. *eLife* **6**:e30490. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.30490>, PMID: 29231814
- Geisinger A**, Benavente R. 2017. Mutations in genes coding for synaptonemal complex proteins and their impact on human fertility. *Cytogenetic and Genome Research* **150**:77–85. DOI: <https://doi.org/10.1159/000453344>
- Gershoni M**, Pietrokovski S. 2014. Reduced selection and accumulation of deleterious mutations in genes exclusively expressed in men. *Nature Communications* **5**:4438. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms5438>, PMID: 25014762
- Gómez-H L**, Felipe-Medina N, Sánchez-Martín M, Davies OR, Ramos I, García-Tuñón I, de Rooij DG, Dereli I, Tóth A, Barbero JL, Benavente R, Llano E, Pendas AM. 2016. C14ORF39/SIX6OS1 is a constituent of the synaptonemal complex and is essential for mouse fertility. *Nature Communications* **7**:13298. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms13298>, PMID: 27796301
- Gómez-H L**, Felipe-Medina N, Condezo YB, Garcia-Valiente R, Ramos I, Suja JA, Barbero JL, Roig I, Sánchez-Martín M, de Rooij DG, Llano E, Pendas AM. 2019. The PSMA8 subunit of the spermatoproteasome is essential for proper meiotic exit and mouse fertility. *PLOS Genetics* **15**:e1008316. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008316>, PMID: 31437213
- Guo T**, Zhao S, Zhao S, Chen M, Li G, Jiao X, Wang Z, Zhao Y, Qin Y, Gao F, Chen ZJ. 2017. Mutations in MSH5 in primary ovarian insufficiency. *Human Molecular Genetics* **26**:1452–1457. DOI: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx044>, PMID: 28175301
- Halldorsson BV**, Palsson G, Stefansson OA, Jonsson H, Hardarson MT, Eggertsson HP, Gunnarsson B, Oddsson A, Halldorsson GH, Zink F, Gudjonsson SA, Frigge ML, Thorleifsson G, Sigurdsson A, Stacey SN, Sulem P, Masson G, Helgason A, Gudbjartsson DF, Thorsteinsdottir U, et al. 2019. Characterizing mutagenic effects of recombination through a sequence-level genetic map. *Science* **363**:eaau1043. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aau1043>, PMID: 30679340
- Handel MA**, Schimenti JC. 2010. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nature Reviews Genetics* **11**:124–136. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg2723>, PMID: 20051984
- Hassold T**, Hall H, Hunt P. 2007. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Human Molecular Genetics* **16**:R203–R208. DOI: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm243>, PMID: 17911163
- He WB**, Tu CF, Liu Q, Meng LL, Yuan SM, Luo AX, He FS, Shen J, Li W, Du J, Zhong CG, Lu GX, Lin G, Fan LQ, Tan YQ. 2018. DMC1 mutation that causes human non-obstructive azoospermia and premature ovarian

- insufficiency identified by whole-exome sequencing. *Journal of Medical Genetics* **55**:198–204. DOI: <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104992>, PMID: 29331980
- 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. *The EMBO Journal* **30**:3091–3105. DOI: <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.222>, PMID: 21743440
- Hunt PA, Hassold TJ. 2002. Sex matters in meiosis. *Science* **296**:2181–2183. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1071907>, PMID: 12077403
- Hunter N. 2015. Meiotic recombination: the essence of heredity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **12**:a016618. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016618>
- Isaksson R, Tiitinen A. 2004. Present concept of unexplained infertility. *Gynecological Endocrinology* **18**:278–290. DOI: <https://doi.org/10.1080/0951359042000199878>, PMID: 15346664
- Lake CM, Hawley RS. 2013. RNF212 marks the spot. *Nature Genetics* **45**:228–229. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.2559>, PMID: 23438588
- Loidl J. 2016. Conservation and variability of meiosis across the eukaryotes. *Annual Review of Genetics* **50**:293–316. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035100>, PMID: 27686280
- Loregian A, Appleton BA, Hogle JM, Coen DM. 2004. Specific residues in the connector loop of the human Cytomegalovirus DNA polymerase accessory protein UL44 are crucial for interaction with the UL54 catalytic subunit. *Journal of Virology* **78**:9084–9092. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.78.17.9084-9092.2004>, PMID: 15308704
- Malhas A, Goulbourne C, Vaux DJ. 2011. The nucleoplasmic reticulum: form and function. *Trends in Cell Biology* **21**:362–373. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.03.008>, PMID: 21514163
- Martinez JS, von Nicolai C, Kim T, Ehlén Å, Mazin AV, Kowalczykowski SC, Carreira A. 2016. BRCA2 regulates DMC1-mediated recombination through the BRC repeats. *PNAS* **113**:3515–3520. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1601691113>, PMID: 26976601
- Matzuk MM, Lamb DJ. 2008. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature Medicine* **14**:1197–1213. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.f.1895>, PMID: 18989307
- Melton DA, Krieg PA, Rebagliati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR. 1984. Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Research* **12**:7035–7056. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/12.18.7035>, PMID: 6091052
- Primary Ovarian Insufficiency Collaboration, Wang J, Zhang W, Jiang H, Wu BL. 2014. Mutations in *HFM1* in recessive primary ovarian insufficiency. *The New England Journal of Medicine* **370**:972–974. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMc1310150>, PMID: 24597873
- Qiao H, Prasada Rao HB, Yang Y, Fong JH, Cloutier JM, Deacon DC, Nagel KE, Swartz RK, Strong E, Holloway JK, Cohen PE, Schimenti J, Ward J, Hunter N. 2014. Antagonistic roles of ubiquitin ligase HEI10 and SUMO ligase RNF212 regulate meiotic recombination. *Nature Genetics* **46**:194–199. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.2858>, PMID: 24390283
- Reynolds A, Qiao H, Yang Y, Chen JK, Jackson N, Biswas K, Holloway JK, Baudat F, de Massy B, Wang J, Höög C, Cohen PE, Hunter N. 2013. RNF212 is a dosage-sensitive regulator of crossing-over during mammalian meiosis. *Nature Genetics* **45**:269–278. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.2541>, PMID: 23396135
- Rossetti R, Ferrari I, Bonomi M, Persani L. 2017. Genetics of primary ovarian insufficiency. *Clinical Genetics* **91**:183–198. DOI: <https://doi.org/10.1111/cge.12921>, PMID: 27861765
- Schimenti JC, Handel MA. 2018. Unpackaging the genetics of mammalian fertility: strategies to identify the "reproductive genome". *Biology of Reproduction* **99**:1119–1128. DOI: <https://doi.org/10.1093/biolre/i0y133>, PMID: 29878059
- Schürmann A, Koling S, Jacobs S, Saftig P, Krauss S, Wennemuth G, Kluge R, Joost HG. 2002. Reduced sperm count and normal fertility in male mice with targeted disruption of the ADP-ribosylation factor-like 4 (*Arl4*) gene. *Molecular and Cellular Biology* **22**:2761–2768. DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.22.8.2761-2768.2002>, PMID: 11909968
- Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. 2011. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**:337–342. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature10098>, PMID: 21593866
- Shang Y, Huang T, Liu H, Liu Y, Liang H, Yu X, Li M, Zhai B, Yang X, Wei Y, Wang G, Chen Z, Wang S, Zhang L. 2020. MEIOK21: a new component of meiotic recombination bridges required for spermatogenesis. *Nucleic Acids Research* **48**:6624–6639. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa406>, PMID: 32463460
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.00888>, PMID: 14660434
- Shi B, Xue J, Yin H, Guo R, Luo M, Ye L, Shi Q, Huang X, Liu M, Sha J, Wang PJ. 2019. Dual functions for the ssDNA-binding protein RPA in meiotic recombination. *PLoS Genetics* **15**:e1007952. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007952>, PMID: 30716097
- Siaud N, Barbera MA, Egashira A, Lam I, Christ N, Schlacher K, Xia B, Jasin M. 2011. Plasticity of BRCA2 function in homologous recombination: genetic interactions of the PALB2 and DNA binding domains. *PLoS Genetics* **7**:e1002409. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002409>, PMID: 22194698
- Singh P, Schimenti JC, Bolcun-Filas E. 2015. A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications. *Genetics* **199**:1–15. DOI: <https://doi.org/10.1534/genetics.114.169771>, PMID: 25271304

- Souquet B**, Abby E, Hervé R, Finsterbusch F, Tourpin S, Le Bouffant R, Duquenne C, Messiaen S, Martini E, Bernardino-Sgheri J, Toth A, Habert R, Livera G. 2013. MEIOB targets single-strand DNA and is necessary for meiotic recombination. *PLOS Genetics* **9**:e1003784. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003784>, PMID: 24068956
- Takemoto K**, Tani N, Takada-Horisawa Y, Fujimura S, Tanno N, Yamane M, Okamura K, Sugimoto M, Araki K, Ishiguro KI. 2020. Meiosis-Specific C19orf57/4930432K21Rik/BRME1 modulates localization of RAD51 and DMC1 to DSBs in mouse meiotic recombination. *Cell Reports* **31**:107686. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107686>, PMID: 32460033
- Tenenbaum-Rakover Y**, Weinberg-Shukron A, Renbaum P, Lobel O, Eideh H, Gulsuner S, Dahary D, Abu-Rayyan A, Kanaan M, Levy-Lahad E, Bercovich D, Zangen D. 2015. Minichromosome maintenance complex component 8 (MCM8) gene mutations result in primary gonadal failure. *Journal of Medical Genetics* **52**:391–399. DOI: <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102921>, PMID: 25873734
- Tucker EJ**, Grover SR, Robevska G, van den Bergen J, Hanna C, Sinclair AH. 2018. Identification of variants in pleiotropic genes causing "isolated" premature ovarian insufficiency: implications for medical practice. *European Journal of Human Genetics* **26**:1319–1328. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0140-4>, PMID: 29706645
- Veitia RA**. 2003. A sigmoidal transcriptional response: cooperativity, synergy and dosage effects. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **78**:149–170. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1464793102006036>, PMID: 12620064
- Wang S**, Hassold T, Hunt P, White MA, Zickler D, Kleckner N, Zhang L. 2017. Inefficient crossover maturation underlies elevated aneuploidy in human female meiosis. *Cell* **168**:977–989. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.002>, PMID: 28262352
- Webster A**, Schuh M. 2017. Mechanisms of aneuploidy in human eggs. *Trends in Cell Biology* **27**:55–68. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.09.002>, PMID: 27773484
- Wood-Trageser MA**, Gurbuz F, Yatsenko SA, Jeffries EP, Kotan LD, Surti U, Ketterer DM, Matic J, Chipkin J, Jiang H, Trakselis MA, Topaloglu AK, Rajkovic A. 2014. MCM9 mutations are associated with ovarian failure, short stature, and chromosomal instability. *The American Journal of Human Genetics* **95**:754–762. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.11.002>, PMID: 25480036
- Yoshima T**, Yura T, Yanagi H. 1998. Novel testis-specific protein that interacts with heat shock factor 2. *Gene* **214**:139–146. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00208-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00208-X), PMID: 9651507
- Zangen D**, Kaufman Y, Zeligson S, Perlberg S, Fridman H, Kanaan M, Abdulhadi-Atwan M, Abu Libdeh A, Gussow A, Kisslov I, Carmel L, Renbaum P, Levy-Lahad E. 2011. XX ovarian dysgenesis is caused by a PSMC3IP/HOP2 mutation that abolishes coactivation of estrogen-driven transcription. *The American Journal of Human Genetics* **89**:572–579. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.09.006>, PMID: 21963259
- Zhang J**, Fujiwara Y, Yamamoto S, Shibuya H. 2019. A meiosis-specific BRCA2 binding protein recruits recombinases to DNA double-strand breaks to ensure homologous recombination. *Nature Communications* **10**:722. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08676-2>, PMID: 30760716
- Zhang J**, Gurusaran M, Fujiwara Y, Zhang K, Echbarthi M, Vorontsov E, Guo R, Pendlebury DF, Alam I, Livera G, Emmanuelle M, Wang PJ, Nandakumar J, Davies OR, Shibuya H. 2020. The BRCA2-MEILB2-BRME1 complex governs meiotic recombination and impairs the mitotic BRCA2-RAD51 function in Cancer cells. *Nature Communications* **11**:2055. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15954-x>, PMID: 32345962
- Zhao W**, Vaithiyalingam S, San Filippo J, Maranon DG, Jimenez-Sainz J, Fontenay GV, Kwon Y, Leung SG, Lu L, Jensen RB, Chazin WJ, Wiese C, Sung P. 2015. Promotion of BRCA2-Dependent homologous recombination by DSS1 via RPA targeting and DNA mimicry. *Molecular Cell* **59**:176–187. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.032>, PMID: 26145171
- Zickler D**, Kleckner N. 2015. Recombination, pairing, and Synapsis of homologs during meiosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **7**:a016626. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016626>, PMID: 25986558

Appendix 1

Key resources table

Appendix 1—key resources table

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Genetic reagent (<i>M. musculus</i>)	<i>Hsf2bp</i> ^{-/-}	This paper		Materials and methods section Figure 2—figure supplement 1 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Genetic reagent (<i>M. musculus</i>)	<i>Hsf2bp</i> ^{S167L/S167L}	This paper		Materials and methods section Figure 2—figure supplement 1 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Genetic reagent (<i>M. musculus</i>)	<i>Brme1</i> ^{-/-}	This paper		Materials and methods section Figure 8—figure supplement 1 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Genetic reagent (<i>M. musculus</i>)	<i>Brme1</i> ^{Δ142-472/Δ142-472}	This paper		Materials and methods section Figure 7—figure supplement 1 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Genetic reagent (<i>M. musculus</i>)	<i>Rnf212</i> ^{-/-}	This paper		Materials and methods section Figure 7—figure supplement 5 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Genetic reagent (<i>M. musculus</i>)	<i>Hei10</i> ^{-/-}	This paper		Materials and methods section Figure 7—figure supplement 5 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Genetic reagent (<i>M. musculus</i>)	<i>Spo11</i> ^{-/-}	This paper		Materials and methods section Figure 7—figure supplement 6 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Genetic reagent (<i>M. musculus</i>)	<i>Psmα8</i> ^{-/-}	PMID:31437213		
Genetic reagent (<i>M. musculus</i>)	<i>Six6os1</i> ^{-/-}	PMID:27796301		
Genetic reagent (<i>M. musculus</i>)	<i>Rec8</i> ^{-/-}	PMID:15515002		Dr. John C. Schimenti (Cornell university)
Cell line (<i>H. sapiens</i>)	U2OS	ATCC	HTB-96	

Continued on next page

Appendix 1—key resources table continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Cell line (<i>H. sapiens</i>)	HEK293T	ATCC	CRL-11268	
Recombinant DNA reagent	pEGFP-C1	Clontech	Catalog: 6084-1	
Recombinant DNA reagent	pcDNA3	Invitrogen	A-150228	
Recombinant DNA reagent	pcDNA3-2xFlag	This paper Generated from pcDNA3		Materials and methods section Figure 6—figure supplement 2 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Recombinant DNA reagent	pEGFP-C1 HSF2BP	This paper		Materials and methods section Figure 7 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Recombinant DNA reagent	pcDNA3 2xFlag HSF2BP	This paper		Materials and methods section Figure 7 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Recombinant DNA reagent	pcDNA3 2xFlag HSF2BP-S167L	This paper		Materials and methods section Figure 7 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Recombinant DNA reagent	pcDNA3 2xHA HSF2BP	This paper		Materials and methods section Figure 10—figure supplement 1 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Recombinant DNA reagent	pEGFP-C1 BRME1	This paper		Materials and methods section Figure 10—figure supplement 1 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Recombinant DNA reagent	pcDNA3 2xFlag BRME1	This paper		Materials and methods section Figure 10—figure supplement 1 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Recombinant DNA reagent	pcDNA3 2xFlag BRME1Δ142–472	This paper		Materials and methods section Figure 7 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)

Continued on next page

Appendix 1—key resources table continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Recombinant DNA reagent	pEGFP-C1 HSF2BP	This paper		Materials and methods section Figure 10 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Recombinant DNA reagent	pEGFP-C1 HSF2BP-S167L	This paper		Materials and methods section Figure 10 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Recombinant DNA reagent	pEGFP-C1 BRCA2-C	This paper		Materials and methods section Figure 6—figure supplement 2 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Recombinant DNA reagent	pcDNA3 2xFlag BRCA2-C	This paper		Materials and methods section Figure 10 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Recombinant DNA reagent	pcDNA3 2xFlag BRCA2-M	This paper		Materials and methods section Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Recombinant DNA reagent	pcDNA3 2xFlag BRCA2-N	This paper		Materials and methods section Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Recombinant DNA reagent	pcDNA3 2xFlag RPA1	This paper		Materials and methods section Figure 10—figure supplement 1 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Recombinant DNA reagent	pcDNA3 2xFlag RAD51	This paper		Materials and methods section Figure 10—figure supplement 1 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Recombinant DNA reagent	pEGFP-C1 PALB2	This paper		Materials and methods section Figure 10—figure supplement 1 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Recombinant DNA reagent	pcDNA 2xHA PALB2	This paper		Materials and methods section Figure 10—figure supplement 1 Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)

Continued on next page

Appendix 1—key resources table continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Antibody	Anti-HSF2BP-R2 (rabbit polyclonal)	This paper (Proteintech™)		Materials and methods section IF (1:30) WB (1:2000) Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Antibody	Anti-BRME1-R1 (rabbit polyclonal)	This paper (Proteintech™)		Materials and methods section WB (1:3000) Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Antibody	Anti-BRME1-R2 (rabbit polyclonal)	This paper (Proteintech™)		Materials and methods section IF (1:100) Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Antibody	Anti-DMC1 (rabbit polyclonal)	This paper (Proteintech™)		Materials and methods section IF (1:500) Available from the authors upon request Dr. Alberto M. Pendás (amp@usal.es)
Antibody	Anti-SYCP3 (mouse monoclonal)	Santa cruz	sc-74569	IF (1:100)
Antibody	Anti-SYCP3 (rabbit polyclonal)	PMID:27796301	K921	Dr. José Luis Barbero (Centro de Investigaciones Biológicas) IF (1:60)
Antibody	Anti-SYCP1 (rabbit polyclonal)	Abcam	ab15090	IF (1:200)
Antibody	anti-γH2AX (ser139) (rabbit polyclonal)	Millipore	#07–164	IF (1:500)
Antibody	Anti-MLH1 (mouse monoclonal)	BD Biosciences	51-1327GR	IF (1:20)
Antibody	Anti-CDK2 (mouse monoclonal)	Santa Cruz	sc-6248	IF (1:20)
Antibody	αRAD51 (rabbit polyclonal)	Calbiochem	PC130	IF (1:50)
Antibody	αRPA1 serum (rabbit polyclonal)		“Molly”	Dr. Edyta Marcon (Medical Research University of Toronto) IF (1:30)
Antibody	αRPA2 (rat monoclonal)	Cell Signalling	2208S	IF (1:100) WB (1:1000)
Antibody	Anti-SPATA22 (rabbit polyclonal)	Proteintech Europe	16989–1-AP	IF (1:60)
Antibody	Anti-Flag (mouse monoclonal)	Sigma-Aldrich	F1804	IF (1:100) IP (5 μg)
Antibody	Anti-GFP (mouse monoclonal)	Cusabio	CSB-MA000051M0m	IP (5 μg)
Antibody	Anti-HA (mouse monoclonal)	BioLegend	MMS-101P	IP (5 μg)

