



Facultad de Ciencias
Departamento de Biología

Modificaciones de histonas
implicadas en el establecimiento del
dominio centromérico interno en
la meiosis de ratón

Memoria presentada por **Inés Berenguer López**
para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid
en el Programa de Doctorado de Biociencias Moleculares

2017

El presente trabajo ha sido desarrollado en la Unidad de Biología Celular del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid. Toda la investigación en el laboratorio ha sido subvencionada por el Ministerio de Economía y Competitividad dentro de los proyectos “Regulación de la asociación entre cromátidas hermanas en la meiosis de mamíferos: Implicaciones en la aparición de aneuploidías” (SAF2011-28842-C02-01), “Modificaciones post-traduccionales de histonas en el centrómero interno e impacto sobre las divisiones meióticas de mamíferos y el origen de aneuploidías” (BFU2014-53681-P) y “MEIONET” (Redes de Excelencia, BFU2015-71786-REDT).

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad mediante la concesión de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) asociada al proyecto de investigación SAF2011-28842-C02-01.

Los resultados de este trabajo han sido presentados en los congresos internacionales “*EMBO: Conference on Meiosis*” y “*International Symposium of the Ramón Areces Foundation: The biology of meiosis*”, y en los nacionales de la Red Española de Meiosis (MEIONet 2014, 2016 y 2017). Además, parte de los resultados obtenidos forman parte de un artículo en proceso de revisión en la revista científica *Nature Communications*: El Yakoubi *et al.*, 2017.

A mis padres y a mi hermano.

A Dani.

A G R A D E C I M I E N T O S

Agradecimientos

Esta memoria es el resultado de muchos años de dedicación, esfuerzo y sacrificio, pero sobre todo de ilusión. Y no habría sido posible llegar hasta aquí sin el apoyo, colaboración y cariño de una larga lista de personas que han formado parte activa durante estos últimos años.

*En primer lugar quiero agradecer a mis directores de Tesis, los **Dres. José Ángel Suja y Rocío Gómez**, por haberme enseñado tanto a lo largo de estos años, por vuestra paciencia y por haber corregido este trabajo minuciosamente y a contrarreloj. Gracias **José** por haberme dado la oportunidad de formar parte de este grupo de investigación y por introducirme en el campo de la meiosis que tanto me ha fascinado y donde he podido conocer a gente maravillosa, como es el caso de mi codirectora y amiga **Rocío**. Gracias por haber sido mi gran apoyo durante estos años. Gracias por “tirar siempre del carro”, por tener la mente llena de ideas y ganas de llevarlas a cabo. Eres el motor del laboratorio y también de esta Tesis, ya que sin ti ni la mitad de lo que hay en esta memoria habría sido posible, ni si quiera yo habría llegado hasta aquí. Gracias por transmitirnos a todos los que trabajamos contigo tu entusiasmo por la ciencia y la docencia, y por haber hecho de escudo para protegernos siempre que lo hemos necesitado. Gracias por tu honestidad pero, sobre todo, gracias por tu amistad. Has sido y eres un gran ejemplo como directora, científica y persona, y me siento muy afortunada por haber tenido la oportunidad de trabajar contigo.*

*Por supuesto, no podían faltar unas líneas al que ha sido mi mentor en la sombra (o del “Lado Oscuro”), el **Dr. Julio S. Rufas**. Gracias por haberme enseñado tanto aun cuando no tenías por qué. Gracias por tu eterno apoyo y cariño, por tu fantástico sentido del humor, por tu característica y admirable honestidad y, por supuesto, por tus toques de atención (o regañinas) cada vez que me he equivocado. Ha sido un honor haber trabajado contigo. También quiero agradecer al **Dr. Alberto Viera**, al cual admiro por su destreza a la hora de llevar a cabo cualquier protocolo en el laboratorio, por aconsejarme y ayudarme siempre que lo he necesitado. A la **Dra. Mayte Parra** porque gracias a su trabajo esta Tesis ha cobrado forma. Y, cómo no, al **Dr. Jesús Page**, por estar siempre dispuesto a dar un punto de vista diferente y hacernos pensar. Por último, y no por ello menos importante, a **Lorena**, con quien más tiempo he pasado en el laboratorio. Sin ella no habría podido sacar adelante gran parte del trabajo que se presenta en esta memoria.*

*A su vez me gustaría agradecer a todos los docentes de la Unidad de Biología Celular con los que he tenido la suerte de compartir docencia, pues de todos y cada uno de ellos he aprendido. Gracias también al laboratorio A-110, por haber tenido la puerta siempre abierta para resolverme cualquier duda y, en especial a la **Dra. Ana Peropadre**, por las terapias grupales en el pasillo que tanto bien nos han hecho.*

*Pero no todo se queda en la UAM. Mi formación no habría sido igual sin haber conocido a los **Dres. Juan Luis Santos y Mónica Pradillo**, a quienes tengo un especial aprecio por su grandeza como profesionales, pero más aún como personas.*

Tampoco puedo olvidar agradecer a los dos grupos de investigación donde he tenido la suerte de poder trabajar durante un período de tiempo a lo largo de estos años. En primer lugar,

Agradecimientos

al grupo del **Dr. Ignasi Roig**, por haberme acogido en su laboratorio nada más empezar esta aventura. En especial, a las ya **Dras. Sarai Pacheco** y **Marina Marcet**, por su paciencia y amabilidad a la hora de enseñarme (Gràcies!). Y, como no, a la **Dra. Katja Wassmann** y a su grupo, porque trabajar con ellos ha sido una de las experiencias más enriquecedoras de mi vida. Gracias por haberme tratado como a una más del equipo y por haber confiado en mí y en mi trabajo desde el primer momento. A todos y a cada uno de los miembros del equipo, **Damien, Warif, Eulalie, Soraya, Sandra, Ioanna, Antoine** y **Sara**, gracias (Merci!) por haberme aportado tanto a nivel científico y personal en tan solo unos meses.

Y no puedo dejarme en el tintero a los otros “sufridores” o becarios que, con el tiempo, se han convertido en grandes amigos. A mis chicas del máster, **Martita** e **Irene**, con quienes he compartido esta aventura incluso antes de que comenzara. A **Judith** y a **Gloria**, porque gracias a ellas comenzó una larga lista de becarios y amigos dando lugar a un grupo singular y heterogéneo de gente con una cosa en común: la ilusión y las ganas de hacer ciencia. Ambas tuvieron que irse de la UAM, pero han seguido al pie del cañón durante todos estos años. A **Alex** (Dr. Franco), por estar siempre pendiente de sus “señoritas” y dispuesto a solucionar el mundo con una buena cerveza. A todos los paleontólogos, en especial a los que comenzaron en la UAM. A **Carlitos** y a **Alex**, por tantas risas en la hora de la comida. A **Danny**, por tu cariño y amistad, y por habernos demostrado a todos que con esfuerzo y mucho sacrificio es posible alcanzar la meta que uno se propone. A **Sandra** y a **Candela**, las últimas paleontólogas en llegar, por traer un poco de sensatez al grupo. Y sobre todo, a mi paleontóloga favorita, la **Dra. Cuesta**, con la que he compartido toda esta experiencia desde el minuto uno. Gracias Elenita, por demostrar que dos personas tan diferentes como nosotras pueden llegar a tener una linda amistad. Gracias por tu inconfundible risa, por tus abrazos con palmadita en la espalda pero, sobre todo, gracias por estar siempre ahí (en la ventana de enfrente). Tampoco me olvido del bichólogo por excelencia del grupo, **Juanpa**, por amenizarnos la hora de comer con temas tan poco apropiados y que tantas risas nos ha sacado. Y para terminar este grupo, quiero agradecer a **Tania**, mi primera “compi” oficial de labo con quien tantos buenos ratos he pasado.

Y cuando pensaba que esto era todo, llegó la siguiente “hornada” y de un día para otro el laboratorio de “cito” se llenó de gente. La primera en llegar fue **Anita** y conectamos al instante. Y llegó en un momento en el que ni yo misma sabía cuánto la necesitaba. Porque llegar hasta aquí no ha sido un camino fácil. Por eso, gracias de corazón, por preocuparte tanto por mí desde el primer día, por reír y llorar conmigo, y por esos abrazos que lo dicen todo. A **Eva** y a **Marta**, mis otras chicas de “Cito de Abajo”, por vuestro apoyo y cariño. Gracias Eva por tus continuos gestos de amabilidad, y a Marta por tantos y tantos vídeos que quedarán para la posteridad. Gracias a las tres por llenar de alegría, no sólo el C-001, sino también el A-113. Gracias también a los “pollitos”, porque sin ellos este último año no habría sido tan grandioso. Gracias **Irene** por aguantarme no sólo como codirectora, también como compañera de despacho estos dos últimos años. Gracias por tus risas, por ponerle ritmo al labo y, cómo no, por tu amistad. Has sido una excelente alumna y aún mejor compañera. A **Pablo**, quien junto con Irene ha sido el que más me ha sufrido. Gracias por aguantar mis meteduras de pata, por no colapsar cada vez que te descolocaba las cosas en el labo y por hacerme compañía los viernes por la tarde con una cerveza fría. Y es que sin ti tarareando o haciendo ruido, el despacho parece vacío. Y tranquilo, que no me olvido, gracias por encontrar “la diacinesis”. Gracias también a las “pequeñas”, una por edad

*y la otra por estatura, del grupo. A **Nuri**, a la “teen”, por traer la locura y revolucionar el labo. Y a **Tere**, por ser tan sumamente adorable. Gracias a todos y a cada uno de vosotros por vuestra amistad, por haberme devuelto el entusiasmo por mi trabajo y por haber hecho que este último año haya sido tan especial.*

*Por último, darle las gracias a mi familia y amigos. En especial a **mis padres** y a **mi hermano**, por su incondicional cariño y apoyo desde mucho antes de empezar esta aventura. Y es que todo lo que soy es gracias a ellos. A **Bea** y a **Ángel**, por ser mucho más que familia. A **mis amigos**, “a los de siempre” porque da igual los años que pasen que siempre están ahí. Y, por supuesto, a **Dani**, porque él ha sido el que realmente me ha sufrido durante estos últimos años. Gracias por quererme tanto.*

Y es que “cuando la gratitud es tan absoluta, sobran las palabras”

-Álvaro Mutis-

A B R E V I A T U R A S

Abreviaturas

ACA, anticuerpo anti-centrómero (*Anti-centromere antibody*)

ADN, ácido desoxirribonucleico

AMPC, adenosin 3',5'-monofosfato cíclico

ARN, ácido ribonucleico

BUB1^{KD/KD}, mutante deficiente para el dominio quinasa de BUB1 (*Bub1 Kinase Death*)

CC, complejos de cohesina

CENP, proteína centromérica (*Centromeric protein*)

cm, centímetros

CP, corpúsculo polar

CPC, complejo cromosómico pasajero (*Chromosome passenger complex*)

CREST, suero ACA

CS, complejo sinaptonémico

DAPI, 4', 6-diamidino-2-fenilindol

dbAMPC, N⁶,2'-dibutiriladenosin 3',5'-monofosfato cíclico

DCI, dominio centromérico interno

DI, dominio intercromatídico

DMSO, dimetil sulfóxido

EAs, elementos axiales del CS

EC, elemento central del CS

ELs, elementos laterales del CS

EN, envoltura nuclear

Fig., figura

FITC, isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein Isothiocyanate*)

FTs, filamentos transversos del CS

g, fuerza gravitatoria

GFP, proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

gr, gramos

GV, vesícula germinal (*Germ Vesicle*)

GVBD, rotura de la envoltura nuclear (*Germ vesicle breakdown*)

HC, heterocromatina centromérica

H-PTM, Modificaciones post-traduccionales de histonas (*Histone Post-Translational Modifications*)

HP1, *Heterochromatin protein 1*

H2A-RFP, histona H2A conjugada con la proteína roja fluorescente (*Red fluorescent protein*)

H2AT120ph, histona H2A fosforilada en el residuo de treonina 120

H3T3ph, histona H3 fosforilada en el residuo de treonina 3

INCENP, proteína centromérica interna (*Inner centromere protein*)

kDa, kilodalton

KO, individuo mutante que presenta un gen inactivo (*Knockout*)

l, litros

M, molar

mA, miliamperios

MCAK, quinesina mitótica asociada al centrómero (*Mitotic centromere associated kinesin*)

mg, miligramos

ml, mililitros

Abreviaturas

mM, milimolar

MTs, microtúbulos

MTOC, centro organizador de microtúbulos (*Microtubules Organizing Center*)

μm, micrómetros

nm, nanómetros

PAR, región pseudoautosómica de los cromosomas sexuales (*Pseudo-autosomal Region*)

pb, pares de bases

PBS, tampón fosfato salino (*Phosphate buffer saline*)

PFA, paraformaldehído

PLK1, *Polo-like kinase 1*

PNA, sonda peptidonucleica (*Peptide Nucleic Acid*),

PP2A, fosfatasa 2A (*Phosphatase 2A*)

PVP, polivinilpirrolidona

RCI, Red del Centrómero Interno

rcf, fuerza centrífuga relativa (*Relative Centrifuge Force*)

rpm, revoluciones por minuto (*Revolutions Per Minute*)

SAC, punto de control mitótico (*Spindle-assembly checkpoint*)

SDS, dodecil sulfato sódico (*Sodium dodecyl sulfate*)

SGO, Shugoshina

ZP, zona pelúcida

V, voltios

WT, individuo silvestre (*Wild t*)

Í N D I C E

Índice

| | |
|--|-----------|
| ABSTRACT | 1 |
| RESUMEN | 5 |
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| 1. Meiosis | 11 |
| 1.1 Primera división meiótica..... | 12 |
| 1.2 Segunda división meiótica..... | 16 |
| 2. Modificaciones post-traduccionales de histonas | 17 |
| 2.1 El código de histonas..... | 17 |
| 3. El centrómero | 19 |
| 3.1 Identidad y función del centrómero..... | 20 |
| 3.2 Dominios funcionales del centrómero..... | 21 |
| 4. Vías de señalización para el ensamblaje del dominio interno del centrómero | 24 |
| 4.1 Vía de señalización BUB1-H2AT120ph-SGO1/2..... | 25 |
| 4.2 Vía de señalización Haspina-H3T3ph-CPC..... | 28 |
| OBJETIVOS | 33 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 37 |
| 1. Material utilizado | 39 |
| 1.1 Animales..... | 39 |
| 1.1.1 Animales con fenotipo silvestre (<i>Wild type</i> , WT)..... | 39 |
| 1.1.2 Animales modificados genéticamente..... | 39 |
| 2. Métodos empleados | 40 |
| 2.1 Obtención de preparaciones de espermatoцитos..... | 41 |
| 2.1.1 Aplastado de túbulos seminíferos..... | 41 |
| 2.1.2 Esparcido de espermatoцитos fijados con paraformaldehído..... | 41 |
| 2.1.3 Esparcido de espermatoцитos fijados con metanol:ácido acético..... | 42 |
| 2.1.4 Cultivo de túbulos seminíferos..... | 43 |
| 2.2 Obtención de preparaciones de oocitos..... | 44 |
| 2.2.1 Cultivo y esparcido de oocitos..... | 44 |
| 2.2.2 Microinyección de la histona H2B-RFP y seguimiento de oocitos <i>in vivo</i> | 45 |
| 2.3 Inhibición de la quinasa Haspina en espermatoцитos..... | 46 |
| 2.4 Inmunolocalización de proteínas..... | 46 |
| 2.4.1 Inmunolocalización indirecta de proteínas en meiocitos..... | 46 |
| 2.5 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH) de secuencias teloméricas..... | 50 |
| 2.6 Preparaciones histológicas de testículo..... | 51 |
| 2.6.1 Secciones histológicas de testículo..... | 51 |
| 2.6.1 Tinciones..... | 51 |
| ➤ Tricrómico de Masson..... | 52 |
| ➤ Ácido peryódico-Schiff (PAS)..... | 52 |
| 2.7 Captura y procesamiento de imágenes..... | 53 |
| 2.8 Análisis estadístico..... | 53 |

| | |
|---|------------|
| RESULTADOS | 55 |
| 1. Vía de señalización BUB1/H2AT120ph/SGO2 en meiosis | 57 |
| 1.1 Dinámica de las proteínas de la BUB1 en la meiosis masculina de ratón..... | 57 |
| 1.1.2. Localización de BUB1 | 58 |
| ➤ Distribución de la proteína BUB1 durante la meiosis | 58 |
| ➤ Localización relativa de la proteína BUB1 en los centrómeros | 62 |
| 1.1.3. Localización de la variante H2AT120ph | 62 |
| ➤ Distribución de la H2AT120ph durante la meiosis | 62 |
| ➤ Localización precisa de la proteína H2AT120ph en los centrómeros | 66 |
| 1.1.4. Localización de las proteínas SGO2 y MCAKph | 69 |
| ➤ Distribución de la proteína SGO2 durante la meiosis | 69 |
| ➤ Distribución de la proteína MCAKph durante la meiosis | 69 |
| 1.2 Orden de reclutamiento de las proteínas de la vía BUB1 en meiosis..... | 72 |
| 1.3 Dinámica de H2AT120ph y SGO2 en la meiosis femenina de ratón | 73 |
| 2. Vía de señalización Haspina/H3T3ph/CPC en meiosis | 75 |
| 2.1 Dinámica de las proteínas de la Haspina en la meiosis masculina de ratón..... | 77 |
| 2.1.1 Localización de la quinasa Haspina | 77 |
| 2.1.2 Localización de la variante H3T3ph | 78 |
| ➤ Distribución de la variante H3T3ph durante la meiosis | 78 |
| ➤ Localización relativa de la variante H3T3ph en metafase-I y metafase-II | 81 |
| 2.1.3 Localización de las proteínas del CPC..... | 85 |
| ➤ Distribución de Borealina durante la meiosis..... | 85 |
| ➤ Distribución de Survivina durante la meiosis | 88 |
| ➤ Distribución de INCENP durante la meiosis..... | 90 |
| ➤ Distribución de Aurora B/C durante la meiosis | 90 |
| 2.2 Orden de reclutamiento de las proteínas de la vía Haspina en meiosis..... | 96 |
| 2.3 Dinámica de H3T3ph y Aurora B/C en la meiosis femenina de ratón | 96 |
| 3. Estudio del fenotipo meiótico de los mutantes <i>Bub1</i>^{KD/KD} | 98 |
| 3.1 Fenotipo meiótico de los mutantes <i>Bub1</i> ^{KD/KD} | 98 |
| 3.1.1 La meiosis-I en espermatoцитos <i>Bub1</i> ^{KD/KD} : errores en el alineamiento y la segregación cromosómica | 98 |
| 3.1.2 Distribución de las proteínas de la vía BUB1 en espermatoцитos <i>Bub1</i> ^{KD/KD} en metafase-I..... | 103 |
| 3.1.3 Distribución de las proteínas de la vía Haspina en espermatoцитos <i>Bub1</i> ^{KD/KD} en metafase-II..... | 104 |
| 3.1.4 La meiosis-II en espermatoцитos <i>Bub1</i> ^{KD/KD} : errores en el alineamiento y aparición de diploidías .. | 106 |
| 3.1.5 Distribución de las proteínas de las vías BUB1y Haspina en espermatoцитos <i>Bub1</i> ^{KD/KD} en metafase-I | 108 |
| 3.1.6 Producción de espermátidas aberrantes en machos <i>Bub1</i> ^{KD/KD} | 112 |
| 3.1.7 Fenotipo meiótico de los oocitos <i>Bub1</i> ^{KD/KD} | 115 |
| ➤ Alteración del SAC y la cohesión en oocitos <i>Bub1</i> ^{KD/KD} | 115 |
| ➤ Distribución de las proteínas H2AT120ph, SGO2 y Aurora B/C en oocitos <i>Bub1</i> ^{KD/KD} en metafase-I | 116 |
| 4. Análisis del efecto de la inhibición de la quinasa Haspina en la meiosis de ratón | 118 |
| 4.1 Estudio de la inhibición química de la actividad quinasa de Haspina en espermatoцитos | |
| WT | 118 |
| 4.1.1 Puesta a punto de la inhibición de Haspina con LDN-192960 en cultivos de túbulos seminíferos . | 120 |
| 4.1.2 Análisis de la inhibición de Haspina en metafase-I..... | 120 |

| | |
|--|------------|
| 4.1.3 Efecto de la inhibición de Haspina sobre proteínas del DCI en metafase-I | 124 |
| 4.1.4 Análisis de la inhibición de Haspina en metafase-II..... | 126 |
| 4.1.5 Efecto de la inhibición de Haspina sobre proteínas del DCI en metafase-II | 129 |
| 4.2 Estudio de la inhibición química de la actividad quinasa de Haspina en espermatoцитos <i>Bub1^{KD/KD}</i> | 129 |
| 4.2.1 Análisis de la inhibición de la quinasa Haspina en espermatoцитos <i>Bub1^{KD/KD}</i> | 129 |
| 4.2.2 Efecto de la inhibición de Haspina sobre espermatoцитos <i>Bub1^{KD/KD}</i> en la dinámica de las proteínas del DCI en metafase-I | 130 |
| 4.2.3 Efecto de la inhibición de Haspina sobre espermatoцитos <i>Bub1^{KD/KD}</i> en la dinámica de las proteínas del DCI en metafase-II | 134 |
| DISCUSIÓN | 137 |
| 1. Ensamblaje del DCI en la meiosis masculina de ratón..... | 139 |
| 1.1 Vía de señalización de BUB1 en la meiosis de ratón | 139 |
| 1.1.1. Distribución de la quinasa BUB1 en espermatoцитos | 139 |
| 1.1.2. Distribución de la variante H2AT120ph en espermatoцитos..... | 140 |
| 1.1.3. Distribución de las proteínas SGO2 y MCAKph en espermatoцитos | 140 |
| 1.1.4. Orden de reclutamiento de las proteínas de la vía BUB1 en espermatoцитos..... | 142 |
| 1.2 Vía de señalización de Haspina en la meiosis de ratón | 142 |
| 1.2.1. Distribución de la quinasa Haspina en espermatoцитos | 143 |
| 1.2.2. Distribución de la variante H3T3ph en espermatoцитos | 144 |
| 1.2.3. Distribución y ensamblaje en el centrómero de las proteínas del CPC en espermatoцитos | 144 |
| 2. Distribución de las proteínas del DCI en la meiosis femenina de ratón..... | 146 |
| 3. Interacción de las vías de la Red Interna del Centrómero en la meiosis de ratón | 147 |
| 3.1 <i>Bub1^{KD/KD}</i> : Efecto de la inhibición de la actividad quinasa de BUB1 en espermatoцитos | 147 |
| 3.1.1 Alteración en la dinámica de SGO2 en metafases-I y -II | 147 |
| 3.1.2. Problemas de alineamiento y segregación en metafases-I y -II | 149 |
| 3.1.3. Espermatoцитos secundarios diploides y espermátidas aberrantes..... | 150 |
| 3.2 <i>Bub1^{KD/KD}</i> : Efecto de la inhibición de la actividad quinasa de BUB1 en oocitos | 153 |
| 3.3 Efecto de la inhibición química de la actividad quinasa de Haspina en cultivos de túbulos seminíferos | 153 |
| 3.3.1 Problemas de alineamiento y reclutamiento de Aurora B/C | 153 |
| 3.3.2. Alteración en el número de polos celulares | 154 |
| 3.4 Efecto de la doble inhibición de las quinasas BUB1 y Haspina en cultivos de túbulos seminíferos | 155 |
| 4. Modelo de reclutamiento e interacción de la Red Interna del Centrómero en la meiosis de ratón..... | 156 |
| CONCLUSIONS | 159 |
| CONCLUSIONES | 163 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 167 |
| ANEXOS..... | 187 |
| Anexo 1. Figuras suplementarias | 189 |
| Anexo 2. Tablas..... | 198 |
| Anexo 3. Esquemas suplementarios..... | 203 |
| Anexo 4. Trabajo en revisión El Yakoubi <i>et al.</i> , 2017 | 209 |

A B S T R A C T

Abstract

Meiosis is the specialized cell division that produces gametes. One of the main events that ensure the correct progression of meiosis is chromosome segregation, a highly regulated process where the centromeres play a crucial role. Two functional domains, the kinetochore and the inner centromere domain (ICD) constitute this chromosome region. The interplay of two signaling pathways -BUB1-H2AT120ph-SGO1/2 and Haspina-H3T3ph-CPC- regulates the Inner Centromere signaling Network (ICN) at the ICD. In this network two post-translational histone modification (PTMs), H2AT120ph and H3T3ph, are necessary for the Chromosome Passenger Complex (CPC) and Shugoshin 1 (SGO1) recruitment to the centromeres in mitosis, however there are essential gaps about its knowledge in meiosis. This Thesis has aimed to understand the ICN of mammalian meiosis using both a cytological and a functional approach.

From the descriptive perspective, our results show that BUB1-H2AT120ph-SGO2 pathway only show differences in the centromeric distribution of H2AT120ph between mitosis and meiosis, and also differences in the SGO2 centromeric distribution between male and female meiosis. We also present the distribution of the Haspina-H3T3ph-CPC component. From the functional perspective, we have found that the absence of H2AT120ph does not induce precocious sister separation as SGO2 is redistributed to chromosome arms but some protein remains at centromeres. We suggest that the amount of protein that persists at centromeres is enough to protect centromere cohesion until anaphase-II during both female and male meiosis. However, in males, the absence of H2AT120ph causes subfertility as SGO2 and CPC pattern are altered causing alignment and segregation problems leading to the appearance of aberrant spermatids. On the other hand, Haspin pathway is only implicated in the CPC accumulation at the ICD, but it does not participate in its recruitment, nor in the recruitment of SGO2. Finally, only when both PTMs are abolished neither SGO2 nor CPC are present at the centromeres. We conclude that in male meiosis, the CPC needs the presence of SGO2 at the centromeres for its maintenance, but it does not need the histone mark H2AT120ph. In addition, SGO2 is CPC-independent but H2AT120ph dependent. Altogether, the intersection of both pathways is necessary for the proper recruitment and maintenance of SGO2 to the centromeres in male mouse meiosis.

R E S U M E N

Resumen

La meiosis es la división celular especializada por la cual a partir de células germinales diploides se forman células genéticamente diferentes y con el número cromosómico reducido a la mitad (haploides) denominadas gametos. Uno de los eventos de mayor relevancia a lo largo de la meiosis es la segregación de los cromosomas homólogos (meiosis-I) y de las cromátidas hermanas (meiosis-II). La segregación cromosómica es un proceso altamente regulado que está dirigido por los centrómeros. Esta región cromosómica está constituida por dos dominios funcionales, el cinetocoro y el dominio centromérico interno (DCI). En el DCI tiene lugar una red de señalización celular denominada Red Interna del Centrómero (RIC) a través de la cual son reclutados dos complejos proteicos esenciales para la regulación de la segregación, el Complejo Cromosómico Pasajero (CPC) y el complejo Shugoshina-PP2A (SGO-PP2A). Esta red está constituida por dos vías principales de señalización, las denominadas vía BUB1-H2AT120ph-SGO1/2 y vía Haspina-H3T3ph-CPC, cuyo punto central consta de modificaciones post-traduccionales en dos histonas, la H2AT120ph y la H3T3ph. Dado que ambas vías han sido ampliamente estudiadas en mitosis, en esta Tesis Doctoral se presenta el estudio citológico y funcional de la RIC en la meiosis de ratón.