Continued on next page

Appendix 1—key resources table continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Antibody	Mouse IgGs (mouse polyclonal)	Jackson Immunoresearch	015-000-003	IP (5 µg)
Antibody	Anti-Flag (rabbit polyclonal)	Sigma-Aldrich	F7425	WB (1:2000)
Antibody	Anti-GFP (goat polyclonal)	Santa Cruz	sc-5385	WB (1:3000)
Antibody	Anti-GFP (rabbit polyclonal)	Life technologies	A-11122	WB (1:3000)
Antibody	Anti-HA (rabbit polyclonal)	Sigma-Aldrich	H6908	WB (1:3000)
Antibody	Goat α -mouse Alexa555 (goat polyclonal)	ThermoFisher	A-32727	IF (1:200)
Antibody	Goat α -mouse Alexa488 (goat polyclonal)	ThermoFisher	A-11001	IF (1:200)
Antibody	Donkey α -rabbit Alexa555 (donkey polyclonal)	ThermoFisher	A-31572	IF (1:200)
Antibody	Goat α -rabbit Alexa488 (goat polyclonal)	ThermoFisher	A-32731	IF (1:200)
Antibody	Goat α -rabbit Alexa488 Fab (goat polyclonal)	Jackson Immunoresearch	111-547-003	IF (1:100)
Antibody	Goat α -mouse AMCA (goat polyclonal)	Jackson Immunoresearch	115-155-146	IF (1:100)
Antibody	Donkey α -rabbit AMCA (donkey polyclonal)	Jackson Immunoresearch	711-155-152	IF (1:100)
Antibody	Goat α -rat Alexa488 (goat polyclonal)	ThermoFisher	A-11006	IF (1:200)
Antibody	Secondary horseradish peroxidase-conjugated α -mouse (donkey polyclonal)	Jackson Immunoresearch	715-035-150	WB (1:5000)
Antibody	Secondary horseradish peroxidase-conjugated α -rabbit (donkey polyclonal)	Jackson Immunoresearch	711-035-152	WB (1:5000)
Antibody	Secondary horseradish peroxidase-conjugated α -goat (donkey polyclonal)	Jackson Immunoresearch	705-035-147	WB (1:5000)
Antibody	Secondary horseradish peroxidase-conjugated α -rat (donkey polyclonal)	Jackson Immunoresearch	712-035-150	WB (1:5000)

Continued on next page

Appendix 1—key resources table continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Antibody	Secondary DyLight™ 680 conjugated α -mouse (goat polyclonal)	Thermo Scientific	35518	WB (1:10000)
Antibody	Secondary DyLight™ 800 conjugated α -rabbit (goat polyclonal)	Thermo Scientific	35571	WB (1:10000)
Sequence-based reagent	sgRNA1 <i>Hsf2bp</i>	This paper (IDT)	CRISPR-Cas9 crRNA	Materials and methods section Supplementary file 1i Figure 2—figure supplement 1 5'-TCACAAAACCTCCATCGTC-3'
Sequence-based reagent	sgRNA2 <i>Hsf2bp</i>	This paper (IDT)	CRISPR-Cas9 crRNA	Materials and methods section Supplementary file 1i Figure 2—figure supplement 1 5'-ATTGGATGGGGATGTCAAGG-3'
Sequence-based reagent	sgRNA3 <i>Brme1</i>	This paper (IDT)	CRISPR-Cas9 crRNA	Materials and methods section Supplementary file 1i Figure 7—figure supplement 1 5'-AACCTCAGGGACTCTCTCTG-3'
Sequence-based reagent	sgRNA4 <i>Brme1</i>	This paper (IDT)	CRISPR-Cas9 crRNA	Materials and methods section Supplementary file 1i Figure 7—figure supplement 1 5'-GAAGTCTAGTTCATTGCTG-3'
Sequence-based reagent	sgRNA5 <i>Spo11</i>	This paper (IDT)	CRISPR-Cas9 crRNA	Materials and methods section Supplementary file 1i Figure 7—figure supplement 6 5'-TATGTCTCTATGCAGATGCA-3'
Sequence-based reagent	sgRNA6 <i>Spo11</i>	This paper (IDT)	CRISPR-Cas9 crRNA	Materials and methods section Supplementary file 1i Figure 7—figure supplement 6 5'-ACACTGACAGCCAGCTCTTT-3'
Sequence-based reagent	sgRNA7 <i>Rnf212</i>	This paper (IDT)	CRISPR-Cas9 crRNA	Materials and methods section Supplementary file 1i Figure 7—figure supplement 5 5'-ACCCACGTGAGACTCGCGCG-3'
Sequence-based reagent	sgRNA8 <i>Rnf212</i>	This paper (IDT)	CRISPR-Cas9 crRNA	Materials and methods section Supplementary file 1i Figure 7—figure supplement 5 5'-CCTCAAAGGTCCGCGTATTC-3'
Sequence-based reagent	sgRNA9 <i>Hei10</i>	This paper (IDT)	CRISPR-Cas9 crRNA	Materials and methods section Supplementary file 1i Figure 7—figure supplement 5 5'-GAAAGGGTACTGTTGCAAGC-3'

Continued on next page

Appendix 1—key resources table continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Sequence-based reagent	ssODN <i>Hsf2bp</i> ^{S167L/S167L}	This paper (IDT)		Materials and methods section Supplementary file 1j Figure 2—figure supplement 1 5'CTTTGGAAAGATGTGACAG TTCTATCTTTTTATCTTTCA GGACAAAGCATTGAAGTTTT TCAACATAACTGGACAGACGA TGGAGAGTTTTGTGAAGTTA TTGGATGGGGATGTCAAGGAAG TTGATTCTGATGAAAATCAATTTGTC TTTGCCTGGCTGGAATTGTAAC AAGTAGGTAACTTTT CAGATACAGCGCT3'
Sequence-based reagent	ssODN <i>Brme1</i> ^{Δ142-472 /Δ142-472}	This paper (IDT)		Materials and methods section Supplementary file 1j Figure 7—figure supplement 1 5'CTTCAGAGTGCTTGCTTAT TGAAGGCCAGGACTGAATCT TCTTTTCCACAGGAAACAA GGCCAGAGCTGGGAGCCCTC AAAGCAGCCAGCCAGCCACA GGCAATGGAAGTACTGACTTCC TGCCTGACAGCCAGATACAG GATGCCCTGGATGCCACTAA CATGGAGCAGGTAAGAGCT TTCTGTACTCAAATGTACACCC3'
Sequence-based reagent	ssODN <i>Spo11</i> ^{-/-}	This paper (IDT)		Materials and methods section Supplementary file 1j Figure 7—figure supplement 6 5'GTTTCCTGCGGTATGTGT TCTCTGCCGTGGTCTGTGTT TGTCACCGTCCAGGAGCAA TGCTCATTCTGTGTTGAGCT TGCATCTGCATAGAGACAT ATTCTTCACTGACAGCCAGCT CTTTGGCAACCAGGCTGCG GTGGACAGCGCCATCGATG ACATTTCTGTATGCTGA AAGTGCCCAGGAGGAG TCTGCACGTGG-3'
Sequence-based reagent	HSF2BP-F1	This paper	PCR primer	Materials and methods section Supplementary file 1j Figure 2—figure supplement 1 5'- TTCTTTGGAAAGATGTGACAGTTC- 3'
Sequence-based reagent	HSF2BP-R1	This paper	PCR primer	Materials and methods section Supplementary file 1j Figure 2—figure supplement 1 5'- ACCTGGGTTTCTTTAGATCAGTTA- 3'
Sequence-based reagent	BRME1- F2	This paper	PCR primer	Materials and methods section Supplementary file 1j Figure 7—figure supplement 1 5'-GAAAGTTCTTCAGAGTGCTTGCT- 3'

Continued on next page

Appendix 1—key resources table continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Sequence-based reagent	BRME1- R2	This paper	PCR primer	Materials and methods section Supplementary file 1j Figure 7—figure supplement 1 5'-AGCCCTATCTTGTCACCTAAAG-3'
Sequence-based reagent	BRME1- F3	This paper	PCR primer	Materials and methods section Supplementary file 1j Figure 7—figure supplement 1 5'-CCCAGCAGATGCCTCTTTAT-3'
Sequence-based reagent	BRME1- R3	This paper	PCR primer	Materials and methods section Supplementary file 1j Figure 7—figure supplement 1 5'-CTCAGCAGAGTTCCAATGCAG-3'
Sequence-based reagent	SPO11-F4	This paper	PCR primer	Materials and methods section Supplementary file 1j Figure 7—figure supplement 6 5'- AGAGCCCCCAGTGCTCTTAAC-3'
Sequence-based reagent	SPO11-R4	This paper	PCR primer	Materials and methods section Supplementary file 1j Figure 7—figure supplement 6 5'- GGCAGACCCCTCTACCTCTGT-3'
Sequence-based reagent	RNF212-F5	This paper	PCR primer	Materials and methods section Supplementary file 1j Figure 7—figure supplement 5 5'- TTTCTTTGCCCTCCGTACTIONTTGG-3'
Sequence-based reagent	RNF212-R5	This paper	PCR primer	Materials and methods section Supplementary file 1j Figure 7—figure supplement 5 5'- CCCAGGCTTTACTTCAACAACAA-3'
Sequence-based reagent	HEI10-F6	This paper	PCR primer	Materials and methods section Supplementary file 1j Figure 7—figure supplement 5 5'- CTGCCTGTCTCACATCTTC-3'
Sequence-based reagent	HEI10-R6	This paper	PCR primer	Materials and methods section Supplementary file 1j Figure 7—figure supplement 5 5'- AGCTTTCCAGAAAGGGTACTG-3'
Sequence-based reagent	ss60-mer F	PMID:24068956	DNA Binding assay primer	Materials and methods section Figure 7—figure supplement 4 5'-GAT CTG CACGACGC ACACCGGACGTATCTGCTATC GCTCATGTCAACCGCT CAAGCTGC/3'BiotinTEG/
Sequence-based reagent	ss60-mer R	PMID:24068956	DNA Binding assay primer	Materials and methods section Figure 7—figure supplement 4 5'- GCAGCTTGAGCGTTGACAT GAGCGATAGCAGATACGTCCG GTGTGCGTCGTGCAGATC-3'

Continued on next page

Appendix 1—key resources table continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Sequence-based reagent	HSF2BP-EX6F	This Paper	Sanger sequencing primer	Material and methods section Figure 1—figure supplement 1 5'-CTAGAATCTTCTGTATCCTGCA-3'
Sequence-based reagent	HSF2BP-EX6R2	This Paper	Sanger sequencing primer	Material and methods section Figure 1—figure supplement 1 5'-GGTCTGGAAGCAAACAGGCAA-3'
Commercial assay or kit	TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate Systems	Promega	L4610	Figure 7—figure supplement 4
Commercial assay or kit	In Situ Cell Death Detection Kit	Roche	11684795910	Figure 2
Commercial assay or kit	Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System	Clontech	630489	Materials and methods section
Commercial assay or kit	Mouse testis Mate and Plate cDNA library	Clontech	638852	Materials and methods section
Commercial assay or kit	Jetpei	PolyPlus	101-40N	Materials and methods section
Commercial assay or kit	GammaBind G Sepharose	GE Healthcare	17-0885-02	Materials and methods section
Commercial assay or kit	Dynabeads M-280 Streptavidin	Thermo Fisher	11205D	Materials and methods section Figure 7—figure supplement 4
Chemical compound, drug	MG132	Sigma-Aldrich PMDI: 28059716	M8699	Figure 10
Other	DAPI stain	Invitrogen	D1306	Materials and methods section
Other	Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories	H1000	Materials and methods section
Other	ProLong Gold antifade reagent	Invitrogen	P10144	Materials and methods section

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

A Human Hereditary Cardiomyopathy Shares a Genetic Substrate With Bicuspid Aortic Valve

Marcos Sigüero-Álvarez¹, PhD; Alejandro Salguero-Jiménez², PhD; Joaquim Grego-Bessa³, PhD; Jorge de la Barrera⁴, MSc; Donal MacGrogan⁵, PhD; Belén Prados⁶, PhD; Fernando Sánchez-Sáez⁷, MSc; Rebeca Piñeiro-Sabarís⁸, MSc; Natalia Felipe-Medina⁹, PhD; Carlos Torroja¹⁰, PhD; Manuel José Gómez¹¹, PhD; María Sabater-Molina¹², PhD; Rubén Escribá¹³, PhD; Ivonne Richaud-Patin¹⁴, PhD; Olalla Iglesias-García¹⁵, PhD; Mauro Sbroglio¹⁶, PhD; Sergio Callejas¹⁷, PhD; Declan P. O'Regan¹⁸, MD, PhD; Kathryn A. McGurk¹⁹, PhD; Ana Dopazo²⁰, PhD; Giovanna Giovinazzo²¹, PhD; Borja Ibañez²², MD, PhD; Lorenzo Monserrat²³, MD, PhD; José María Pérez-Pomares²⁴, PhD; Fátima Sánchez-Cabo²⁵, PhD; Alberto M. Pendas²⁶, PhD; Angel Raya²⁷, PhD; Juan R. Gimeno-Blanes²⁸, MD, PhD; José Luis de la Pompa²⁹, PhD

BACKGROUND: The complex genetics underlying human cardiac disease is evidenced by its heterogenous manifestation, multigenic basis, and sporadic occurrence. These features have hampered disease modeling and mechanistic understanding. Here, we show that 2 structural cardiac diseases, left ventricular noncompaction (LVNC) and bicuspid aortic valve, can be caused by a set of inherited heterozygous gene mutations affecting the NOTCH ligand regulator MIB1 (MINDBOMB1) and cosegregating genes.

METHODS: We used CRISPR-Cas9 gene editing to generate mice harboring a nonsense or a missense *MIB1* mutation that are both found in LVNC families. We also generated mice separately carrying these *MIB1* mutations plus 5 additional cosegregating variants in the *ASXL3*, *APCDD1*, *TMX3*, *CEP192*, and *BCL7A* genes identified in these LVNC families by whole exome sequencing. Histological, developmental, and functional analyses of these mouse models were carried out by echocardiography and cardiac magnetic resonance imaging, together with gene expression profiling by RNA sequencing of both selected engineered mouse models and human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Potential biochemical interactions were assayed in vitro by coimmunoprecipitation and Western blot.

RESULTS: Mice homozygous for the *MIB1* nonsense mutation did not survive, and the mutation caused LVNC only in heteroallelic combination with a conditional allele inactivated in the myocardium. The heterozygous *MIB1* missense allele leads to bicuspid aortic valve in a NOTCH-sensitized genetic background. These data suggest that development of LVNC is influenced by genetic modifiers present in affected families, whereas valve defects are highly sensitive to NOTCH haploinsufficiency. Whole exome sequencing of LVNC families revealed single-nucleotide gene variants of *ASXL3*, *APCDD1*, *TMX3*, *CEP192*, and *BCL7A* cosegregating with the *MIB1* mutations and LVNC. In experiments with mice harboring the orthologous variants on the corresponding *Mib1* backgrounds, triple heterozygous *Mib1 Apcdd1 Asx3* mice showed LVNC, whereas quadruple heterozygous *Mib1 Cep192 Tmx3;Bcl7a* mice developed bicuspid aortic valve and other valve-associated defects. Biochemical analysis suggested interactions between CEP192, BCL7A, and NOTCH. Gene expression profiling of mutant mouse hearts and human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes revealed increased cardiomyocyte proliferation and defective morphological and metabolic maturation.

CONCLUSIONS: These findings reveal a shared genetic substrate underlying LVNC and bicuspid aortic valve in which MIB1-NOTCH variants plays a crucial role in heterozygous combination with cosegregating genetic modifiers.

Key Words: bicuspid aortic valve ■ cardiomyopathy ■ genetic modifiers ■ left ventricular non compaction ■ MIB1 ■ NOTCH ■ valves

Correspondence to: José Luis de la Pompa, PhD, Intercellular Signaling in Cardiovascular Development & Disease Laboratory, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Melchor Fernández Almagro 3, 28029 Madrid, Spain. Email jlpompa@cnic.es

Supplemental Material is available at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.058767>.

For Sources of Funding and Disclosures, see page 62–63.

© 2022 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at www.ahajournals.org/journal/circ

Clinical Perspective

What Is New?

- Heterozygous mutations in the NOTCH regulator *MIB1* lead to human left ventricular noncompaction (LVNC), but cause LVNC or bicuspid aortic valve (BAV) in a NOTCH-sensitized mouse genetic background.
- Whole exome sequencing of LVNC families has identified heterozygous missense mutations in 5 genes, cosegregating with *MIB1* and LVNC. The corresponding mouse models show LVNC or BAV in a NOTCH-sensitized genetic background.
- Gene profiling shows increased cardiomyocyte proliferation and defective morphological and metabolic maturation in mouse hearts and human induced pluripotent stem cell–derived cardiomyocytes. Biochemistry suggests a direct interaction between NOTCH and some of the identified gene products.
- These data support a shared genetic basis for LVNC and BAV with *MIB1*-NOTCH playing a crucial role.

What Are the Clinical Implications?

- Novel insights into the genetic basis and oligogenic nature of LVNC.
- Identification of heterozygous mutations leading to LVNC (*MIB1 ASXL3 APCDD1*) or BAV (*MIB1 CEP192 TMX3; BCL7A*) may allow expansion of the genetic testing panel repertoire for better diagnosis and stratification of patients with LVNC and BAV.
- Whether patients with LVNC have a higher prevalence of BAV remains uncertain, and further evaluation is required.

The genetic basis of cardiovascular disease is poorly understood, and it is only with the advent of new high-throughput DNA sequencing techniques that a picture has begun to emerge of its complexity and the difficulty of establishing direct genotype-phenotype correlations. Cardiomyopathies were initially thought to be monogenic disorders; however, phenotypic expressivity and penetrance have been found to be affected by variable presentation within a family with the same mutation,¹ the influence of multiple genetic variants and their epistatic relationships, and epigenetic and environmental factors.^{2,3}

Left ventricular noncompaction (LVNC) is the third most common cardiomyopathy (prevalence, 0.05%⁴) and is characterized by the presence of excessive trabeculae with deep recesses in the left ventricle.^{5,6} Trabeculae are endocardial cell–covered cardiomyocyte bundles in the vertebrate ventricle that facilitate oxygen and nutrient exchange.⁷ As development proceeds, the outer compact myocardium layer expands by proliferation, contributing to the integration of trabeculae in the ventricular wall

Nonstandard Abbreviations and Acronyms

APCDD1	APC down-regulated 1
ASXL3	ASXL transcriptional regulator 3
BAV	bicuspid aortic valve
BCL7A	BAF chromatin remodeling complex subunit BCL7A
CEP192	centrosomal protein 192
co-IP	coimmunoprecipitation
CT	C-terminal fragment
E	embryonic day
EMT	EPITHELIAL_TO_MESENCHYMAL_TRANSITION
GATK	Genome Analysis Toolkit
GERP	genomic evolutionary rate profiling
hiPSC	human induced pluripotent stem cell
hiPSC-CM	human induced pluripotent stem cell–derived cardiomyocyte
iPSC	induced pluripotent stem cell
LVNC	left ventricular noncompaction
MIB1	MIB E3 ubiquitin protein ligase 1
N1ICD	NOTCH1 intracellular domain
NOTCH1	NOTCH receptor 1
PCR	polymerase chain reaction
RNA-seq	RNA sequencing
RBPI	recombining binding protein suppressor of hairless
SNP	single nucleotide polymorphism
ssODN	single-stranded donor oligonucleotides
TMX3	thioredoxin related transmembrane protein 3
Tnnt2	cardiac troponin T
WB	Western blot
WES	whole exome sequencing

through the poorly understood process of compaction,^{8,9} which coincides with the invasion of the myocardium by the coronary vasculature.^{8,10} Familial LVNC has been attributed to defective ventricular maturation and compaction in utero^{5,11} and is characterized by a dilated left ventricle and associated systolic dysfunction.⁵ In addition, zones of fibrotic tissue related to disease severity might be dispersed on the endocardial surfaces.¹² One of the echocardiographic diagnosis criteria for LVNC is a ratio of noncompacted to compacted myocardium of ≥ 2 at end-systole.^{13,14} Clinical presentation of LVNC ranges from asymptomatic cases to severe heart failure requiring heart transplantation.^{15–17}

LVNC is genetically heterogeneous, with a predominantly autosomal-dominant inheritance pattern,¹⁸ and has been linked to sarcomere gene mutations, particularly in *MYH7*.^{19,20} Other mutations implicated in LVNC affect genes encoding the scaffold protein α -dystrobrevin and

the nuclear protein lamin A/C.^{21,22} The proposed developmental origin of LVNC has prompted suggestions of the involvement of genetic alterations of the signals and transcription factors that regulate cardiovascular development.^{23–25} A key mediator of cell fate specification and tissue patterning in metazoans is the highly conserved signaling pathway NOTCH,^{26,27} and NOTCH signaling disruption in humans leads to developmental abnormalities affecting the heart and vessels.^{28–31} Studies in targeted mutant mice have shown that NOTCH is crucial for the endocardium-to-myocardium signaling processes that govern cardiac valve and ventricle development and have shed light on the disease mechanisms associated with NOTCH dysfunction (see reviews^{32,33}). We showed that LVNC in mice and humans can be caused by mutations in the ubiquitin ligase MIB1 (MIB E3 ubiquitin protein ligase 1),³⁴ which is required for NOTCH ligand endocytosis and signaling activation.³⁵

Here, we used CRISPR-Cas9 gene editing and whole exome sequencing (WES) to study LVNC inheritance in 2 large families carrying *MIB1*-inactivating mutations.³⁴ The *Mib1*^{R530X} nonsense mutation causes LVNC in mice in heteroallelic combination with a conditional *Mib1*^{flox} allele, whereas the *Mib1*^{V943F} missense allele leads to bicuspid aortic valve (BAV) in a NOTCH-sensitized genetic background. We identified single-nucleotide variants in the *ASXL3* (ASXL transcriptional regulator 3), *APCDD1* (APC down-regulated 1), *TMX3* (Thioredoxin Related Transmembrane Protein 3), *CEP192* (Centrosomal protein 192), and *BCL7A* (BAF chromatin remodelling complex subunit BCL7A) genes that cosegregate with the *MIB1* mutations and LVNC in our pedigrees. Triple heterozygous *Mib1* *Apccdd1* *Asxl3* mutant mice develop features of LVNC, whereas quadruple heterozygous *Mib1* *Cep192* *Tmx3*; *Bcl7a* mice develop BAV and valve-associated defects. Coimmunoprecipitation (co-IP) analysis confirmed interaction among CEP192 (centrosomal protein 192), BCL7A (BAF chromatin remodeling complex subunit BCL7A), and NOTCH protein products. Gene profiling of mouse hearts and human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived cardiomyocytes (hiPSC-CM) revealed a common defect in metabolism and cardiomyocyte maturation. These findings provide evidence for a shared genetic substrate underlying LVNC and BAV composed of MIB1-NOTCH and a set of genetic modifiers.

METHODS

Data Availability

The authors declare that all data that support the findings of this study are available within the article and its [Supplemental Material](#). The data, analytical methods, and study materials will be available to other researchers for purposes of reproducing the results or replicating the procedure. The RNA sequencing (RNA-seq) data are deposited in the NCBI GEO database under accession number GSE185395. The UK Biobank data in this article are available from <http://www.ukbiobank.ac.uk/>.

Ethics and DNA collection

Clinical evaluations and genetic studies were performed in accordance with the principles of the Helsinki Declaration, and after informed consent of participating subjects for inclusion according to the protocol approved by the Ethics Committee of Clinical Research from the Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (218/C/2020). All patients underwent a clinical evaluation, including an ECG and 2-dimensional and Doppler echocardiography. A pedigree was drawn for each patient, and first-degree relatives were screened with the same protocol. Blood samples were taken for genetic analysis, and all patients and their relatives gave written informed consent. Genomic DNA was obtained from 1-mL blood samples extracted in EDTA using the DNAeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, 69506).

Mice

Established mouse strains used in this study were *Tnnt2*^{Cre} (*Tnnt2*: cardiac troponin T),³⁶ *Myh6*^{Cre},³⁷ *Nkx2.5*^{Cre},³⁸ *Mib1*^{flox},³⁹ and *Notch1*^{KO}.⁴⁰ The following new mouse lines were generated as part of this study: *Mib1*R530X/+, *Mib1*V943F/+, *Mib1*R530X/+ *Asxl3*M1361V/+ *Apccdd1*V150I/+, *Mib1*V943F/+ *Cep192*T1522M/+ *Tmx3*^{F191X/+}, *Bcl7a*^{AG,GA/+}, *R26* *MIB1*^{V943F/+}, and *R26* *MIB1*^{WT/+} (see “Generation of New Mouse Lines”). Genotyping details will be provided on request.

Animal studies were approved by the Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Animal Experimentation Ethics Committee and by the Community of Madrid (Ref. PROEX 155.7/20). All animal procedures conformed to EU Directive 2010/63EU and Recommendation 2007/526/EC on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes, enacted in Spanish law under Real Decreto 1201/2005.

Generation of New Mouse Lines

To generate the *Mib1*^{R530X/+} and *Mib1*^{V943F/+} lines, complementary single-stranded oligodeoxynucleotides (ssODNs) were designed as custom synthetic genes (Megamer single-stranded Gene Fragments, IDT) including these point mutations. sgRNAs sequences were selected using Breaking-Cas⁴¹ and the CRISPOR-TEFOR online tool.⁴² The *Cas9* mRNA and single guide RNAs (sgRNAs) templates were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with the addition of the SP6 and T7 promoters, respectively, and assembled in the pX330 plasmid.⁴³ *Cas9* mRNA was transcribed using the mMACHINE mMACHINE SP6 Transcription Kit (Invitrogen, AM1340), sgRNAs were transcribed with the Megashortscript T7 transcription Kit (Invitrogen, AM1354), and all species were purified on NucAway Spin Columns (Ambion, AM10070). The final concentration of components was 30 pmol/μL sgRNA, 30 ng/μL *Cas9* mRNA, and 30 or 10 ng/μL ssODN, as detailed in [Table S1](#), sheets 1 and 2. The sgRNA and ssODN sequences used are listed in [Table S1](#), sheet 1. Reagents were microinjected into 1-cell fertilized C57BL/6 mouse embryos.⁴⁴ Pups were screened for the targeted mutation or insertion by PCR analysis and sequencing, and the selected founders were backcrossed to the C57BL/6 background.

Triple mutant mice were obtained by microinjecting the editing reagents for each combination into zygotes obtained from crosses between *Mib1* mutant males (*Mib1*^{V943F/V943F} or *Mib1*^{R530X/+})

and C57Bl/6CrI females, with synthetic crisprRNA (crRNA) and trans-activating crRNA (tracrRNA) incubated with Cas9 protein and ssODN at the concentrations indicated in Table S1, sheet 3. Complementary and asymmetric ssODNs (Table S1, sheet 1) were designed according to published guidelines⁴⁵ as custom synthetic genes (Megamer single-stranded Gene Fragments, IDT). Founders were identified by PCR and confirmed by Sanger sequencing. Single and multiple mutants were obtained for all microinjections except for the second Cep192+Tmx3 experiment, in which no pup was born. In a second experiment with these reagents, we obtained 1 triple heterozygote founder (Mib1^{V943F/+} Cep192^{T1522M/+} Tmx3-204^{F191X/+}) out of 4 survivors (25%). In the Bcl7a microinjection experiment, with only 1 crRNA and 1 ssODN carrying the intron variants, we obtained 13 founders with both intronic mutations out of 21 pups (61.9%).

For the polymorphisms found in the R530X family, 2 triple heterozygotes (Mib1^{R530X/+} Asxl3^{M1361V/+} Apcc11^{V150I/+}) were obtained out of 16 pups (12.5%) (Table S1, sheet 3). Founders were crossed with C57Bl/6 mice to dilute possible off-target effects of CRISPR-Cas9 editing. The crosses also allowed us to determine whether the mutations were introduced in *cis* or *trans* heterozygosity. Thus, the generation of single mutants was a rare event because most of the animals were either triple heterozygotes or WT, indicating *cis* heterozygosity (Table S2, sheet 4). Generation of the *cis* triple heterozygote was further confirmed by comparing the number of mice with cosegregating alleles versus the number with mixed markers, which showed that all gene pairs were linked. With the set of mutations associated with the MIB1^{V943F} family, we obtained similar results, although cosegregation was less complete (Table S2, sheet 4). When comparing pairs of genes, no significant difference between mutant and WT alleles was found. In addition, despite the distance between *Tmx3* and *Mib1* (almost 80 Mb), the 3 genes cosegregated. Primers for genotyping and expression analyses are provided in Table S3.

Transgenic R26MIB1^{V943F/+} and R26MIB1^{WT/+} mice were generated by homologous recombination in mouse embryonic stem cells. The HA-MIB1^{WT}-IRES-eGFP and HA-MIB1^{V943F}-IRES-eGFP constructs were obtained from pCDNA3.1-HA-MIB1^{WT} or ^{V943F}-IRES-eGFP,³⁴ cloned into pBigT (Addgene, plasmid 15037) and loxP-flanked. *PGK-Neo^rSTOP-MIB1^{WT}-EGFP* or *-MIB1^{V943F}-EGFP* expression cassettes were cloned into a modified version of the *pROSA26-1* plasmid (Figure S1A). Gene targeting of these 2 constructs was performed in G4 mouse embryonic stem cells and confirmed by Southern blotting with external 5' and 3' hybridization probes (Figure S1B). Mice were generated by injecting targeted cells into B6CRL blastocysts to generate chimeras that were then analyzed for germline transmission. The selected animals were backcrossed to the C57Bl/6 background.

LVNC Clinical Phenotype Evaluation

We included patients with an echocardiographic diagnosis of LVNC, defined by the presence of at least 3 prominent trabeculations in the left ventricle and a ratio of noncompacted to compacted segment >2.0 at end-diastole.^{46,47}

Exome Sequencing and Data Analysis

DNA was sequenced on Illumina HiSeq2500 or Illumina HiSeq3000 platforms. Variant discovery was performed using Genome Analysis Toolkit (GATK) Best Practices

Workflows for germline short variants version 3.7⁴⁸ and bundle reference files for genome version b37/GRCh37. For data pre-processing, quality trimming and adaptor removal were performed using Trimmomatic 0.38⁴⁹ in paired mode (ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10). Low quality bases from the beginning and end of the read pair were deleted if the score was <3 (LEADING:3 TRAILING:3) or if the average quality was <15 using a sliding window of size 4 for the whole read (SLIDINGWINDOW:4:15). The read pair was discarded if the posttrimming length was <36 bp (MINLEN:36). Reads were mapped to GRCh37/b37 human genome using BWA mem version 0.7.10-r789 with shorter split hits set as secondary (-M).⁵⁰ Reads originating from the same DNA fragment (duplicates) during library construction were identified with Picard v1.97 (MarkDuplicates). For reads obtained from HiSeq 2500 runs (unpatterned flowcell), the maximum offset between 2 duplicated clusters parameter (*OPTICAL_DUPLICATE_PIXEL_DISTANCE*) was set to 100, and reads obtained from HiSeq3000 (patterned flowcell) were set to 2500. The base quality score of bases was recalibrated to better account for systematic errors using the BaseRecalibrator tool in GATK 3.7. The following databases of known polymorphic sites (-knownSites) were used: 1000G_phase1.snps.high_confidence.b37.vcf.gz; Mills_and_1000G_gold_standard.indels.b37.vcf.gz and dbsnp_137.b37.vcf.gz. For each sample, intermediate gVCF files with single nucleotide polymorphisms (SNPs) and Indels calls were created for each sample independently using GATK HaplotypeCaller, restricting calling regions to the enrichment targeted regions (L). "SureSelect Human All Exon V6" target intervals were downloaded from Agilent (<https://www.agilent.com>).

Joint genotyping from gVCF files was performed using the GenotypeGVCFs tool in GATK 3.7. Variants were annotated using the VEP (Variant Effect Predictor) in ensembletools version 84 with the plugin modules LoFtool and CADD (version 1.3) in offline cache version 90.⁵¹ For each putative variant, a variant quality score log-odds (VQSLOD) score was calculated using the VariantRecalibrator and ApplyRecalibration tools in GATK 3.7. SNPs and Indels were treated separately. For SNPs (-mode SNP), QualByDepth (QD), RMSMappingQuality (MQ), MappingQualityRankSumTest (MQRankSum), ReadPosRankSumTest (ReadPosRankSum), FisherStrand (FS), and StrandOddsRatio (SOR) covariates were annotated. In addition, hapmap_3.3.b37.vcf.gz was set as both a truth and a training set (prior 15.0). 1000G_omni2.5.b37.vcf.gz and 1000G_phase1.snps.high_confidence.b37.vcf.gz were set as training sets (prior 12.0 and 10.0, respectively). dbsnp_137.b37.vcf.gz was set as a known set (prior 2.0). For Indels (-mode INDEL), the max number of Gaussians for the positive model (-maxGaussians) was set to 4. QualByDepth (QD), FisherStrand (FS), StrandOddsRatio (SOR), MappingQualityRankSumTest (MQRankSum), and ReadPosRankSumTest (ReadPosRankSum) covariates were annotated.

Mills_and_1000G_gold_standard.indels.b37.vcf.gz was set both as truth and a training set (prior 12), and dbsnp_137.b37.vcf.gz was set as a known set (prior 2.0). In both cases, the truth sensitivity level was set to 75 (--ts_filter_level) to achieve a Ti/Tv ratio close to the expected value for WES (2.8). Because family pedigree data were insufficiently sensitive to allow dismissal of Mendelian inconsistencies as presumable

false positives, we did not use VQSLOD for filtering (although we did use it as for accuracy guidance). The total number of variants identified and proportion of them present in the Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) as a readout of homogeneity and quality are shown in [Table S4](#).

Cosegregating Variants Filtering

Our workflow is summarized in [Figure S2](#). After obtaining the raw reads and filtering out the low-quality sequences, we mapped the reads to the reference human genome version GRCh37. These mapped reads were handled according to GATK best practices.^{52,53} For the MIB1^{R530X} family, of 1341 variants present in an autosomal dominant pattern cosegregating with LVNC, we had data for all the family members of 106 SNPs. These 106 variants affected 21 unique genomic positions, and filtering out low impact and untranslated region (UTR)-affecting polymorphisms, 15 candidates were further examined. In the MIB1^{V943F} family, we found 1963 variants inherited in an autosomal dominant fashion, of which 565 were sequenced in all samples. Of the 77 unique positions affected, 32 were not variants of low impact or affecting UTRs. Candidate variants were selected through 3 approaches. First, we performed filtering on the basis of variants. We used databases such as ClinVar⁵⁴ to determine if the identified candidate variants were already described in congenital heart disease, but found none already related to LVNC except MIB1^{R530X} and MIB1^{V943F}. We also examined the prevalence of the polymorphisms and their presence in the homozygous condition in gnomAD,⁵⁵ although they were not excluding criteria, given how rare *MIB1* mutations are and our hypothesis of the cosegregation of additional mutations. The highest frequency of the selected variants was 0.21 for TMX3^{F191X} ([Figure S3C](#)). Another criterion was their predicted functional effect, based on the nature of the mutations, how deleterious were they predicted to be, using CADD⁵⁶ (ex post cutoff value: 0.771), PolyPhen (0),⁵⁷ and genomic evolutionary rate profiling (GERP)⁵⁸ (−3.92), or the potentially affected domain (based on PFAM, PROSITE, etc).⁵¹ These criteria did not allow us to exclude any variant, but were useful to prioritize them for the next 2 approaches. Second, we used a gene-centered strategy. We searched several gene databases for information about the relationship of the variants to congenital heart disease,⁵⁹ their annotation in Cardiovascular Gene Ontology,⁶⁰ and their expression during heart development (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>^{61,62}). Third, we used haplotypes mapping. We looked for rare variants inherited together in affected relatives using variants themselves (Rare Heterozygous Rule Out) or region markers (Identity-By-Descent or Collapsed Haplotype Patterning⁶³).

TMX3 Variants Analysis

The identified *TMX3* mutation (c.637+16_367+17del) affects intron 9 of the main isoform (*TMX3-201*), but also generates a nonsense mutation at Phe191 (TTT) in isoform *TMX3-202*, located in exon 8. This is equivalent to exon 8 and part of intron 9 in *TMX3-201*, because alternative splicing discards exon 6. The *TMX3-201* nonsense mutation deletes Ts 2 and 3 from the codon, creating a stop codon through combination with the As in the subsequent Asp192 codon (AAC). The remaining protein coding isoform, *TMX3-204*, consists of the first 8 exons of the main isoform with an alternative 3' end fragment including part of *TMX3-201* intron 8. This third isoform

encodes a VIFKI sequence in a fragment of intron 8, as well as including a Phe191 (TTT) followed by Lys192 (AAA). The c.579+8_c.579+9_del deletion, analogous to that generating TMX3-202^{F191X}, would therefore cause a similar nonsense mutation in TMX3204 ([Figure 3E](#)). Although the DNA sequence is conserved at that amino acid position, the mouse sequence contains a previous stop codon (Q189X). Mouse homologs of the *TMX3-202* and *TMX3-204* isoforms have not been annotated. To determine if the mouse heart expresses a *Tmx3-204* isoform, we designed 2 primer pairs for reverse transcription-PCR. One forward primer (long) binds to exon 6; the other (short) is homologous to a sequence in exon 7. The shared reverse primer binds to the putative 3'UTR, located in intron 8 of the main isoform, and allowed us to amplify *Tmx3-204* alone. reverse transcription-PCR with RNA from whole E14.5 hearts showed transcription of this mRNA species in the mouse ([Figure S3F](#)).

Additional methods are detailed in the [Supplemental Material](#).

RESULTS

Mib1^{R530X} and Mib1^{V943F} Mutations Cause LVNC and BAV

To assess the consequences of the MIB1^{R530X} and MIB1^{V943F} mutations previously identified in LVNC families,³⁴ we generated mice harboring the orthologous nonsense and missense variants by CRISPR-Cas9 gene editing ([Figure S1A and S1B](#), [Table S1](#), sheets 1 and 2). Homozygous Mib1^{R530X} mutants died at embryonic day (E) 11 ([Table S2](#), sheet 1) with severe growth retardation and defective heart looping ([Figure 1A through 1A'](#)), reduced NOTCH1 (NOTCH receptor 1) activity ([Figure 1B through 1C''](#)), and impaired trabeculation and ventricular patterning ([Figure S4C through S4J](#)). Quantitative PCR analysis showed a severely reduced *Mib1* transcription in E10.5 homozygous Mib1^{R530X} mutants ([Figure S4K](#)). Heterozygous Mib1^{R530X/+} mice were born at the expected Mendelian ratio and did not show LVNC ([Table S2](#), sheet 1, [Figure S5A and S5B](#)).