Nuestros resultados muestran que en la meiosis de ratón, la vía de señalización BUB1-H2AT120ph-SGO2, parece presentar un patrón de reclutamiento similar al observado en mitosis. Sin embargo, la ruta iniciada por Haspina está implicada en la acumulación del CPC a nivel del DCI y no en su reclutamiento al centrómero, ya que todos los miembros de este complejo son reclutados a la heterocromatina centromérica previamente a la fosforilación de la variante H3T3ph. Además, existen diferencias en cuanto a la distribución centromérica de algunos miembros de ambas vías, como es el caso de H2AT120ph, entre meiosis y mitosis, y de SGO2, entre la meiosis masculina y femenina de ratón.

A nivel funcional, la estrategia que hemos seguido se basa en dos aproximaciones experimentales. En primer lugar, hemos realizado un estudio de la meiosis en ausencia de la actividad quinasa de BUB1 (ratones *Bub1^{KD/KD}*). Los datos extraídos del análisis de machos *Bub1^{KD/KD}* nos han permitido concluir que, del mismo modo que ocurre en mitosis, en ausencia de H2AT120ph en meiosis, la proteína SGO2 se distribuye mayoritariamente en los brazos cromosómicos apareciendo disminuida su presencia en el centrómero. Los datos sugieren que esa pequeña cantidad de proteína pudiera ser suficiente para proteger la cohesión

centromérica hasta la anafase-II ya que no se observa pérdida prematura de la cohesión entre cromátidas hermanas durante la meiosis-I. Además, en ausencia de H2AT120ph, la distribución del complejo CPC en los centrómeros también aparece alterada. Estos resultados aportan una explicación a los problemas de fertilidad que presentan los machos con esta mutación. Por otro lado, en hembras *Bub1^{KD/KD}*, la distribución de SGO2 no se ve alterada, pero sí se reduce su presencia en los centrómeros. No obstante, ese remanente de SGO2 a nivel centromérico parece ser suficiente para que la meiosis en hembras transcurra de manera correcta. A su vez, en los oocitos *Bub1^{KD/KD}* ni la distribución ni la cantidad de Aurora B/C se ve alterada en los centrómeros, conduciendo a una fertilidad normal. Por otro lado, la segunda aproximación experimental utilizada ha consistido en inhibir *in vitro* la actividad quinasa de Haspina en espermatoцитos en cultivo con el inhibidor químico LDN-192960. Estos experimentos demuestran que Haspina es responsable de generar la modificación H3T3ph en la meiosis de machos, y que en ausencia de esta variante histónica no aparecen alteraciones en la distribución de SGO2 en los centrómeros, pero sí en la del complejo CPC, lo cual provoca problemas en el alineamiento de los bivalentes y cromosomas en metafase-I y metafase-II, respectivamente.

Por último, tras la combinación de ambas estrategias, es decir, mediante el tratamiento con LDN sobre espermatoцитos *Bub1^{KD/KD}*, se consigue inhibir las dos quinasas responsables de generar las variantes H2AT120ph y H3T3ph, induciendo que tanto el CPC como SGO2 no sean reclutados al DCI. En conjunto, estos datos parecen indicar que en la meiosis de ratón el reclutamiento del CPC al DCI depende no sólo de la modificación H3T3ph, sino de la presencia de SGO2 en el centrómero, ya que en presencia de la variante H2AT120ph y en ausencia de SGO2, el CPC aparece alterado. Por el contrario, la localización de SGO2 en el DCI depende de las variantes H2AT120ph y H3T3ph, pero no de la presencia del CPC.

INTRODUCCIÓN

Introducción

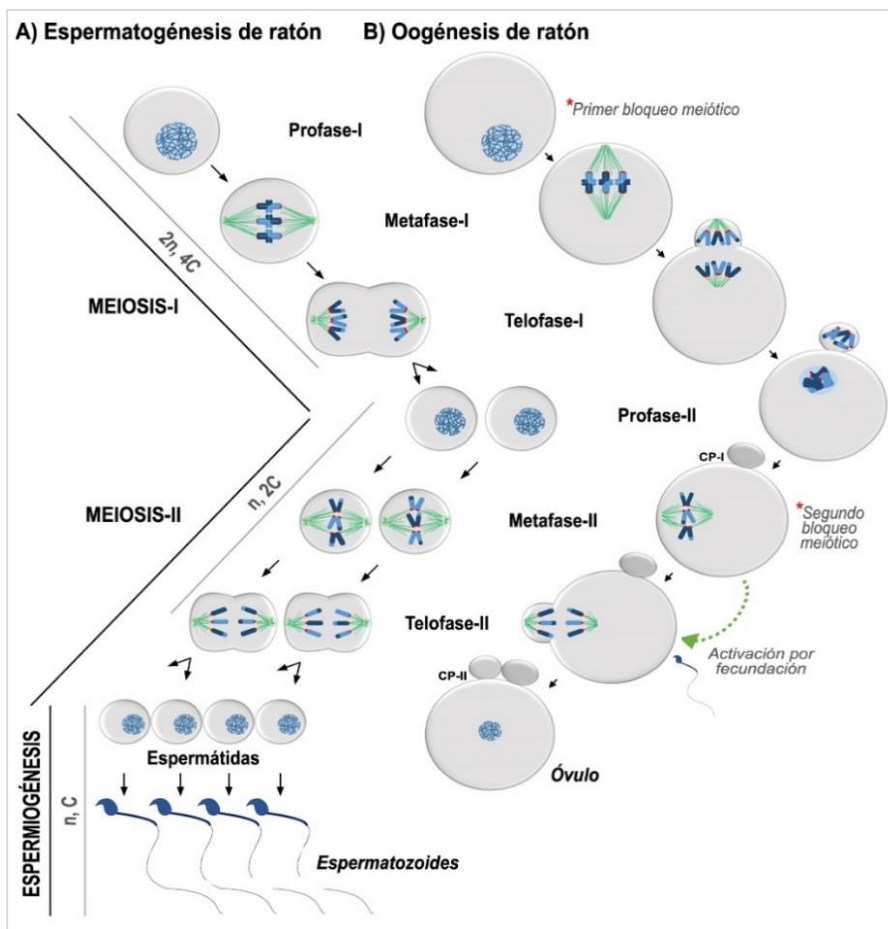
1. Meiosis

La meiosis es el proceso por el cual a partir de una célula progenitora diploide, y tras dos rondas de división celular consecutivas con un único suceso de replicación previa del ADN, se obtienen cuatro células haploides genéticamente diferentes entre sí llamadas gametos. En los organismos superiores animales, la meiosis tiene lugar en los órganos sexuales dentro de un proceso denominado **gametogénesis**. Dependiendo del tipo de gameto que se forme durante este proceso, hablaremos de **oogénesis** o de **espermatogénesis**. La gametogénesis comienza con una etapa proliferativa donde la población de células precursoras o **gonias** aumenta. Tras este período proliferativo, las gonias entran en meiosis y adquieren el nombre de **meiocitos**, **oocitos** en el caso de la meiosis femenina, y **espermaticitos** en el caso de la meiosis masculina. Al finalizar el proceso meiótico, los meiocitos sufren una serie de transformaciones morfológicas que les otorgarán la capacidad de ser fecundados en el caso de los gametos femeninos, denominados **óvulos**, o de fecundar en el caso de los gametos masculinos, los **espermatozoides**.

La formación de óvulos y espermatozoides presenta características diferenciales tanto a nivel citológico como temporal. La oogénesis tiene lugar en las gónadas femeninas, los ovarios. Durante la gestación del individuo hembra son generados todos los oocitos, quedando bloqueada la oogénesis en mamíferos en las primeras etapas de la meiosis desde el nacimiento del individuo hasta su maduración sexual. A partir de esta maduración sexual de la hembra se reactivará el proceso meiótico y, dependiendo de la especie, irán madurando entre uno y varios óvulos por ciclo menstrual. Sin embargo, en el caso de los machos, la espermatogénesis tiene lugar en las gónadas masculinas, los testículos, y se inicia con la maduración sexual del individuo. A partir de este momento se formarán los gametos masculinos de manera continuada a lo largo de toda la vida del individuo. Junto con esta disparidad temporal, los gametos masculinos y femeninos también presentan diferencias citológicas. Como resultado de la oogénesis se obtiene una única célula germinal redondeada y de gran tamaño, el óvulo, quedando las otras dos o tres células resultantes de la meiosis como corpúsculos polares (CPs) que acaban degenerando en las primeras etapas del desarrollo temprano del embrión. Por otro lado, la espermatogénesis resulta en la formación de cuatro espermatozoides, a partir de una misma

espermatogonia, células pequeñas cuya característica principal es la motilidad (Li y Albertini, 2013; Svingen y Koopman, 2013; MacLennan *et al.*, 2015; Teletin *et al.*, 2017) (Esquema 1).

La meiosis presenta dos divisiones celulares, la denominada **meiosis-I o primera división meiótica** durante la cual tiene lugar la segregación de los cromosomas homólogos recombinados, y la **meiosis-II o segunda división meiótica** en la cual segregan las cromátidas hermanas de dichos cromosomas recombinados. Ambas divisiones se dividen en las etapas de profase, prometafase, metafase, anafase y telofase.



Esquema 1. Representación gráfica de la espermatogénesis y la ovogénesis en ratón.

Se muestra la comparativa entre la gametogénesis masculina y femenina de ratón desde el inicio de la meiosis hasta la formación de los gametos. El citoplasma aparece en gris, la cromatina en azul, los cinetocoros en rojo y los microtúbulos en verde. Los asteriscos rojos indican los bloqueos meióticos que sufren los oocitos en las etapas de dictiotena (primer bloqueo) y metafase-II (segundo bloqueo). Los corpúsculos polares aparecen indicados (CP-I y CP-II).

1.1. PRIMERA DIVISIÓN MEIÓTICA

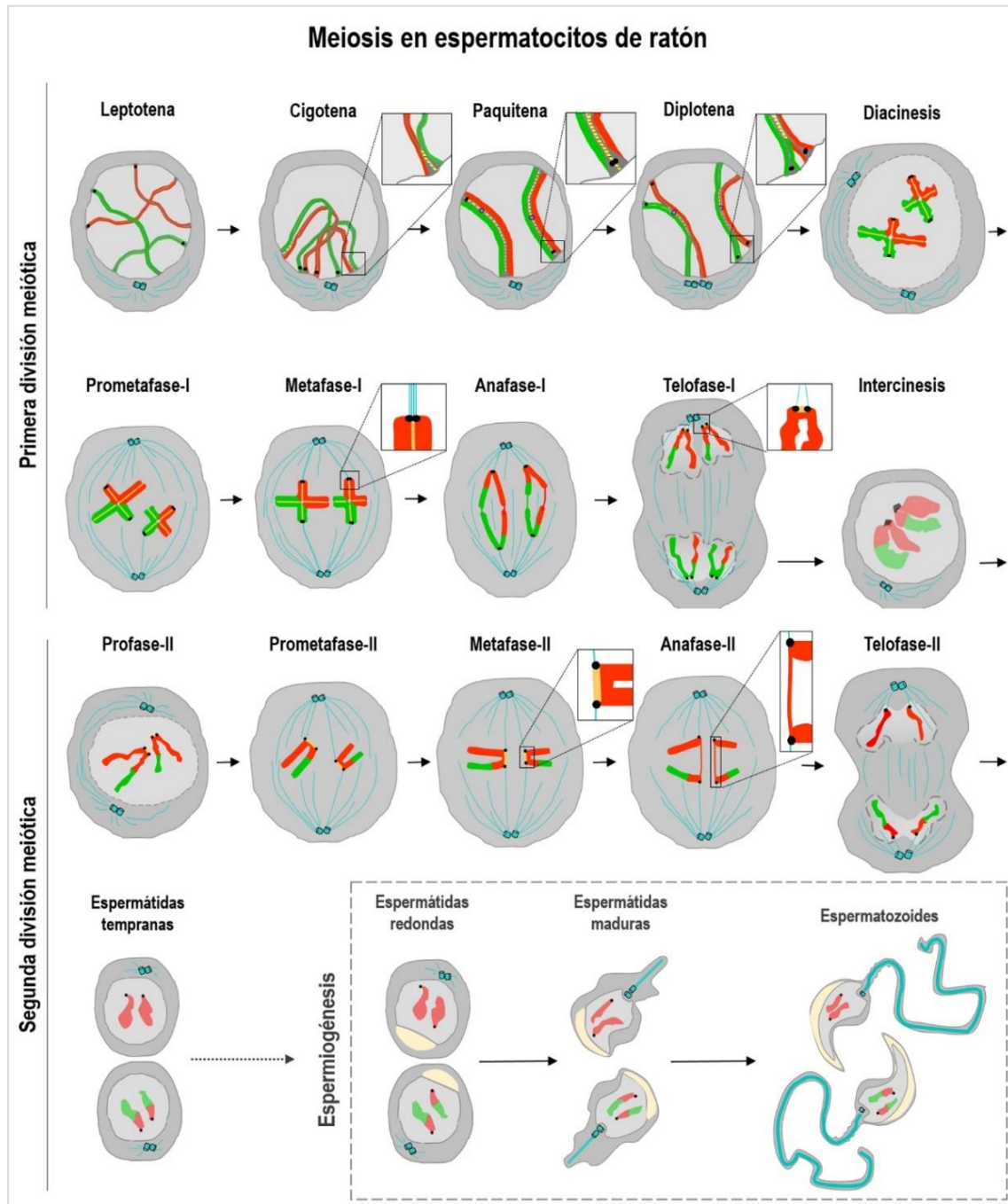
Tras la replicación del ADN y el establecimiento de los complejos de cohesina (CC) entre las cromátidas hermanas (Suja y Barbero, 2009; Peters y Nishiyama, 2012) durante la fase S de la interfase premeiótica, los meiocitos están listos para cursar la primera división meiótica, en la cual tendrá lugar una primera segregación cromosómica de tipo reduccional. Como resultado de la primera división meiótica, se obtienen meiocitos secundarios con una dotación cromosómica haploide (n) y con una carga de ADN 2C (Esquema 1).

La profase-I meiótica constituye la etapa más larga y de mayor complejidad de la meiosis. En concreto en la especie *Mus musculus* estudiada en esta Tesis Doctoral, la profase-I tiene una duración de alrededor de una semana en machos (Oakberg, 1956; Griswold, 2016; Soh *et al.*, 2017) y unos 10 días en hembras hasta el bloqueo de todos los oocitos en la etapa de diplotena difusa o dictiotena (Borum, 1961; MacLennan *et al.*, 2015; Dutta *et al.*, 2016). La extensión en la duración de esta etapa es debida a que durante la profase-I tienen lugar una serie de acontecimientos fundamentales como son los procesos de apareamiento entre homólogos (reconocimiento de las parejas de cromosomas homólogos entre sí), su sinapsis (la unión física entre ellos), la recombinación entre hebras homólogas de ADN (intercambio de material genético entre homólogos) y la desinapsis (separación física de los homólogos tras la recombinación). Estos procesos son esenciales para que tengan lugar correctamente las dos divisiones celulares consecutivas posteriores. Para una mejor comprensión de los diferentes procesos que engloba, la profase-I se ha subdividido en cinco subetapas: leptotena, cigotena, paquitena, diplotena y diacinesis.

En la etapa de **leptotena**, los cromosomas se encuentran unidos a la envoltura nuclear (EN) por sus telómeros y empiezan a desplazarse por el núcleo en busca de su homólogo en el proceso denominado apareamiento cromosómico. Al mismo tiempo, sobre cada cromosoma se forma una estructura proteica axial, el denominado Elemento Axial (EA). A su vez, se inicia el proceso de recombinación por el que se producen roturas de doble hebra en ambos cromosomas y comienzan a asociarse diferentes enzimas que promoverán el intercambio de material genético entre homólogos (Lam y Keeney, 2014).

Durante la etapa de **cigotena** comienza la sinapsis entre cromosomas homólogos. Los cromosomas adoptan una disposición denominada en *bouquet* (ramo en francés) al concentrarse todos los telómeros en una región concreta de la EN. Esta conformación espacial favorece el apareamiento y el inicio de la sinapsis entre las parejas de cromosomas homólogos mediante la formación de un complejo proteico que estabiliza la unión física entre ellos, el denominado **complejo sinaptonémico (CS)** (Page y Hawley, 2004). Este complejo proteico tiene una estructura tripartita que se forma a partir de la interacción entre los dos EAs de cada pareja de cromosomas homólogos, uno por cromosoma, que al formar parte ya del CS, pasan a llamarse Elementos Laterales (ELs). Los ELs se disponen paralelos entre sí para establecer

contacto a través de una serie de Filamentos Transversos (FTs), sobre los cuales se ensambla el tercer elemento del CS, el Elemento Central (EC) (Westergaard y von Wettstein, 1972).



Esquema 2. Etapas de la meiosis y de la espermiogénesis de ratón.

Se muestra dos parejas de cromosomas homólogos en las diferentes etapas de la meiosis. Los cromosomas paternos se representan en rojo y los maternos en verde. El citoplasma aparece en gris oscuro y el nucleoplasma en gris claro. Los MTs y los centriolos están en azul. Los cinetocoros se muestran como esferas negras. Los EA/ELs de los cromosomas se han dibujado en gris y el EC en amarillo. Los detalles ampliados en las etapas de la profase-I muestran la interacción de los telómeros de los cromosomas con la EN. En las etapas de paquitena y diplotena aparecen dibujadas bolas rosas representando los nódulos de recombinación tardíos en los puntos de quiasma. Los detalles en las etapas de metafase-I y telofase-I representan la orientación sintética de los cinetocoros hermanos. En las etapas de la espermiogénesis se representa en amarillo el acrosoma. El esquema ha sido adaptado del original realizado por la Dra. Rocío Gómez y se utiliza bajo su autorización.

Una vez completada la sinapsis en toda la longitud de los cromosomas homólogos autosómicos, y en la región pseudoautosómica (PAR) del par sexual XY, se puede hablar ya de la etapa de **paquitena**. Las parejas de cromosomas homólogos se encuentran por tanto sinapsadas en toda su longitud y el CS se extiende de telómero a telómero. Esta unión física de dos cromosomas homólogos unidos por el CS se denomina **bivalente**. Durante esta etapa tiene lugar la maduración de los nódulos de recombinación, puntos donde se han acumulado enzimas encargadas de realizar el intercambio de material genético entre cromátidas homólogas formándose sobrecruzamientos o *crossing-overs* (Lam y Keeney, 2014).

En **diplotena** tiene lugar el desensamblaje del CS o desinapsis, quedando cada par de homólogos unidos únicamente por los quiasmas, regiones citológicas en donde se ha producido la recombinación. Al unísono, los bivalentes comienzan a condensar su cromatina.

En **diacinesis** la condensación cromosómica se hace progresivamente más evidente y al final de esta etapa se produce la desorganización de la EN para favorecer la interacción de los bivalentes con los microtúbulos (MTs) provenientes del huso. Es interesante mencionar, que tal y como se ha comentado previamente, en hembras, la profase-I meiótica y, por tanto, todos los eventos que transcurren durante ésta, tienen lugar en etapas embrionarias, quedando todos los oocitos bloqueados hasta la maduración sexual del individuo en una etapa equivalente a diacinesis denominada **dictiotena** (Borum, 1961; Dutta *et al.*, 2016).

Tras una **prometáfase-I** en la que se producen movimientos cromosómicos encaminados al alineamiento de los bivalentes, en **metáfase-I** los bivalentes alcanzan su grado máximo de condensación y se alinean en la placa metafásica. Los cinetocoros hermanos de cada cromosoma homólogo actúan como una misma unidad funcional gracias a diversas proteínas que favorecen la cohesión intercinetocórica, de manera que, una vez interaccionan con MTs del huso, quedan orientados sintéticamente hacia el mismo polo. Así, las parejas de cinetocoros hermanos de cada bivalente quedan orientadas hacia polos opuestos.

Durante las etapas de **anafase-I** y **telofase-I** tiene lugar la segregación de los cromosomas homólogos recombinados hacia polos opuestos de la célula, llevándose a cabo por tanto una **segregación cromosómica reduccional**. En la transición metafase-I a anafase-I se produce la pérdida de la cohesión entre cromátidas hermanas a nivel braquial (Gomez *et al.*, 2013), de manera que los cromosomas homólogos recombinados que migran a polos opuestos mantienen sus cromátidas hermanas unidas únicamente a nivel del centrómero. La primera división

meiótica culmina con la llegada de los juegos de cromosomas a cada polo en telofase-I, y con la descondensación de la cromatina y la reorganización de la EN en cada núcleo hijo. De esta manera, como resultado de la primera división meiótica reduccional, se obtienen dos células con la mitad de la dotación cromosómica de la especie (n) y una carga cromosómica $2C$, al presentar dos cromátidas por cromosoma (Esquema 2).

1.2. SEGUNDA DIVISIÓN MEIÓTICA

Tras una etapa intermedia entre las dos divisiones meióticas denominada **intercinesis**, que sólo ocurre en machos, en la cual no se produce una segunda ronda de replicación de ADN, los meiocitos secundarios cursan la segunda división meiótica, tras la cual mantienen la dotación cromosómica haploide (n) pero reducen la carga de ADN $2C$ a C .

La **profase-II**, al contrario de lo que ocurre con la profase-I, es una etapa rápida en la que se produce la condensación progresiva de los cromosomas y que termina con la desorganización de la EN.

Tras la desorganización de la EN, los cromosomas oscilan realizando movimientos de congregación hasta alinearse en placa en **metafase-II**. Los cinetocoros hermanos de cada cromosoma aparecen individualizados e interaccionan con MTs provenientes de polos opuestos de manera que los cromosomas quedan dispuestos en la placa metafásica con los cinetocoros biorientados de manera anfitélica sometidos a la tensión que ejerce el huso proveniente de polos opuestos de la célula.

En **anafase-II** y **telofase-II**, las cromátidas hermanas de cada cromosoma segregan hacia los polos opuestos de la célula, llevándose a cabo por tanto una segregación cromosómica ecuacional, similar a la mitosis. Cuando las cromátidas llegan a polos opuestos de la célula en telofase-II, se produce la descondensación de la cromatina y la reorganización de la EN, seguida de la posterior citocinesis de la célula. Así, al finalizar la segunda división meiótica, se dará lugar a la formación de gametos haploides (n) y con una carga de ADN C , es decir, una cromátida por cromosoma. En el caso de la espermatogénesis, los espermatozoides secundarios que se obtienen tras la meiosis sufrirán un proceso de maduración y diferenciación celular denominado **espermioogénesis** que capacitará a los espermatozoides con facultades fecundativas como la motilidad o la formación del acrosoma (Gervasi y Visconti, 2017) (Esquema 2).

2. Modificaciones post-traduccionales de histonas

Las histonas son proteínas estructurales básicas encargadas de la organización del material genético en los eucariotas, constituyendo las unidades básicas de condensación de la cromatina, los nucleosomas. Estas estructuras están formadas por un octámero de histonas, compuesto por dos moléculas de cada una de las denominadas histonas canónicas (H2A, H2B, H3 y H4) (McGhee y Felsenfeld, 1980) sobre el cual se enrollan dos vueltas de ADN. Sin embargo, cada histona canónica, excepto la histona H4, presenta varios subtipos, las denominadas **variantes estructurales**, que están codificadas por diferentes genes y difieren, principalmente, en la longitud de su secuencia aminoacídica (Kamakaka y Biggins, 2005). Esta homología de secuencias entre las histonas canónicas y las variantes estructurales permite su intercambio en los nucleosomas a lo largo del desarrollo embrionario y la diferenciación celular, proporcionando características funcionales específicas a la cromatina en las regiones donde se localizan (Kamakaka y Biggins, 2005).

En los extremos de los dímeros de histonas quedan dos colas desplegadas correspondientes a los extremos N- y C-terminal de cada histona, tanto canónica como sus variantes (Luger *et al.*, 1997). Estos extremos están expuestos a la acción de las enzimas modificadoras de histonas, las cuales generarán diferentes modificaciones covalentes o **modificaciones post-traduccionales de histonas** (H-PTMs, del inglés *Histone-Post-Translational Modifications*), que tendrán un papel fundamental en la regulación de la dinámica de la cromatina y, por tanto, de los procesos celulares en los que está implicada.

2.1. EL CÓDIGO DE HISTONAS

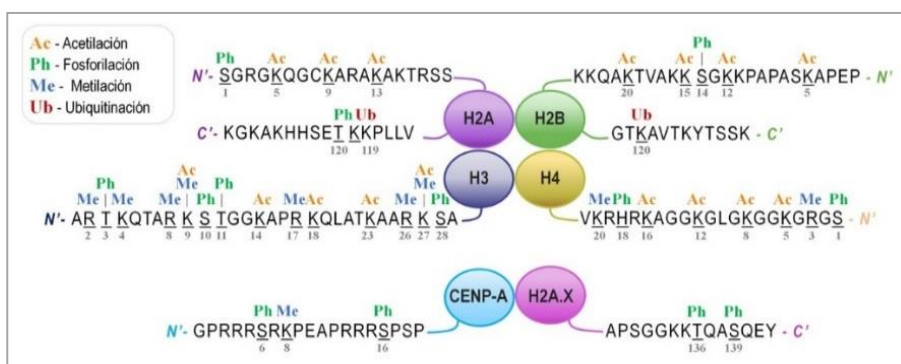
Las H-PTMs actúan de manera secuencial y/o combinatorial formando el denominado **código de histonas**, el cual es reconocido por otras proteínas encargadas de inducir una respuesta celular (Strahl y Allis, 2000; Jenuwein y Allis, 2001). Alteraciones en el código de histonas puede dar lugar a fallos en procesos celulares y, en consecuencia, desencadenar enfermedades en humanos, principalmente cáncer (Munshi *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2009).

Existen varios tipos de H-PTMs, siendo las más estudiadas las metilaciones, fosforilaciones, acetilaciones y ubiquitinaciones (Bhaumik *et al.*, 2007; Latham y Dent, 2007). Sin embargo, y dada su relevancia en la regulación de los procesos celulares, en los últimos años se han descrito

un gran número de H-PTMs nuevas como son las sumoilaciones, ribosilaciones, biotilaciones, citrulaciones e isomerizaciones de prolina (Histone Database 2.0, NCBI) (Esquema 3).

Las **acetilaciones** y las **metilaciones** son las H-PTMs más estudiadas dada su relación con la actividad génica (Eberharter y Becker, 2002; Oliver y Denu, 2011). En los centrómeros de mamíferos, una de las metilaciones más estudiadas es la triple metilación en el residuo de lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3). La H3K9me3 es catalizada por la metiltransferasa Suv39h y ha sido identificada, junto a la trimetilación en la lisina 20 de la histona H4 (H4K20me3), como un marcador constitutivo de la heterocromatina en los centrómeros (Kourmouli *et al.*, 2004; Schotta *et al.*, 2004). A su vez, la H3K9me3 en meiosis parece participar en la inactivación de los cromosomas sexuales (Khalil *et al.*, 2004).

Otro tipo de H-PTMs muy relevante en los procesos biológicos son las **fosforilaciones**. Una de las más estudiadas y utilizadas es la fosforilación de la histona H3 en la serina 10 (H3S10ph) por acción de la quinasa Aurora B (Giet y Glover, 2001). Esta H-PTM está implicada en la condensación, segregación, cohesión y expresión génica (Cerutti y Casas-Mollano, 2009; Hayashi-Takanaka *et al.*, 2009). Otra H-PTM de gran relevancia es la fosforilación en la serina 139 de la variante estructural H2AX (γ H2AX). La variante γ H2AX ha sido identificada como un marcador de dobles roturas de ADN, participando en los mecanismos meióticos de recombinación génica (Pilch *et al.*, 2003; Scully y Xie, 2013), inactivación de los cromosomas sexuales (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003; Turner *et al.*, 2004) y en el silenciamiento de la cromatina asinapsada (Turner *et al.*, 2005).