During compaction, MIB1 regulates myocardial NOTCH-ligand signaling to the endocardium.^{10,34} To specifically abrogate MIB1 in the myocardium, we generated Mib1^{R530X/flox};Tnnt2^{Cre} mice. These mice developed severe LVNC by E16.5 ([Figure 1D through 1E'](#), [Figure S5C and S5D](#)), with a 45% thinning of the compact myocardium, deep endocardial recesses, a reduced compact-to-trabecular myocardium ratio ([Figure 1E'''](#)), and attenuated NOTCH1 activity ([Figure 1C'' and 1F through 1G''](#)). Only 5% of Mib1^{R530X/flox};Tnnt2^{Cre} mice reached adulthood ([Table S2](#), sheet 2), suggesting that the combination of myocardial MIB1 abrogation with global MIB1 haploinsufficiency compromises viability ($P < 0.0001$, 2-tailed binomial test). Indeed, Western blot (WB) analysis revealed a drastically reduced MIB1 expression in Mib1^{R530X/flox};Tnnt2^{Cre} hearts ([Figure S5E](#)). Ultrasound analysis of surviving adult mice revealed the

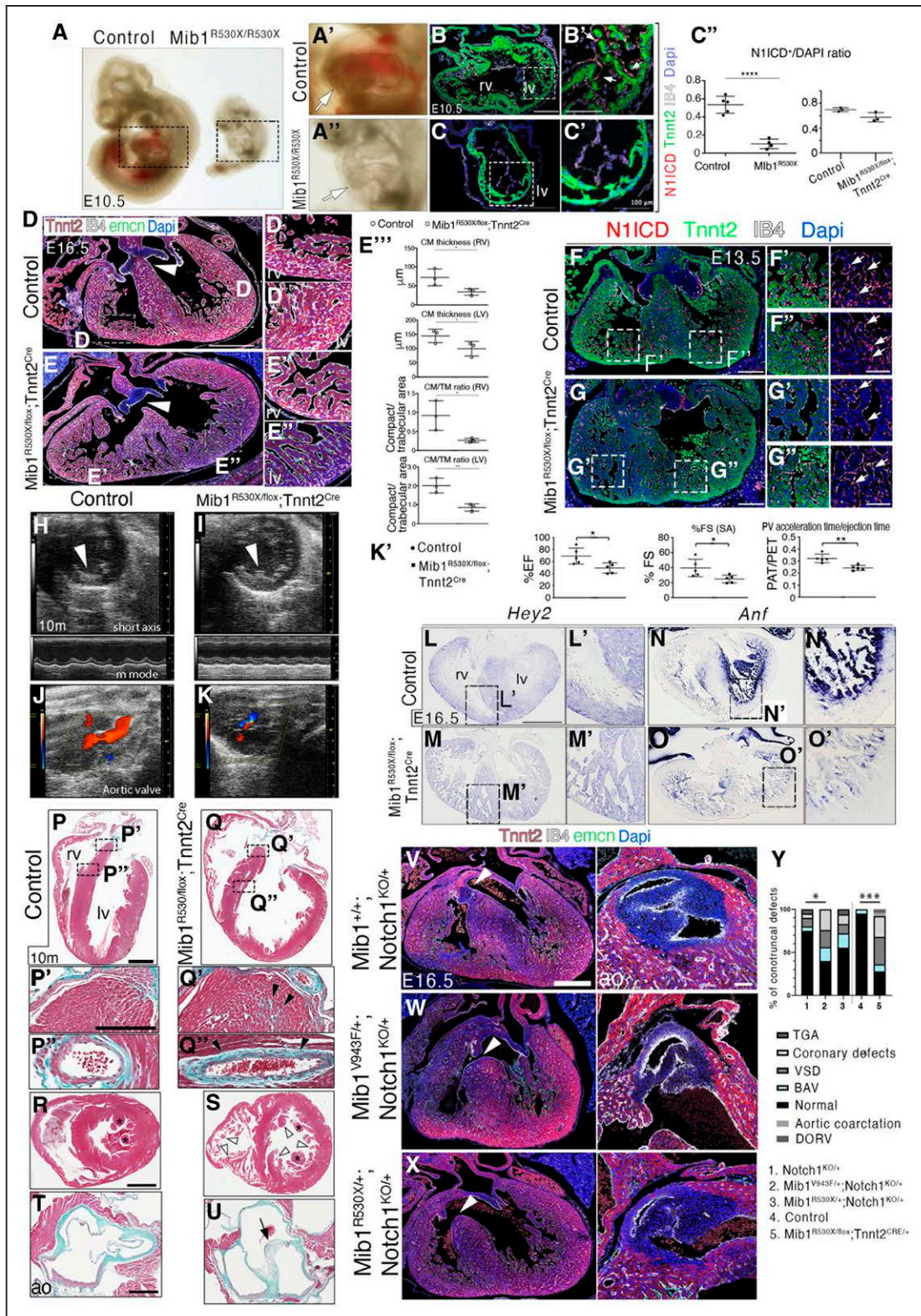


Figure 1. Mib1^{R530X} and Mib1^{V943F} mutations cause LVNC or BAV in a sensitized NOTCH1-deficient genetic background. **A**, Whole mounts of E10.5 control (left) and Mib1^{R530X/R530X} mouse embryos (right). High-magnification views of the boxed areas show a lateral aspect of a control looped heart (A') and a dysmorphic unlooped mutant heart (A''). **B** through **C'**, E10.5 control and Mib1^{R530X/R530X} hearts immunostained for N1ICD (red), Tnnt2 (green), and IB4 (isolectin B4; white). Nuclei are counterstained with DAPI. Arrows point to positive nuclei. Scale bars, 100 μ m (**B** and **C**) and 50 μ m (**B'** and **C'**). **C'**, Left, Quantification of N1ICD staining (n=3 sections from 5 control and n=3 sections from 4 mutant embryos, *****P*<0.0001 by Student *t*-test). **D** and **E**, E16.5 control (**D** through **D''**) and Mib1^{R530X/flox};Tnnt2^{Cre} (**E** through **E''**) transverse heart sections immunostained for Tnnt2 (red), IB4 (white), and emcn (endomucin, green), (Continued)

Figure 1 Continued. and counterstained with DAPI. General views and high-magnification views of right and left ventricles (**D'** and **D''**) show the reduction in compact myocardium thickness in mutant embryos (**E'** and **E''**). Scale bar, 200 μm . **E'''**, Quantification of compact myocardium (CM) thickness and the CM-to-trabecular myocardium (TM) ratio in both ventricles. Data are mean \pm SD (each point represents the average of 3 sections of each animal, 3 control and 3 mutants ** $P<0.005$ by Student *t*-test). **F** through **G''**, E13.5 control (**F**) and Mib1^{R530X/flox};Tnnt2^{Cre} (**G**) transverse heart sections immunostained for N1ICD (red), Tnnt2 (green), and IB4 (white) and counterstained with DAPI. General views and insets of right (**F'** and **G'**) and left (**F''** and **G''**) ventricles. Arrows point to positive nuclei. Scale bar, 50 μm . **C''**, **Right**, Quantification of N1ICD staining. Data are mean \pm SD (n=3 sections from 5 WT and n=3 sections from 4 mutant embryos, $P<0.0585$, by Student *t*-test). **H** through **K**, Ultrasound short axes and M-mode views of 10-month-old control and Mib1^{R530X/flox};Tnnt2^{Cre} ventricles. **H** and **I**, Arrowheads indicate the smooth surface of the control left ventricle and the trabeculae in the Mib1^{R530X/flox};Tnnt2^{Cre} left ventricle. **J** and **K**, Color flow imaging of control and Mib1^{R530X/flox};Tnnt2^{Cre} hearts showing regurgitation through the aortic valve in the mutant. **K'**, Quantification of ejection fraction (EF), fractional shortening (FS), and the pulmonary vein acceleration time-to-ejection time ratio. Data are mean \pm SD (n=5 WT and n=5 mutants, * $P<0.05$ and ** $P<0.01$, Student *t*-test). **L** through **O'**, ISH in E16.5 control and Mib1^{R530X/flox};Tnnt2^{Cre} heart sections. *Hey2* expressed in compact myocardium (**L** through **L'**) is expanded to trabeculae in mutants (**M** through **M'**), whereas the trabecular marker *Anf* (**N** through **N'**) is weakly expressed in mutant trabeculae (**O** through **O'**). Scale bar, 200 μm . **P** through **U**, Trichrome acid staining of 10-month-old adult control and Mib1^{R530X/flox};Tnnt2^{Cre} heart sections. **P** and **Q**, Four-chamber view. Note the dilated mutant heart (**Q**). High-magnification views of boxed areas show details of the ventricular septum (**P'** and **Q'**) and coronary vessels (**P''** and **Q''**). **R** and **S**, transverse heart sections. Papillary muscles are marked with an asterisk. Arrowheads point to trabeculae in mutant heart (**S**). **T** and **U**, Section at the level of aortic valves. Arrow points to a dysplastic BAV in mutant heart. Scale bars, 1 mm and 400 μm . **V** through **X**, Transverse heart sections and aortic valves from E16.5 Mib1^{+/+}; Notch1^{KO/+} (**V**), Mib1^{V943F/+}; Notch1^{KO/+} (**W**), and Mib1^{R530X/+}; Notch1^{KO/+} (**X**) embryos immunostained for Tnnt2 (red), IB4 (white) and *emcn* (green), and counterstained with DAPI. Arrowheads mark the membranous ventricular septum, which is defective in Mib1^{V943F/+}; Notch1^{KO/+} and Mib1^{R530X/+}; Notch1^{KO/+} hearts. Sections on the **right** show the aortic valves, which are bicuspid in the hearts of double heterozygotes. Scale bar, 100 μm . **Y**, Quantification of conotruncal defects. Data are mean \pm SD (n=18 N1^{KO/+}, n=24 Mib1^{V943F/+}; Notch1^{KO/+}, n=16 Mib1^{R530X/+}; Notch1^{KO/+}, n=22 control and n=18 Mib1^{R530X/flox};Tnnt2^{Cre}, * $P<0.05$, *** $P=0.0003$, Fisher exact test for the proportion of abnormal hearts). ao indicates aortic valve; BAV, bicuspid aortic valve; DORV, double outlet right ventricle; E, embryonic day; FS, fractional shortening; LV, left ventricle; ISH, hybridization; LVNC, left ventricular noncompaction; N1ICD, NOTCH1 intracellular domain; RV, right ventricle; TGA, transposition of great arteries; Tnnt2, cardiac troponin T; and VSD, ventricular septal defect.

presence of trabeculations and a significant reduction in ejection fraction and fractional shortening, indicating impaired cardiac function (Figure 1H, 1I, and 1K'). In addition, color Doppler profiling detected regurgitation through the aortic valve in mutant mice (Figure 1J and 1K). Developmental analysis of chamber markers in E16.5 Mib1^{R530X/flox};Tnnt2^{Cre} embryos revealed expansion of the compact myocardium marker *Hey2* to the trabeculae (Figure 1L through 1M') and low expression of the trabecular marker *Anf* (Figure 1N through 1O'), indicating altered chamber myocardium patterning in Mib1^{R530X/flox};Tnnt2^{Cre} mutants. Masson trichrome-stained sections of adult hearts revealed myocardial fibrosis in the septum and around the coronary vessels of the dilated Mib1^{R530X/flox};Tnnt2^{Cre} ventricles (Figure 1P through 1Q'). Transverse heart sections revealed the presence of noncompacted trabeculae in Mib1^{R530X/flox};Tnnt2^{Cre} ventricles (Figure 1R and 1S). It is interesting that the adult aortic valve was dysplastic in Mib1^{R530X/flox};Tnnt2^{Cre} mutants (Figure 1T and 1U), suggesting that aortic valve morphogenesis is sensitive to MIB1 dosage.

Heterozygous Mib1^{V943F/+} and homozygous Mib1^{V943F/V943F} mice did not develop LVNC (Figure S5H and S5I) and were viable (Table S2, sheet 3). To test the sensitivity of the LVNC phenotype to NOTCH gene dosage, we introduced a *Notch1* loss-of-function allele (Notch1^{KO})⁴⁰ into the Mib1^{V943F} background. Surprisingly, E16.5 Mib1^{V943F/+};Notch1^{KO/+} double heterozygotes mice had highly penetrant BAV and multiple associated valve defects (Figure 1V, 1W, and 1Y, Figure S5J through S5O, Table S5, sheet 1) but not LVNC. Valve defects were not substantial in Mib1^{R530X/+};Notch1^{KO/+} hearts (Figure 1X and 1Y, Table S5, sheet 1), but severe MIB1 depletion in Mib1^{R530X/flox};Tnnt2^{Cre} mice caused BAV and additional

conotruncal defects (Figure 1Y, Figure S5F and S5G, Table S5, sheet 1).

We generated 2 transgenic lines bearing a Rosa26-floxNeoSTOPflox-MIB1^{WT}-EGFP or a Rosa26-floxNeoSTOPflox-MIB1^{V943F}-EGFP expression cassette, resulting in conditional expression of a wild-type or a mutant (MIB1^{V943F}) MIB1 (Figure S1A and S1B). To monitor transgene expression, we crossed these lines with mice harboring the Nkx2.5^{Cre} driver line, which is active in cardiac progenitors from E7.5.³⁸ CRE-mediated removal of the floxed NeoSTOP sequences resulted in Rosa26-driven MIB1^{V943F}-EGFP expression in the E9.0 heart (Figure S1C). To examine the effect of MIB1^{V943F} expression on compaction, we used the MYH6^{Cre} driver, expressed in the developing chamber myocardium from E10.5 onwards.³⁷ The hearts of mice expressing wild-type MIB1 in the myocardium were normal at E15.5, whereas mice expressing MIB1^{V943F} had thinner compact myocardium and persistent trabeculae compatible with LVNC (Figure S1D through S1F). These results indicate that the Mib1^{R530X} and Mib1^{V943F} mutations impair both chamber and valve development, leading to LVNC and BAV in specific genetic configurations.

MIB1 Is Required for Myocardial Differentiation and Metabolic Maturation

To gain mechanistic insight, we performed RNA-seq on E15.5 Mib1^{R530X/flox};Tnnt2^{Cre} and control ventricles followed by gene set enrichment analysis against "HALL-MARK" gene sets (Figure 2A, Table S6, sheets 1 through 6). "EPITHELIAL_TO_MESENCHYMAL_TRANSITION" (EMT) was the highest positively enriched gene set in Mib1^{R530X/flox};Tnnt2^{Cre} mutants (Figure 2A and 2B,

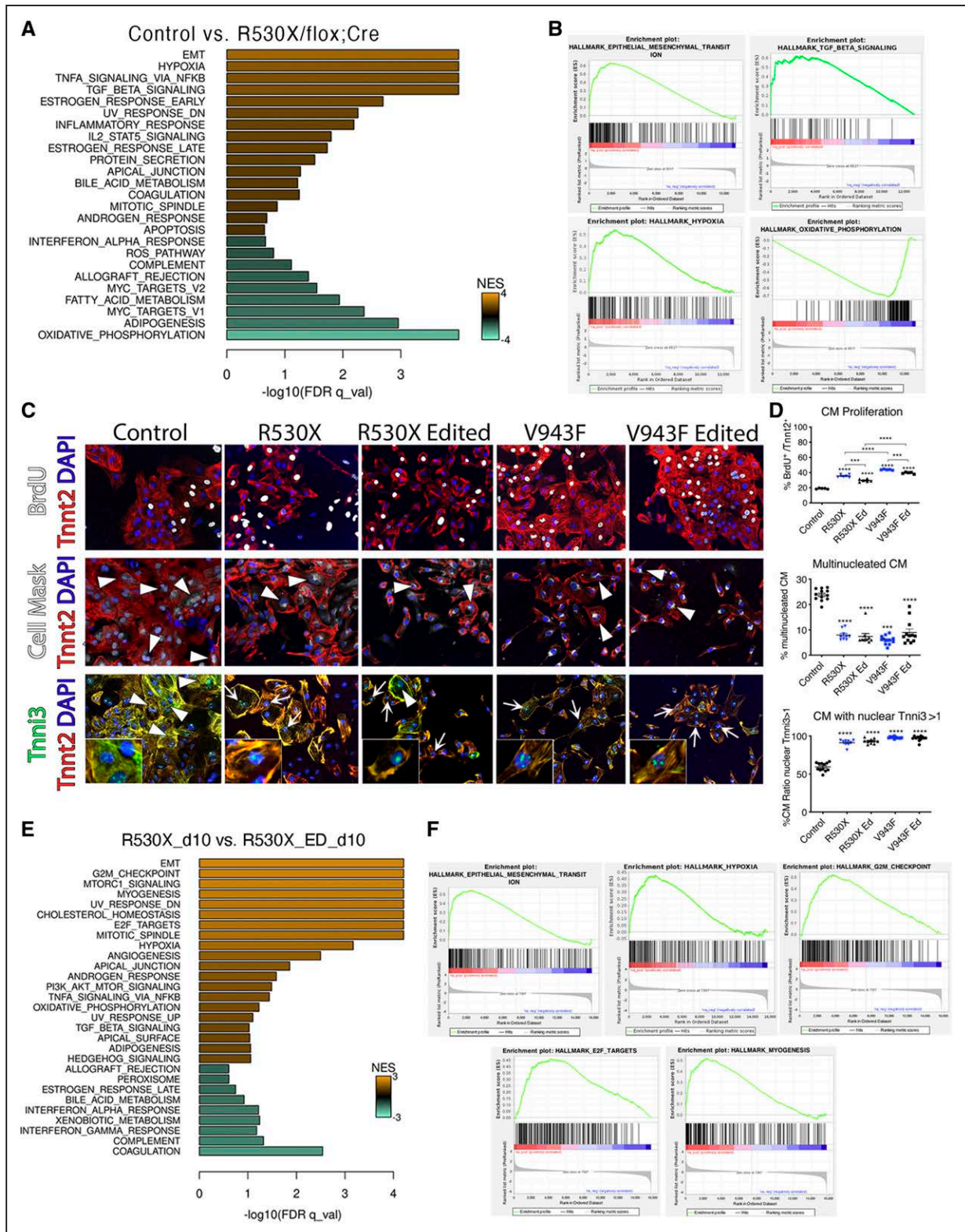


Figure 2. Defective cardiomyocyte differentiation and metabolic maturation in *Mib1*^{R530X/flox};*Tnt2*^{Cre/+} mice and *MIB1*^{R530X/+} hiPSC-derived cardiomyocytes.

Gene set enrichment analysis (GSEA) of *Mib1*^{R530X/flox};*Tnt2*^{Cre} (R530/flox;Cre) and control expression profiles. **A**, Bar plot representing enrichment data for 25 gene sets at false discovery rate (FDR q -value) <0.25. Of these, 15 had an FDR q -value <0.05. Scale bar indicates the Normalized Enrichment Score (NES) from -4 to 4. Positive and negative scores were found for 16 and 9 gene sets, respectively. **B**, Gene enrichment profiles for “HALLMARK” gene sets “EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION” (FDR q -value=0; NES=2.54), “TGF_BETA_SIGNALING” (FDR q -value=0; NES=2), “HYPOXIA” (FDR q -value=0; NES=2.15), and “OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION” (FDR q -value=0; NES=-2.88). (Continued)

Figure 2 Continued. C, Cardiomyocytes derived from control, MIB1^{R530X/+}, edited MIB1^{R530X/+}, MIB1^{V943F/+}, and edited MIB1^{V943F/+} hiPSCs after 20 days of differentiation. Cells were stained with antibodies against BrdU (white), Tnnt2 (red), and Tnni3 (green) and counterstained with DAPI (**top** and **bottom** rows), or DAPI and CellMask (blue and white, **middle** row). The **top** row shows increased BrdU staining in cells derived from the patients; the **middle** row shows less multinucleated mature cardiomyocytes in the patients' cardiomyocytes (arrowheads); the **bottom** row shows predominant Tnni3 staining in the nuclei of mutant hiPSC-CMs. **D**, Quantification of BrdU incorporation, percentage of multinucleation, and percentage of nuclear Tnni3 (see [Supplemental Material](#)). Data are mean±SD (n=5 or 6 proliferation; n=9–12 multinucleation/maturation). ****P*<0.005 and *****P*<0.001, 1-way ANOVA, Tukey multiple comparisons test. **E**, GSEA of R530X_d10 versus R530X_ED_d10 expression profiles. Bar plot representing enrichment data for 29 gene sets at FDR q-value <0.25. Of these, 16 had FDR q-value <0.05. Scale bar indicates NES from -3 to 3. Positive and negative scores were found for 20 and 9 gene sets, respectively. **F**, Gene enrichment profiles for "HALLMARK" gene sets "EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION" (FDR q-value=0; NES=2.46), "HYPOXIA" (FDR q-value=6.13E-04; NES=1.95), "G2M_CHECKPOINT" (FDR q-value=0; NES=-2.39), "E2F_TARGETS" (FDR q-value=0; NES=2.10), and "MYOGENESIS" (FDR q-value=0; NES=2.31). FDR indicates false discovery rate; hiPSC, human induced pluripotent stem cell; hiPSC-CM, hiPSC-derived cardiomyocytes; NES, normalized enrichment score; Tnnt2, cardiac troponin T; and Tnni3, cardiac troponin I.

Table S6, sheets 1 and 3). Related to this pathway are "TGF BETA SIGNALING", "APICAL_JUNCTION", and "MITOTIC_SPINDELE" (Figure 2A and 2B, Table S6, sheets 1 and 4), suggesting activation of cell migratory processes involving oriented cell division as those occurring in cardiomyocytes during chamber development.^{64,65} Prominent cellular stress responses such as "HYPOXIA", "TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB", "UV_RESPONSE_DN", "INFLAMMATORY_RESPONSE", and "IL2_STAT5_SIGNALING", were also enriched positively and might involve "APOPTOSIS" as a final common pathway (Figure 2A and 2B, Table S6, sheets 1 and 5). Conversely, the most negatively enriched pathway was "OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION" (Figure 2A and 2B, Table S5, sheets 2 and 6). Related to this pathway are FATTY_ACID_METABOLISM" and "ROS_PRODUCTION" (Figure 2A), suggesting defective cardiac metabolic maturation. Pathways involved in protein homeostasis such as "MYC_TARGET_V1", "MYC_TARGET_V2", and "PROTEIN_SECRETION" were also enriched in Mib1^{R530X/flox};Tnnt2^{Cre} mutants (Figure 2A, Table S6, sheets 1 and 2).

hiPSC-CMs Show Maturation Impairment and Enhanced Proliferation

To determine the cellular phenotype of disease-affected cardiomyocytes, we generated hiPSCs by retroviral transduction of reprogramming factors in skin fibroblasts obtained from MIB1^{V943F/+} and MIB1^{R530X/+} LVNC family members (Figure 3C and 3D; see Methods). Using CRISPR-Cas9 editing, we reverted both *MIB1* mutations to obtain hiPSC isogenic controls. These hiPSC lines were differentiated in vitro into cardiomyocytes.⁶⁶ Tnnt2 expression in MIB1^{V943F/+} and MIB1^{R530X/+} hiPSC-CM confirmed similar differentiation efficiency in all lines (Figure 2C and 2D). Human and mouse studies have shown an association between altered proliferation of ventricular cardiomyocytes and the pathogenesis of LVNC,^{25,67} with persistent proliferation reported in mouse MIB1-deficient trabecular cardiomyocytes.^{34,68} We assessed the proliferative potential of control and MIB1-mutant induced pluripotent stem cell (iPSC)-CMs by measuring BrdU incorporation. We found significantly

elevated proliferation in MIB1^{V943F/+} and MIB1^{R530X/+} hiPSC-CMs (Figure 2C and 2D). In addition, MIB1-mutant hiPSC-CMs showed reduced multinucleation and a predominantly nuclear, rather than cytosolic, distribution of Tnni3 (cardiac troponin I) (Figure 2C and 2D), an indication of immaturity.⁶⁹

We performed RNA-seq in mutant (MIB1^{R530X/+}, named R530X) and gene-edited (R530X_ED) patient hiPSC lines at day 10 of cardiomyocyte differentiation (Figure 2E). Enrichment against "HALLMARK" gene sets revealed "EMT" as the most positively enriched gene set (Figure 2E and 2F, Table S7, sheets 1 and 3), consistent with in vivo findings in mice. The cellular stress pathways "UV_RESPONSE_DN", "HYPOXIA", and "UV_RESPONSE_UP" (Figure 2E, Table S7, sheets 1 and 4) were also enriched. Enrichment of "G2M_CHECKPOINT" (Figure 2E and 2F, Table S6, sheets 1 and 5) and "E2F_TARGETS" (Figure 2E and 2F, Table S7, sheets 1 and 6), supports deregulation of cell cycle progression and the observed increased in proliferation of R530X hiPSC-CMs (Figure 2C and 2D). MIB1^{R530X/+} hiPSC-CMs displayed altered protein and lipid metabolisms reflected in "MTORC1_SIGNALING", "PI3K_AKT_MTOR_SIGNALING", "MYOGENESIS" (Figure 2E and 2F, Table S7, sheets 1 and 7), and "CHOLESTEROL_HOMEOSTASIS", "ADIPOGENESIS", "BILE_ACID_METABOLISM", "XENOBIOTIC_METABOLISM" and "PEROXISOME" (Figure 2E, Table S7, sheet 1), respectively. Conversely, downregulation of several immunohematological processes (Figure 2E, Table S7, sheet 2) suggests impaired processes of innate immunological recognition.

Multiple Genetic Variants Cosegregate With *MIB1* and LVNC

Individuals heterozygous for the MIB1^{R530X} and MIB1^{V943F} mutations in our pedigrees show fully penetrant LVNC (Table S8) with characteristic heart dilatation and trabeculations (Figure 3A). The absence of disease in mice heterozygous for these *Mib1* mutations prompted us to perform a WES of these families. We hypothesized that additional genetic variants may cosegregate with the *MIB1* mutations and contribute to the manifestation of

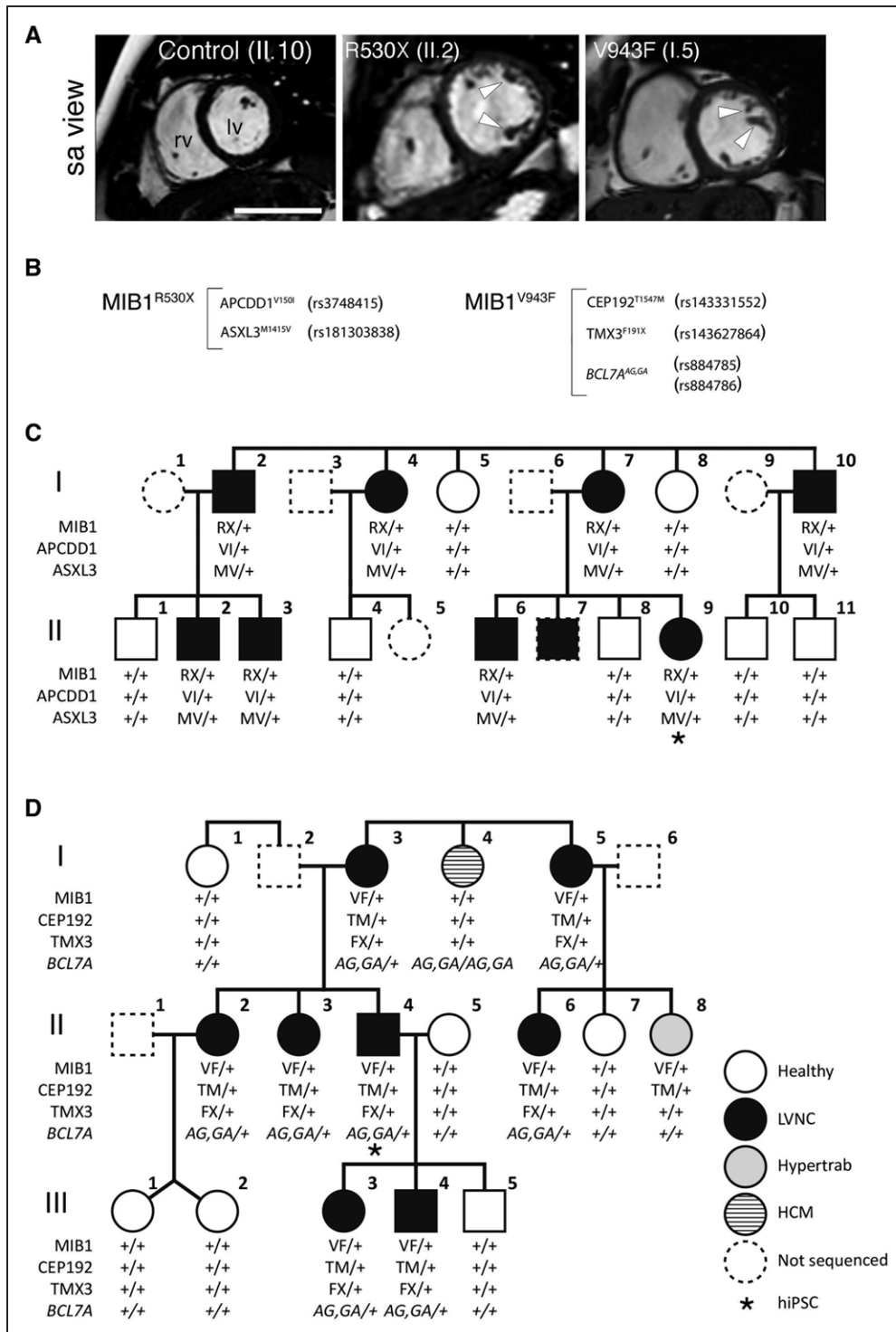


Figure 3. Identification of variants segregating with *MIB1* mutations in human LVNC families by whole exome sequencing.

A, CMRI heart sections showing short axis (sa) views of the right and left ventricles of a control individual (II.10) and patients II.2 and I.5, carrying the *MIB1*^{R530X/+} and *MIB1*^{V943F/+} mutations, respectively. Arrowheads point to trabeculae. Scale bar, 50 mm. **B**, Genetic variants associated with the *MIB1*^{R530X/+} and *MIB1*^{V943F/+} mutations. Corresponding reference SNP (rs) report references are shown in parentheses. **C**, *MIB1*^{R530X/+} pedigree. Note the perfect cosegregation of the *MIB1*^{R530X/+} mutation with the newly identified variants and LVNC. **D**, *MIB1*^{V943F/+} pedigree. Note the cosegregation of the *MIB1*^{V943F/+} mutation with the newly identified variants and LVNC. Members of each generation are indicated numerically. Squares, males; circles, females. Asterisks indicate the individuals from which hiPSCs were generated. CMRI indicates cardiac magnetic resonance imaging; hiPSC, human induced pluripotent stem cell; HCM, hypertrophic cardiomyopathy; lv, left ventricle; LVNC, left ventricular noncompaction; rv, right ventricle; and SNP, single nucleotide polymorphism.

the LVNC phenotype in a heterozygous setting. Briefly, variants were filtered using several quality parameters and inheritance assumptions on the basis of LVNC affection in the family. Filtered variants (15 in MIB1^{R530X} family and 32 in MIB1^{V943F} family) were analyzed focusing on variant, gene, or haplotype characteristics. Our workflow is summarized in Figure S2, and a detailed description of the filtering process can be found in the Methods.

We identified 2 candidate missense variants in the MIB1^{R530X} family (Figure 3B), occurring in heterozygosis in all affected family members and in none of the healthy relatives (Figure 3C). rs3748415 is a valine-to-isoleucine substitution at position 150 (V150I) in APCDD1, a WNT signaling inhibitor.⁷⁰ It is interesting that WNT and NOTCH have been shown to genetically interact during cardiac development.⁷¹ The second genetic variant, rs181303838, is a methionine-to-valine substitution in position 1415 (M1415V) in ASXL3, a transcription factor involved in heart development and homeostasis.⁷² Both APCDD1 and ASXL3 are physically close to MIB1 in chromosome 18, increasing the chances of cosegregation (Figure S6A). The mutation found in APCDD1 alters Val150, which is conserved between zebrafish and humans (Figure S6B) and predicted to be in the top 2.4% of deleterious variants in the genome (CADD Phred 16.26). Met1415 in ASXL3 is a rare variant (minor allele frequency 0.0004467) conserved in all eutherians examined (Figure S6B). Its hydrophobicity is maintained in *Xenopus laevis*'s Leu1368 (Figure S6B). The APCDD1^{V150I} mutation was predicted to be more deleterious than ASXL3^{M1415V} (PolyPhen scores of 0.555 and 0, respectively) and to be more evolutionarily conserved (CADD Phred, 16.26 and 8.681; and GERP, 1.79 and -1.58). Nevertheless, APCDD1^{V150I} was more prevalent in human populations (minor allele frequency 0.1611; Figure S6C). Both genes are expressed during mouse ventricular and cardiac valve morphogenesis (E12.5–E16.5). Quantitative PCR of whole hearts from C57Bl/6 embryos from E10.5 to E16.5 demonstrated that *Apcdd1* and *Asxl3* are regulated differentially during this period ($P < 0.0001$ in both cases). The expression of both genes peaks at E12.5 and then declines progressively (Figure S6D).

The first identified variant in the MIB1^{V943F} family (rs143331552) was a threonine-to-methionine substitution at position 1547 (T1547M) of CEP192, which is required for mitotic spindle assembly.⁷³ The second variant (rs143627864) was a nonsense mutation of the phenylalanine at position 191 (F191X) of TMX3, which catalyzes the isomerization of protein disulfide bonds.⁷⁴ TMX3 mutations have been linked to microphthalmia.⁷⁵ The third and fourth variants (c.175-56A>G, rs884785, and c.175-27G>A, rs884786) occur in intron 2 of BCL7A, which is involved in the pathogenesis of B cell lymphomas.⁷⁶ All of these variants appeared in hetero-

zygous combination with MIB1^{V943F} and cosegregated with LVNC (Figure 3D). CEP192 and TMX3 are physically linked to MIB1 on chromosome 18, but BCL7A is not. In humans, CEP192 is located on the short arm of chromosome 18, close to MIB1. In mice, this gene is farther away, in a translocated region of the long arm. In both species, TMX3 is located at the end of the long arm, almost 50 Mb away from MIB1 in humans and 80 Mb away from *Mib1* in mice. BCL7A is located on human chromosome 12. In mice, *Bcl7a* is located on the long arm of chromosome 5 (Figure S3A). The T1547M variant of the CEP192 gene is rare (maximum minor allele frequency 0.00003). PolyPhen identifies it as possibly damaging (Polyphen, 0.658), and CADD predicts it to be among the 1.45% most deleterious variants (CADD Phred score, 18.39). Thr1547 is in a highly conserved region of the CEP192 amino acid sequence in zebrafish and all Tetrapoda (Figure S3B). Both intron mutations in BCL7A are conserved between zebrafish and humans (Figure S3B). The CADD Phred scores for the BCL7A intron variants were low (6.350 and 0.771), as were the GERP scores (-3.88 and -3.92). The GERP score for CEP192^{T1547M} (0.69) was also not high; however, the prevalence of this mutation is sufficiently low (0.00003) to warrant consideration. The BCL7A mutations are prevalent (rs884785, 0.11; rs884786, 0.032; Figure S3C). Quantitative PCR analysis showed that these genes are expressed from E10.5 to E14.5, followed by a significant decline in transcription (Figure S3D). The mutated phenylalanine residue in TMX3^{F191X} is subjected to some selective pressure (GERP score: 0.63, Figure S3C), and substitution occurs at a frequency that could fit in LVNC prevalence in combination with any of the other candidate mutations found in the MIB1^{V943F} family (Figure S3E). Reverse transcription-PCR analysis at E14.5 confirmed that the TMX3 is expressed in the mouse heart (Figure S3F; see Methods). All these variants, although predicted as benign or of uncertain significance by their effect or prevalence (Figures S3 and S6), are not present simultaneously with their respective MIB1 variants in any gnomAD HGDP or 1000 genomes⁷⁷ individual (Tables S9 and S10).

Heterozygous Combination of MIB1 Mutations With the ASXL3 and APCDD1 or With the CEP192, TMX3, and BCL7A Variants Causes LVNC or BAV in Mice

To determine whether the newly identified candidate variants contribute to the autosomal dominant inheritance pattern of LVNC in our pedigrees, we used CRISPR-Cas9 gene editing to generate triple (Mib1^{R530X/+} Asxl3^{M1361V/+} Apcdd1^{V150I/+}) and quadruple (Mib1^{V943F/+} Cep192^{T1522M/+} Tmx3^{F191X/+}; Bcl7a^{AG,GA/+}) heterozygous mutant mice using gene editing (Figure S7). CRISPR reagents were microinjected into zygotes

of crosses between *Mib1* mutant males (*Mib1*^{V943F/V943F} or *Mib1*^{R530X/+}) and C57BL/6J females (Table S1, sheet 3). We aimed to introduce the new variants in cis with those in *Mib1* because the genes involved are linked, so this would yield a higher frequency of multiple heterozygotes. Founders were identified by PCR and confirmed by Sanger sequencing (Figure S7). For the variants identified in the *MIB1*^{R530X} family, we obtained 2 triple heterozygotes (*Mib1*^{R530X/+} *Asxl3*^{M1361V/+} *Apcdd1*^{V150I/+}) out of 16 (12.5%) animals (Table S1, sheet 3). For those of the *MIB1*^{V943F} family variants, we obtained 1 triple heterozygote founder (*Mib1*^{V943F/+} *Cep192*^{T1522M/+} *Tmx3*^{F191X/+}) out of 4 survivors (25%). In the *Bcl7a* microinjection, we obtained 13 founders out of 21 pups (61.9%) with both intronic mutations (Table S1, sheet 3). The founders generated were crossed with C57BL/6J mice to dilute any possible off-target effect of CRISPR-Cas9 gene edition. These crosses also allowed us to determine if the mutations were introduced in *cis* or in *trans* heterozygosity. Most of the animals were either triple heterozygotes or wild-type, indicating *cis* heterozygosity. For details, see the Supplemental Material.