Esquema 3. Modificaciones post-traduccionales de histonas.

Representación gráfica de algunas de las H-PTMs de las histonas canónicas y las variantes estructurales CENP-A y γ -H2AX más estudiadas.

Aunque actualmente las principales líneas de investigación sobre el código de histonas estudian la relación de estas modificaciones epigenéticas y el desarrollo de enfermedades como el cáncer (Bhaumik *et al.*, 2007; Fullgrabe *et al.*, 2011; Kummar *et al.*, 2012; Di Cerbo y Schneider, 2013), las H-PTMs también juegan un papel fundamental en la correcta formación

de los gametos. En la gametogénesis de mamíferos, las H-PTMs están implicadas en la regulación diferentes aspectos como la condensación y segregación de los cromosomas en oocitos (Gu *et al.*, 2010), la formación y silenciamiento del cuerpo XY en espermatocitos (Khalil *et al.*, 2004) o en la espermiogénesis en humanos y ratón (Churikov *et al.*, 2004). No obstante, teniendo en cuenta la relevancia de las H-PTMs y sus enzimas modificadoras, los estudios sobre H-PTMs en la meiosis de mamíferos son escasos y dejan muchas incógnitas en el panorama científico.

3. El centrómero

La segregación cromosómica es uno de los acontecimientos celulares de mayor relevancia ya que su finalidad es la correcta distribución del material genético a las células hijas tanto en mitosis como en meiosis. El dominio cromosómico responsable de dirigir este proceso de segregación es el centrómero, el cual tomará parte en importantes eventos como la cohesión entre cromátidas hermanas, el mecanismo que regula la entrada en anafase (SAC, del inglés *Spindle-Assembly Checkpoint*), la unión de los MTs a los cinetocoros y la congregación de los cromosomas a la placa metafásica (Verdaasdonk y Bloom, 2011). Fallos en la estructuración, maduración, o regulación de las funciones centroméricas puede dar lugar a problemas de segregación, inestabilidad cromosómica y/o generación de aneuploidías.

Durante los últimos años, se ha demostrado en diferentes modelos de estudio que la unidad estructural fundamental para la identidad de los centrómeros evolutivamente conservada es la variante estructural de la histona H3 denominada CENP-A (cenH3/CID). Hasta el momento, se pensaba que esta variante histónica formaba parte de heterotetrámeros, también denominados hemisomas, (Dalal *et al.*, 2007; Henikoff y Furuyama, 2012). Sin embargo, estudios recientes revelan que los nucleosomas con CENP-A están constituidos por un octámero de histonas, constituidos por dos moléculas de CENP-A y otras dos moléculas de cada una de las histonas canónicas H4, H2A y H2B (Nechemia-Arbely *et al.*, 2017).

La distribución de CENP-A en los cromosomas de eucariotas ha permitido distinguir diferentes tipos de centrómeros: los denominamos monocentrómeros y los centrómeros difusos u holocentrómeros. La mayor parte de los eucariotas presentan cromosomas monocéntricos, en los cuales el centrómero se localiza en una única región concreta del

cromosoma. Sin embargo, existen algunas especies, como el nematodo *Caenorhabditis elegans*, cuyos cromosomas presentan centrómeros difusos que se extienden a lo largo de todo el cromosoma o gran parte de él, los denominados cromosomas holocéntricos (Guerra *et al.*, 2010; Melters *et al.*, 2012).

Dependiendo de la especie, los cromosomas monocéntricos pueden presentar centrómeros puntuales, caracterizados por una secuencia corta de ADN centromérico (como es el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*), o centrómeros regionales, cuyo ADN centromérico consta de secuencias repetidas en tándem que ocupan regiones que pueden abarcar desde kilobases hasta megabases de ADN (Pluta *et al.*, 1995). Dado que los centrómeros regionales son los más comunes en la mayoría de los eucariotas superiores, su posición dentro del cromosoma ha dado lugar a la clasificación de los cromosomas en cuatro grupos: metacéntricos, submetacéntricos, acrocéntricos y telocéntricos. En el caso del ratón, nuestro modelo de estudio en esta Tesis Doctoral, todos sus cromosomas son telocéntricos presentando un centrómero regional localizado en el extremo terminal del cromosoma, inmediatamente por debajo de los telómeros (Kipling *et al.*, 1991) (Esquema 4).

3.1. IDENTIDAD Y FUNCIÓN DEL CENTRÓMERO

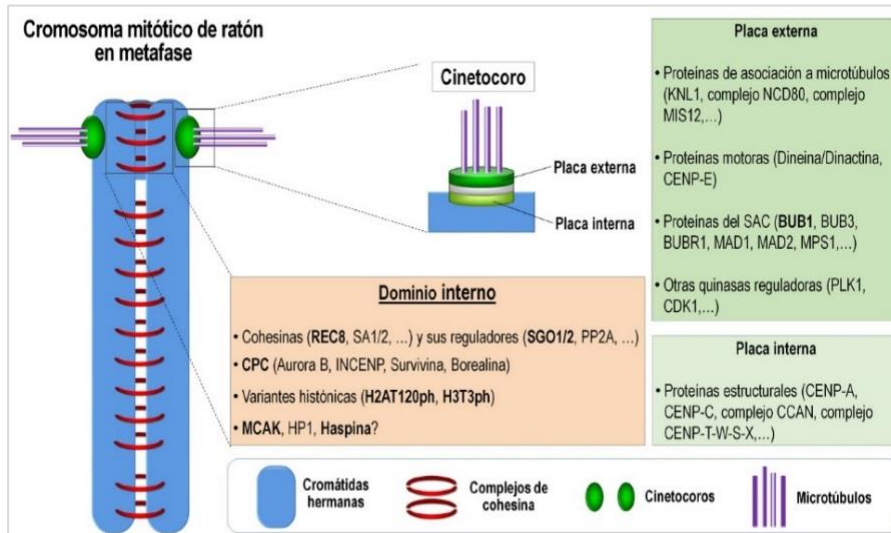
A pesar de que las funciones de los centrómeros están altamente conservadas, la secuencia subyacente de ADN de estos dominios cromosómicos difiere entre especies. En organismos eucariotas superiores, la cromatina centromérica está constituida por repeticiones en tándem de ADN satélite que son específicas de cada especie, pudiendo variar las secuencias y el número de repeticiones. En el genoma de ratón (*Mus musculus*), encontramos dos tipos de secuencias satélite, la secuencia satélite menor, formada por la repetición de unidades de 120 pares de bases (pb) donde se ensambla la proteína CENP-A y la secuencia satélite mayor constituida por unidades de repetición de aproximadamente 234 pb (Guenatri *et al.*, 2004). En este sentido, y aunque estas secuencias repetidas de ADN satélite contribuyen a la estructuración de los centrómeros, existen varias evidencias de que la identidad del centrómero es de naturaleza epigenética. La primera prueba para proponer esta hipótesis se obtuvo a partir del estudio de los centrómeros inactivos de cromosomas humanos dicéntricos, en los cuales aparecían dos regiones de la cromatina con ADN centromérico pero sólo en una de estas regiones se ensamblaba un centrómero completo (Earnshaw y Migeon, 1985). Estudios posteriores demostrando la existencia de neocentrómeros, es decir, centrómeros ectópicos funcionales en

regiones de eucromatina sin secuencias repetitivas de ADN (Marshall *et al.*, 2008), confirmando así la naturaleza epigenética de la identidad y función de los centrómeros, como ya sugirieron previamente (Karpen y Allshire (1997). Ya que los neocentrómeros se forman por la acumulación de nucleosomas de CENP-A en regiones no centroméricas (Marshall *et al.*, 2008), se propuso que la pieza fundamental para el establecimiento de un centrómero es la existencia de la proteína CENP-A, y no necesariamente las secuencias repetidas de ADN. Sin embargo, hay evidencias que proponen que la estructuración del ADN centromérico en secuencias satélite genera un ambiente propicio para la acumulación de H-PTMs que, a su vez, formarán marcas en la cromatina para el reclutamiento en el centrómero de diferentes proteínas con un patrón espacio-temporal determinado. De esta manera, se ha descrito que las secuencias satélites menores acumulan modificaciones epigenéticas como H3K4me2 y H3K36me2 (Sullivan y Karpen, 2004), las cuales servirán de marca para el reclutamiento de la chaperona HJURP, encargada de intercambiar la histona H3 por CENP-A (Dunleavy *et al.*, 2009). En conjunto, estos estudios demuestran que, a pesar de la relevancia del ADN centromérico, para la formación de un centrómero, hasta ahora, la pieza clave que otorga identidad epigenética a estos dominios cromosómicos es CENP-A (McKinley y Cheeseman, 2016).

En resumen, hasta el momento se ha podido esclarecer la participación de varios elementos que otorgan identidad al centrómero: (1) los nucleosomas específicos de centrómero con la variante CENP-A y (2) la acción combinada de H-PTMs, elementos fundamentales que confieren carácter epigenético a dicho dominio; (3) la estructuración del ADN centromérico en secuencias satélite, el cual también juega un papel importante en la generación de un ambiente epigenético; y (4) las proteínas asociadas, que actuarán como efectores de las funciones de este dominio cromosómico. Sin embargo, aún quedan muchas incógnitas por esclarecer sobre los mecanismos moleculares que subyacen a la estructuración y función de los centrómeros mitóticos y meióticos, algunas de las cuales se han pretendido aclarar en esta Tesis Doctoral estudiando las rutas de señalización que permiten el ensamblaje de una serie de proteínas centroméricas durante la meiosis en la especie *Mus musculus*.

3.2. DOMINIOS FUNCIONALES DEL CENTRÓMERO

En mitosis, los centrómeros de vertebrados están constituidos por dos dominios funcionales, el cinetocoro y el dominio interno del centrómero, estando ambos inmersos en la heterocromatina centromérica.



Esquema 4. Dominios funcionales del centrómero

Representación gráfica de un cromosoma telocéntrico de ratón en metafase donde se resaltan los dos dominios funcionales del centrómero, el dominio interno y el cinetocoro, y las proteínas principales que los componen. El esquema ha sido modificado a partir del original realizado por el Dr. José Á. Suja y se utiliza bajo su autorización.

Los **cinetocoros** son estructuras proteicas que se ensamblan en la superficie del centrómero y que están encargadas principalmente de la unión a los MTs del huso, los movimientos de los cromosomas y la regulación del SAC. Mediante estudios de microscopía electrónica se observó que los cinetocoros de vertebrados eran estructuras trilaminares constituidas por las denominadas láminas interna, media y externa (Jokelainen, 1967).

La lámina interna del cinetocoro está constituida por una red de proteínas estructurales constitutivas denominada CCAN (del inglés Constitutive Centromere-Associated Network) (Santaguida y Musacchio, 2009) asociadas a la cromatina centromérica constituida por nucleosomas con la variante CENP-A (Blower *et al.*, 2002; Mellone y Allshire, 2003). El CCAN está constituido por 16 proteínas centroméricas denominadas CENPs (del inglés Centromeric Proteins) y todas ellas requieren la presencia de CENP-A para ser reclutadas (Liu *et al.*, 2006; Hori *et al.*, 2008). Dentro de la red CCAN destacan dos subgrupos de proteínas: el heterotetrámero CENP-T-W-S-X y la proteína CENP-C. Las proteínas CENP-T-W-S-X forman un hemisoma que, junto con los nucleosomas de CENP-A, es necesario para el establecimiento del cinetocoro (Foltz y Stukenberg, 2012; Nishino *et al.*, 2012). En este hemisoma la proteína CENP-T (Cnn1) es necesaria para el reclutamiento del complejo Ndc80, complejo proteico de la lámina externa, a través de su dominio amino-terminal (Schleiffer *et al.*, 2012; Nishino *et al.*, 2013). Junto con la proteína CENP-T, la proteína CENP-C (Mif2/Cnp3) es esencial para el reclutamiento de proteínas de la lámina externa (Przewlaka *et al.*, 2011; Screpanti *et al.*, 2011) (revisado en Hori y Fukagawa, 2012).

Por otro lado, la lámina externa del cinetocoro está compuesta por proteínas motoras y del SAC, las cuales otorgan funcionalidad al cinetocoro. Este conjunto de proteínas necesarias para la interacción del cinetocoro con los MTs constituyen la denominada red KMN (Knl1–Mis12–Ndc80) y son reclutadas a partir de la fase G2 y liberadas al final de la mitosis. La red KMN está constituida por tres componentes, (1) el complejo Ndc80, cuya activación depende de Aurora B, y que está implicado en la interacción con los MTs y de desestabilizar uniones incorrectas (Cheeseman *et al.*, 2006; DeLuca *et al.*, 2006; Welburn *et al.*, 2010), (2) la proteína KNL1, necesaria para el reclutamiento de las proteínas del SAC (Bolanos-Garcia y Blundell, 2011; Caldas y DeLuca, 2014; Ghongane *et al.*, 2014; Krenn *et al.*, 2014), y (3) el complejo Mis12, que interviene como plataforma para el reclutamiento de los otros componentes de la red KMN actuando como nexo entre las dos láminas del cinetocoro (Cheeseman *et al.*, 2006; Petrovic *et al.*, 2010) (revisado en Hori y Fukagawa, 2012).

Entre la lámina interna y externa del cinetocoro, detectadas con microscopía electrónica como dos estructuras electrodensas, se encuentra una región de menor densidad electrónica. Ésta región es la denominada lámina media, la cual se cree que pueda ser un artefacto de la técnica, donde quedan relegadas las regiones de interacción entre las otras dos láminas (Rattner y Bazett-Jones, 1989) (Esquema 4).

El **centrómero interno** o **dominio centromérico interno (DCI)** es la región del centrómero mitótico que se expande entre los cinetocoros hermanos y donde se van a localizar dos H-PTMs, la fosforilación de la histona H2A en el residuo de treonina 120 (H2AT120ph) y la fosforilación de la histona H3 en el residuo de treonina 3 (H3T3ph) (Yamagishi *et al.*, 2010). Ambas modificaciones actúan como señales para el reclutamiento de diferentes proteínas al DCI. Algunos de estos complejos proteicos que han sido localizados en esta región en mitosis son el complejo cromosómico pasajero (CPC), (del inglés *Chromosome Passenger Complex*), el cual participa tanto en los procesos de congregación y alineamiento cromosómicos como en la citocinesis (Ruchaud *et al.*, 2007, 2007; Carmena *et al.*, 2012); los complejos de cohesina (CC), complejos multiproteicos que mantienen asociadas las cromátidas hermanas (Peters *et al.*, 2008; Suja y Barbero, 2009; Peters y Nishiyama, 2012; Remeseiro y Losada, 2013); el complejo formado por la Shugoshina 1/2 (SGO1/2) y la fosfatasa 2A (PP2A), encargado de la protección de los CC de su degradación por Separasa (Kitajima *et al.*, 2004; Watanabe, 2005); y la proteína MCAK (Mitotic centromere-associated kinesin), quinesina implicada en la corrección de uniones

incorrectas de los MTs a los cinetocoros (Maney *et al.*, 1998; Moore y Wordeman, 2004; Ritter *et al.*, 2015) (Esquema 5).

En la meiosis, los centrómeros de vertebrados también presentan los mismos dominios funcionales que en los cromosomas mitóticos, sin embargo, dada la peculiar segregación cromosómica que acontece durante la meiosis (una segregación reduccional seguida de una segregación ecuacional), la conformación de los centrómeros meióticos es especial. En concreto, durante la primera división meiótica, los cinetocoros hermanos de cada cromosoma homólogo han de comportarse como una misma unidad funcional. De este modo, los cinetocoros hermanos quedan asociados entre sí y orientados sintéticamente hacia el mismo polo de la célula. Este fenómeno se ha visto que está regulado por proteínas específicamente meióticas, como es el caso de la proteína MEIKIN (*Meiosis-specific Kinetochore protein*) (Kim *et al.*, 2015). Desde un punto de vista estructural, durante esta primera división meiótica, en cada cromosoma homólogo, el DCI se dispone inmediatamente por debajo de los cinetocoros hermanos asociados, el cual, en los cromosomas de ratón, va a formar una estructura en forma de cono o copa denominada en inglés como *cone-like shape*, que favorece y facilita el mantenimiento de los cinetocoros hermanos mono-orientados (Parra *et al.*, 2006). En anafase-I se inicia una reorganización de los centrómeros de cada cromosoma hasta adquirir una estructura similar a la de los cromosomas mitóticos. Esta reordenación madura progresivamente hasta alcanzar la metafase-II, en la que los cinetocoros hermanos de cada cromosoma se orientan de manera anfitética uniéndose a MTs provenientes de polos opuestos. Esta reorganización centromérica que transcurre desde la primera a la segunda división meiótica es fundamental para que tenga lugar correctamente la segregación cromosómica en meiosis. Sin embargo, y a pesar de su relevancia, existen pocos estudios hasta el momento sobre la estructura y cambio conformacional de los centrómeros durante la meiosis de mamíferos, y por tanto sobre su relación con la segregación de los cromosomas homólogos, durante la meiosis-I, y de las cromátidas hermanas, durante la meiosis-II.

4. Vías de señalización para el ensamblaje del dominio centromérico interno

En los últimos años se ha descrito una red de señalización celular implicada en la regulación de dos de los procesos más relevantes que tienen lugar a nivel del centrómero

mitótico: la corrección de errores de anclaje MTs-cinetocoro, y el mantenimiento de la cohesión entre las cromátidas hermanas hasta anafase. Esta red de señalización denominada Red del Centrómero Interno (RCI) (Tanno *et al.*, 2015; Trivedi y Stukenberg, 2016), está mediada por la interacción de las dos H-PTMs características del DCI, la H2AT120ph y la H3T3ph, las cuales cooperan en el reclutamiento del CPC, cuya subunidad catalítica es Aurora B, y del complejo Shugoshina/PP2A al centrómero (Kawashima *et al.*, 2010; Watanabe, 2010; Yamagishi *et al.*, 2010). Estas dos H-PTMs constituyen el eje de dos vías de señalización principales dentro de la RCI, la vía de señalización para el reclutamiento de la Shugoshina SGO1 o vía BUB1-H2AT120ph-SGO1, y la vía para el reclutamiento del CPC o vía Haspina-H3T3ph-CPC.

4.1. VÍA DE SEÑALIZACIÓN BUB1-H2AT120PH-SGO1/2

En vertebrados, la histona H2A es fosforilada en el residuo de treonina 120 (residuo de treonina 121 en ratón) por la quinasa BUB1 tanto en mitosis como en meiosis, y es la señal que regula el reclutamiento de la proteína SGO1/2 en el DCI (Kawashima *et al.*, 2010; Yamagishi *et al.*, 2010). A continuación, se explican de manera resumida los datos que existen hasta el momento de los diferentes componentes de esta ruta.

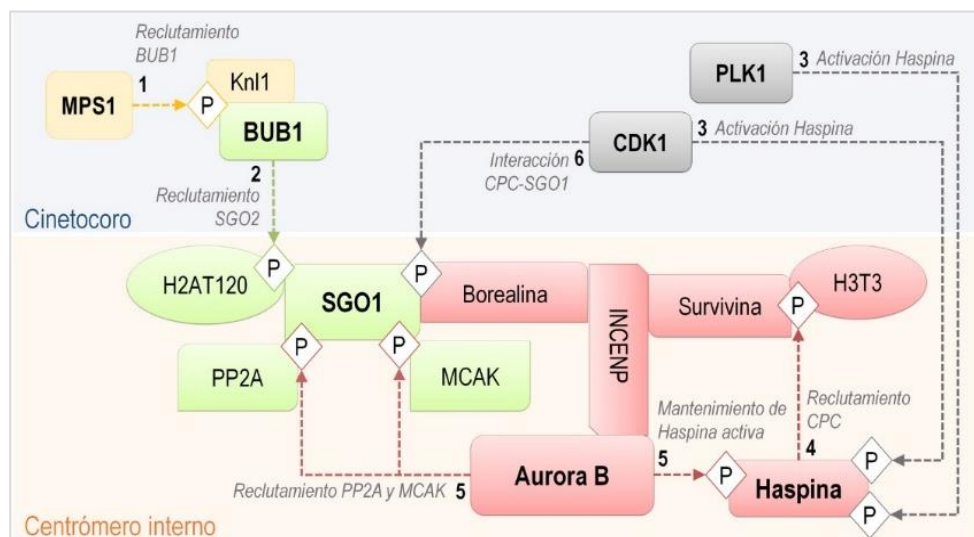
BUB1 (*Budding uninhibited by benzimidazole 1*) es una proteína del SAC con actividad serina/treonina quinasa que juega un papel fundamental en la segregación de los cromosomas. En mitosis, se ha descrito que BUB1 actúa como proteína estructural del cinetocoro, ejerciendo como plataforma para el reclutamiento de otras proteínas del SAC (Sharp-Baker y Chen, 2001; Fernius y Hardwick, 2007). Como proteína quinasa participa en la regulación de la transición metafase/anafase y en el ensamblaje del DCI funcional (Elowe, 2011). Como proteína del SAC, actualmente existe cierta controversia sobre los mecanismos moleculares por los que BUB1 participa en la regulación del SAC. Estudios en diferentes organismos proponen que para la activación del SAC es necesaria la actividad quinasa de BUB1 (Kawashima *et al.*, 2010; Yamagishi *et al.*, 2010). En cambio, otros estudios parecen indicar que la actividad quinasa de BUB1 no es necesaria para la activación del SAC (Warren *et al.*, 2002; Fernius y Hardwick, 2007; Perera *et al.*, 2007; Rischitor *et al.*, 2007; Baker *et al.*, 2009). Recientemente, se ha propuesto que en células humanas el papel de BUB1 es meramente estructural a través del reclutamiento de la proteína CDC20, la cual parece ser la pieza clave para la activación del SAC (Vleugel *et al.*, 2015). A su vez, estudios funcionales complementarios sobre la inhibición de la actividad quinasa de BUB1 apoyan este hecho: los ratones transgénicos con la proteína BUB1 truncada en el dominio

quinasa denominados *Bub1 Kinase-Death* (*Bub1^{KD/KD}*) demuestran que la falta de actividad quinasa y, por tanto, la ausencia de fosforilación de la H2A, afecta parcialmente a la actividad de Aurora B y del SAC (Ricke *et al.*, 2012). Estos mismos resultados se han obtenido recientemente mediante la inhibición química de BUB1 en células humanas, con el uso de los inhibidores BAY-320 y BAY-524 (Baron *et al.*, 2016). Según estos estudios, el dominio quinasa de BUB1 parece estar principalmente relacionado con la fosforilación de la H2A y el establecimiento del DCI funcional, ya que afecta tanto a la actividad de la Aurora B como al reclutamiento de SGO1 y SGO2 al centrómero (Watanabe y Kitajima, 2005; Fernius y Hardwick, 2007; Kawashima *et al.*, 2010; Ricke *et al.*, 2012). Además, para que la fosforilación de la H2A tenga lugar en el DCI, es necesaria la autofosforilación de BUB1 en el residuo de treonina 589. Dicha modificación de BUB1 (BUB1T589ph) parece estar implicada en la regulación del reclutamiento de BUB1 al cinetocoro (Asghar *et al.*, 2015).

La variante **H2AT120ph** es generada por la actividad quinasa de BUB1 (Kawashima *et al.*, 2010). Esta H-PTM fue descrita por primera vez en *Drosophila melanogaster*, donde el residuo de treonina conservado que es fosforilado ocupa la posición 119 (Aihara *et al.*, 2004), mientras que en mamíferos se encuentra en la 120 (Ivanovska *et al.*, 2005) y en levaduras en la serina 121 (Kawashima *et al.*, 2010). Esta modificación está implicada en el reclutamiento de SGO (Kawashima *et al.*, 2010; Ricke *et al.*, 2012) y del CPC al DCI (Yamagishi *et al.*, 2010; Ricke *et al.*, 2012). La inhabilitación de la fosforilación de H2A en los residuos mencionados provoca la deslocalización de SGO del centrómero tanto en levaduras (Kawashima *et al.*, 2010) como en cultivos somáticos de ratón (Ricke *et al.*, 2012).

Shugoshina (SGO) es una proteína centromérica encargada de la protección de los CC de su degradación hasta la transición metafase/anafase en mitosis, y hasta la transición metafase-II/anafase-II en meiosis (Watanabe, 2005; Javerzat, 2010). En mamíferos existen dos proteínas parálogas, Shugoshina 1 (SGO1), la cual es predominante en mitosis, y Shugoshina 2 (SGO2), cuya función se restringe principalmente a la meiosis (Lee *et al.*, 2008). SGO1/2 forma un complejo con la fosfatasa PP2A, la cual impedirá la degradación de los CC centroméricos hasta la anafase en mitosis y hasta la anafase-II en meiosis (Tanno *et al.*, 2010; Rattani *et al.*, 2013). En mitosis, la unión PP2A-SGO1 depende de la acción de la quinasa CDK1, la cual fosforila a SGO1 en el residuo de treonina 346 mediando la formación del complejo SGO1-PP2A (Liu *et al.*, 2013). En el caso de SGO2, es la Aurora B la que media dicha unión (Rattani *et al.*, 2013). Ambas

proteínas se localizan en el DCI desde profase hasta anafase en mitosis (Tanno *et al.*, 2010), y en meiosis desde diplotena hasta anafase-II (Gomez *et al.*, 2007). Además de su función como protectores de la cohesión centromérica, SGO1/2 actúan como plataforma para el reclutamiento de proteínas al DCI regulando diferentes aspectos de la dinámica del centrómero (Gomez *et al.*, 2007; Gutierrez-Caballero *et al.*, 2011; Rattani *et al.*, 2013). Tanto en mitosis como en meiosis, SGO1/2 reclutan a la quinesina MCAK (Huang *et al.*, 2007; Llano *et al.*, 2008; Tanno *et al.*, 2010; Rattani *et al.*, 2013). A su vez, estudios en levaduras y células humanas han demostrado que SGO1 está directamente relacionada con el reclutamiento y/o el mantenimiento del CPC al DCI (Kawashima *et al.*, 2007; Vanoosthuyse *et al.*, 2007; Tsukahara *et al.*, 2010; Tanno *et al.*, 2015; Baron *et al.*, 2016). Por otro lado, estudios en *Xenopus laevis* y ratón muestran que en meiosis, SGO2 parece estar implicada en el reclutamiento de Mad2, un componente esencial del SAC (Orth *et al.*, 2011; Rattani *et al.*, 2013) (Esquema 5).



Esquema 5. Red Interna del Centrómero en mitosis

Representación gráfica de la interacción de las vías de señalización BUB1-H2AT120ph-SGO1 y Haspina-H3T3ph-CPC en mitosis dentro del centrómero. Se muestran las quinasas en negrita y las fosforilaciones (P) generadas. Se indican con números (1-6) el orden de acción de las diferentes quinasas. (1) Fosforilación de MPS1 sobre Knl1 que favorece el reclutamiento de BUB1 al cinetocoro. (2) BUB1 genera la H2AT120ph en el DCI y se recluta SGO1. (3) Activación de Haspina por la doble acción de las quinasas PLK1 y CDK1. (4) Haspina genera la H3T3ph en el DCI e interacciona con el CPC a través de Survivina. (5) Aurora B activa actúa sobre Haspina reactivándola y sobre SGO1 promoviendo el reclutamiento de las proteínas PP2A y MCAK. (6) CDK1 fosforila a Borealina promoviendo su interacción con SGO1.