Triple heterozygous *Mib1*^{R530X/+} *Asxl3*^{M1361V/+} *Apcdd1*^{V150I/+} mice (abbreviated as *Thet*) reached adulthood and were fertile. At E16.5, the hearts of these mice displayed thinner ventricles and larger but thinner trabeculae than control counterparts, and also had a significantly reduced a compact myocardium:trabeculae area ratio, indicating LVNC (Figure 4A through 4C, Table S5, sheet 2). Cardiac magnetic resonance imaging of adult *Mib1*^{R530X/+} *Asxl3*^{M1361V/+} *Apcdd1*^{V150I/+} mice revealed dilated chambers with elevated end diastolic volume, left ventricular mass, systolic volume, and cardiac output (Figure 4D through 4H). These elevated parameters are compatible with the pathogenesis of high-output heart failure.⁷⁸

We performed RNA-seq at E15.5, followed by gene set enrichment analysis, and identified “DNA_REPAIR” as the most enriched pathway, followed by “MYC_TARGETS_V1” and “E2F_TARGETS” (Figure 4I and 4J, Table S11, sheets 1 through 3), reflecting dysregulation of cell cycle checkpoint controls (G2/M and S phases). We also found enriched the “P53_PATHWAY”, an effector of cellular stress pathways including “ROS_PATHWAY”, “UNFOLDED PROTEIN RESPONSE”, and “UV_RESPONSE (_UP and _DN)” that may act upstream of cell-cycle checkpoints and involve “APOPTOSIS” as an outcome (Figure 4I, Table S11, sheet 1). Enrichment of the “ALLOGRAFT_REJECTION” and “INTERFERON_ALPHA_RESPONSE” terms (Figure 4I, Table S11, sheet 1), may reflect activation of innate immunity pathways. “MTORC1_SIGNALING” enrichment and “PROTEIN SECRETION” depletion suggest that protein homeostasis is likely altered in *Thet* mice (Figure 4I, Table S11, sheets 1 and 6). Given that APCDD1 is a direct WNT signaling target,⁷⁰ the enrichment of

“WNT_BETA_CATENIN_SIGNALING” (Figure 4I and 4J, Table S11, sheets 1 and 4), is consistent with WNT and NOTCH pathways playing opposite roles during cardiogenesis. “EMT” enrichment (Figure 4I and 4J, Table S11, sheets 1 and 5) is consistent with an increase in cell migratory processes. Defective ventricular development in *Thet* mutants is associated with increased proliferative and migratory processes, defective cellular stress responses, and protein homeostasis, indicative of a maturation defect.

After including our published *Mib1*^{flx/flx};Tnt2^{Cre} mice gene profile,³⁴ we performed a comparative analysis of all the gene set enrichment analyses made in this study. We observed that the *Mib1*^{R530X/flx};Tnt2^{Cre} signature was more closely related to those of the *Mib1*^{flx/flx};Tnt2^{Cre} mice and R530X_d10 iPSCs than to that of *Thet* mice (Figure S8). Considering all the pathway overlaps, we found that contrasts showing the strongest enrichments ($P < 0.05$), were *Mib1*^{R530X/flx};Tnt2^{Cre} versus control and R530X_d10 versus R530X_ED_d10 iPSCs (Figure S8). Shared pathways included “EMT”, “TGF_BETA_SIGNALING”, “ESTROGEN_RESPONSE_EARLY”, “TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB”, and “IL2_STA5_SIGNALING” (Figure S8). These pathways were more enriched, with a level of significance at q -value < 0.05 or q -value < 0.25 in *Mib1*^{R530X/flx};Tnt2^{Cre} and R530X_d10 (Figure S8). Depleted pathways (at q -value < 0.05 or q -value < 0.25) involved immune-hematological processes (Figure S8). However, these pathways were either moderately enriched or unchanged in *Thet* mice (Figure S8). Collectively, the RNA-seq data suggest that defective ventricular chamber maturation in *Mib1* mutants is caused by aberrant proliferative, migratory, fibrotic, and inflammatory pathway gene activation. Acting alongside these “primary” pathways are “secondary” pathways, which are enriched or depleted depending on the specific genotype.

Triple heterozygous *Mib1*^{V943F/+} *Cep192*^{T1547M/+} *Tmx3*^{F191X/+} E16.5 mice showed significantly more penetrant valve abnormalities at E16.5, including BAV (Figure 4K through 4N and 4S), as well as defects in both the muscular and the membranous ventricular septum (Table S5, sheet 3). Quadruple heterozygous mutants harboring the *Bcl7a* variants also had BAV, as well as coronary artery defects (Figure 4O through 4S, Table S5, sheet 3).

We examined the UK Biobank in search of BAV or aortopathy cases with *MIB1* mutations. We found that in the WES cohort of 454756 individuals, 1408 heterozygous participants carried 412 rare predicted loss of function *MIB1* variants (0.3%; 1 in 323), and 3028 participants carried 533 rare missense *MIB1* variants (0.2%; 1 in 853). Eighty-five heterozygous missense variant carriers of 3028 heterozygote individuals were diagnosed with aortic valve disease (0.03%; 1 in 36). Thirty-six heterozygous predicted loss of function variant carriers

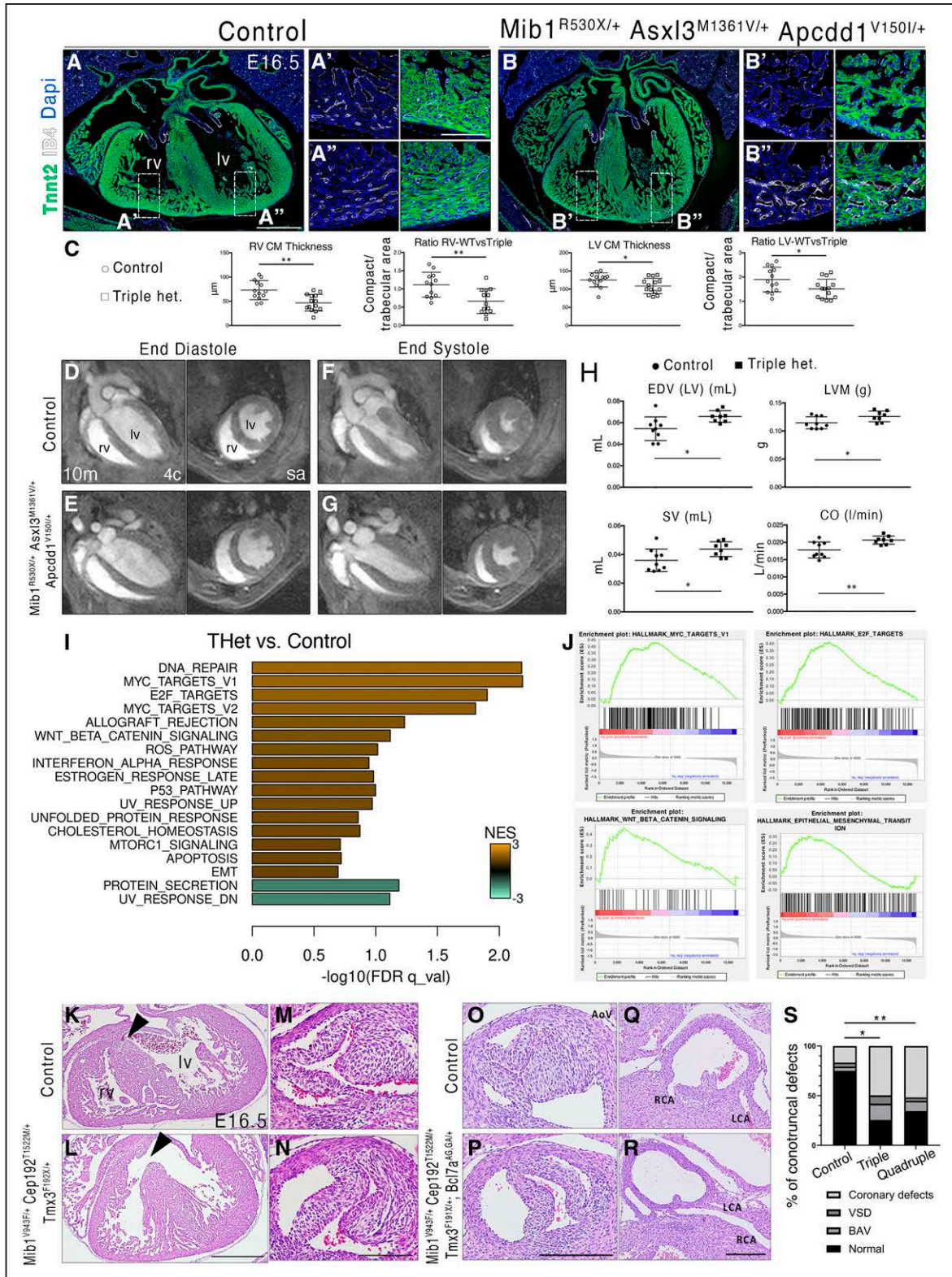


Figure 4. Mib1^{R530X/+} Asx13^{M1361V/+} Apcdd1^{V150I/+} and Mib1^{V943F/+} Cep192^{T1522M/+} Tmx3^{F191X/+};Bcl7a^{AG,GA/+} compound heterozygous mice show LVNC and BAV.

A and **B**, Transverse heart sections from E16.5 control and Mib1^{R530X/+} Asx13^{M1361V/+} Apcdd1^{V150I/+} embryos stained with antibodies to Tnnt2 (green) and isolectin B4 (white), and counterstained with DAPI (blue). General views of left and right ventricle (**A** and **B**) and high-magnification views of boxed areas (**A'**, **A''**, **B'**, and **B''**), showing reduced compact myocardium thickness in triple heterozygous embryos. Scale bars, 500 μ m (**A** and **B**) and 100 μ m (magnifications). **C**, Quantification of compact myocardium (CM) thickness and the compact-to-trabecular myocardium area ratio in both ventricles. Data are mean \pm SD (n=3 sections from 11 and 1 section from 2 WT and n=3 sections from 11 and 1 section from 3 mutant embryos, *P<0.05 and **P<0.005, by Student *t*-test). **D** through **G**, CMRI images of adult (10-month-old) control (*Continued*)

Figure 4 Continued. (D and F) and triple heterozygous (E and G) mice showing chamber dilation in the mutant. H, Quantification of end diastolic volume (EDV), left ventricular mass (LVM), stroke volume (SV), and cardiac output (CO). Data are mean±SD (n=9 WT and n=8 mutants, * $P<0.05$ and ** $P<0.01$, by Student *t*-test). I, Gene set enrichment analysis of E15.5 triple heterozygous (Thet) versus control heart expression profiles. The bar plot represents enrichment data for 18 gene sets at FDR q -value <0.25 . Of these gene sets, 4 had an FDR q -value <0.05 . The scale bar is the normalized enrichment score (NES) from -3 to 3 . Positive scores were found for 16 gene sets and negative scores for 2 gene sets. J, Gene enrichment profiles for the “HALLMARK” gene sets “MYC_TARGETS_V1” (FDR q -value=0.006; NES=1.84), “E2F_TARGETS” (FDR q -value=0.012; NES=1.75), “WNT_BETA_CATENIN_SIGNALING” (FDR q -value=0.076; NES=1.51), and “EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION” (FDR q -value=0.202; NES=1.28). K through R, Hematoxylin and eosin staining of control (K and O), triple heterozygote *Mib1*^{V943F/+} *Cep192*^{T1522M/+} *Tmx3f191X/+* (L), and quadruple heterozygote *Mib1*^{V943F/+} *Cep192*^{T1522M/+} *Tmx3f191X/+*; *Bcl7aAG,GA/+* hearts (P). Note the ventricular septal defect (K and L, arrowhead), BAV (M and N), and coronary malformations (Q and R). Scale bars, 500 μ m (K and L), 100 μ m (M through P), and 200 μ m (Q and R). S, Quantification of conotruncal defects. Data are mean±SD (n=24 WT, 13 triple and 28 quadruple mutants, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, Fisher exact test for the proportion of abnormal hearts). BAV indicates bicuspid aortic valve; CMRI, cardiac magnetic resonance imaging; E, embryonic day; FDR, false discovery rate; IB4, isolectin B4; LCA, left coronary artery; LV, left ventricle; LVNC, left ventricular noncompaction; RCA, right coronary artery; RV, right ventricle; Tnnt2, cardiac troponin T; VSD, ventricular septal defect; and WT, wild-type.

of 1408 heterozygote individuals were diagnosed with aortic valve disease (0.3%; 1 in 39). Assessments of the burden of aortic valve disease in *MIB1* variant carriers were not significant ($P>0.05$).

Molecular Interactions Among CEP192, BCL7A, and NOTCH

Our results support a genetic interaction between *MIB1* and the genes identified in our LVNC family exome: *ASXL3*, *APCDD1*, *CEP192*, *TMX3*, and *BCL7A*. To determine if the corresponding proteins interacted in vitro, we conducted co-IP experiments in HEK293T cells. On the basis of the nature of the proteins involved, we cotransfected *MIB1*, *N1ICD* (*NOTCH1* intracellular domain), or *RBPJ* (recombining binding protein suppressor of hairless) in pairwise combinations with the candidate interacting proteins. Thus, according to the exome data from the *MIB1*^{R530X} family, we cotransfected HEK293T cells with FLAG-*ASXL3* plus *N1ICD*-myc, *RBPJ*-GFP, or *RBP*-myc expression vectors, or with *APCDD1*FLAG plus *MIB1*-HA or *N1ICD*-myc expression vectors. For the *MIB1*^{V943F} family, we cotransfected HEK293T cells with *CEP192*-GFP plus *MIB1*-HA or *N1ICD*-myc; with *TMX3*-HA plus *N1ICD*-myc or *RBPJ*-GFP; or with *BCL7a*-FLAG plus *N1ICD*-myc or *RBPJ*-GFP. Co-IP experiments with *N1ICD* or *RBPJ* were negative for *ASXL3*, *APCDD1*, or *TMX3* (Figure S9A) but did detect interaction with *CEP192* and *BCL7a* (Figure 5A through 5D, Figure S9B). We obtained a positive co-IP result for full-length *CEP192* (192 kDa) and *N1ICD* (Figure S9B). To identify the region involved in this interaction, we split *CEP192* in a N-terminal (amino acids [aa] 1-1322) and a C-terminal fragment (CT, aa 1323-2537). Co-IP experiments with *N1ICD* showed that it is the CT *CEP192* region that interacts with *N1ICD* (Figure 5A). Thus, immunoprecipitation with anti-myc antibody and WB with anti-FLAG detected an ~150-kDa band corresponding to the CT *CEP192* region. Conversely, immunoprecipitation with anti-FLAG and WB with anti-myc detected a 70-kDa band corresponding to *N1ICD* (Figure 5A). This region contains the T1522M mutation identified in the *MIB1*^{V943F} family (Figure 3B and 3D); however, the in-

teraction with *N1ICD* persisted after site-directed mutagenesis to introduce the mutation into the CT fragment (Figure 5B), suggesting that the *CEP192*-*N1ICD* interaction domain may be larger. Surprisingly, co-IP did not detect interaction between *CEP192* and *MIB1* (Figure S9B), despite the association of *MIB1* with centrosomal proteins.^{79,80} In the case of *BCL7A*, co-IP with anti-myc antibody and WB with anti-FLAG detected a 50-kDa band corresponding to *BCL7A*, and the reciprocal experiment detected the 70-kDa band corresponding to *N1ICD* (Figure 5C). Because *BCL7A* is a transcription factor, we tested whether it interacted with the *NOTCH* effector transcription factor *RBPJ* cotransfecting cells with *RBPJ*-GFP and *BCL7A*-FLAG. Co-IP with anti-GFP antibody and WB with anti-FLAG detected a 50-kDa band corresponding to *BCL7A*, and the reciprocal experiment detected the 100-kDa band corresponding to *RBPJ*-GFP (Figure 5D). These results support direct molecular interaction among *CEP192*, *BCL7A*, and *N1ICD* proteins.

DISCUSSION

Defining the genetic basis of cardiac disease has proved more challenging than anticipated, despite the technological advances in genomic analysis of the last decade.⁸¹ The likely reason is that coding and noncoding DNA variants appear to make similar contributions to cardiac disease,⁸² implying that progress toward precision cardiovascular medicine will require experimental testing of the influence of multiple potential regulatory and coding sequence variants.⁸³ Even in severe cardiac diseases that manifest in children or young adults (ie, congenital heart disease and cardiomyopathies) and may appear to have a single Mendelian genetic basis, phenotypic expression is influenced by multiple DNA variants, suggesting that these diseases are oligogenic⁸⁴ or polygenic.⁸⁵ This implies that the combined action of genetic modifiers can have a major effect on the expression of a cardiac disease phenotype,^{3,86} making it difficult to define its genetic pathogenesis.

Our data show that mice harboring the ortholog *MIB1*^{R530X} and *MIB1*^{V943F} mutations that cause LVNC

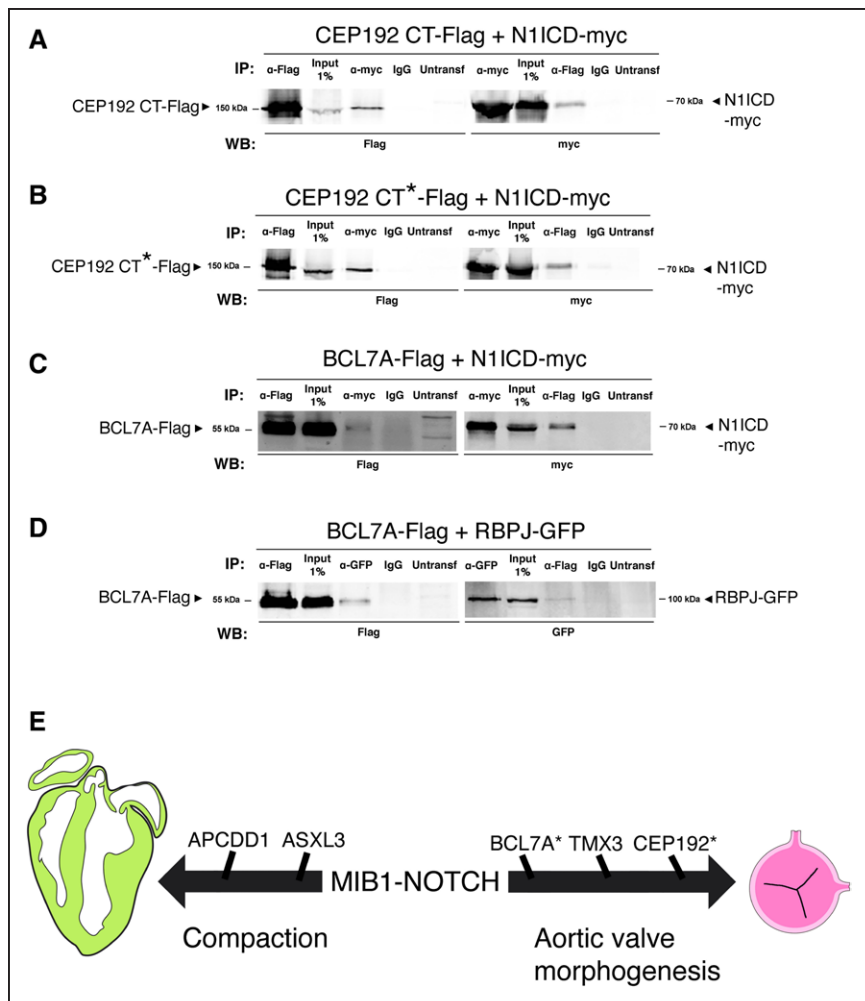


Figure 5. In vitro interaction between CEP192 and BCL7A, with N1ICD or RBPJ and MIB1-NOTCH pathway interactions during compaction and aortic valve development.