En conjunto, los datos obtenidos hasta la fecha demuestran la relevancia de la modificación H2AT120ph en la dinámica del DCI para asegurar un correcto alineamiento y segregación cromosómica durante la mitosis, a través del reclutamiento de SGO1/2 y del complejo CPC al

mismo dominio. Sin embargo, aunque los mecanismos que regulan la actividad centromérica parecen estar conservados en mitosis y meiosis, son pocos los estudios relativos a la conservación de la ruta BUB1-H2AT120ph-SGO2 en la meiosis de mamíferos (Llano *et al.*, 2008; Tanno *et al.*, 2010; Rattani *et al.*, 2013).

4.2. VÍA DE SEÑALIZACIÓN HASPINA-H3T3PH-CPC

En mitosis, la fosforilación de la histona H3 en la treonina 3 (H3T3ph) por la quinasa Haspina es necesaria para el reclutamiento del complejo CPC al DCI (Kelly *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). A continuación, se explican de manera resumida los datos que existen hasta el momento de los diferentes componentes de esta ruta.

Haspina o GSG2 (*Germ cell-specific gene 2*), es una serina/treonina quinasa conservada entre diferentes organismos, desde levaduras hasta vertebrados (Higgins, 2003, 2010). Esta quinasa fue descrita por primera vez en testículo de ratón como un gen específico de meiosis (Tanaka *et al.*, 1999), aunque también se expresa en células somáticas (Tanaka *et al.*, 2001). Hasta el momento se conocen tres sustratos de esta quinasa: la H3T3, la macroH2AS137 y la CENP-T T57 (Maiolica *et al.*, 2014), siendo la H3T3ph su principal diana (Dai y Higgins, 2005; Dai *et al.*, 2005; Markaki *et al.*, 2009; Maiolica *et al.*, 2014). La delección en células somáticas de la quinasa Haspina y, por tanto, la ausencia de la H-PTM H3T3ph, promueve fallos en la biorientación de los cromosomas debido a fallos en el reclutamiento del CPC al DCI y, por consiguiente, provocando problemas de alineamiento de los cromosomas en la placa metafásica y en el mantenimiento de la cohesión entre cromátidas hermanas (Dai *et al.*, 2006; Dai *et al.*, 2009). La inhibición química de esta quinasa en células somáticas utilizando diferentes tipos de inhibidores, como el LDN-192960 (Cuny *et al.*, 2012; Huertas *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012), corroboran su implicación en la regulación de la actividad de Aurora B en la segregación de los cromosomas (De Antoni *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). En cuanto a la relación entre la cohesión centromérica y la actividad de Haspina, varios trabajos demuestran colocalización de H3T3ph con la subunidad de cohesina SA2, y la asociación de Haspina con PDS5, un regulador de los CC (Dai *et al.*, 2006; Yamagishi *et al.*, 2010; Carretero *et al.*, 2013). Para su activación, Haspina es fosforilada en primer lugar por la quinasa CDK1 y, seguidamente, por la quinasa PLK1 (*Polo-like kinase 1*) (Zhou *et al.*, 2014). Una vez fosforilada y, por tanto, activa, Haspina fosforila a la histona H3 dando lugar a la variante H3T3ph (Dai *et al.*, 2005). Aunque la variante H3T3ph es fosforilada principalmente por Haspina, puede ser generada por otras quinasas, como VRK1

(*Vaccinia-Related Kinase 1*), tanto en mitosis como en meiosis (Schober *et al.*, 2011; Jeong *et al.*, 2013), pero su función aún no está muy clara.

En meiosis, se ha descrito recientemente que la actividad quinasa de Haspina en oocitos de ratón también está relacionada con el reclutamiento del CPC, y que su inhibición química provoca fallos en la biorientación de los bivalentes en metafase-I, hecho equiparable a lo que ocurre en mitosis, así como alteraciones en la condensación de los cromosomas (Nguyen *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016). A su vez, se ha propuesto la participación de esta quinasa en la citocinesis, al localizarla en el cuerpo medio durante la meiosis-I en oocitos de ratón (Wang *et al.*, 2016).

En mitosis, la H-PTM **H3T3ph** es generada desde profase hasta anafase a lo largo de los brazos cromosómicos. Sin embargo, en metafase se observa una mayor acumulación en los centrómeros (Dai *et al.*, 2005). A nivel del centrómero, la H3T3ph recluta al CPC al DCI a través del dominio BIR de la Survivina (Kelly *et al.*, 2010), uno de los componentes del CPC que se describe a continuación.

El **CPC** es un complejo multiproteico altamente conservado entre organismos al ser esencial en la regulación de la segregación de los cromosomas y en la ejecución de la citocinesis. En mamíferos, el CPC consta de cuatro subunidades denominadas Survivina, Borealina (Darsa-B), INCENP y la quinasa Aurora B, siendo ésta última la subunidad catalítica del complejo (van der Horst y Lens, 2014). La interacción entre las cuatro subunidades es fundamental para la estabilidad del complejo, dado que la delección o inhibición de la expresión de cualquiera de ellas causa fenotipos similares de deslocalización del CPC (Honda *et al.*, 2003; Gassmann *et al.*, 2004; Vader *et al.*, 2006; Ruchaud *et al.*, 2007). De este modo, alteraciones en la función del CPC provoca fallos en la congresión y segregación de los cromosomas, debido a errores en las uniones cinetocoro-MTs y en la función del SAC, y fallos en la citocinesis, hecho que puede dar lugar a la generación de células tetraploides (van der Horst y Lens, 2014). Las proteínas del CPC presentan un patrón de distribución muy dinámico durante la mitosis, hecho por el cual se las denominó **proteínas pasajeras** (Earnshaw y Bernat, 1991). A nivel del centrómero, el CPC es reclutado al DCI mediante la interacción directa entre el dominio BIR de la Survivina y la H3T3ph en prometafase (Kelly *et al.*, 2010), donde ejercerá como regulador de la segregación de los cromosomas corrigiendo los errores de anclaje de los MTs al cinetocoro. En anafase, el CPC se deslocaliza del centrómero al cuerpo medio del huso, donde participará en el proceso de

citocinesis (Carmena y Earnshaw, 2003; Vader *et al.*, 2006; Sharif *et al.*, 2010; Carmena *et al.*, 2012; Kitagawa y Lee, 2015).

La quinasa **Aurora B** constituye la subunidad catalítica del CPC y es, por tanto, la responsable de las funciones que éste desempeña (Krenn y Musacchio, 2015). Esta proteína forma parte de la familia de las Aurora quinastas, constituida en mamíferos por tres miembros, las denominadas Aurora A, Aurora B y Aurora C. Aurora A participa en los procesos de maduración y separación de los centrosomas tras su replicación en la fase S de la interfase, en el establecimiento del huso bipolar y en el alineamiento de los cromosomas en la metafase mitótica (Berdnik y Knoblich, 2002; Eyers *et al.*, 2005; Marumoto *et al.*, 2005; Komlodi-Pasztor *et al.*, 2012); y finalmente se deslocaliza al cuerpo medio del huso cooperando en el proceso de citocinesis durante la telofase (Ye *et al.*, 2016; Afonso *et al.*, 2017). Por otro lado, Aurora B y Aurora C forman parte estructural y funcional del CPC. Ambas proteínas son muy similares en secuencia, siendo Aurora C una proteína paróloga de Aurora B cuya expresión tiene lugar mayoritariamente en células germinales durante los primeros estadios del desarrollo embrionario, y en células tumorales (Gopalan *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 1999; Assou *et al.*, 2006; Fernandez-Miranda *et al.*, 2011; Quartuccio y Schindler, 2015).

Desde el punto de vista funcional, estudios realizados en células somáticas de mamíferos demuestran que, una vez que el CPC es reclutado al centrómero, es necesaria la activación de la quinasa Aurora B para el mantenimiento del CPC unido al centrómero. Recientemente, se ha propuesto la existencia de un circuito de activación de Aurora B que promueve su acumulación y autofosforilación mediada por una H-PTM en la variante H2AX, la H2AXS121ph (Shimada *et al.*, 2016; Shimada y Nakanishi, 2016). Una vez activa, se establece otro circuito de retroalimentación positiva en el cual Aurora B fosforila a Haspina promoviendo el estado activo de esta quinasa, y por tanto, su acción sobre la H3T3ph (Wang *et al.*, 2011). Al mismo tiempo, Aurora B actúa sobre el complejo PP1/Repo-Man inhibiendo su actividad fosfatasa sobre la H3T3ph (Qian *et al.*, 2011). Junto con este bucle de retroalimentación positiva en la vía Haspina-H3T3ph-CPC, se ha descrito que la quinasa CDK1 también participa en el mantenimiento del CPC en el centrómero al fosforilar a Borealina promoviendo la interacción directa de ésta con SGO1 (Tsukahara *et al.*, 2010). Estos datos, junto con la actividad de Aurora B sobre SGO1/2 para el reclutamiento de las proteínas PP2A y MCAK (Tanno *et al.*, 2010), demuestran la estrecha relación entre las dos vías de señalización que forman la Red del Centrómero Interno.

Por otro lado, el reclutamiento del CPC al DCI durante prometafase es esencial para la activación de Aurora B y, por tanto, para su actuación sobre otras proteínas del centrómero y sobre los MTs (Tan y Kapoor, 2011) (Esquema 5).

No obstante, si bien los estudios de Aurora B y Aurora C en mitosis son extensos, actualmente existen estudios contradictorios sobre las funciones y la localización de estas dos proteínas parálogas durante la meiosis de mamíferos. Estudios en oocitos de ratón sugieren que Aurora B se localiza en los cinetocoros en metafase-I, y es la principal responsable de la regulación de la congresión y alineamiento de los cromosomas, mientras que la distribución de Aurora C queda únicamente acotada a los brazos cromosómicos y por tanto no regula la dinámica centromérica (Shuda *et al.*, 2009). Por el contrario, otros datos recientes, también en oocitos de ratón, proponen la participación independiente en meiosis de dos CPC con funciones diferentes. Un primer CPC estaría compuesto por Aurora C como subunidad catalítica (CPC-Aurora C), y sería el encargado de participar en las funciones de corrección de uniones cinetocoro-MTs erróneas regulando la congresión cromosómica en prometafase. Y por otro lado, existiría un segundo CPC cuyo núcleo catalítico estaría constituido por Aurora B (CPC-Aurora B), el cual restringiría su función a la regulación del SAC (Balboula y Schindler, 2014). Sin embargo, estos datos siguen sin aclarar cuáles son las diferencias específicas a nivel funcional entre ambas parálogas (Aurora B y Aurora C), ya que se ha demostrado que en ausencia de una la otra suple su función (Sasai *et al.*, 2004; Bolanos-Garcia, 2005). Por este motivo, y dada la controversia en la bibliografía, en esta Tesis Doctoral, al no poder discernir entre las dos quinasas a nivel funcional ni de distribución, recurriremos a la terminología Aurora B/C, la cual ya ha sido utilizada previamente por otros autores (Yoshida *et al.*, 2015) (revisado en Dumont, 2015).

Por último, desde el punto de vista de la distribución de las proteínas del CPC en la meiosis, estudios en espermatoцитos de ratón determinaron un ensamblaje secuencial de las proteínas pasajeras al centrómero, siendo reclutada en primer lugar en paquitena Borealina, seguida de INCENP. Finalmente, Aurora B/C es reclutada en diplotena (Parra *et al.*, 2009).

Si bien los avances en el conocimiento de la RCI en mitosis han sido significativos en los últimos años, las investigaciones realizadas en meiosis son escasas. Hasta el momento, se desconoce la función de las quinasas BUB1 y Haspina en el mecanismo de ensamblaje de SGO2 y del CPC, así como la distribución de las variantes H2AT120ph y H3T3ph durante la meiosis

masculina en mamíferos. Este trabajo demuestra la existencia de las dos vías de señalización del DCI, la vía BUB1-H2AT120ph-SGO2 y la vía Haspina-H3T3ph-CPC, durante la meiosis de ratón y analiza la interacción entre ambas mediante la inhibición de la actividad quinasa de algunos de los componentes principales de estas rutas utilizando diferentes estrategias experimentales

O B J E T I V O S

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es el estudio de las vías de señalización del dominio interno del centrómero y su interacción en la meiosis de mamíferos usando como modelo de estudio el ratón de laboratorio *Mus musculus*. Este objetivo se ha desglosado en seis objetivos más específicos:

- 1) Analizar la localización y distribución de diferentes proteínas que intervienen en la vía de señalización BUB1/H2AT120ph/SGO2 a lo largo de la meiosis en ratones macho *wild type* (WT).
- 2) Analizar la localización y distribución de diferentes proteínas que intervienen en la vía de señalización Haspina/H3T3ph/CPC a lo largo de la meiosis en ratones macho WT.
- 3) Analizar la localización relativa de proteínas de las dos vías de señalización del dominio interno del centrómero durante metafase-I y metafase-II en hembras WT de ratón.
- 4) Estudiar el efecto de la falta de actividad quinasa de BUB1 en la localización y dinámica de algunas proteínas implicadas en las dos vías de señalización tanto en machos como en hembras de ratones mutantes *Bub1^{KD/KD}*.
- 5) Estudiar el efecto de la inhibición de la actividad quinasa de Haspina en la localización y dinámica de algunas de las proteínas implicadas en las dos vías de señalización tanto en machos WT.
- 6) Por último, estudiar el efecto de la inhibición de la actividad quinasa de Haspina sobre espermatocitos con falta de actividad quinasa BUB1 (*Bub1^{KD/KD}*).

**M
A
T
E
R
I
A
L
Y
M
É
T
O
D
O
S**

Material y métodos

1. Material de estudio

1.1. ANIMALES

Para la realización de esta Tesis Doctoral se han utilizado como material de estudio testículos y ovarios de ratones adultos de laboratorio (*Mus musculus*). Esta especie presenta un complemento cromosómico de 40 cromosomas, con un determinismo del sexo del tipo XY en machos y XX en hembras.

1.1.1. Animales con genotipo silvestre (*Wild type*, WT)

Se han utilizado ratones macho y hembra de las cepas C57BL/6 y CD1. La cepa más utilizada en este trabajo ha sido la C57BL/6 la cual es una cepa consanguínea principalmente utilizada como base genética para la creación de líneas modificadas genéticamente. Estos ratones nos han servido para analizar el patrón de distribución de proteínas, y como control para los estudios llevados a cabo con diferentes líneas de ratón modificadas genéticamente que se presentarán más adelante. Para los estudios realizados en hembras se ha utilizado la cepa CD1, debido a que los individuos presentan un tamaño mayor que la cepa anterior, los ovarios son más grandes y constan, por tanto, un mayor número de oocitos.

1.1.2. Animales modificados genéticamente

En la presente Tesis Doctoral también han sido utilizadas tres líneas de ratón modificadas genéticamente, las cuales se han obtenido tras establecer colaboraciones con tres grupos de investigación diferentes.

- ♦ Se han utilizado ratones macho con pérdida de función (KO, *Knockout*) del gen para la Shugoshina 2 (*Sgo2^{-/-}*) (Llano *et al.*, 2008), los cuales fueron generados y facilitados por el grupo de investigación del Dr. Alberto M. Pendás del Centro de Investigación del Cáncer (CIC) de Salamanca.
- ♦ Por otro lado, se realizaron algunos experimentos con ratones macho de la cepa C57BL/6J portadores de un transgen *REC8-myc* (Kudo *et al.*, 2006), generados y cedidos por el Dr. Kim Nasmyth de la Universidad de Oxford, Inglaterra.

- ◇ Por último, se han utilizado machos y hembras de la línea de ratones con pérdida de función del dominio quinasa de la proteína BUB1, los denominados *Bub1^{KD/KD}* o *BUB1KD* (*Bub1 Kinase-Death*). Estos ratones fueron generados y cedidos por el grupo del Dr. Jan van Deursen de la Clínica Mayo de Rochester, Minnesota, en Estados Unidos (Ricke *et al.*, 2012).

Todos los individuos que han sido utilizados para la elaboración de esta Tesis Doctoral, tanto los individuos WT como los modificados genéticamente, eran sexualmente maduros. En el caso de los machos, se han utilizado individuos jóvenes con edades comprendidas entre los 1,5 y 6 meses. En el caso de las hembras, la edad idónea para la obtención de un máximo número de oocitos maduros en estadio de vesícula germinal (VG o GV, del inglés *Germ Vesicle*) comprende edades entre las 8 y 10 semanas de vida.

Todos los animales utilizados han sido mantenidos siguiendo la normativa vigente para el cuidado de animales de experimentación de acuerdo al Real Decreto 53/2013 en condiciones óptimas de espacio y ambientales y bajo supervisión de un veterinario en los animalarios de la Facultad de Medicina de la UAM, del CBMSO (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa), del IBPS (*Institut de Biologie Paris-Seine*) y de la empresa Vivotecnia Management & Services (Vivotecnia M&S, www.vivotecnia-ms.com). Los individuos fueron sacrificados de acuerdo al RD 53/2013 sobre protección de animales de experimentación y otros fines científicos mediante dislocación cervical para la posterior extracción de los ovarios y testículos. Toda la experimentación con animales realizada en el transcurso de esta Tesis Doctoral ha sido autorizada por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) dentro de los proyectos de investigación “Dinámica de los complejos proteicos implicados en la asociación entre cromátidas hermanas durante la meiosis y su implicación en aneuploidías” (SAF-2011-28842-CO2-01) y “Modificaciones post-traduccionales de histonas en el centrómero interno e impacto sobre las divisiones meióticas de mamíferos y en el origen de aneuploidías” (BFU2014-53681-P).

2. Métodos empleados

Una vez sacrificado el animal y extirpadas las gónadas (testículos u ovarios), éstas fueron procesadas siguiendo los procedimientos experimentales que se explican a continuación.

2.1. OBTENCIÓN DE PREPARACIONES DE ESPERMATOCITOS

2.1.1. Aplastado de túbulos seminíferos

Tras la extracción de los testículos, la túnica albugínea es retirada y los túbulos seminíferos son procesados siguiendo la técnica de aplastado descrita previamente (Page *et al.*, 1998; Parra *et al.*, 2002). Los túbulos seminíferos son fijados en una solución de formaldehído al 2% y Triton al 0,05%, y posteriormente se aplastan permitiendo que las células que los componen queden dispuestas en una monocapa manteniendo cierto volumen.

Para llevar a cabo esta técnica, se elabora el fijador añadiendo 2,5 ml de formaldehído (Panreac, 131328.1211) al 37-38% y 25 µl de Triton X-100 (Sigma, T8787) en PBS (NaCl 8 g, KCl 0,2 g, Na₂HPO₄ 1,44 g, KHPO₄ 0,2 g, H₂O_d 1 l; pH 7,2-7,4) hasta un volumen final de 50 ml. Los túbulos seminíferos son introducidos en un pocillo de vidrio con el fijador entre 10 y 20 minutos. Una vez fijado el material, se llevan a cabo los aplastados sobre portaobjetos previamente cubiertos por una capa de poli-L-lisina (Sigma, P-8920), para conseguir una mayor adherencia de las células al portaobjetos. Sobre estos portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina se depositan pequeños grupos de túbulos seminíferos sobre los que se añade una gota de fijador y un cubreobjetos. Sujetando el cubreobjetos para evitar que se deslice y que las células se rompan, con la punta de un lápiz se disgregan los túbulos y, a continuación, con ayuda de una almohadilla de papel de filtro, se ejerce presión con el dedo pulgar sobre el cubreobjetos, aplastando de esta manera los túbulos hasta quedar en una única capa de células. Una vez realizado el aplastado, las preparaciones son sumergidas en nitrógeno líquido (-195 °C) y, si van a ser utilizadas en ese momento, se levantan los cubreobjetos con ayuda de una cuchilla y se sumergen los portaobjetos en una jarra de tinción Coplin con PBS. Por el contrario, si las preparaciones no van a utilizarse en ese momento, tras la congelación con nitrógeno líquido, se mantiene el cubreobjetos y se guardan en seco a -80°C. Estas preparaciones congeladas podrán ser utilizadas más adelante. Cuando llegue el momento, las preparaciones se volverán a sumergir en nitrógeno líquido y se levantará el cubreobjetos siguiendo el mismo procedimiento que con los preparados frescos.

2.1.2. Esparcido de espermatozoides fijados con paraformaldehído

Para la obtención de esparcidos de espermatozoides se llevó a cabo la técnica descrita anteriormente por Peters *et al.* (1997). Inmediatamente tras el sacrificio del animal, se extirpan los testículos, se elimina la túnica albugínea, y los túbulos seminíferos son disgregados mediante

fricción con dos pinzas dentadas en una placa Petri con unos 300 µl de PBS. Como resultado, se obtiene una suspensión celular que es transferida a un tubo de cristal de centrifuga donde añadiremos PBS hasta un volumen final de 3 ml. La suspensión celular se centrifuga a 113 rcf (o fuerza-G) (1.200 rpm con un rotor de 7 cm de radio) durante 8 minutos y se descarta el sobrenadante. Se añaden otros 3 ml de PBS sobre el precipitado, se resuspende y se vuelve a centrifugar con las mismas condiciones. Tras la eliminación de nuevo del sobrenadante, se resuspende el precipitado cuidadosamente en un volumen pequeño de sacarosa 100 µM para someter a las células a un choque hipotónico durante 15-20 minutos.

Antes de repartir la suspensión celular en los portaobjetos, éstos han de ser limpiados con una solución 1:1 de etanol:acetona y, posteriormente, sumergidos en una solución fijadora de paraformaldehído (PFA) al 1%. Dicha solución es preparada a partir de 1 g de PFA sólido (Panreac, 141451.1210) diluido en 100 ml de agua destilada en un Erlenmeyer. A esta solución se le añaden un par de gotas de NaOH 5N para mantener un pH básico de 9,2-9,5. El Erlenmeyer se tapa con Parafilm, y tras realizar varias perforaciones en éste para permitir la salida de vapores, se calienta en un baño a 60 °C agitándolo repetidas veces para disolver el PFA. Una vez homogeneizada, la solución se enfría bajo el grifo con agua corriente y se añaden dos pipetas Pasteur completas de tetraborato sódico ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 50 mM en agua destilada. Finalmente, se añaden 150 µl de Triton X-100 a la solución, quedando a una concentración final del 0,15%, y se sumergen los portaobjetos. Éstos se sacan del fijador y se inclinan con el objetivo de concentrar en una de sus esquinas un pequeño volumen de líquido restante, donde se depositan alrededor de 20 µl de la suspensión de espermatozoides. Mediante movimientos balanceantes se reparte la suspensión homogéneamente por la superficie del portaobjetos y se dejan secar horizontalmente en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, se lavan los preparados dos veces con una disolución de Photoflo (Kodak) al 0,08%. Finalmente, se dejan secar al aire hasta su uso, siendo entonces necesaria una rehidratación durante 10 minutos en PBS. Las preparaciones obtenidas por este método pueden ser preservadas en buen estado hasta su uso almacenándolas en seco a -80 °C.

[2.1.3. Esparcido de espermatozoides fijados con metanol:ácido acético](#)

Para la realización de esta técnica, inmediatamente tras el sacrificio del animal, se extirpan los testículos, se elimina la túnica albugínea, y los túbulos seminíferos se disgregan por fricción en un *potter* de cristal en citrato sódico al 2,2% a temperatura ambiente. La suspensión celular

obtenida se traspasa a un tubo de cristal de centrífuga y se dejan decantar los fragmentos de túbulo mediante una centrifugación de 8 minutos a 78 rcf (1.000 rpm con un rotor de 7 cm de radio). Tras esta primera centrifugación, se descarta el sobrenadante y se aplica al precipitado un choque hipotónico de 10 minutos con citrato sódico al 1%. Se centrifuga de nuevo la suspensión celular a 78 rcf (1.000 rpm con un rotor de 7 cm de radio) durante 10 minutos, se retira el sobrenadante, y las células precipitadas se fijan, resuspendiéndolas en fijador fresco metanol:ácido acético en proporción 3:1. Las células fijadas que no van a ser utilizadas en fresco pueden preservarse a -20°C hasta su uso. Previo a su utilización, se dejan atemperar las células y se realiza un cambio de fijador recién preparado. Se resuspende la suspensión celular en el fijador nuevo y se lanza una gota de la suspensión sobre un portaobjetos (previamente lavado con etanol) y se deja secar al aire. Estos preparados pueden ser utilizados en el momento o almacenados a temperatura ambiente.

2.1.4. Cultivo de túbulos seminíferos

Gracias a la técnica descrita por Sato *et al.* (2011), los túbulos seminíferos de ratón pueden mantenerse en cultivo de manera organotípica durante varios días. Para llevar a cabo esta técnica, se sacrifica el animal e inmediatamente se extirpan los testículos. Los túbulos seminíferos se fragmentan cuidadosamente con una cuchilla obteniendo pequeños trozos. Estos fragmentos de túbulos seminíferos se colocan en pequeños grupos sobre un gel de agarosa embebido en medio de cultivo α -MEM (*α -Minimum Essential Medium*) (Gibco, A10490-01) suplementado con suero KRS (*Knockout Replacement Serum*) (Gibco, A10828-010) al 10% y con una combinación de antibióticos (Penicilina y Estreptomina) (Merck, A2212) al 1%. De esta manera, los pequeños fragmentos de túbulos seminíferos dispuestos sobre el gel no quedan del todo sumergidos en el medio α -MEM permitiendo que el intercambio de gases tenga lugar directamente a través de la atmósfera y el de nutrientes a través del medio de cultivo. A continuación, los cultivos de túbulos se mantienen en un incubador con un requerimiento de CO₂ del 5% y a una temperatura constante de 36 °C, hasta ser recogidos para su procesamiento. Tras el período de cultivo establecido para cada experimento, los túbulos son recogidos y procesados por las técnicas de aplastado y/o esparcido anteriormente descritas.

2.2. OBTENCIÓN DE PREPARACIONES DE OOCITOS

2.2.1. Cultivo y esparcido de oocitos

Para la obtención de oocitos, se procede a sacrificar a hembras adultas de entre 8 y 10 semanas de edad, a las que se extraen los ovarios, que son disgregados bajo una lupa binocular en un medio de cultivo casero denominado M2. La disgregación tiene lugar con la ayuda de una aguja, con la cual se va desgarrando el estroma ovárico y con él los folículos dejando salir los oocitos al medio M2 con 100 µg/ml de dbAMPc (N⁶,2'-dibutiriladenosin 3',5'-monofosfato cíclico) (Sigma, D0627). Este compuesto sintético análogo al AMPc (adenosin 3',5'-monofosfato cíclico) es utilizado para la inhibición de la entrada de los oocitos a división permitiendo, a su vez, la sincronización de éstos. Tras ser disgregados los ovarios y con ayuda de una pipeta Pasteur de cristal esterilizada y moldeada para que el diámetro de la punta sea algo mayor que el diámetro de un oocito, recogemos los oocitos maduros en estadio de vesícula germinal (GV) por succión y los colocamos en otra placa Petri con medio M2 fresco sin dbAMPc para que puedan entrar en división. Antes de meterlos en el incubador, eliminamos las células foliculares que puedan quedar pegadas mediante succiones con la pipeta y, una vez limpios, colocamos los oocitos en otra gota de medio M2 fresco y los dejamos en el incubador a una temperatura de 38°C y en una atmósfera húmeda. Tras 1 hora y media de incubación, los oocitos que han sido capaces de desorganizar la envoltura nuclear (*GVBD*, del inglés *Germ Vesicle Breakdown*) y, por tanto, de entrar en división de manera sincronizada, son transferidos a otra gota de M2 limpia, y descartamos los que aún continúan bloqueados en el estadio GV. Los oocitos sincronizados y en división se mantienen en el incubador las horas necesarias para obtener el estadio de división de interés. Dado que el período de incubación puede llegar a durar hasta 18 horas (si queremos estudiar la segunda división meiótica), las gotas de medio M2 dispuestas en la placa Petri son cubiertas por una capa de aceite mineral (Sigma, M8410) para evitar su evaporación.