A, Flag and myc immunoblotting of Flag and myc immunoprecipitates from HEK293T cells cotransfected with Flag-tagged carboxy terminal CEP192 (CEP192 CT-Flag) and myc-tagged N1ICD (N1ICD-myc). **B**, Flag and myc immunoblotting of Flag and myc immunoprecipitates from HEK293T cells cotransfected with Flag-tagged mutant carboxy terminal CEP192 (CEP192 CT*-Flag) and myc-tagged N1ICD (N1ICD-myc). **C**, Flag and myc immunoblotting of Flag and myc immunoprecipitates from HEK293T cells cotransfected with Flag-tagged BCL7A (BCL7A-Flag) and myc-tagged N1ICD (N1ICD-myc). **D**, Flag and GFP immunoblotting of Flag and GFP immunoprecipitates from HEK293T cells cotransfected with Flag-tagged BCL7A (BCL7A-Flag) and GFP-tagged RBPJ (RBPJ-GFP). **E**, Cartoon summarizing the human and mouse data. MIB1-NOTCH signaling regulates chamber compaction and aortic valve morphogenesis in humans and mice. Whole exome sequencing analysis has identified 5 candidate genes interacting with *MIB1* mutations in LVNC. Mouse modeling shows their involvement in compaction or aortic valve morphogenesis. Asterisks indicate potential biochemical interactions. CT indicates C-terminal fragment; IP, immunoprecipitation; LVNC, left ventricular noncompaction; N1ICD, NOTCH receptor 1 intracellular domain; and WB, Western blot.

in heterozygous human carriers³⁴ develop LVNC when cardiac MIB1 is depleted, or BAV on a MIB1 heterozygous and NOTCH-sensitized genetic background. The recessive nature of the LVNC phenotype in mice contrasts with its dominant character in humans, suggesting the existence of additional contributing genes (modifiers)⁸⁷ that interact with *MIB1* to cause LVNC in a dominant fashion in humans. Moreover, the BAV phenotype of mice heterozygous for the *Mib1*^{V943F} or *Mib1*^{R530X} mutations on a NOTCH-sensitized genetic background suggests that valve morphogenesis is strictly sensitive to the NOTCH-MIB1 dosage and that its haploinsufficiency leads to BAV. The high dosage requirement for NOTCH-MIB1 function is also supported by the observation that only 5% of mice with cardiac MIB1 depletion (*Mib1*^{R530X/flox}; *Tnnt2*^{CRE}) survived embryogenesis, instead of the Mendelian 12.5%. The MIB1^{V943F} mutation is deleterious in cellular assays and in zebrafish embryos,³⁴ and our results show that mice expressing the MIB1^{V943F} protein in the embryonic myocardium display LVNC features. In our search for additional genetic variants that contribute to LVNC, WES of families carrying the MIB1^{R530X} and MIB1^{V943F} mutations identified a set of missense variants in *ASXL3*, *APCDD1*, *CEP192*, *TMX3*, and *BCL7A* that cosegregate with the

MIB1 mutations and LVNC, suggesting a genetic interaction between *MIB1* and these modifier genes during cardiogenesis. With the exception of *BCL7A*, these genes are located on chromosome 18 close to *MIB1*, increasing the probability of cosegregation, and the exome data reveal a perfect cosegregation of these variants with *MIB1* mutations and LVNC. It remains to be determined if *MIB1* and these newly identified candidates are coordinately regulated during cardiac development.

Generation of the corresponding mouse models revealed that triple heterozygous *Mib1*^{R530X/+} *Asxl3*^{M1361V/+} *Apcdd1*^{V150I/+} mice (*Thet* mice) showed features of LVNC, whereas quadruple heterozygous *Mib1*^{V943F/+} *Cep192*^{T1522M/+} *Tmx3*^{F191X/+}; *Bcl7a*^{AG,GA/+} mice showed a variety of valve-related defects, including BAV. Thus, WES of our LVNC pedigrees allowed us to identify new genes contributing to LVNC or BAV. These results suggest that 2 congenital structural heart abnormalities, LVNC and BAV,⁸⁸ share a genetic substrate in which *MIB1* mutations disrupt a major developmental pathway regulating ventricular and valve development. *MIB1* mutations can thus lead to LVNC or BAV depending on their combination with a set of mutations in modifier genes that influence disease phenotype. In other words,

MIB1-NOTCH signaling plays a major role in ventricular and valve development, and its genetic disruption can lead to human LVNC or BAV in the presence of a certain genetic substrate, produced by alterations in a set of modifier genes (Figure 5E). The causal implication of *NOTCH1* mutations in BAV has been described in humans³¹ and mice.⁸⁹ Likewise, *MIB1* inactivation causes LVNC in both humans and mice³⁴ and also BAV and valve dysmorphology in mice,^{89,90} although its implication in human BAV has not been described so far.

Although patients heterozygous for the *MIB1*^{V943F/+} *CEP192*^{T1522M/+} *TMX3*^{F191X/+}; *BCL7A*^{AG,GA/+} variants show LVNC and not BAV, mice carrying the 4 ortholog mutations have BAV but no LVNC, emphasizing the strong influence of the genetic background on disease phenotype and the sensitive response of inbred mouse strains (C57BL/6J) in the manifestation of cardiac phenotypes. Developmental marker analysis revealed defective chamber patterning and maturation in mice deficient for *MIB1* in the myocardium, indicating the developmental origin of LVNC. Gene profiling of *Mib1*^{R530X/flox;Tnnt2Cre} mice, *Mib1*^{R530X/+} *Asxl3*^{M1361V/+} *Apcdd1*^{V150I/+} triple heterozygous mice, and *MIB1*^{R530X/+} patient-derived hiPSCs revealed shared defects in myocardial differentiation, and metabolic maturation together with increased cardiomyocyte proliferation, processes that must be tightly coordinated to achieve full cardiomyocyte maturation.⁹¹ Mechanistically, abnormal activation of the TGFβ pathway is a consistent finding across the different *Mib1* genotypes, and TGFβ signaling has been related to pro-EMT and pro- or antiproliferative pathways.⁹² Reinforcing this notion, persistent cardiomyocyte proliferation has been reported in mice with myocardial *Mib1* inactivation,^{10,34} whereas blunted proliferation was found in a hiPSC model of LVNC with perturbed TGFβ signalling.⁶⁷ Immunoprecipitation assays between NOTCH pathway elements and the proteins identified by WES suggested direct biochemical interaction of N1ICD/RBPJ with CEP192 and BCL7A. The lack of positive evidence about the other proteins may be a result of low expression or defective protein modification or folding, and thus possible interactions cannot be discarded. In addition, the genetic interaction between *MIB1* and *APCDD1* is worth exploring on the basis of the interplay between NOTCH and WNT in different cardiac settings.^{71,93}

Previous studies have suggested the oligogenic nature of LVNC.^{20,84} Our study is the first in which exome data from 2 large pedigrees reveal LVNC resulting from cosegregation of mutations in a critical gene with mutations in a set of linked modifier genes. Modeling of these mutations in mice suggests that ventricle and valve morphogenesis share, at least in part, a common genetic substrate and developmental pathway. Extrapolation of our mouse model's data to humans would imply that patients with LVNC harboring *MIB1* mutations should also be screened for valve abnormalities, and vice versa. Our study demonstrates the power

of combining WES with humanized animal models generated through careful gene editing to provide mechanistic insight into complex diseases and the contribution to disease phenotype of coding and noncoding genetic variants identified through massive sequencing.

ARTICLE INFORMATION

Received December 14, 2021; accepted September 27, 2022.

Affiliations

Intercellular Signaling in Cardiovascular Development & Disease Laboratory, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares and Ciber de Enfermedades Cardiovasculares, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain (M.S.-A., A.S.-J., J.G.-B., D.M., B.P., R.P.-S., M.S., S.C., A.D., B.I., J.L.d.I.P.). Bioinformatics Unit (J.d.I.B., C.T., M.J.G., F.S.-C.), Genomics Unit (S.C., A.D.), Pluripotent Cell Technology Unit (B.P., G.G.), Translational Laboratory (B.I.), Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain. Molecular Mechanisms Program, Centro de Investigación del Cáncer and Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer Universidad de Salamanca, Spain (F.S.-S., N.F.-M., A.M.P.). Laboratorio de Cardiogenética, Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria, European Reference Networks and Unidad de Referencia-Europan Reference Networks Guard Heart de Cardiopatías Familiares, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca-Universidad de Murcia, El Palmar, Spain (M.S.-M., J.R.G.-B.). Regenerative Medicine Program, Bellvitge Institute for Biomedical Research, Program for Clinical Translation of Regenerative Medicine in Catalonia, Centre for Networked Biomedical Research on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine and Institutíu Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Barcelona, Spain (R.E., I.R.-P., O.I.-G., A.R.). Regenerative Medicine Program, Cima Universidad de Navarra, Navarra Institute for Health Research, Pamplona, Spain (O.I.-G.). Center for Chromosome Stability and Institut for Cellulær og Molekylær Medicin, University of Copenhagen, Denmark (M.S.). Medical Research Council London Institute of Medical Sciences (D.P.O., K.A.M.), National Heart and Lung Institute (K.A.M.), Imperial College London, United Kingdom. Cardiology Department, Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz Hospital, Madrid, Spain (B.I.). Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña and Departamento Científico, Health in Code S.L., A Coruña, Spain (L.M.). Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga and Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología, Universidad de Málaga, Spain (J.M.P.-P.).

Acknowledgments

The authors thank the Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Transgenesis and Microscopy Units for technical support. They thank A. Galicia and L. Méndez for mouse husbandry, and S. Bartlett for English editing. This research has been conducted using the United Kingdom Biobank Resource under application no. 40616.

Sources of Funding

This study was supported by grants PID2019-104776RB-I00 and PID2020-120326RB-I00, CB16/11/00399 (Centro de Investigación Biomédica en Red-Cardiovascular) financed by MCIN/AEI/10.13039/501100011033, a grant from the Fundación Banco Bilbao Vizcaya Argentaria (Ref. BIO14_298), and a grant from Fundació La Marató de TV3 (Ref. 20153431) to J.L.d.I.P. M.S.-A. was supported by a PhD contract from the Severo Ochoa Predoctoral Program (SVP-2014-068723) of the MCIN/AEI/10.13039/501100011033. J.R.G.-B. was supported by SEC/FEC-INV-BAS 21/021. A.R. was funded by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación (MCIN) (PID2021 1239250B-I00), Red de Terapia Celular (TerCel) (RD16/0011/0024), Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de recerca (AGAUR) (2017-SGR-899), and Fundació La Marató de TV3 (201534-30). J.M.P.-P. was supported by RTI2018-095410-B-I00 (MCIN) and PY2000443 (Junta de Andalucía). B.I. was supported by the European Commission (H2020-HEALTH grant No. 945118) and by MCIN (PID2019-107332RB-I00). D.P.O. was supported by the Medical Research Council (MC-A658-5QEBO) and K.A.M. by the British Heart Foundation (RG/19/6/34387, RE/18/4/34215). The cost of this publication was supported in part with funds from the European Regional Development Fund. The Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares is supported by the Instituto de Salud Carlos III the MCIN, and the Pro Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Foundation and is a Severo Ochoa Center of Excellence (grant CEX202001041-S) financed by MCIN/AEI/10.13039/501100011033. For the purpose of open access, the authors have applied a CC BY public copyright license to any Author Accepted Manuscript version arising.

Disclosures

None.

Supplemental Material

Supplemental Methods

Figures S1–S9

Tables S1–S12

References 94–112

REFERENCES

- Bos JM, Towbin JA, Ackerman MJ. Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:201–211. doi: 10.1016/j.jacc.2009.02.075
- Watkins H, Ashrafian H, Redwood C. Inherited cardiomyopathies. *N Engl J Med*. 2011;364:1643–1656. doi: 10.1056/NEJMra0902923
- Puckelwartz MJ, Pesce LL, Dellefave-Castillo LM, Wheeler MT, Pottinger TD, Robinson AC, Kearns SD, Gacita AM, Schoppen ZJ, Pan W, et al. Genomic context differs between human dilated cardiomyopathy and hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc*. 2021;10:e019944. doi: 10.1161/JAHA.120.019944
- Ritter M, Oechslin E, Sutsch G, Attenhofer C, Schneider J, Jenni R. Isolated noncompaction of the myocardium in adults. *Mayo Clin Proc*. 1997;72:26–31. doi: 10.4065/72.1.26
- Chin TK, Perloff JK, Williams RG, Jue K, Mohrmann R. Isolated noncompaction of left ventricular myocardium. A study of eight cases. *Circulation*. 1990;82:507–513. doi: 10.1161/01.cir.82.2.507
- Jenni R, Oechslin EN, van der Loo B. Isolated ventricular non-compaction of the myocardium in adults. *Heart*. 2007;93:11–15. doi: 10.1136/hrt.2005.082271
- Sedmera D, Pexieder T, Vuillemin M, Thompson RP, Anderson RH. Developmental patterning of the myocardium. *Anat Rec*. 2000;258:319–337. doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(20000401)258:4<319::AID-AR1>3.0.CO;2-O
- Tian X, Li Y, He L, Zhang H, Huang X, Liu Q, Pu W, Zhang L, Li Y, Zhao H, et al. Identification of a hybrid myocardial zone in the mammalian heart after birth. *Nat Commun*. 2017;8:87. doi: 10.1038/s41467-017-00118-1
- Faber JW, D'Silva A, Christoffels VM, Jensen B. Lack of morphometric evidence for ventricular compaction in humans. *J Cardiol*. 2021;8:397–405. doi: 10.1016/j.jjcc.2021.03.006
- D'Amato G, Luxan G, del Monte-Nieto G, Martinez-Poveda B, Torroja C, Walter W, Bochter MS, Benedetto R, Cole S, Martinez F, et al. Sequential Notch activation regulates ventricular chamber development. *Nat Cell Biol*. 2016;18:7–20. doi: 10.1038/ncb3280
- Freedom RM, Yoo SJ, Perrin D, Taylor G, Petersen S, Anderson RH. The morphological spectrum of ventricular noncompaction. *Cardiol Young*. 2005;15:345–364. doi: 10.1017/S1047951105000752
- Nucifora G, Aquaro GD, Pingitore A, Masci PG, Lombardi M. Myocardial fibrosis in isolated left ventricular non-compaction and its relation to disease severity. *Eur J Heart Fail*. 2011;13:170–176. doi: 10.1093/eurjhf/hfq222
- Jenni R, Oechslin E, Schneider J, Attenhofer Jost C, Kaufmann PA. Echocardiographic and pathoanatomical characteristics of isolated left ventricular non-compaction: a step towards classification as a distinct cardiomyopathy. *Heart*. 2001;86:666–671. doi: 10.1136/heart.86.6.666
- Oechslin EN, Attenhofer Jost CH, Rojas JR, Kaufmann PA, Jenni R. Long-term follow-up of 34 adults with isolated left ventricular noncompaction: a distinct cardiomyopathy with poor prognosis. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:493–500. doi: 10.1016/s0735-1097(00)00755-5
- Captur G, Nihoyannopoulos P. Left ventricular non-compaction: genetic heterogeneity, diagnosis and clinical course. *Int J Cardiol*. 2010;140:145–153. doi: 10.1016/j.ijcard.2009.07.003
- Ichida F. Left ventricular noncompaction. *Circ J*. 2009;73:19–26. doi: 10.1253/circj.08-0995
- Towbin JA, Lorts A, Jefferies JL. Left ventricular non-compaction cardiomyopathy. *Lancet*. 2015;386:813–825. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61282-4
- Hoedemaekers YM, Caliskan K, Michels M, Frohn-Mulder I, van der Smagt JJ, Phefferkorn JE, Wessels MW, ten Cate FJ, Sijbrands EJ, Dooijes D, et al. The importance of genetic counseling, DNA diagnostics, and cardiologic family screening in left ventricular noncompaction cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010;3:232–239. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.109.903898
- Klaassen S, Probst S, Oechslin E, Gerull B, Krings G, Schuler P, Greutmann M, Hurlimann D, Yegitbasi M, Pons L, et al. Mutations in sarcomere protein genes in left ventricular noncompaction. *Circulation*. 2008;117:2893–2901. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.746164
- van Waning JI, Caliskan K, Hoedemaekers YM, van Spaendonck-Zwarts KY, Baas AF, Boekholdt SM, van Melle JP, Teske AJ, Asselbergs FW, Backx A, et al. Genetics, clinical features, and long-term outcome of non-compaction cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71:711–722. doi: 10.1016/j.jacc.2017.12.019
- Ichida F, Tsubata S, Bowles KR, Haneda N, Uese K, Miyawaki T, Dreyer WJ, Messina J, Li H, Bowles NE, et al. Novel gene mutations in patients with left ventricular noncompaction or Barth syndrome. *Circulation*. 2001;103:1256–1263. doi: 10.1161/01.cir.103.9.1256
- Sedaghat-Hamedani F, Haas J, Zhu F, Geier C, Kayvanpour E, Liss M, Lai A, Frese K, Pribe-Wolferts R, Amr A, et al. Clinical genetics and outcome of left ventricular noncompaction cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2017;38:3449–3460. doi: 10.1093/eurheartj/ehx545
- Grego-Bessa J, Luna-Zurita L, del Monte G, Bolos V, Melgar P, Arandilla A, Garratt AN, Zang H, Mukoyama YS, Chen H, et al. Notch signaling is essential for ventricular chamber development. *Dev Cell*. 2007;12:415–429. doi: 10.1016/j.devcel.2006.12.011
- Zhang W, Chen H, Qu X, Chang CP, Shou W. Molecular mechanism of ventricular trabeculation/compaction and the pathogenesis of the left ventricular noncompaction cardiomyopathy (LVNC). *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2013;163C:144–156. doi: 10.1002/ajmg.c.31369
- Choquet C, Nguyen THM, Sicard P, Buttigieg E, Tran TT, Kober F, Varlet I, Sturny R, Costa MW, Harvey RP, et al. Deletion of Nkx2-5 in trabecular myocardium reveals the developmental origins of pathological heterogeneity associated with ventricular noncompaction cardiomyopathy. *PLoS Genet*. 2018;14:e1007502. doi: 10.1371/journal.pgen.1007502
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999;284:770–776. doi: 10.1126/science.284.5415.770
- Kopan R. Notch signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4:a011213,1–4. doi: 10.1101/cshperspect.a011213
- Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cecillion M, Marechal E, et al. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature*. 1996;383:707–710. doi: 10.1038/383707a0
- Li L, Krantz ID, Deng Y, Genin A, Banta AB, Collins CC, Qi M, Trask BJ, Kuo WL, Cochran J, et al. Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat Genet*. 1997;16:243–251. doi: 10.1038/ng0797-243
- Oda T, Elkahloun AG, Pike BL, Okajima K, Krantz ID, Genin A, Piccoli DA, Meltzer PS, Spinner NB, Collins FS, et al. Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat Genet*. 1997;16:235–242. doi: 10.1038/ng0797-235
- Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, Grossfeld PD, Srivastava D. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature*. 2005;437:270274.
- MacGrogan D, Munch J, de la Pompa JL. Notch and interacting signalling pathways in cardiac development, disease, and regeneration. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15:685–704. doi: 10.1038/s41569-018-0100-2
- Meester JAN, Verstraeten A, Alaerts M, Schepers D, Van Laer L, Loeys BL. Overlapping but distinct roles for NOTCH receptors in human cardiovascular disease. *Clin Genet*. 2019;95:85–94. doi: 10.1111/cge.13382
- Luxan G, Casanova JC, Martinez-Poveda B, Prados B, D'Amato G, MacGrogan D, Gonzalez-Rajal A, Dobarro D, Torroja C, Martinez F, et al. Mutations in the NOTCH pathway regulator MIB1 cause left ventricular noncompaction cardiomyopathy. *Nat Med*. 2013;19:193–201. doi: 10.1038/nm.3046
- Itoh M, Kim CH, Palardy G, Oda T, Jiang YJ, Maust D, Yeo SY, Lorick K, Wright GJ, ArizaMcNaughton L, et al. Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev Cell*. 2003;4:67–82. doi: 10.1016/s1534-5807(02)00409-4
- Jiao K, Kulesa H, Tompkins K, Zhou Y, Batts L, Baldwin HS, Hogan BL. An essential role of Bmp4 in the atrioventricular septation of the mouse heart. *Genes Dev*. 2003;17:2362–2367. doi: 10.1101/gad.1124803
- Agah R, Frenkel PA, French BA, Michael LH, Overbeek PA, Schneider MD. Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle in vivo. *J Clin Invest*. 1997;100:169–179. doi: 10.1172/JCI119509

38. Stanley EG, Biben C, Elefany A, Barnett L, Koentgen F, Robb L, Harvey RP. Efficient Cre-mediated deletion in cardiac progenitor cells conferred by a 3'UTR-ires-Cre allele of the homeobox gene *Nkx2-5*. *Int J Dev Biol*. 2002;46:431–439.
39. Koo BK, Yoon MJ, Yoon KJ, Im SK, Kim YY, Kim CH, Suh PG, Jan YN, Kong YY. An obligatory role of mind bomb-1 in notch signaling of mammalian development. *PLoS One*. 2007;2:e1221. doi: 10.1371/journal.pone.0001221
40. Conlon RA, Reaume AG, Rossant J. Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development*. 1995;121:1533–1545. doi: 10.1242/dev.121.5.1533
41. Oliveros JC, Franch M, Tabas-Madrid D, San-Leon D, Montoliu L, Cubas P, Pazos F. Breaking-Cas-interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBLgenomes. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:W267–W271. doi: 10.1093/nar/gkw407
42. Concordet JP, Haeussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res*. 2018;46:W242–W245. doi: 10.1093/nar/gky354
43. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339:819–823. doi: 10.1126/science.1231143
44. Harms DW, Quadros RM, Seruggia D, Ohtsuka M, Takahashi G, Montoliu L, Gurumurthy CB. Mouse genome editing using the CRISPR/Cas system. *Curr Protoc Hum Genet*. 2014;83:15 17 11–15 17 127. doi: 10.1002/0471142905.hg1507s83
45. Richardson CD, Ray GJ, Bray NL, Corn JE. Non-homologous DNA increase gene disruption efficiency by altering DNA repair outcomes. *Nat Commun*. 2016;7:12463. doi: 10.1038/ncomms12463
46. Stollberger C, Finsterer J. Left ventricular hypertrabeculation/noncompaction. *J Am Soc Echocardiogr*. 2004;17:91–100. doi: 10.1016/S0894-7317(03)00514-5
47. Stollberger C, Finsterer J, Blazek G. Left ventricular hypertrabeculation/noncompaction and association with additional cardiac abnormalities and neuromuscular disorders. *Am J Cardiol*. 2002;90:899–902. doi: 10.1016/S0002-9149(02)02723-6
48. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, del Angel G, Rivas MA, Hanna M, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet*. 2011;43:491–498. doi: 10.1038/ng806
49. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30:2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
50. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25:1754–1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324
51. McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GR, Thormann A, Flicek P, Cunningham F. The Ensembl variant effect predictor. *Genome Biol*. 2016;17:122. doi: 10.1186/s13059016-0974-4
52. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;20:1297–1303. doi: 10.1101/gr.107524.110
53. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, Del Angel G, Levy-Moonshine A, Jordan T, Shakir K, Roazen D, et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2013;43:11.10.1–11.10.33. doi: 10.1002/0471250953.bi1110s43
54. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM, Maglott DR. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:D980–D985. doi: 10.1093/nar/gkt1113
55. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, Collins RL, Laricchia KM, Ganna A, Birnbaum DP, et al; Genome Aggregation Database Consortium. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*. 2020;581:434–443. doi: 10.1038/s41586-020-2308-7
56. Kircher M, Witten DM, Jain P, O'Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet*. 2014;46:310–315. doi: 10.1038/ng.2892
57. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7:248–249. doi: 10.1038/nmeth0410-248
58. Davydov EV, Goode DL, Sirota M, Cooper GM, Sidow A, Batzoglou S. Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++. *PLoS Comput Biol*. 2010;6:e1001025. doi: 10.1371/journal.pcbi.1001025
59. Walsh R, Thomson KL, Ware JS, Funke BH, Woodley J, McGuire KJ, Mazzarotto F, Blair E, Sellar A, Taylor JC, et al. Reassessment of Mendelian gene pathogenicity using 7,855 cardiomyopathy cases and 60,706 reference samples. *Genet Med*. 2017;19:192–203. doi: 10.1038/gim.201690
60. Huntley RP, Sawford T, Mutowo-Muullenet P, Shypitsyna A, Bonilla C, Martin MJ, O'Donovan C. The GOA database: gene ontology annotation updates for 2015. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:D1057–D1063. doi: 10.1093/nar/gku1113
61. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, Marshall KA, Phillippy KH, Sherman PM, Holko M, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:D991–D995. doi: 10.1093/nar/gks1193
62. Diez-Roux G, Banfi S, Sultan M, Geffers L, Anand S, Rozado D, Magen A, Canidio E, Pagani M, Peluso I, et al. A high-resolution anatomical atlas of the transcriptome in the mouse embryo. *PLoS Biol*. 2011;9:e1000582. doi: 10.1371/journal.pbio.1000582
63. Wang X, Xin Q, Li L, Li J, Zhang C, Qiu R, Qian C, Zhao H, Liu Y, Shan S, et al. Exome sequencing reveals a heterozygous *DLX5* mutation in a Chinese family with autosomal dominant split-hand/foot malformation. *Eur J Hum Genet*. 2014;22:1105–1110. doi: 10.1038/ejhg.2014.7
64. Li J, Miao L, Shieh D, Spiotto E, Li J, Zhou B, Paul A, Schwartz RJ, Firulli AB, Singer HA, et al. Single-cell lineage tracing reveals that oriented cell division contributes to trabecular morphogenesis and regional specification. *Cell Rep*. 2016;15:158–170. doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.012
65. Meilhack SM, Esner M, Kerszberg M, Moss JE, Buckingham ME. Oriented clonal cell growth in the developing mouse myocardium underlies cardiac morphogenesis. *J Cell Biol*. 2004;164:97–109. doi: 10.1083/jcb.200309160
66. Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X, Hsiao C, Kamp TJ, Palecek SP. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc*. 2013;8:162–175. doi: 10.1038/nprot.2012.150
67. Kodo K, Ong SG, Jahanbani F, Termglinchan V, Hirono K, InanlooRahatloo K, Ebert AD, Shukla P, Abilez OJ, Churko JM, et al. iPSC-derived cardiomyocytes reveal abnormal TGF-beta signalling in left ventricular non-compaction cardiomyopathy. *Nat Cell Biol*. 2016;18:1031–1042. doi: 10.1038/ncb3411
68. D'Amato G, Luxan G, de la Pompa JL. Notch signalling in ventricular chamber development & cardiomyopathy. *FEBS J*. 2016;283:4223–4237. doi: 10.1111/febs.13773
69. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*. 2009;324:98–102. doi: 10.1126/science.1164680
70. Shimomura Y, Agalliu D, Vonica A, Luria V, Wajid M, Baumer A, Belli S, Petukhova L, Schinzler A, Brivanlou AH, et al. APCDD1 is a novel Wnt inhibitor mutated in hereditary hypotrichosis simplex. *Nature*. 2010;464:1043–1047. doi: 10.1038/nature08875
71. Wang Y, Wu B, Chamberlain AA, Lui W, Koirala P, Susztak K, Klein D, Taylor V, Zhou B. Endocardial to myocardial notch-wnt-bmp axis regulates early heart valve development. *PLoS One*. 2013;8:e60244. doi: 10.1371/journal.pone.0060244
72. Fu F, Li R, Lei TY, Wang D, Yang X, Han J, Pan M, Zhen L, Li J, Li FT, et al. Compound heterozygous mutation of the *ASXL3* gene causes autosomal recessive congenital heart disease. *Hum Genet*. 2021;140:333–348. doi: 10.1007/s00439-020-02200-z
73. Gomez-Ferrera MA, Rath U, Buster DW, Chanda SK, Caldwell JS, Rines DR, Sharp DJ. Human Cep192 is required for mitotic centrosome and spindle assembly. *Curr Biol*. 2007;17:1960–1966. doi: 10.1016/j.cub.2007.10.019
74. Haugstetter J, Maurer MA, Blicher T, Pagac M, Wider G, Ellgaard L. Structure-function analysis of the endoplasmic reticulum oxidoreductase TMX3 reveals interdomain stabilization of the N-terminal redox-active domain. *J Biol Chem*. 2007;282:33859–33867. doi: 10.1074/jbc.M706442200
75. Chao R, Nevin L, Agarwal P, Riemer J, Bai X, Delaney A, Akana M, JimenezLopez N, Bardakjian T, Schneider A, et al. A male with unilateral microphthalmia reveals a role for TMX3 in eye development. *PLoS One*. 2010;5:e10565. doi: 10.1371/journal.pone.0010565
76. Balinas-Gavira C, Rodriguez MI, Andrades A, Cuadros M, Alvarez-Perez JC, AlvarezPrado AF, de Yébenes VG, Sanchez-Hernandez S, Fernandez-Vigo E, Munoz J, et al. Frequent mutations in the amino-terminal domain of BCL7A impair its tumor suppressor role in DLBCL. *Leukemia*. 2020;34:2722–2735. doi: 10.1038/s41375-020-0919-5

77. Fairley S, Lowy-Gallego E, Perry E, Flicek P. The International Genome Sample Resource (IGSR) collection of open human genomic variation resources. *Nucleic Acids Res.* 2020;48:D941–D947. doi: 10.1093/nar/gkz836
78. Reddy YNV, Melenovsky V, Redfield MM, Nishimura RA, Borlaug BA. High-output heart failure: a 15-year experience. *J Am Coll Cardiol.* 2016; 68:473–482. doi: 10.1016/j.jacc.2016.05.043
79. Tozer S, Baek C, Fischer E, Gojame R, Morin X. Differential routing of Mindbomb1 via centriolar satellites regulates asymmetric divisions of neural progenitors. *Neuron.* 2017;93:542–551.e4. doi: 10.1016/j.neuron.2016.12.042
80. Villumsen BH, Danielsen JR, Povlsen L, Sylvestersen KB, Merdes A, Beli P, Yang YG, Choudhary C, Nielsen ML, Mailand N, et al. A new cellular stress response that triggers centriolar satellite reorganization and ciliogenesis. *EMBO J.* 2013;32:3029–3040. doi: 10.1038/emboj.2013.223
81. Morton SU, Quiat D, Seidman JG, Seidman CE. Genomic frontiers in congenital heart disease. *Nat Rev Cardiol.* 2021;16:26–42. doi: 10.1038/s41569-021-00587-4
82. Richter F, Morton SU, Kim SW, Kitaygorodsky A, Wasson LK, Chen KM, Zhou J, Qi H, Patel N, DePalma SR, et al. Genomic analyses implicate noncoding de novo variants in congenital heart disease. *Nat Genet.* 2020;52:769–777. doi: 10.1038/s41588-020-0652-z
83. Dainis AM, Ashley EA. Cardiovascular precision medicine in the genomics era. *JACC Basic Transl Sci.* 2018;3:313–326. doi: 10.1016/j.jaccbts.2018.01.003
84. Gifford CA, Ranade SS, Samarakoon R, Salunga HT, de Soysa TY, Huang Y, Zhou P, Eifenbein A, Wyman SK, Bui YK, et al. Oligogenic inheritance of a human heart disease involving a genetic modifier. *Science.* 2019; 364:865–870. doi: 10.1126/science.aat5056
85. Tadros R, Francis C, Xu X, Vermeer AMC, Harper AR, Huurman R, Kelu Bisabu K, Walsh R, Hoorntje ET, Te Rijdt WP, et al. Shared genetic pathways contribute to risk of hypertrophic and dilated cardiomyopathies with opposite directions of effect. *Nat Genet.* 2021;53:128–134. doi: 10.1038/s41588-020-00762-2
86. Harper AR, Goel A, Grace C, Thomson KL, Petersen SE, Xu X, Waring A, Ormondroyd E, Kramer CM, Ho CY, et al; HCMR Investigators. Common genetic variants and modifiable risk factors underpin hypertrophic cardiomyopathy susceptibility and expressivity. *Nat Genet.* 2021;53:135–142. doi: 10.1038/s41588-020-00764-0
87. Koussi M, Katsanis N. Genetic modifiers and oligogenic inheritance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5:a017145. doi: 10.1101/cshperspect.a017145
88. Curfman G. Bicuspid aortic valve—a common form of structural heart disease. *JAMA.* 2021;325:540–541. doi: 10.1001/jama.2021.0109
89. MacGrogan D, D'Amato R, Travisano S, Martinez-Poveda B, Luxan G, Del Monte-Nieto G, Papoutsis T, Sbroglio M, Bou V, Gomez-Del Arco P, et al. Sequential ligand-dependent Notch signaling activation regulates valve primordium formation and morphogenesis. *Circ Res.* 2016;118:1480–1497. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.308077
90. Captur G, Wilson R, Bennett MF, Luxan G, Nasis A, de la Pompa JL, Moon JC, Mohun TJ. Morphogenesis of myocardial trabeculae in the mouse embryo. *J Anat.* 2016;229:314325. doi: 10.1111/joa.12465
91. Guo Y, Pu WT. Cardiomyocyte maturation: new phase in development. *Circ Res.* 2020;126:1086–1106. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315862
92. Zhang Y, Alexander PB, Wang XF. TGF-beta family signaling in the control of cell proliferation and survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9:a022145. doi: 10.1101/cshperspect.a022145
93. Zhao L, Ben-Yair R, Burns CE, Burns CG. Endocardial Notch signaling promotes cardiomyocyte proliferation in the regenerating zebrafish heart through Wnt pathway antagonism. *Cell Rep.* 2019;26:546–554.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2018.12.048
94. Raya A, Rodríguez-Piza I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, Consiglio A, Castella M, Rio P, Sleep E, et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2009;460:53–59. doi: 10.1038/nature08129
95. Sanchez-Danes A, Richaud-Patin Y, Carballo-Carbajal I, Jimenez-Delgado S, Caig C, Mora S, Di Guglielmo C, Ezquerro M, Patel B, Giral A, et al. Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPSC-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO Mol Med.* 2012;4:380–395. doi: 10.1002/emmm.201200215
96. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8:2281–2308. doi: 10.1038/nprot.2013.143
97. Calatayud C, Carola G, Fernandez-Carasa I, Valtorta M, Jimenez-Delgado S, Diaz M, Soriano-Fradera J, Cappelletti G, Garcia-Sancho J, Raya A, et al. CRISPR/Cas9-mediated generation of a tyrosine hydroxylase reporter iPSC line for live imaging and isolation of dopaminergic neurons. *Sci Rep.* 2019;9:6811. doi: 10.1038/s41598-019-43080-2
98. Valls-Margarit M, Iglesias-García O, Di Guglielmo C, Sarlabous L, Tadevosyan K, Paoli R, Comelles J, Blanco-Almazan D, Jimenez-Delgado S, Castiello-Fernandez O, et al. Engineered macroscale cardiac constructs elicit human myocardial tissue-like functionality. *Stem Cell Rep.* 2019;13:207–220. doi: 10.1016/j.stemcr.2019.05.024
99. Kanzler B, Kuschert SJ, Liu YH, Mallo M. Hoxa-2 restricts the chondrogenic domain and inhibits bone formation during development of the branchial area. *Development.* 1998;125:2587–2597. doi: 10.1242/dev.125.14.2587
100. Yang J, Bucker S, Jungblut B, Bottger T, Cinnamon Y, Tchorz J, Müller M, Bettler B, Harvey R, Sun QY, et al. Inhibition of Notch2 by Numb/Numblike controls myocardial compaction in the heart. *Cardiovasc Res.* 2012;96:276–285. doi: 10.1093/cvr/cvs250
101. Chen H, Zhang W, Li D, Cordes TM, Mark Payne R, Shou W. Analysis of ventricular hypertrabeculation and noncompaction using genetically engineered mouse models. *Pediatr Cardiol.* 2009;30:626–634. doi: 10.1007/s00246-009-9406-5
102. Martin M. CUTADAPT removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnetjournal.* 2011;17:10–12. doi: 10.14806/ej.17.1.200
103. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinf.* 2011;12:323. doi: 10.1186/1471-2105-12-323
104. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2010;26:139–140. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616
105. Kramer A, Green J, Pollard J Jr, Tugendreich S. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics.* 2014;30:523–530. doi: 10.1093/bioinformatics/btt703
106. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:15545–15550. doi: 10.1073/pnas.0506580102
107. Cruz-Adalia A, Jimenez-Borreguero LJ, Ramirez-Huesca M, Chico-Calero I, Barreiro O, Lopez-Conesa E, Fresno M, Sanchez-Madrid F, Martin P. CD69 limits the severity of cardiomyopathy after autoimmune myocarditis. *Circulation.* 2010;122:1396–1404. doi: 10.1161/circulationaha.110.952820
108. van de Weijer T, van Ewijk PA, Zandbergen HR, Slenter JM, Kessels AG, Wildberger JE, Hesselink MK, Schrauwen P, Schrauwen-Hinderling VB, Kooi ME. Geometrical models for cardiac MRI in rodents: comparison of quantification of left ventricular volumes and function by various geometrical models with a full-volume MRI data set in rodents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302:H709–H715. doi: 10.1152/ajpheart.00710.2011
109. Sudlow C, Gallacher J, Allen N, Beral V, Burton P, Danesh J, Downey P, Elliott P, Green J, Landray M, et al. UK Biobank: an open access resource for identifying the causes of a wide range of complex diseases of middle and old age. *PLoS Med.* 2015;12:e1001779. doi: 10.1371/journal.pmed.1001779
110. Backman JD, Li AH, Marcketta A, Sun D, Mbatchesou J, Kessler MD, Benner C, Liu D, Locke AE, Balasubramanian S, et al; Regeneron Genetics Center. Exome sequencing and analysis of 454,787 UK Biobank participants. *Nature.* 2021;599:628–634. doi: 10.1038/s41586-021-04103-z
111. McLaren W, Pritchard B, Rios D, Chen Y, Flicek P, Cunningham F. Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. *Bioinformatics.* 2010;26:2069–2070. doi: 10.1093/bioinformatics/btq330
112. Jaganathan K, Kyriazopoulou Panagiotopoulou S, McRae JF, Darbandi SF, Knowles D, Li Yi, Kosmicki JA, Arbelaez J, Cui W, Schwartz GB, et al. Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning. *Cell.* 2019;176:535–548.e24. doi: 10.1016/j.cell.2018.12.015