Tras el período de incubación, el siguiente paso es preparar los oocitos para ser procesados mediante la técnica de esparcido. Para ello, ha de eliminarse en primer lugar la Zona Pelúcida (ZP) sumergiendo los oocitos en solución de Tyrode ácida (NaCl 0,8 gr, KCl 0,02 gr, CaCl₂·2H₂O 0,265 gr, MgCl₂·6H₂O 0,01 gr, PVP 0,4 gr, D-glucosa 0,1 gr y H₂O_d 100 ml; ajustado a pH 2,3). Una vez eliminada la ZP, se prepara una solución fijadora de PFA al 4% (0,8 g de PFA sólido en 20 ml de PBS; pH a 9,2-9,4) con Triton X-100 al 1,2%. Con este fijador fresco se rellenan los pocillos de un portaobjetos con una lámina de teflón con 8 o 10 pocillos. Bajo una lupa binocular

sin placa calefactable, y ayudados por una pipeta Pasteur de cristal, los oocitos son dispuestos en cada pocillo, siendo el número de oocitos por pocillo variable. Por efecto del compuesto fijador, los oocitos estallan y esparcen su contenido al contacto con la superficie del portaobjetos.

Todo el trabajo de manipulación con oocitos vivos de ratón requiere mantener una temperatura más o menos constante de 38 °C, por lo que todo el material, desde las lupas binoculares hasta las agujas de disección, junto con todos los compuestos y soluciones utilizadas, deben estar a dicha temperatura.

2.2.2. Microinyección de la histona H2B-RFP y seguimiento de oocitos *in vivo*

Para el seguimiento *in vivo* de los cromosomas en oocitos de ratón, se extraen oocitos en estadio GV en medio M2 suplementado con dbAMPc. Estas células bloqueadas en dictiotena son microinyectadas con construcciones de mRNA de la histona H2B-RFP a una concentración de entre 1 y 10 pM. Las construcciones de mRNA son generadas mediante el kit de transcripción Ambion mMessage mMachine (Thermo Fisher Scientific) y purificados a través de columnas RNAeasy (Qiagen). Una vez obtenidos los mRNAs purificados, éstos se microinyectan en los oocitos bloqueados en GV mediante micromanipuladores Eppendorf de cristal en un microscopio Nikon Eclipse Ti equipado con un microinyector FmoJet. Los oocitos microinyectados se mantienen en el incubador alrededor de 2 horas para permitir la expresión del transcrito microinyectado. Pasado este tiempo, los oocitos en buen estado son traspasados a medio M2 nuevo, sin dbAMPc, para permitir que entren en división. Una vez alcanzado el estadio de interés, los oocitos son dispuestos en una cámara calefactable para realizar el seguimiento celular *in vivo* mediante un microscopio invertido Nikon TE2000E (con un objetivo Plan APO 20x/0,75 NA) equipado con PrecisExit High Power LED Fluorescence (LAM 1: 400/465, LAM 2: 585), un controlador de platina Märzhäuser Scanning Stage, una cámara CoolSNAP HQ2 y controlado por el *software* Metamorph.

Tal y como se ha mencionado con anterioridad, toda la manipulación de oocitos vivos de ratón ha de llevarse a cabo a una temperatura constante de 38 °C.

2.3. INHIBICIÓN DE LA QUINASA HASPINA EN ESPERMATOCITOS

Para la elaboración de parte de los resultados de esta Tesis Doctoral, se han realizado una serie de estudios funcionales basados en la inhibición química de la quinasa Haspina tanto en cultivos organotípicos de túbulos seminíferos. Para ello, se ha utilizado el inhibidor químico LDN-192960 (Sigma, SML0755) a una concentración de 1 mM.

En los cultivos organotípicos de túbulos seminíferos, los espermatoцитos no se encuentran aislados como ocurre en los cultivos de células somáticas y en los cultivos de oocitos. Al tratarse del túbulo seminífero completo, los espermatoцитos se encuentran rodeados de diferentes tipos celulares (células de Sertoli, de Leydig, mioepiteliales, espermatogonias) con los que están interactuando directa o indirectamente, siendo más difícil la accesibilidad del inhibidor a los espermatoцитos. Por esta razón, para los ensayos realizados en este tipo de cultivos se ha utilizado el inhibidor LDN-192960 a una concentración de 1 mM, 100 veces más concentrado que lo descrito para células somáticas (Wang *et al.*, 2012). El LDN-192960 es diluido en medio de cultivo α -MEM y, una vez que los grupos de túbulos seminíferos están colocados sobre el gel de agarosa, se sustituye el medio limpio por éste con el inhibidor. Los ensayos realizados demuestran que el tiempo de acción de este inhibidor en el cultivo de los túbulos seminíferos comienza a ser apreciable a las 2 horas de tratamiento, siendo a las 6 horas el tiempo de máxima eficacia.

2.4. INMUNOLocalIZACIÓN DE PROTEÍNAS

En esta Tesis Doctoral se han realizado inmunolocalizaciones indirectas de proteínas sobre aplastados y esparcidos de espermatoцитos, esparcidos de oocitos, y células somáticas en cultivo.

2.4.1. Inmunolocalización indirecta de proteínas en meiocitos

Las preparaciones de meiocitos, tanto en el caso de espermatoцитos como en el de oocitos, han de ser lavadas, y rehidratadas en su caso, tres veces durante 5 minutos en PBS antes de realizar las inmunodetecciones. Una vez rehidratadas y lavadas las preparaciones, se procede a añadir los anticuerpos primarios. Para las inmunodetecciones en espermatoцитos, los anticuerpos primarios se diluyen directamente en PBS y se incuban en cámara húmeda toda la noche a 4 °C o durante 1 hora a temperatura ambiente. Para las preparaciones de oocitos, los

anticuerpos primarios se diluyen en BSA al 3% en PBS y se incuban en cámara húmeda durante toda la noche a 4 °C o durante 3 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios utilizados y sus correspondientes diluciones de uso aparecen en la Tabla 1. A continuación, las preparaciones se lavan de nuevo tres veces durante 5 minutos en PBS y, se añaden los anticuerpos secundarios correspondientes (ver Tabla 2). Similar al procedimiento de los anticuerpos primarios, los anticuerpos secundarios son diluidos en PBS para el caso de preparaciones de espermatozoides, o en BSA al 3 % en PBS para las preparaciones de oocitos. En ambos casos, los anticuerpos secundarios se incuban durante 1-2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente, la cromatina fue teñida con 10 mg/ml de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Sigma, D9542) durante 3 minutos, para el caso de espermatozoides, o con 0,1 mg/ml de Hoechst 33342 (Life Technologies, H21492) o Yoduro de Propidio (Sigma, P4170) para el caso de oocitos, durante 10 minutos. Por último, y tras un lavado en PBS de 5 minutos, todas las preparaciones se montaron con Vectashield (Vector Laboratories) o Citifluor (Citifluor Ltd), montantes que evitan el desvanecimiento rápido de la fluorescencia, y se sellaron con esmalte de uñas para evitar la entrada de aire. Las preparaciones pueden ser almacenadas a 4°C hasta su observación conservándose en buen estado durante varias semanas.

| ANTICUERPOS PRIMARIOS | | | | | |
|-------------------------------|--------------------|-------------------------|-------------|----------------------|-----------------|
| PROTEÍNA | ANTICUERPO | PROCEDENCIA | REFERENCIA | TIPO DE ANTICUERPO | DILUCIÓN DE USO |
| Marcaje de cinetocoros | ACA | Antibodies Incorporated | 441-10BK-50 | Policlonal de humano | 1:20 (♂) |
| | CREST | Invitrogen | PA5-30500 | Policlonal de humano | 1:150 (♀) |
| SYCP3 | mSYCP3 | Santa Cruz | sc-74569 | Monoclonal de ratón | 1:50 |
| | hSYCP3 | Abcam | ab-150292 | Policlonal de conejo | 1:50 |
| α-Tubulina | α-Tubulina-FITC | Sigma | F2168 | Monoclonal de ratón | 1:100 |
| | α-Tubulina (YL1/2) | Abcam | ab-6160 | Monoclonal de rata | 1:100 |
| H2AT120ph | H2AT120ph | Dr. Sun | -- | Policlonal de conejo | 1:10 |
| | H2AT120ph (suero) | Active Motif | 39391 | Policlonal de conejo | 1:60 |

| | | | | | |
|--|---------------------------------|--------------------|------------|-------------------------|--------------------------|
| | H2AT120ph (purificado) | Active Motif | 61195 | Policlonal de conejo | 1:60 |
| H3T3ph | H3T3ph | Abcam | ab-17352 | Policlonal de conejo | 1:100 (es) 1:800 (ap) |
| | H3T3ph | Abcam | ab-130940 | Policlonal de conejo | 1:100 (es) 1:800 (ap) |
| | H3T3ph | Merck | 07-424 | Policlonal de conejo | 1:100 (es) 1:800 (ap) |
| BUB1 | hBUB1 (SB1.3) | Dr. Taylor | -- | Policlonal de oveja | 1:10 |
| | hBUB1 (aa. 25-165) | Dr. van Deursen | -- | Policlonal de conejo | 1:50 |
| SGO2 | mSGO2 | Dr. Barbero | K-1059 | Policlonal de conejo | 1:10 (♂) 1:50 (♀) |
| | mSGO2-like | Dr. Barbero | C-105 | Policlonal de conejo | 1:20 (♂) 1:50 (♀) |
| MCAK | hMCAK | Dra. Wordeman | -- | Policlonal de oveja | 1:40 |
| | mMCAK | Abcam | Ab-95150 | Policlonal de conejo | 1:10 |
| MCAKph | hMCAK S95ph | Abcam | ab-74146 | Policlonal de conejo | 1:10 |
| Haspina | hHaspin | Bethyl | A302-241A | Policlonal de conejo | 1:10 |
| Aurora B/C | rAIM-1 (aa. 2-124) | BD Biosciences | 611082 | Monoclonal de ratón | 1:10 |
| Aurora A/B/C fosforiladas | hAurora T phospho (A/B/C) | Cell Signalling | 2914S | Monoclonal de conejo | 1:10 (♂) 1:50 (♀) |
| INCENP | hINCENP | Dr. Earnshaw | -- | Policlonal de conejo | 1:100 |
| Survivina | hSurvivina | Cell Signalling | 2808S | Monoclonal de conejo | 1:10 |
| Borealina | Borealina | Dr. Earnshaw | -- | Policlonal de conejo | 1:10 |
| MAD2 | hMAD2 (286) | Dra. Wassmann | -- | Policlonal de conejo | 1:10 |
| myc | Myc | GeneTex | GTX 628259 | Monoclonal de ratón | 1:10 |

Tabla 1. Listado de anticuerpos primarios. Se indica entre paréntesis anticuerpos cuyas diluciones de uso difieren entre las técnicas utilizadas (*es*, esparcido; *ap*, aplastado) o el material de trabajo (♂, espermatozoides; ♀, oocitos).

Para el caso concreto de dobles inmunodetecciones donde los anticuerpos primarios hayan sido generados en la misma especie, hemos procedido como se describe en Page *et al.* (2003). En primer lugar, incubamos uno de los anticuerpos primarios durante 1 hora a temperatura ambiente y lo revelamos con su correspondiente anticuerpo secundario de tipo Fab durante toda la noche a 4 °C. Los anticuerpos secundarios Fab reconocen y saturan la fracción F(ab)² del anticuerpo primario. Al día siguiente, tras tres lavados de 5 minutos con PBS, se incubaba el otro anticuerpo primario y, posteriormente se revela con un anticuerpo secundario acoplado a un fluorocromo diferente al utilizado para revelar el primer anticuerpo. A continuación se procede a teñir la cromatina y el montaje de las preparaciones tal y como se ha descrito anteriormente.

| ANTICUERPOS SECUNDARIOS | | | | |
|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------|-----------------|
| PROTEÍNA | TIPO DE ANTICUERPO | PROCEDENCIA | FLUOROCROMO | DILUCIÓN DE USO |
| Humano | Burro ML anti-IgG | Jackson 709-075-149 | Texas Red | 1:100-1:200 |
| | Cabra anti-IgG | Molecular Probes A-11014 | Alexa 594 | 1:100-1:200 |
| | Cabra anti-IgG | Molecular Probes A-11013 | Alexa 488 | 1:100-1:200 |
| | Burro ML anti-IgG | Jackson 709-095-149 | FITC | 1:100-1:200 |
| Ratón | Burro anti-IgG | Molecular Probes A-21203 | Alexa 594 | 1:100-1:200 |
| | Burro anti-IgG | Molecular Probes A-21202 | Alexa 488 | 1:100-1:200 |
| Rata | Burro ML anti-IgG | Jackson 712-075-153 | Texas Red | 1:100-1:200 |
| | Burro ML anti-IgG | Jackson 712-095-153 | FITC | 1:100-1:200 |
| Conejo | Cabra anti-IgG | Molecular Probes A-11037 | Alexa 594 | 1:100-1:200 |
| | Burro anti-IgG | Molecular Probes A-21206 | Alexa 488 | 1:100-1:200 |
| | Burro anti-F(ab) ² | Jackson 711-076-152 | Texas Red | 1:100 |
| Oveja | Burro ML anti-IgG | Jackson 713-075-147 | Texas Red | 1:40 |
| | Burro ML anti-IgG | Jackson 713-095-147 | FITC | 1:40 |

Tabla 2. Listado de anticuerpos secundarios. Todos los anticuerpos secundarios a excepción de los de oveja, fueron utilizados a una concentración de 1:100 sobre espermatozoides y de 1:200 sobre oocitos.

2.5. HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH) DE SECUENCIAS TELOMÉRICAS

Para la detección de secuencias de ADN telomérico en esparcidos de espermatozoides se realizó una hibridación *in situ* fluorescente (FISH, del inglés *Fluorescence in situ hybridization*) utilizando una sonda peptidonucleica (PNA, del inglés *Peptide Nucleic Acid*), la cual consta de tres repeticiones de la secuencia CCCTAA y está acomplejada con isotiocianato de fluoresceína (FITC, del inglés *Fluorescein isothiocyanate*) (Applied Biosystems).

Las preparaciones de espermatozoides esparcidos se lavan dos veces durante 15 minutos con PBS a temperatura ambiente. A continuación, se fijan las muestras con PFA al 4% durante 2 minutos. Para retirar el exceso de fijador, las muestras se lavan con PBS tres veces durante 5 minutos y, seguidamente, se introducen en una solución de pepsina 1 mg/ml (Sigma P-6887) en agua destilada conteniendo 50 µl de HCL al 37% en la estufa a 37 °C durante 10 minutos. Tras el tratamiento con pepsina se lavan de nuevo las muestras 3 veces durante 5 minutos en PBS y se lleva a cabo una segunda fijación en PFA al 4% durante 2 minutos. Los preparados son lavados 3 veces en PBS durante 5 minutos. Tras esta segunda fijación las muestras se deshidratan en una serie de alcoholes de concentración ascendente (70°, 90° y 100°) durante 5 minutos en cada uno. Tras dejar secar al aire, a cada portaobjetos se le añaden 25 µl de la mezcla de hibridación que contiene la sonda PNA acomplejada con FITC a una concentración final de 10 µM. Para desnaturalizar el ADN por calor, los preparados son colocados sobre una placa de calor a 80 °C durante 3 minutos. Para favorecer la hibridación de la sonda tras la desnaturalización por calor, los preparados se disponen en una cámara húmeda a temperatura ambiente y en oscuridad durante 2 horas. A continuación, se realizan dos lavados con formamida al 70% conteniendo Tris 10 mM (pH 7,2) y suero BSA al 10%, durante 15 minutos. Posteriormente, se vuelven a lavar las muestras, pero esta vez con tampón TBS (Tris 1 M pH 7, NaCl 1,5 M en H₂O y 0,05% de Tween-20) durante 5 minutos. Finalmente, los preparados se vuelven a deshidratar en una secuencia de alcoholes de concentraciones crecientes y, una vez deshidratados, se tiñen con DAPI y se montan con Vectashield para su posterior observación.

| Mezcla de hibridación (para 25 µl) | |
|------------------------------------|---------|
| Tris 1 M (pH 7,2) | 0,2 µl |
| Tampón MgCl ₂ * | 2,1 µl |
| Formamida desionizada (Sigma) | 17,5 µl |
| Agua destilada | 2,7 µl |
| Sonda PNA (5 µl/ml) | 2,5 µl |

*MgCl₂ 25 mM, ácido cítrico 9 mM, Na₂HPO₄ 82 mM; pH 7

2.6. PREPARACIONES HISTOLÓGICAS DE TESTÍCULO

2.6.1. Secciones histológicas

Tras el sacrificio del animal, se extirpan los testículos y se fijan en dos tipos diferentes de solución fijadora: Bouin acuoso (ácido pícrico 150 ml, formol 50 ml y ácido acético 10 ml) o PFA al 4%. Para que el fijador acceda adecuadamente, una vez extraídos los testículos, la túnica albugínea es perforada con una aguja fina para permitir que penetre bien la solución fijadora. Los testículos se sumergen durante 24 horas en Bouin acuoso a temperatura ambiente, o en PFA al 4% a 4 °C. La proporción de volumen a usar respecto al tamaño de la muestra es de 20:1, quedando ésta siempre sumergida. Tras la fijación con Bouin, lavamos la muestra con agua corriente durante toda la noche para eliminar el exceso de fijador. En el caso de la fijación con PFA, realizamos dos lavados con PBS a 4 °C durante 30 minutos. Una vez eliminado el fijador, deshidratamos la muestra mediante baños sucesivos de etanol de concentración creciente (70°, 80°, 96° y 100°) durante 30 minutos cada uno. Una vez deshidratada, la muestra se incluye en Paraplast Plus (Leica, 39602004) de manera gradual mediante los procesos de aclarado e infiltración. En el proceso de aclarado, se sustituye el etanol por una mezcla de xilol y Paraplast. Tras 20 minutos en esta mezcla en una estufa a 60 °C, la muestra está lista para la infiltración en Paraplast durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se traspasa la muestra a otro recipiente con Paraplast limpio. Tras 1 hora de infiltración, montamos la pieza en un molde adecuado a su tamaño para confeccionar el bloque. Para ello, se añade lentamente el Paraplast líquido evitando la formación de burbujas y, una vez que el fondo del bloque empieza a enfriarse y, por tanto, a endurecerse, incluimos la pieza con la orientación requerida en la región central procurando que queden bien inmersas y se deja enfriar el bloque. Una vez enfriado el bloque, éste es tallado en forma de pirámide invertida para su posterior corte en secciones seriadas en el microtomo de rotación. Las ristras de cortes se estiran en un baño de agua caliente a 40 °C y se recogen con portaobjetos. Los portaobjetos con las secciones se dejan secar en una placa de metal caliente a 40 °C. Una vez secos pueden ser utilizados inmediatamente o almacenados a temperatura ambiente o a 4 °C hasta su uso.

2.6.2. Tinciones

Una vez secos los preparados y previo a la tinción, se procede a desparafinar los cortes y rehidratarlos mediante baños sucesivos de etanol de concentración decreciente (xilol, etanol 100°, 96°, 80°, 70°), finalizando con un último baño en agua destilada. Tras la hidratación, los

preparados de secciones histológicas se someten a diferentes tipos de tinciones dependiendo de las estructuras que se quieran teñir para su observación.

➤ Tricrómico de Masson

Mediante esta técnica de coloración vamos a poder detectar diferentes estructuras celulares como son los núcleos y los cromosomas en tonos violáceos, los citoplasmas en tonos rosados y las fibras de colágeno y las láminas basales en tonos verdes. Los preparados histológicos desparafinados y rehidratados son sumergidos en diferentes cubetas de tinción con diferentes colorantes, pasando por lavados con agua entre cada colorante. Para esta tinción se utilizan cuatro tipos de colorantes, la hematoxilina de Harris (Merk, 104302), la fucsina ácida al 50% (Panreac, 2510331), el Orange G al 50% (Panreac, 123596) y el verde luz al 0,1% (Panreac 253524). Una vez pasados los preparados por todos los colorantes, se retira el exceso de éstos mediante dos baños en agua corriente y se deshidratan las muestras mediante pases rápidos en baños sucesivos de alcoholes de concentración creciente (etanol 96°, 100° y xilol). Una vez deshidratados, se añade una gota de medio de montaje permanente DePeX (Serva, 18243) por preparado y se coloca el cubreobjetos. Se deja secar durante unos minutos, y una vez secos, las muestras están listas para su observación en el microscopio.

➤ Ácido Peryódico-Schiff o PAS

La técnica de coloración PAS (del inglés *P*eryodic *A*cid-*S*chiff) nos permite detectar estructuras celulares que contienen carbohidratos, como es el caso del acrosoma en las espermátidas, tiñéndolas de un tono rosado. Una vez desparafinados y rehidratados, los preparados histológicos son sumergidos en una solución de ácido peryódico (Panreac 142320) durante 5 minutos. Retiramos el ácido mediante un lavado en agua corriente y sumergimos los preparados en una solución denominada reactivo de Schiff (Merck 1090330500) durante media hora, donde adquirirán un color rosado. Los preparados se aclaran con un baño de agua sulfurosa (corriente) de 2 minutos. Como contraste celular, se añade hematoxilina de Harris durante 1 minuto y medio. Después, los preparados se lavan en agua corriente, se deshidratan y se montan de manera permanente de la misma manera que se ha descrito en el apartado anterior.

2.7. CAPTURA Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

Las imágenes de las preparaciones obtenidas a partir de individuos macho fueron capturadas con dos microscopios ópticos de epifluorescencia Olympus BX-61 motorizados y equipados con una cámara digital Olympus DP-70 o DP-71, y controlados con el *software* AnalySIS. Ambos microscopios están dotados con filtros adecuados para la observación de distintos fluorocromos acoplados a los anticuerpos secundarios, y de DAPI para la tinción de la cromatina.

Las imágenes obtenidas a partir de las preparaciones de oocitos de ratón fueron capturadas por un microscopio confocal Olympus IX70 de disco giratorio de barrido (*Spinning Disk*) motorizado y equipado con un set de filtros de paso triple, una rueda de filtro de excitación Sutter y una cámara CCD (*Charge-Couple Device*) refrigerada MicroMax, todo ello controlado por el *software* Metamorph.

Para el procesamiento de las imágenes obtenidas se han utilizado los *softwares* ImageJ, Adobe Photoshop 7.0 y CS5 e Image Lab mediante los cuales se han preparado y montado las láminas presentes en esta Tesis Doctoral.

2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos y las representaciones gráficas de los datos obtenidos en los diferentes estudios se llevaron a cabo con los *softwares* Microsoft Excel 2013 y GraphPad Prism 6.01. Para cada parámetro estudiado las muestras se analizaron mediante el test *t-Student*. Las diferencias se consideraron significativas a unos valores $p \leq 0,05$ y $p \leq 0,01$.

Para llevar a cabo un análisis estadístico que permitiese detectar diferencias significativas entre las diferentes muestras se realizaron al menos 3 réplicas independientes, utilizando a su vez, al menos 3 individuos diferentes. Los experimentos cuyos datos han sido recopilados en 2 réplicas no han sido sometidos a ningún análisis estadístico.

R E S U L T A D O S

Resultados

1. Vía de señalización BUB1/H2AT120ph/SGO2 en meiosis

Como primera aproximación a nuestro estudio de las vías de señalización del DCI y de la interacción entre las proteínas que lo componen, hemos analizado la dinámica de varias proteínas implicadas en las dos vías de señalización durante la primera y la segunda división meiótica. Para ello, hemos utilizado espermatoцитos de ratones de la cepa BL/6 con edades comprendidas entre los 3 y 6 meses, ya que son animales adultos en edad reproductora, y por tanto nos permite estudiar todas las etapas de la meiosis en un mismo preparado. Sin embargo, para comparar la localización de algunas de las proteínas más relevantes de cada vía de señalización durante las etapas de metafase-I y metafase-II en oocitos de ratón, hemos utilizado hembras de la cepa CD1, puesto que es la más comúnmente empleada debido a que presentan un mayor número de oocitos comparado con las hembras BL/6.

Como marcadores de seguimiento de la meiosis hemos utilizado inmunodetecciones de proteínas del cinetocoro con el suero humano ACA, y de la proteína SYCP3, componente estructural de los EAs/ELs del CS y, por tanto, específica de meiosis. El suero ACA (del inglés *Anti-Centromere Autoantibody*) es un suero humano generado como una respuesta autoinmune que consta de una combinación inespecífica de anticuerpos contra proteínas centroméricas localizadas en el cinetocoro, siendo las más comunes las proteínas CENP-A, CENP-B y CENP-C (Earnshaw y Rothfield, 1985; Earnshaw, 2015). Este suero nos ha permitido reconocer en nuestro estudio la localización de los cinetocoros en los cromosomas y, a su vez, nos ha servido como indicador de la orientación de los bivalentes y cromosomas en la primera y segunda división meiótica, respectivamente. En cuanto a la proteína SYCP3, su distribución ha sido descrita en la meiosis de machos de diferentes especies de roedores (Dobson *et al.*, 1994; Page *et al.*, 1998; Schalk *et al.*, 1998; Parra *et al.*, 2004) y ha sido utilizada desde entonces como marcador de las diferentes etapas de la meiosis.

1.1. DINÁMICA DE LAS PROTEÍNAS DE LA VÍA BUB1 EN LA MEIOSIS MASCULINA DE RATÓN

La primera vía de señalización a estudiar en esta Tesis Doctoral ha sido la vía para el reclutamiento de la proteína Shugoshina 1/2 (SGO1/2). Esta vía de señalización ha sido descrita

en mitosis para el reclutamiento de la proteína SGO1 en el centrómero (Kawashima *et al.*, 2010; Ricke *et al.*, 2012; Asghar *et al.*, 2015). Dado que la proteína encargada de la protección de los CC en la meiosis de mamíferos es SGO2 (Lee *et al.*, 2008; Llano *et al.*, 2008), el objetivo para este primer capítulo fue describir la vía de señalización BUB1-H2AT120ph-SGO2 en la meiosis de ratón. Mediante diferentes inmunolocalizaciones procedimos a la detección de las principales proteínas de esta vía tanto en esparcidos como en aplastados de ratón, analizando la dinámica de distribución de estas proteínas a lo largo de la meiosis masculina y su localización relativa en metafase-I y metafase-II en individuos macho y hembra WT.

1.1.1. Localización de BUB1

➤ Distribución de la proteína BUB1 durante la meiosis

La proteína BUB1 no sólo participa en el centrómero como miembro del SAC (Elowe, 2011), sino que también ha sido descrita como la quinasa encargada de la fosforilación de la histona H2AT120ph (Kawashima *et al.*, 2010). Dada la escasa bibliografía sobre esta quinasa en el contexto de la meiosis de mamíferos, procedimos a estudiar su distribución en espermatoцитos de ratón mediante las técnicas de esparcido y de aplastado. Para el estudio de la dinámica de esta proteína durante la profase-I, hemos utilizado la técnica de esparcido, con la cual la cromatina queda extendida en un plano permitiendo una mayor exposición de los epítomos a los anticuerpos y, además, los bivalentes pueden ser observados de manera independiente al quedar esparcidos y separados unos de otros (Fig. 1). Sin embargo, para el estudio de las segregaciones hemos utilizado la técnica de aplastado, la cual preserva el volumen del núcleo y, por tanto, la posición relativa de los bivalentes/cromosomas originales en la célula, permitiéndonos así poder analizar la disposición espacial de BUB1 en estas etapas (Fig. 2).

Durante la profase-I, analizamos la distribución relativa de BUB1 respecto a la distribución de SYCP3, nuestra proteína de referencia, y a la apariencia de la cromatina teñida con DAPI. Como localización específica durante la meiosis, observamos que BUB1 aparece en primer lugar sobre los cromosomas sexuales desde paquitena media, donde está acumulada en la cromatina del cuerpo XY hasta el final de diplotena. En esta etapa la señal de BUB1 queda restringida a los EAs de los cromosomas sexuales, colocalizando con la señal de SYCP3 (Fig. 1A-C). En paquitena, etapa en cual la sinapsis es completa en que todos los bivalentes, SYCP3 aparece marcando los ELs del CS. Como cada CS está formado por dos ELs, uno por cada cromosoma homólogo, en

esta etapa distinguimos con SYCP3 19 líneas gruesas, correspondientes a los 19 bivalentes autosómicos sinapsados. Además, SYCP3 marca los EAs/ELs no sinapsados de los cromosomas sexuales como filamentos finos alargados que se unen en una región más engrosada correspondiente al CS constituido en la región PAR (Fig. 1A). El bivalente sexual o cuerpo XY presenta una mayor condensación de la cromatina con respecto a la del resto de los bivalentes autosómicos, pudiendo distinguirse mediante la tinción con DAPI desde la etapa de paquitena hasta el final de la profase-I con una tonalidad hipercromática (Fig. 1A-D). A nivel del centrómero, BUB1 es reclutada a los cinetocoros en paquitena tardía, etapa en la que SYCP3 comienza a engrosarse en los extremos de los CS de los autosomas, observándose una señal discreta por cada centrómero de los bivalentes autosómicos y dos señales de menor tamaño en el bivalente sexual, correspondientes a los centrómeros de cada uno de los cromosomas sexuales (Fig. 1B). En diplotena comienza la desinapsis y, por tanto, el desensamblaje del CS, quedando los cromosomas unidos únicamente por los quiasmas. En esta etapa, los cromocentros, regiones de agrupaciones de los centrómeros de varios cromosomas, se pueden observar claramente con DAPI con una tonalidad más brillante e hipercromática. SYCP3 se observa marcando hebras más finas sobre los ELs desinapsados, mientras que BUB1 sólo aparece en los EAs de los cromosomas sexuales y en los centrómeros de todos los bivalentes (Fig. 1C). Este marcaje de BUB1 se mantiene hasta diacinesis, fase en la cual se pierde la señal de los EAs del cuerpo XY y comienza a observarse una mayor acumulación de la proteína en los centrómeros hasta metafase-I (Fig. 1D, 2A). En diacinesis, la señal centromérica de SYCP3 es más intensa y comienzan a formarse engrosamientos a lo largo de los ELs de todos los bivalentes.

Para el análisis de la distribución de BUB1 en las divisiones meióticas y poder observar las segregaciones cromosómicas, utilizamos la técnica de aplastado de los túbulos seminíferos. A partir de espermatocitos aplastados, hemos observado que BUB1 se localiza en el cinetocoro en metafase-I (Fig. 2A). En esta etapa, SYCP3 aparece acumulado en el DCI en forma de "T" o "Y" y en forma de parches en el dominio intercromatídico (DI), región de contacto entre las cromátidas hermanas (Parra *et al.*, 2004) (Fig. 2A). A partir de anafase-I, la señal de SYCP3 desaparece de brazos y se reduce en el centrómero en forma de anillos y barras. A su vez, parte de la proteína SYCP3 deslocalizada forma acumulaciones redondeadas que quedan dispuestas por el citoplasma (Fig. 2B). En esta etapa, los cinetocoros hermanos comienzan a individualizarse y a reorganizar su estructura pudiéndose observar dos señales redondeadas de

Resultados

BUB1 por cada centrómero homólogo, una por cinetocoro hermano (Fig. 2B). En telofase-I, la señal de SYCP3 se reduce a pequeñas barras o “comas”, una por centrómero, en cada polo de la célula, y con BUB1 se hace más evidente la disociación de los cinetocoro como resultado de la pérdida de la cohesión intercinetocórica (Fig. 2B). Durante la intercinesis se pierde la señal de BUB1 (Fig. 2C), pero la proteína vuelve a reclutarse en profase-II (imágenes no mostradas). En las intercinesis tempranas, la señal de SYCP3 queda reducida a unas pocas barras que coinciden con las regiones de mayor intensidad marcados con DAPI (cromocentros) que terminan desapareciendo en intercinesis tardía. En metafase-II se observan dos señales redondeadas de BUB1 en cada cromosoma, una por cada cinetocoro hermano (Fig. 2D). Al comienzo de la anafase-II, las cromátidas hermanas de cada cromosoma segregan a polos opuestos de la célula, observándose una señal de BUB1 por cada cinetocoro hermano. Finalmente, a lo largo de la telofase-II, etapa en la que volvemos a observar algo de señal de SYCP3 en forma de “comas” en los centrómeros, se pierde progresivamente la señal de BUB1 (Fig. 2E).

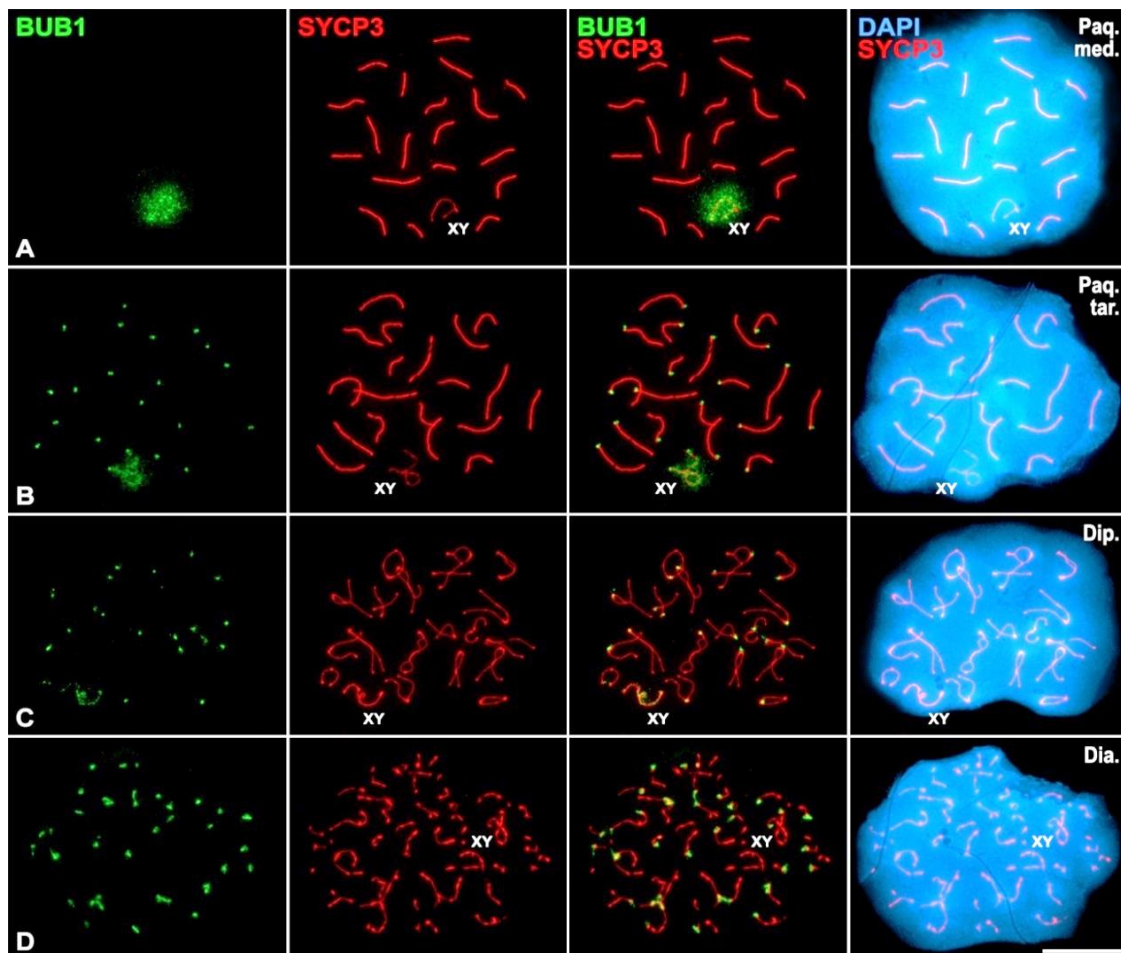


Figura 1. Patrón de distribución de la proteína BUB1 durante la profase-I. Doble inmunolocalización de BUB1 (verde) y SYCP3 (rojo) en esparcidos de espermatocitos de ratón. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A) Paquitena media. (B) Paquitena tardía. (C) Diplotena. (D) Diacinesis. El bivalente sexual (XY) aparece indicado. La barra de medida en D corresponde a 10 μ m.

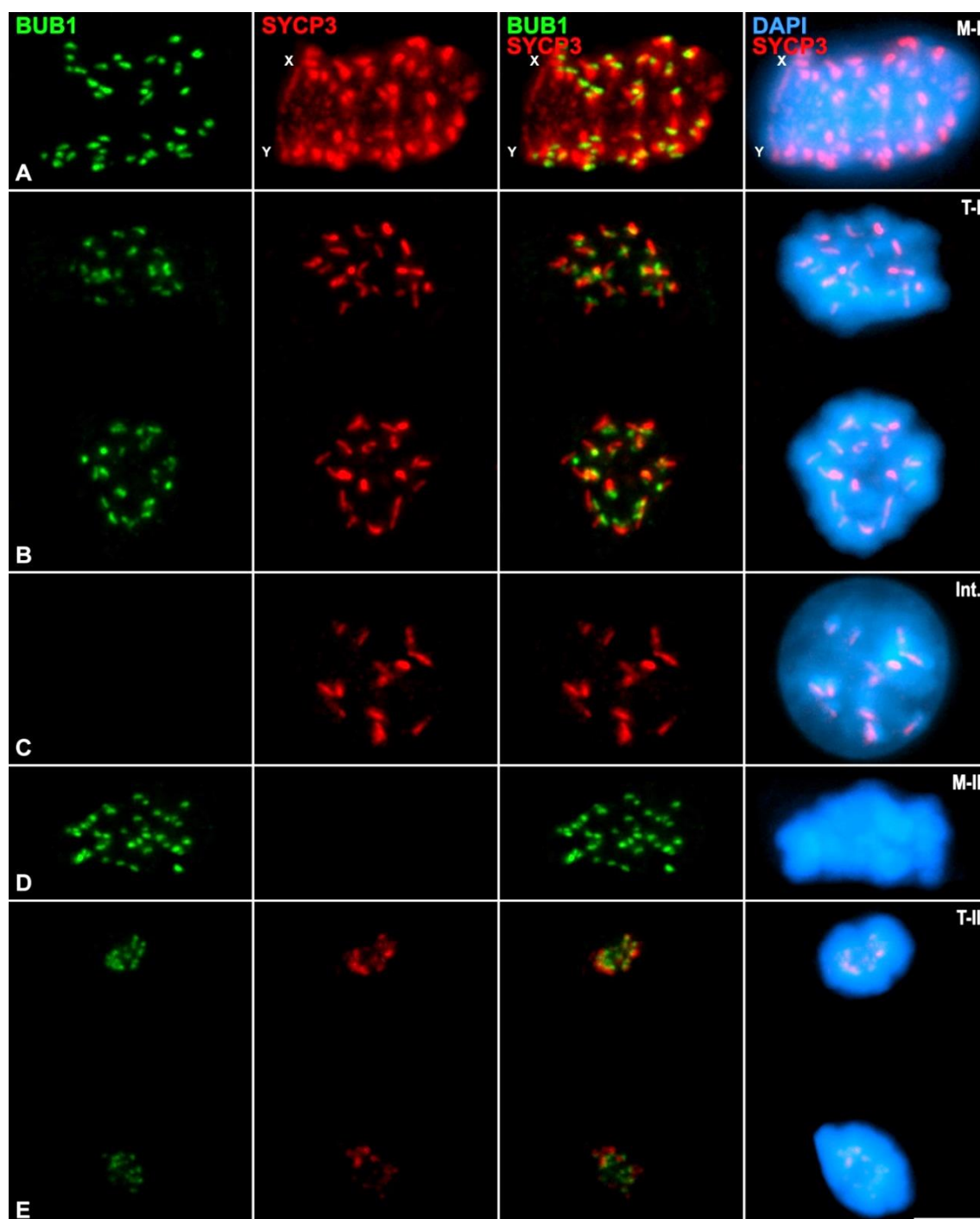


Figura 2. Patrón de distribución de la proteína BUB1 desde metafase-I hasta telofase-II. Doble inmunolocalización de BUB1 (verde) y SYCP3 (rojo) en aplastados de túbulos seminíferos de ratón. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A) Metafase-I. (B) Telofase-I. (C) Intercinesis. (D) Metafase-II. (E) Telofase-II. Los cromosomas sexuales (X e Y) aparecen indicados en la metafase-I. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. La barra de medida en E corresponde a 10 μm .

➤ Localización relativa de la proteína BUB1 en los centrómeros

Para estudiar con más profundidad la distribución de BUB1 en el centrómero, realizamos dobles inmunodetecciones de BUB1 junto a SYCP3 o los cinetocoros tanto en metafase-I como en metafase-II.

En metafase-I, BUB1 se localiza marcando los cinetocoros de los bivalentes alineados en la placa ecuatorial, colocalizando parcialmente con la señal centromérica de SYCP3 (Fig. 3A, B). En un análisis más detallado ampliando las imágenes de bivalentes y centrómeros seleccionados, se observa que, en vista lateral, BUB1 presenta una señal redondeada e intensa por encima del DCI marcado con SYCP3, el cual adquiere una conformación en forma de “T” (Parra *et al.*, 2004) (Fig. 3F, G). La visión polar de la señal en “T” de SYCP3 se muestra como un anillo en cuyo centro se localiza la señal de BUB1 (Fig. 3H).

Para corroborar si la localización de BUB1 correspondía a los cinetocoros, analizamos su distribución con respecto a la de los cinetocoros marcados con el suero ACA. Tanto en metafase-I como en metafase-II BUB1 colocaliza con los cinetocoros (Fig. 3C-E). Sin embargo, esta colocalización es parcial, quedando la señal de BUB1 levemente desplazada con respecto a la señal de ACA (Fig. 3I, J). Esta colocalización parcial es consistente con el hecho de que BUB1 forma parte de la lámina externa del cinetocoro (Cheeseman y Desai, 2008; Sun y Kim, 2012), mientras que el suero ACA detecta proteínas localizadas, principalmente, en la lámina interna (Earnshaw, 2015).

1.1.2. Localización de la variante H2AT120ph

➤ Distribución de H2AT120ph durante la meiosis

La variante histónica H2AT120ph ha sido descrita en el centrómero durante la mitosis (Watanabe, 2010; Yamagishi *et al.*, 2010) y la meiosis-I de ratón (Baarends *et al.*, 2005; Rattani *et al.*, 2013). Los estudios en meiosis sobre esta H-PTM son escasos y se centran, principalmente, en las etapas comprendidas entre prometafase-I y telofase-I. En esta Tesis Doctoral, se presenta un análisis exhaustivo de la distribución de la variante H2AT120ph a lo largo de toda la meiosis de ratón en espermatocitos y su localización relativa a nivel del centrómero en las metafases-I y -II tanto en oocitos como en espermatocitos.

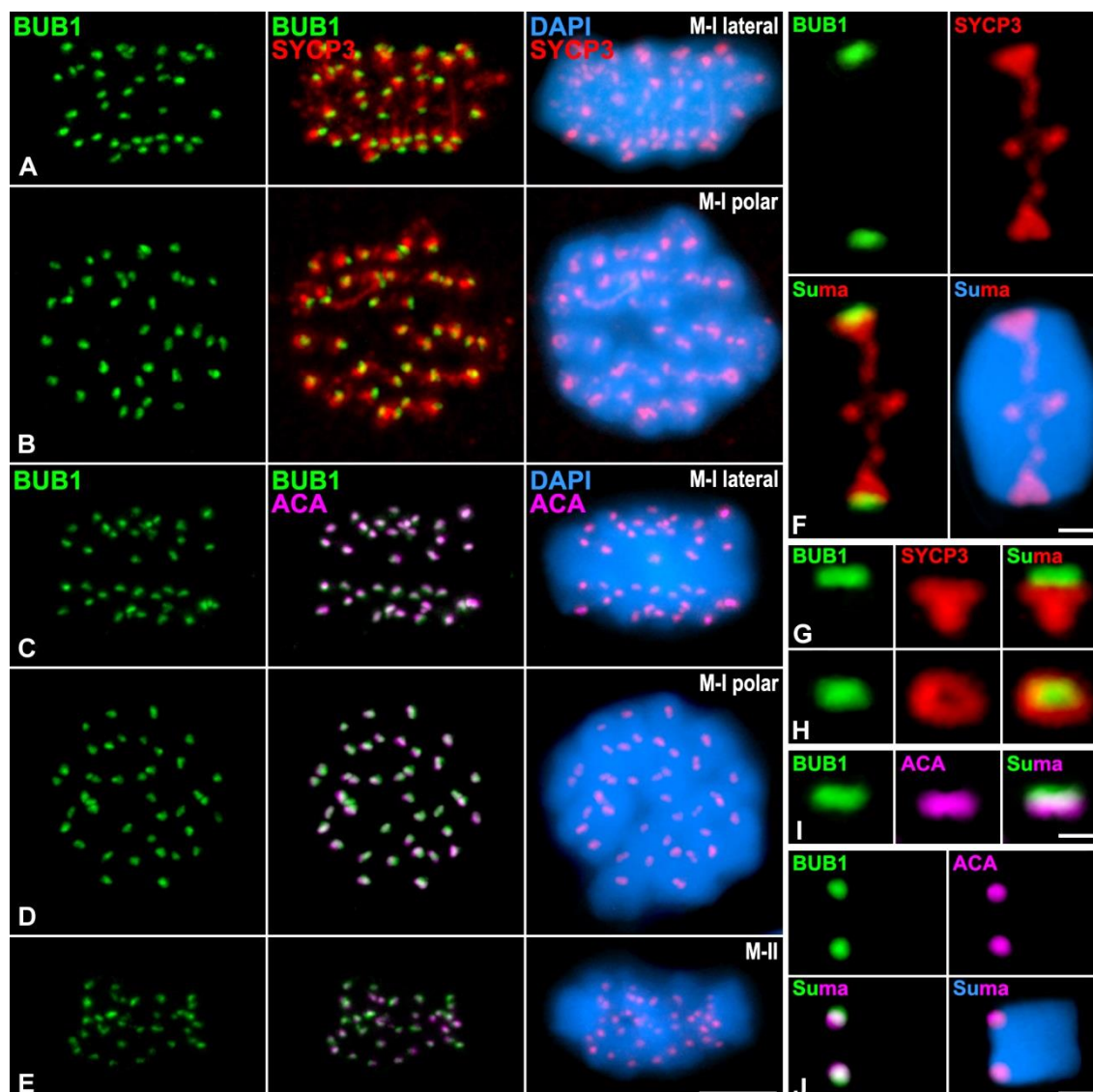


Figura 3. Distribución relativa de BUB1 en los centrómeros en metafase-I y metafase-II. Dobles inmunolocalizaciones de BUB1 (verde) junto con SYCP3 (rojo) o los cinetocoros (ACA, rosa) en aplastados de túbulos seminíferos de ratón. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. (A, C) Metafases-I en vista lateral y (B, D) en vista polar. (E) Metafase-II. (F-J) Detalles a mayor aumento de la localización de BUB1 respecto a la de SYCP3 en el DCI en un bivalente autosómico en metafase-I (F), un centrómero en vista lateral (G) y un centrómero en vista polar (H); y de BUB1 respecto a los cinetocoros en un centrómero en metafase-I (I) y en un cromosoma en metafase-II (J), ambos en vista lateral. Las barras de medida corresponden a 5 μm (E), 2 μm (F y J) y 1 μm (I).

Para el estudio de la dinámica de H2AT120ph hemos analizado su distribución relativa con respecto a la de la proteína SYCP3 en espermatoцитos esparcidos de ratón. Durante la profase-I temprana, H2AT120ph aparece marcando de forma homogénea toda la cromatina desde leptotena hasta el final de cigotena. En estas etapas SYCP3 aparece marcando los EAs de los cromosomas homólogos en forma de parches durante leptotena, y en forma de líneas finas durante cigotena. En esta etapa, comienza el apareamiento entre cromosomas homólogos

observándose los EAs de los cromosomas en forma de finas líneas (Fig. 4A-C). A partir de este momento, en paquitena, toda la señal de la cromatina desaparece observándose exclusivamente el cuerpo XY, en el que la cromatina de los cromosomas sexuales aparece intensamente marcada hasta diplotena media (Fig. 4D, E). Al final de la fase de diplotena H2AT120ph comienza a acumularse en los centrómeros de los autosomas (Fig. 4F). De manera análoga, la señal de la cromatina de los cromosomas sexuales va desapareciendo al tiempo que se acumula únicamente en sus centrómeros (Fig. 4F). La modificación H2AT120ph nunca se observa marcando los EA/ELs del CS como SYCP3 a lo largo de la profase-I (Fig. 4 A-F). A partir de diacinesis y hasta metafase-I, H2AT120ph colocaliza con SYCP3 en el DCI de los autosomas y del cromosoma X (Fig. 5A, B). Es interesante destacar que se marca el centrómero del cromosoma Y, el cual suele mostrar una composición proteica diferente para la mayoría de las proteínas estudiadas, como SYCP3 (Fig. 5A, B). En telofase-I, momento en que se pierde la cohesión intercinetocórica, la señal única redondeada de H2AT120ph pasa a individualizarse y aparecen dos señales redondeadas, una por centrómero de cada cromátida de cada cromosoma (Fig. 5C). Durante la etapa de intercinesis, la señal de H2AT120ph se desvanece (imágenes no mostradas), y vuelve a acumularse en los centrómeros en profase-II, donde aparece como señales redondeadas sobre los cromocentros detectados con DAPI (Fig. 5D). En metafase-II H2AT120ph aparece como dos señales redondeadas en el centrómero de cada cromosoma, una por cada cinetocoro hermano, mientras que la señal de SYCP3 es prácticamente inapreciable (Fig. 5E). Finalmente, en telofase-II, cada polo presenta grupos de señales de H2AT120ph, una por cromátida segregada, que corresponden a las señales de cada cinetocoro hermano (Fig. 5F). Estas señales de H2AT120ph desaparecen en la etapa de espermátida temprana (imágenes no mostradas).

Además de las señales centroméricas descritas previamente, con el anticuerpo utilizado pudimos observar señales de H2AT120ph en los polos celulares. Estas señales aparecen como una pareja de anillos asociados en cada polo celular en metafase-I (Fig.5B), y un anillo por polo en metafase-II (Fig. 5E). Estas señales se encuentran en regiones que no muestran tinción con DAPI tras la técnica de esparcido (Fig. 5B, E).

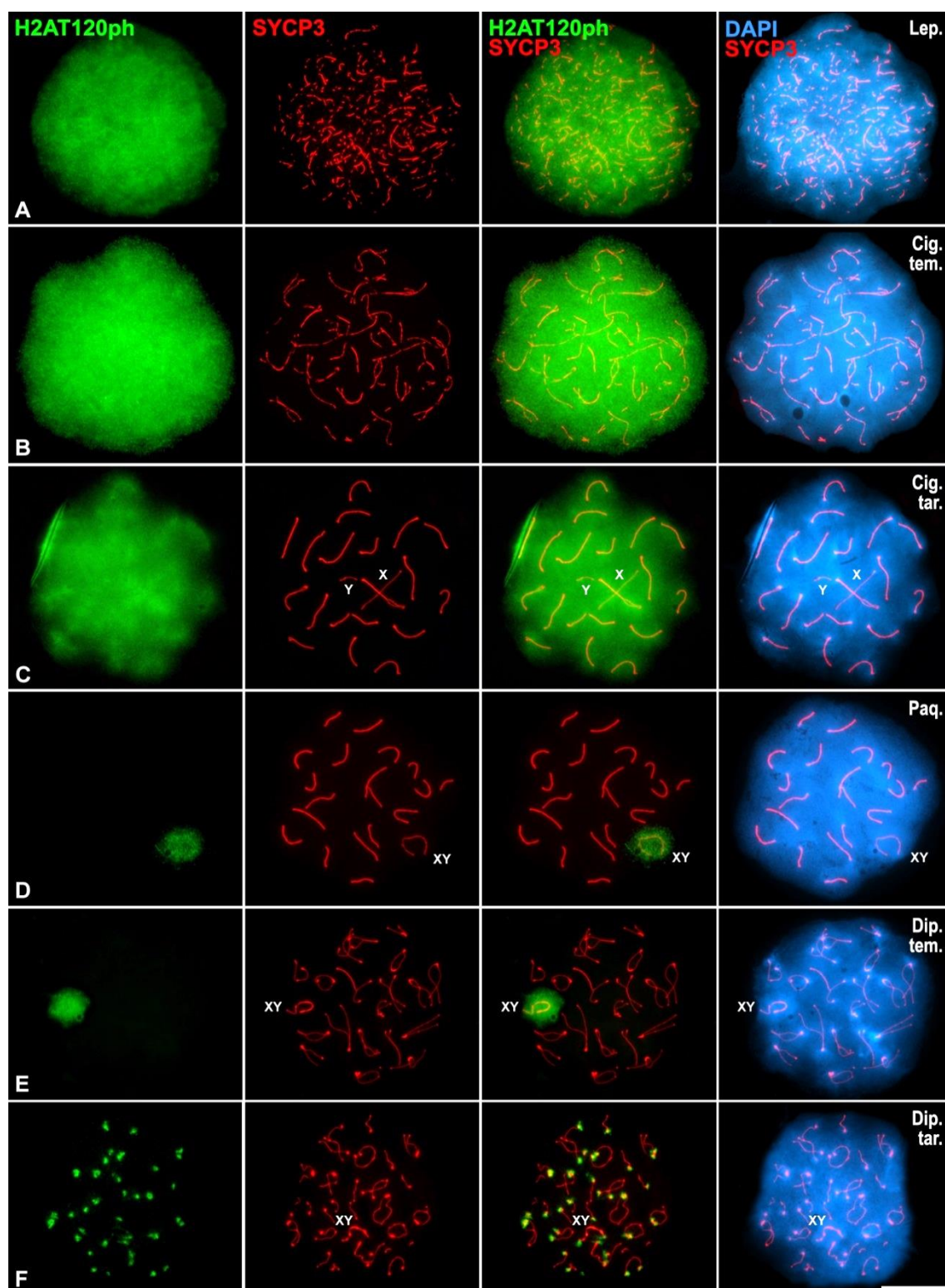


Figura 4. Patrón de distribución de la modificación histónica H2AT120ph durante la profase-I. Doble inmunolocalización de H2AT120ph (verde) y SYCP3 (rojo) en espermátocitos de ratón en diferentes etapas de la profase-I. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A) Leptotena. (B y C) Cigotenas temprana y tardía, respectivamente. (D) Paquitena. (E y F) Diplotenas temprana y tardía, respectivamente. Los cromosomas sexuales asinapsados (X e Y) y el bivalente sexual (XY) aparecen indicados en las etapas donde ha sido posible su identificación. La barra de medida en F corresponde a 10 μ m.

➤ Localización precisa de H2AT120ph en los centrómeros

Dada la relevancia de esta H-PTM en el establecimiento del DCI como dominio funcional del centrómero en mitosis (Watanabe, 2010; Yamagishi *et al.*, 2010), quisimos profundizar más en su distribución precisa en los centrómeros en metafase-I y en metafase-II, mediante las técnicas de aplastado y esparcido. De nuevo, para llevar a cabo un estudio más detallado, analizamos la distribución relativa de H2AT120ph con respecto a la distribución de SYCP3 y los cinetocoros, como proteínas de referencia, y en relación con la proteína MCAK, cuya distribución recuerda a la observada para la modificación H2AT120ph (Parra *et al.*, 2006).

En visiones laterales de las metafases-I tras la técnica de aplastado, y a bajo aumento, H2AT120ph aparentemente colocaliza con SYCP3 en los centrómeros de los autosomas y el cromosoma X (Fig. 6A). No obstante, esta presunta colocalización de H2AT120ph y SYCP3 no es evidente cuando se observan visiones polares de las metafases-I (Fig. 6B). Las observaciones a mayor aumento, y en visión lateral, demuestran que las señales de H2AT120ph en los centrómeros de los autosomas y el cromosoma X presentan mayor amplitud que las señales de SYCP3 (Fig. 6G-I). En este sentido, la señal de H2AT120ph es siempre mucho más amplia que la de SYCP3 en el centrómero del cromosoma Y (Fig. 6H). Por otro lado, en las visiones frontales de los centrómeros de los autosomas se aprecia que mientras que la señal de SYCP3 aparece como dos anillos íntimamente asociados (Parra *et al.*, 2004), la señal de H2AT120ph forma un único anillo que rodea a la señal de SYCP3 (Fig. 6J).

Adicionalmente, estudiando la distribución relativa de H2AT120ph junto con los cinetocoros, nuestros resultados demuestran que el subdominio en forma de “copa” marcado con H2AT120ph rodea a las parejas de cinetocoros hermanos, los cuales están íntimamente asociados en metafase-I (Fig. 6C, D, K-L). En conjunto, la localización de H2AT120ph en los centrómeros en metafase-I nos recuerda a la descrita previamente para las proteínas MCAK (Parra *et al.*, 2006) y SGO2 (Gomez *et al.*, 2007), las cuales tienen una distribución idéntica ya que SGO2 recluta a MCAK a los centrómeros en metafase-I (Llano *et al.*, 2008). Por ello, decidimos realizar una doble inmunodetección de H2AT120ph con alguna de estas proteínas. Dado que los anticuerpos primarios contra las proteínas SGO2 y H2AT120ph están generados en la misma especie (conejo), preferimos utilizar el anticuerpo contra la proteína MCAK, el cual está generado en oveja. Como resultado de la doble inmunodetección de H2AT120ph con MCAK, observamos que, efectivamente, ambas proteínas colocalizan totalmente en el mismo

subdominio centromérico tanto en visiones laterales como polares de los centrómeros (Fig. 6E, F, M, N). Es interesante destacar que tanto H2AT120ph como MCAK están preferencialmente acumuladas en el centrómero del cromosoma Y (Fig. 6E, F).

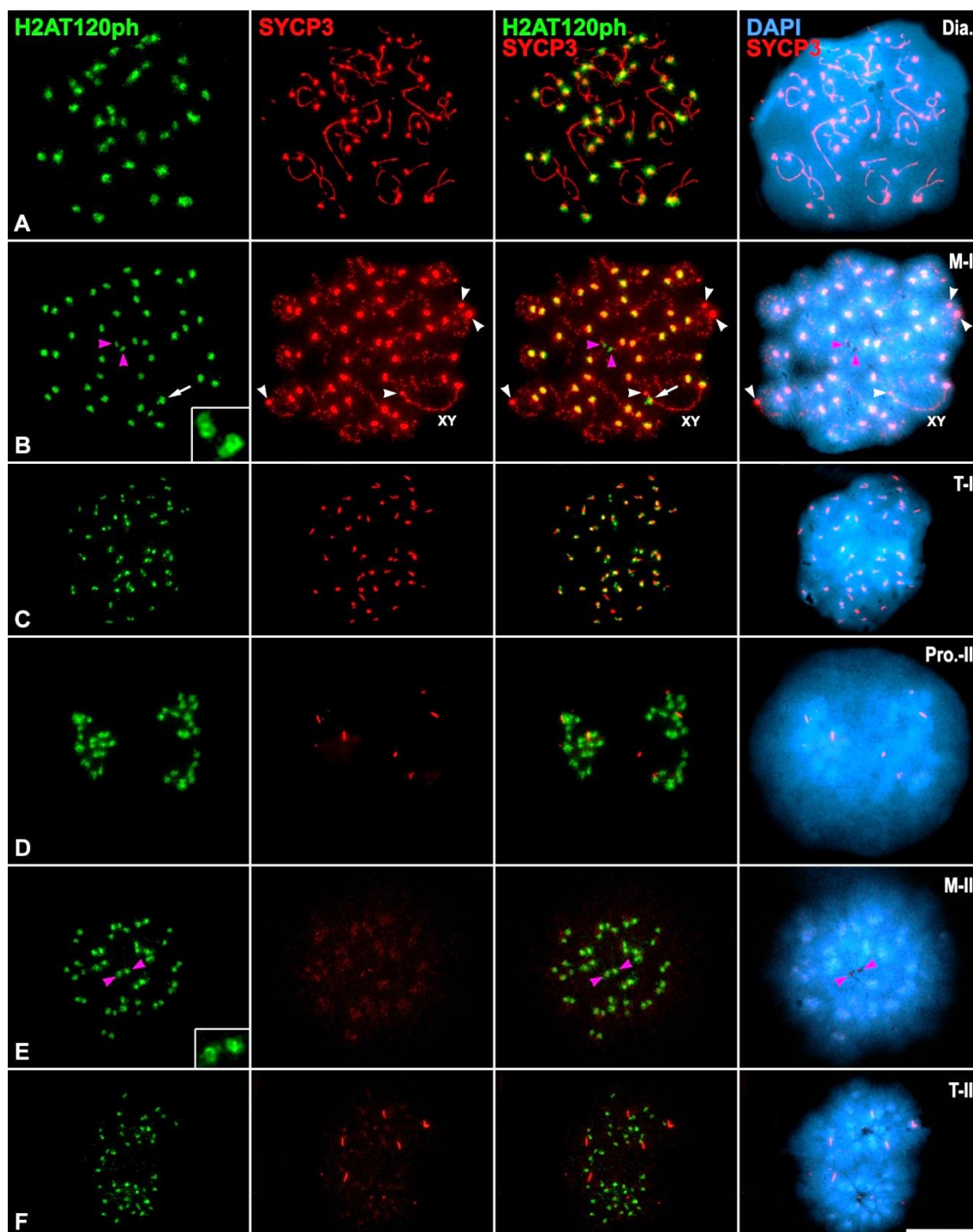


Figura 5. Patrón de distribución de la modificación histónica H2AT120ph desde la diacinesis hasta la telofase-II. Doble inmunolocalización de H2AT120ph (verde) y SYCP3 (rojo) en espermátocitos de ratón. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A) Diacinesis. (B) Metafase-I. (C) Telofase-I. (D) Profase-II. (E) Metafase-II. (F) Telofase-II. Las flechas blancas señalan el centrómero del cromosoma Y. La presencia de H2AT120ph en los polos celulares aparece señalada con puntas de flecha rosas, y se ha ampliado en (B) y (E). Las puntas de flecha blancas indican agregados citoplásmicos de SYCP3. El bivalente sexual (XY) aparece indicado. La barra de medida en F corresponde a 10 μ m.

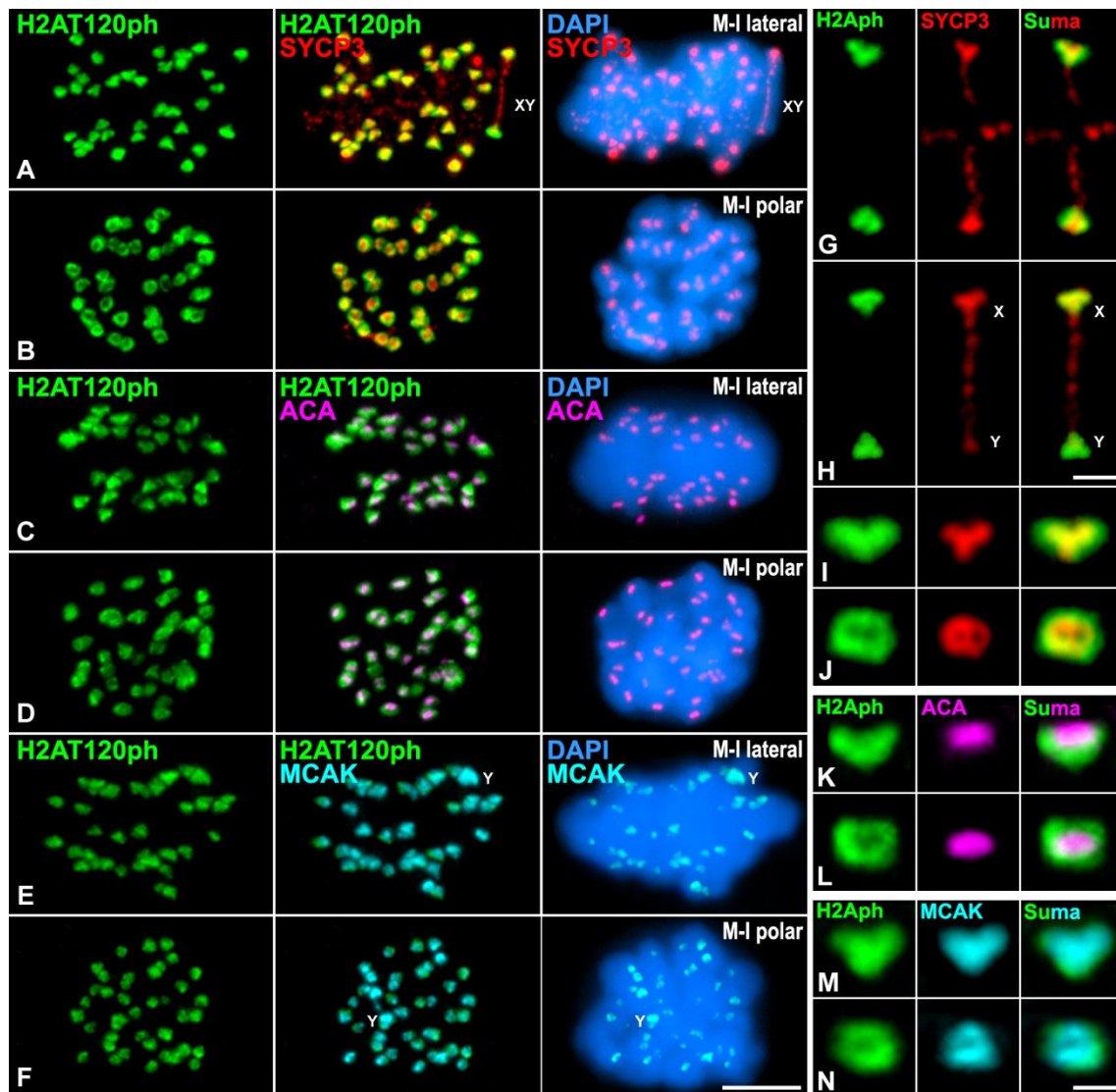


Figura 6. Distribución relativa de la modificación histónica H2AT120ph en el centrómero en metafase-I. Dobles inmunolocalizaciones de H2AT120ph (verde) junto con SYCP3 (rojo en **A, B, G-J**), los cinetocoros (ACA, rosa en **C, D, K y L**) o MCAK (cian en **E, F, M y N**) en aplastados de túbulos seminíferos de ratón. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. (**A-F**) Metafases-I en vista lateral (**A, C y E**) y en vista polar (**B, D y F**). (**G y H**) Bivalentes autosómico (**G**) y sexual (**H**) en metafase-I. (**I-N**) Detalles de centrómeros en metafase-I en visión lateral (**I, K y M**) y en visión polar (**J, L y N**). Los cromosomas sexuales (X e Y), el bivalente sexual (XY), así como los centrómeros del cromosoma Y (Y en **F**), aparecen indicados en las etapas donde ha sido posible su identificación. Las barras de medida corresponden a 5 μm (**F**), 2 μm (**H**) y 1 μm (**N**).

En metafase-II, y tras la técnica de esparcido, H2AT120ph aparece bien como anillos que rodean a los cinetocoros en visión polar de los centrómeros, o bien como pares de puntos que asimismo los rodean en visión lateral (Fig. 7A). Este marcaje, como anillos pericinetocóricos, recuerda al descrito para la proteína MCAK en los centrómeros en metafase-II (Parra *et al.*, 2006). La doble inmunolocalización de H2AT120ph y MCAK confirmó que ambas proteínas

colocalizan en dichos anillos pericinetocóricos en los centrómeros de los autosomas en metafase-II (Fig. 7B). Sin embargo, H2AT120ph no presenta una mayor acumulación en el centrómero del cromosoma Y, como si ocurre con MCAK (Fig. 7B).

En conjunto, los resultados del análisis en detalle de los centrómeros, tanto de metafase-I como de metafase-II, demuestran que H2AT120ph presenta la misma localización que MCAK y, por tanto, que SGO2.

1.1.3. Localización de las proteínas SGO2 y MCAKph

➤ Distribución de la proteína SGO2 durante la meiosis

A continuación procedimos a estudiar la distribución de la proteína SGO2 a lo largo de toda la meiosis utilizando el suero C-105 generado por el Dr. José Luis Barbero (CIB, Madrid) (Fig. S1-S3). SGO2 es reclutada a los centrómeros al final de diplotena y, tanto en metafase-I como en metafase-II, aparece, generalmente, como anillos pericinetocóricos similares a los observados para H2AT120ph y MCAK (Fig. S2, S3). La distribución observada coincide con la ya descrita por Gómez *et al.* (2007), por lo que se incluye en esta Tesis Doctoral en el apartado Anexo I.

➤ Distribución de la proteína MCAKph durante la meiosis

MCAK es una quinasa depolimerizadora de MTs que durante la mitosis actúa bajo la acción de Aurora B (Sanhaji *et al.*, 2011; Shao *et al.*, 2015) para desestabilizar las uniones erróneas de los MTs a los cinetocoros. Para realizar esta función, MCAK ha de ser activada por varias quinastas, entre ellas Aurora B (Ritter *et al.*, 2015), siendo la forma activa de esta proteína la que vamos a estudiar en esta Tesis, la proteína MCAK fosforilada en el residuo de serina 95 (MCAKS95ph) (Zhang *et al.*, 2007).

Tanto en espermatoцитos esparcidos como aplastados de ratón la primera detección de MCAKS95ph, que denominaremos MCAKph a partir de ahora, comienza durante la profase-I. En diplotena MCAKph marca toda la cromatina (Fig. 8A). Al llegar a diacinesis, la señal de la cromatina empieza a perderse y MCAKph comienza a reclutarse específicamente a nivel de los centrómeros (Fig. 8B), siendo más evidente esta localización en metafase-I (Fig. 8C). Durante esta fase, se puede observar cómo las señales centroméricas de MCAKph son más amplias que las de SYCP3, siendo más evidente en el centrómero del cromosoma Y, al igual que ocurriría con la señal de SGO2 (Fig. 8C). En anafase-I, la señal de MCAKph comienza a perderse hasta dejar

Resultados

de detectarse en los centrómeros en telofase-I (Fig. 8D, E). Al final de esta misma etapa, MCAKph reaparece marcando el cuerpo medio del huso acromático (Fig. 8E). En metafase-II se vuelve a observar señal de MCAKph como dos parejas de puntos por centrómero, es decir, como señales pericinetocóricas (Fig. 8F) al igual que se describió previamente para H2AT120ph y SGO2. A lo largo de la telofase-II se pierden las señales de MCAKph de los centrómeros (Fig. 8G). Así pues, la distribución y localización relativa de la forma activa MCAKph a nivel del centrómero es similar a la descrita anteriormente para la proteína no fosforilada (Parra *et al.*, 2006).

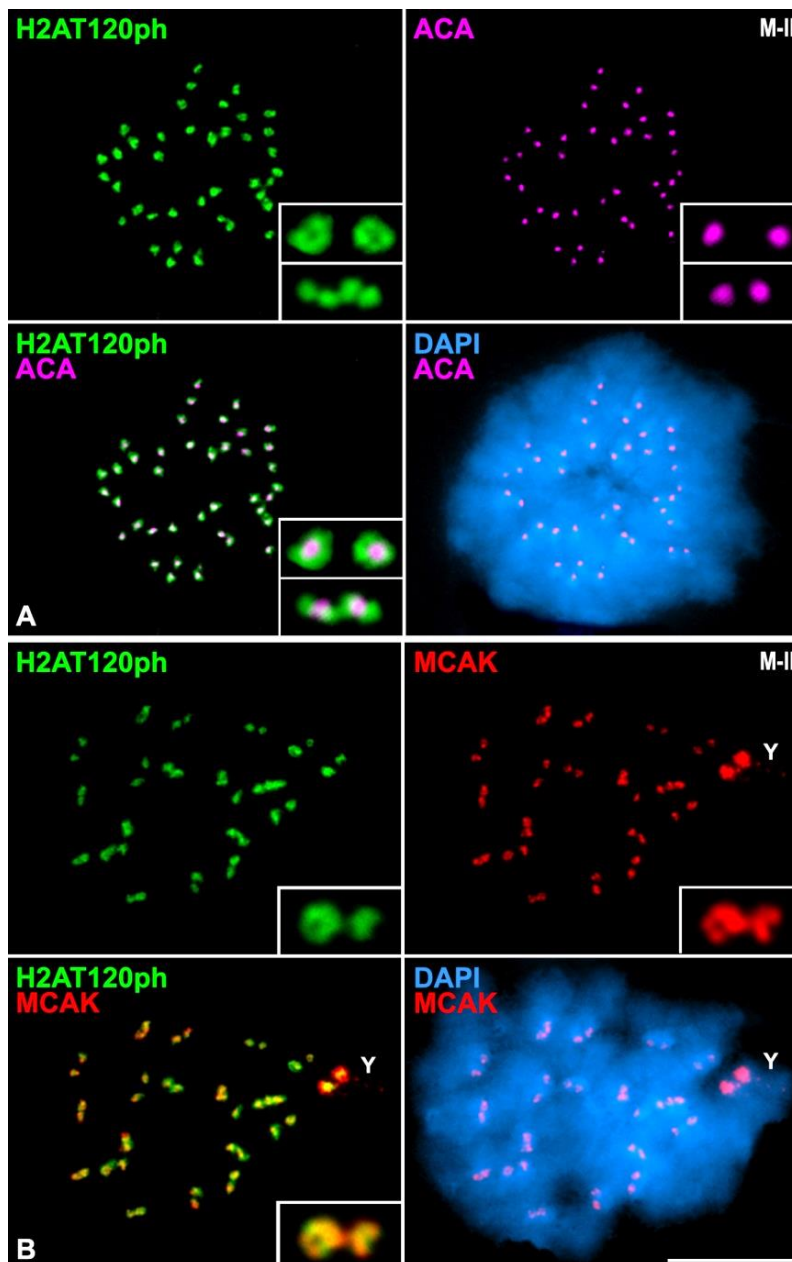
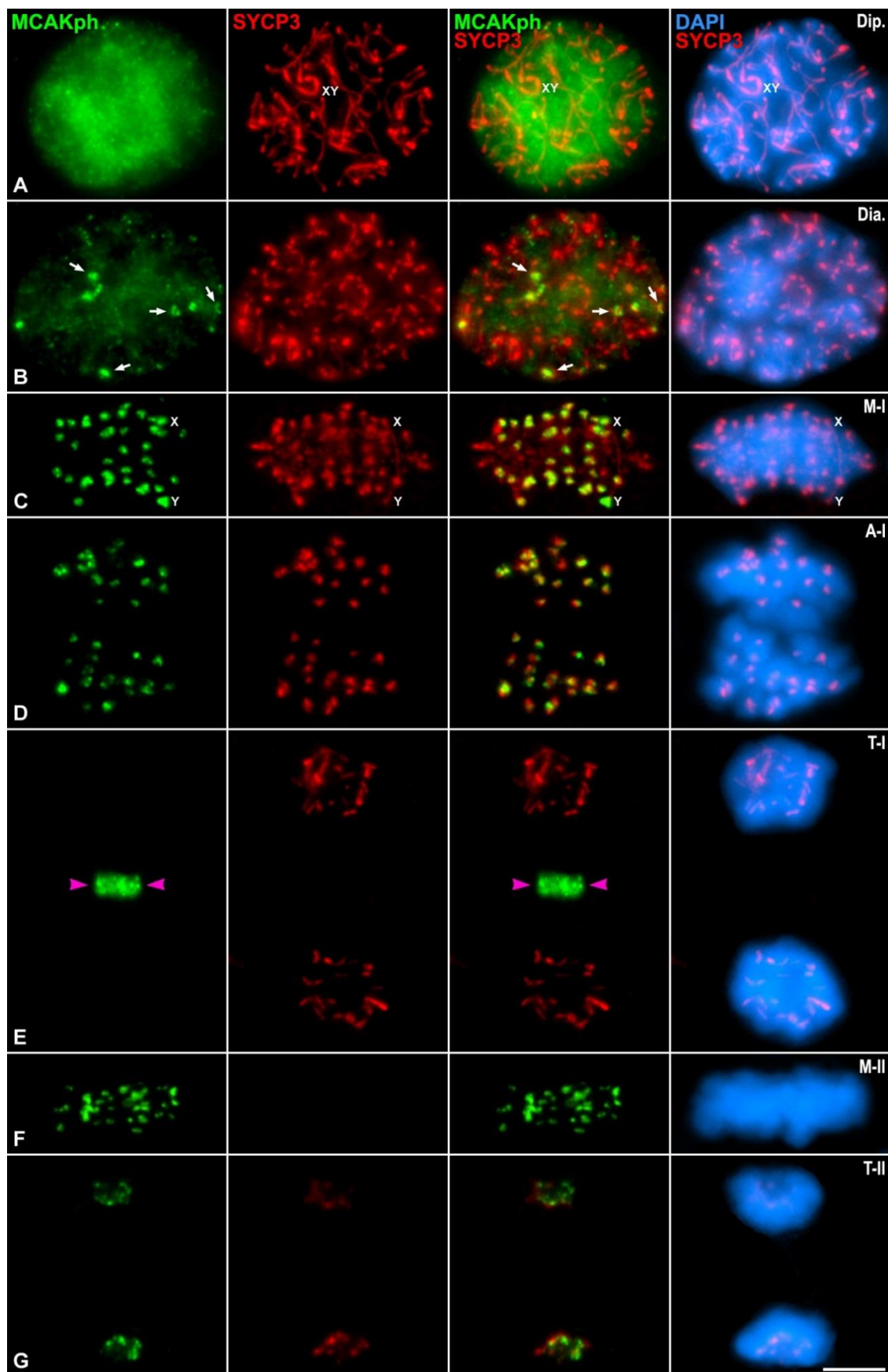


Figura 7. Distribución relativa de la modificación histónica H2AT120ph en el centrómero en metafase-II.

Dobles inmunodetecciones de H2AT120ph (verde) con los cinetocoros (ACA, rosa en A) o con MCAK (rojo en B) en esparcidos de espermátocitos en metafase-II. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). En los detalles incrustados en (A) y (B) se muestran detalles de centrómeros en vista polar y en vista lateral. El centrómero del cromosoma Y (Y) aparece indicado. La barra de medida en B corresponde a 7 μm .



→ **Figura 8. Patrón de distribución de la proteína MCAKph desde diplotena hasta la telofase-II.** Doble inmunolocalización de MCAKph (verde) y SYCP3 (rojo) en aplastados de túbulos seminíferos de ratón. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. (A) Diplotena. (B) Diacinesis. (C) Metafase-I. (D) Anafase-I. (E) Telofase-I. (F) Metafase-II. (G) Telofase-II. Las flechas blancas en (B) indican algunos centrómeros. Las puntas de flecha rosas en (E) indican el cuerpo medio. El bivalente sexual (XY) y los cromosomas sexuales (X, Y) aparecen indicados en las etapas donde ha sido posible su identificación. La barra de medida en D corresponde a 10 μm .

1.2. ORDEN DE RECLUTAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS DE LA VÍA BUB1 EN MEIOSIS

Finalmente, tras el análisis de la distribución de las proteínas de la ruta BUB1-H2AT120ph-SGO2-MCAKph en espermatocitos, quisimos conocer el orden de reclutamiento a los centrómeros de los componentes de esta vía. En base a la realización de dobles inmunolocalizaciones podemos establecer que el orden de reclutamiento de las proteínas de la vía para el reclutamiento de SGO2 en la meiosis de ratones machos es el mismo que en mitosis (Yamagishi *et al.*, 2010; Trivedi y Stukenberg, 2016).

La primera proteína en reclutarse es la quinasa BUB1, la cual se detecta en los centrómeros al final de la etapa de paquitenia (Fig. 1B). A continuación, tanto la variante histórica H2AT120ph como la proteína SGO2 son reclutadas a los centrómeros en diplotena (Fig. 9A-D, S2). El orden entre ambas es difícil de discernir mediante una inmunodetección doble, dado que ambos anticuerpos son de conejo. Sin embargo, basándonos en su dinámica de distribución por separado, parece que H2AT120ph aparece en diplotenas más tempranas (Fig. 4F) que SGO2 (Fig. S2). Tras SGO2, la siguiente proteína en reclutarse en los centrómeros en diacinesis es MCAK (Fig. 9E, F), como ya se describió previamente (Parra *et al.*, 2009). Sin embargo, la activación de MCAK en el centrómero debe tener lugar al mismo tiempo que su reclutamiento o inmediatamente después, ya que no hemos podido encontrar ningún espermatocito en la doble inmunodetección entre MCAK y MCAKph que presente señal de MCAK sin fosforilar (Fig. 9F).

Por tanto, nuestros resultados demuestran que el orden de reclutamiento de las proteínas de la vía BUB1 en la meiosis masculina de ratón coincide con el descrito para células somáticas (Yamagishi *et al.*, 2010; Trivedi y Stukenberg, 2016), siendo por tanto BUB1-H2AT120ph-SGO2-MCAK/MCAKph.

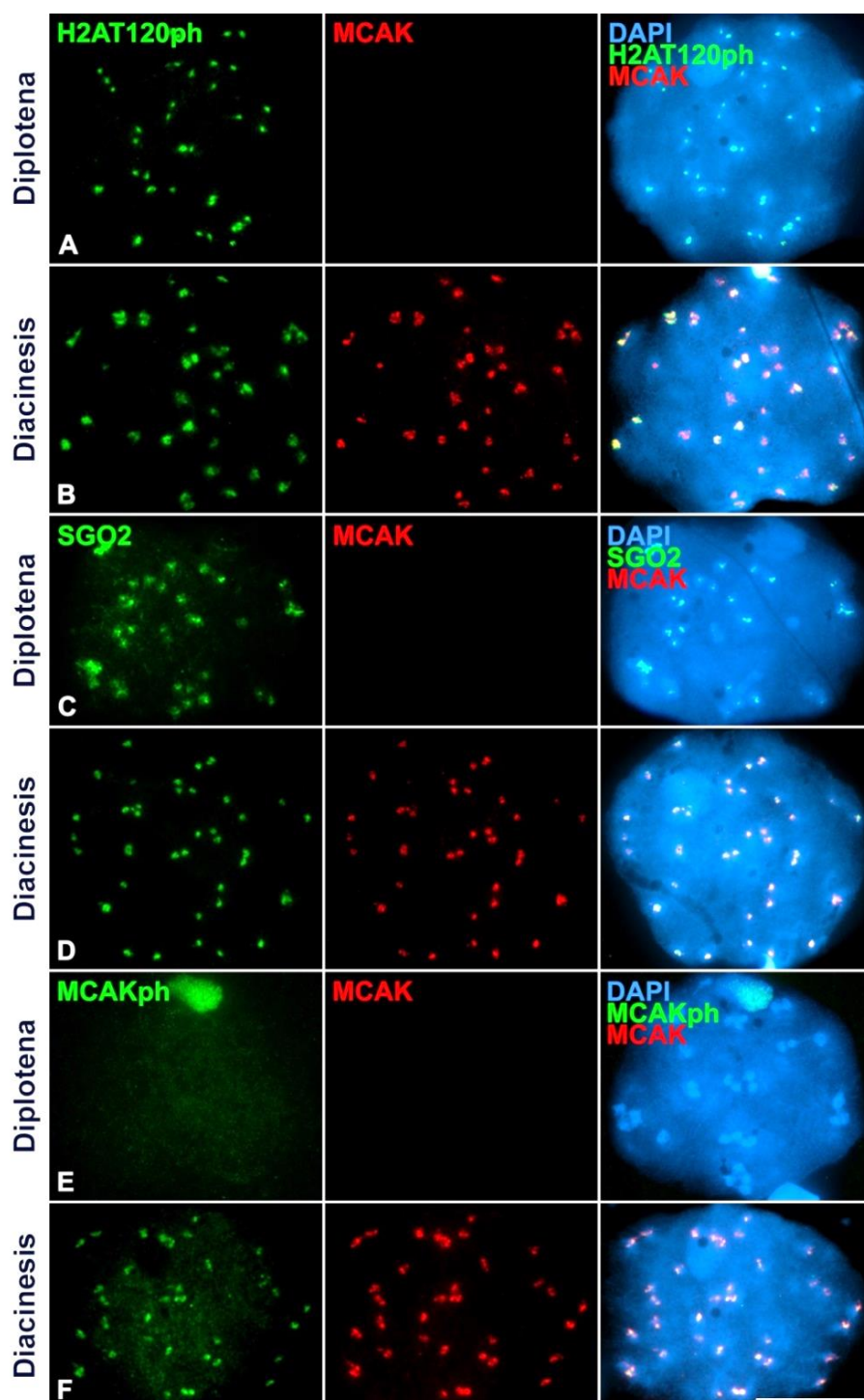


Figura 9. Orden de reclutamiento al centrómero de las proteínas de la vía de señalización de BUB1 al final de la profase-I. Dobles inmunolocalizaciones de MCAK (rojo) con H2AT120ph, SGO2 y MCAKph (verde) en esparcidos de espermatocitos de ratón en diplotena (A, C, y E) y diacinesis (B, D, y F). La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). En diacinesis colocalizan en los centrómeros (F). La barra de medida en D corresponde a 10 μm .

1.3. DINÁMICA DE H2AT120PH Y SGO2 EN LA MEIOSIS FEMENINA DE RATÓN

Para comprobar si la estructura del centrómero en la meiosis femenina de ratón es similar a la del centrómero en la meiosis de machos, decidimos inmunolocalizar alguna de las proteínas más relevantes del DCI en esparcidos de oocitos. Todo el estudio hecho con oocitos de ratón ha sido llevado a cabo en el laboratorio del grupo de la Dra. Katja Wassmann en el

Resultados

Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS) (Université Pierre et Marie Curie, Paris 6). Al tratarse de un material de estudio diferente, tanto las técnicas empleadas para su procesamiento como la captura de imágenes difieren respecto al trabajo realizado con espermatoцитos. Estas diferencias metodológicas han dificultado la detección de alguna de las proteínas de la ruta descritas en machos, ya que aparentemente los mismos anticuerpos no reaccionan igual en espermatoцитos que en oocitos. Por ello, tan sólo se muestra la localización de las dos proteínas más relevantes de la vía BUB1, la variante H2AT120ph y la proteína SGO2 en oocitos esparcidos en las etapas de metafase-I y metafase-II.

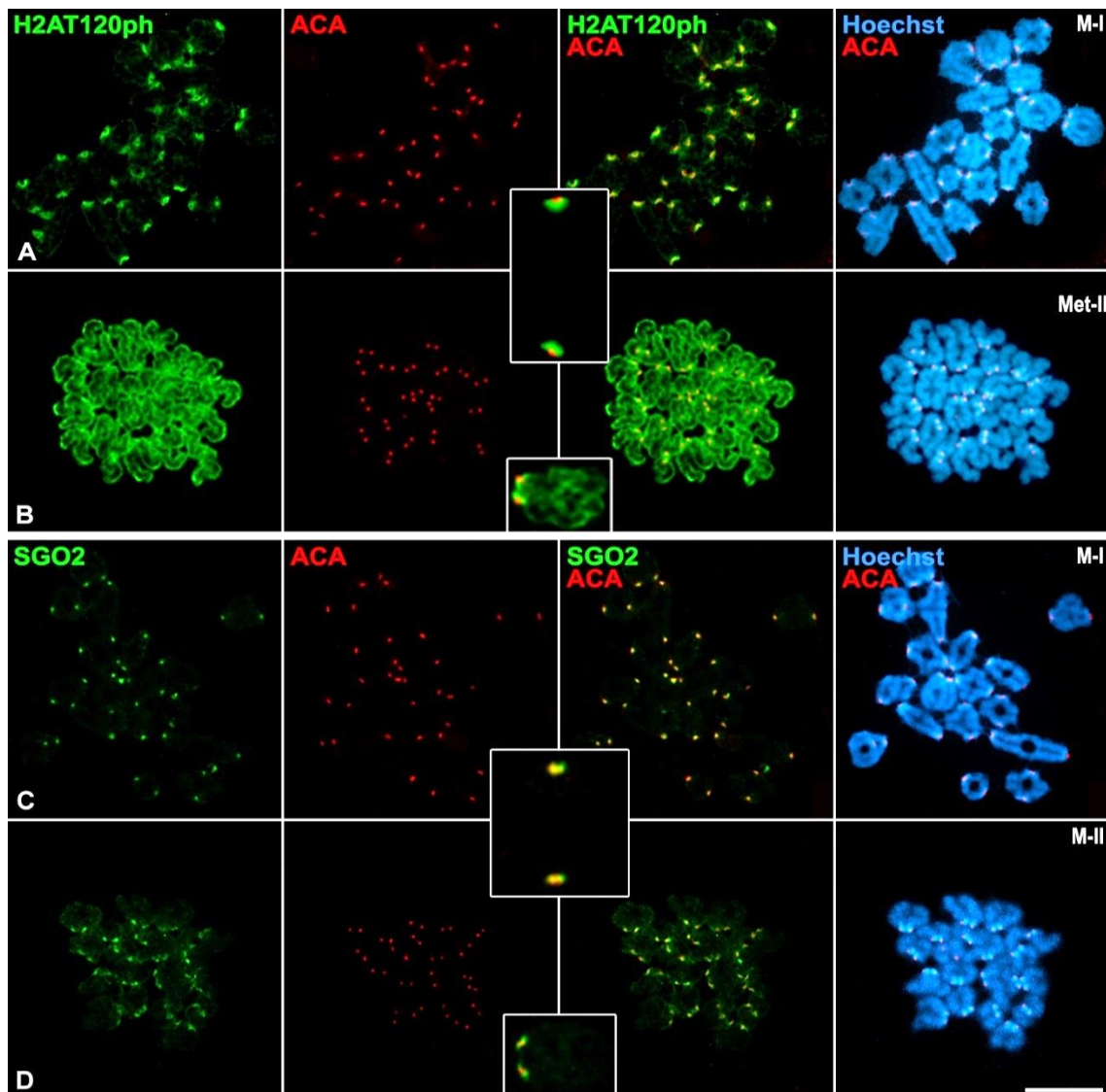


Figura 10. Localización de las proteínas H2AT120ph y SGO2 en oocitos de ratón. Doble inmunolocalización de H2AT120ph y SGO2 (verde) con los cinetocoros (ACA, rojo) en esparcidos de oocitos de ratón. La cromatina se ha teñido con Hoechst (azul). (A y B) Doble localización de H2AT120ph y los cinetocoros en metafase-I (A) y metafase-II (B). (C y D) Doble localización de SGO2 y los cinetocoros en metafase-I (C) y metafase-II (D). En las diferentes figuras aparecen detalles aumentados de bivalentes en metafase-I y cromosomas en metafase-II. La barra de medida en D corresponde a 10 μ m.

H2AT120ph presenta una distribución en el centrómero muy similar a la descrita en machos. En metafase-I, aparece como una copa en el DCI rodeando a los cinetocoros hermanos en todos los bivalentes (Fig. 10A). De la misma manera, en metafase-II la distribución vuelve a ser muy similar con respecto a la observada en machos. Por cada cromosoma en metafase-II se observan dos señales en forma de dos puntos por debajo de cada uno de los cinetocoros hermanos (Fig. 10B).

Sin embargo, la localización de **SGO2** en oocitos presenta diferencias con respecto a la localización en machos en metafase-I, pero no en metafase-II. En metafase-I, la señal centromérica de SGO2 queda restringida a los cinetocoros, colocalizando con ellos (Fig. 10C), mientras que en metafase-I de machos SGO2 se localiza en el DIC (Fig. S2), formando un subdominio en forma de copa similar al que presentan MCAK y H2AT120ph. Por el contrario, la distribución de SGO2 en los centrómeros de cromosomas en metafase-II de oocitos resulta muy parecida a la observada en machos, dado que en esta etapa SGO2 aparece formando dos anillos pericinetocóricos por cromosoma (Fig. 10D).

2. Vía de señalización Haspina/H3T3ph/CPC en meiosis

Tras el estudio de la dinámica de las principales proteínas implicadas en la ruta BUB1-H2AT120ph-SGO2 en la meiosis de ratón, continuamos con el estudio de la vía de señalización implicada en el reclutamiento del CPC al DCI, la ruta Haspina-H3T3ph-CPC. En células somáticas se ha descrito que la quinasa Haspina es la encargada de generar la variante H3T3ph, promoviendo el reclutamiento de las cuatro proteínas que constituyen el CPC (Survivina, Borealina, INCENP y Aurora B) (Yamagishi *et al.*, 2010; Carmena *et al.*, 2012). Estudios realizados en oocitos de ratón parecen indicar que durante la meiosis-I también la quinasa Haspina es la encargada del reclutamiento del CPC al DCI a través de la variante H3T3ph (Nguyen *et al.*, 2014). De nuevo, los estudios centrados en meiosis sobre esta vía de señalización son escasos, están realizados únicamente en hembras y se restringen a la primera división meiótica. Por ello, el objetivo principal de este segundo capítulo de resultados consiste en la descripción de la vía Haspina-H3T3ph-CPC en la meiosis de ratón mediante inmunolocalizaciones indirectas de las proteínas que la componen. De esta manera, hemos estudiado tanto la dinámica de distribución

de cada una de las proteínas de esta ruta, como la distribución relativa de las principales proteínas en metafase-I y metafase-II en espermatoцитos y oocitos WT de ratón.

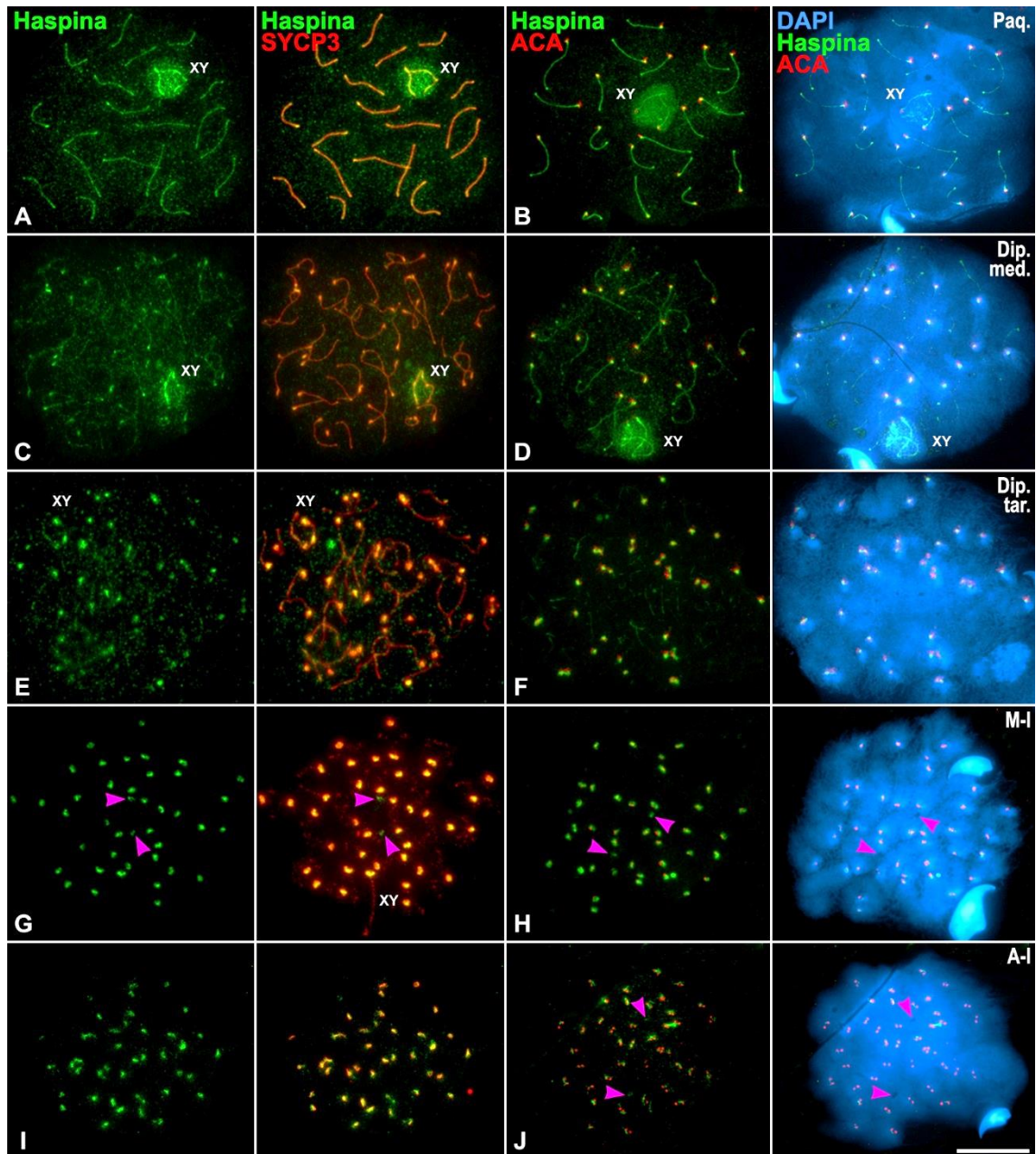
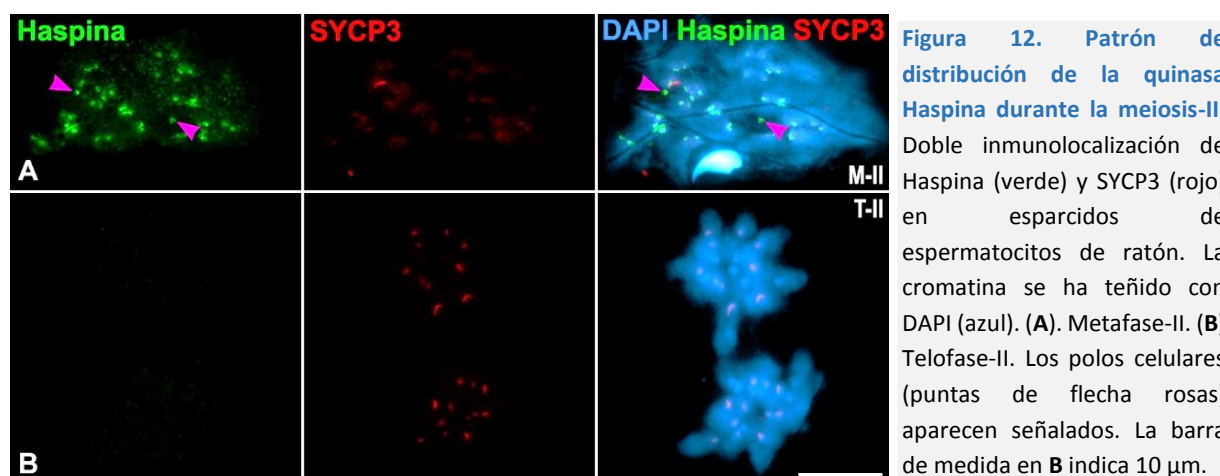


Figura 11. Patrón de distribución de la quinasa Haspina durante la meiosis-I. Dobles inmunolocalizaciones de Haspina (verde) y SYCP3 o los cinetocoros (ACA) (ambos en rojo) en espermatoцитos de ratón. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A, C, E, G, e I) Doble detección de Haspina y SYCP3. (B, D, F, H y J) Doble detección de Haspina y los cinetocoros. (A y B) Paquetenas. (C y D) Diplotenas medias. (E y F) Diplotenas tardías. (G y H) Metáfases-I. (I y J) Anáfases-I. El bivalente sexual (XY) aparece indicado. Los polos celulares (puntas de flecha rosas) están señalados. La barra de medida en J corresponde a 10 μ m.

2.1. DINÁMICA DE LAS PROTEÍNAS DE LA VÍA HASPINA EN LA MEIOSIS MASCULINA DE RATÓN

2.1.1. Localización de la quinasa Haspina

La quinasa Haspina ha sido descrita como la responsable de la fosforilación de la variante H3T3ph tanto en mitosis como en la meiosis femenina (Higgins, 2010). Sin embargo, hasta el momento no existen estudios sobre la distribución de esta proteína en meiosis ya que los anticuerpos disponibles generalmente presentan baja inmunoreactividad, y los estudios presentados sobre su fusión con la proteína GFP resultan poco específicos observándose un patrón difuso en toda la cromatina (Nguyen *et al.*, 2014). Tras analizar varios anticuerpos para esta quinasa encontramos uno que reacciona en espermatoцитos de ratón, el anticuerpo policlonal de ratón anti-hHaspin de Bethyl (A302-241A). De este modo, en esta Tesis Doctoral se muestra por primera vez la distribución de la quinasa Haspina a lo largo de toda la meiosis con respecto a la distribución de la proteína SYCP3 y los cinetocoros.



En espermatoцитos esparcidos comenzamos a detectar la quinasa Haspina en paquitena a nivel de los ELs del CS, colocalizando con SYCP3 (Fig. 11A, B). En diplotena, Haspina continúa detectándose levemente en los ELs desinapsados, marcados con SYCP3, y comienza a acumularse en los centrómeros (Fig. 11C-E). En metafase-I observamos que Haspina colocaliza con la señal de SYCP3 en el DCI de todos los cromosomas (Fig. 11G, H). Adicionalmente, Haspina aparece de forma tenue en los polos celulares (Fig. 11G, H). En anafase-I, la señal de Haspina se convierte en “comas” y “anillos” al igual que SYCP3 con la cual colocaliza quedando, a su vez, como una señal por centrómero (Fig. 11I, J). Al final de telofase-I se pierde la señal centromérica de Haspina (datos no mostrados). En metafase-II Haspina vuelve a ser detectada en los centrómeros como dos señales por cromosoma, una por cromátida hermana, y en los polos

celulares (Fig. 12A). La intensidad de las señales centroméricas de Haspina es mayor en metafase-I que en metafase-II (comparar Fig. 11G, H y Fig. 12A) lo que podría indicarnos que la cantidad de proteína necesaria para la segunda división es inferior a la requerida durante la meiosis-I. Finalmente, en telofase-II se pierden las señales tanto centroméricas como en los polos celulares de Haspina (Fig. 12B).

2.1.2. Localización de la variante H3T3ph

➤ Distribución de la variante H3T3ph durante la meiosis

La variante histónica H3T3ph ha sido descrita, junto con la variante H2AT120ph, como la H-PTM que induce la conformación del DCI, siendo a su vez la encargada del reclutamiento del CPC a dicho dominio (Yamagishi *et al.*, 2010). Muchos son los estudios que relacionan esta variante con el reclutamiento del CPC al centrómero, pero poco se sabe de su distribución y función a lo largo de la meiosis de mamíferos.

De esta manera, procedimos al análisis de la dinámica de H3T3ph en espermatoцитos de ratón mediante la utilización de las dos técnicas de procesamiento del material, aplastado y esparcido, observando diferencias en su distribución cromosómica dependiendo de la técnica utilizada. Mediante la técnica de aplastado y usando el anticuerpo a una dilución de 1:800, observamos una distribución de H3T3ph a nivel de toda la cromatina donde el DI presenta una mayor acumulación de esta H-PTM. Por el contrario, utilizando la técnica de esparcido, con la que tuvimos que concentrar el anticuerpo a una dilución de 1:30, pudimos observar con más detalle la distribución de esta H-PTM en la profase-I y en las divisiones, donde observamos la localización centromérica a nivel del DCI y en los brazos cromosómicos concentrada en el DI. Esta divergencia respecto a lo observado en aplastado, podría deberse a que esta técnica de esparcido resulta más agresiva para la cromatina, pudiendo provocar alteraciones en su estructura, e incluso la pérdida de algunas proteínas. Por el contrario, con la técnica de aplastado al preservarse la estructura de la cromatina condensada, algunos anticuerpos son incapaces de acceder correctamente a los epítomos. Por estos motivos, y dada la información complementaria que nos ofrecen ambas metodologías en cuanto a la distribución de H3T3ph, hemos decidido incluir en esta Tesis Doctoral ambos análisis para facilitar la comprensión de su dinámica y localización a lo largo de la meiosis.

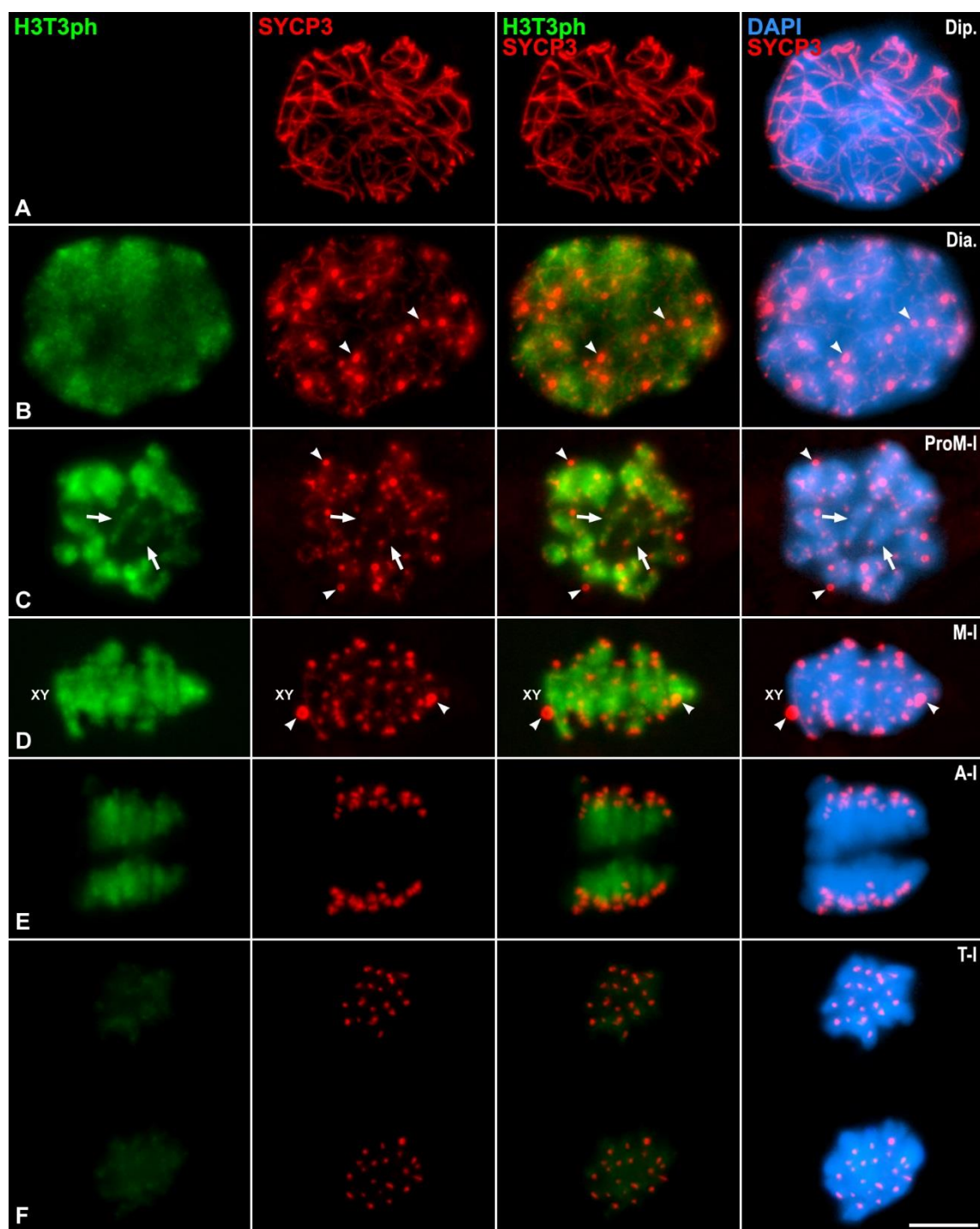


Figura 13. Patrón de distribución de la variante histónica H3T3ph desde diplotena hasta telofase-I. Doble inmunolocalización de H3T3ph (verde) y SYCP3 (rojo) en aplastados de túbulos seminíferos de ratón. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A) Diplotena. (B) Diacinesis. (C) Prometáfase-I. (D) Metafáfase-I. (E) Anafáfase-I. (F) Telofáfase-I. Las flechas blancas señalan algunos bivalentes en los que se puede observar mejor la distribución de H3T3ph. Las puntas de flecha blancas indican agregados nucleoplásmicos o citoplásmicos de SYCP3. El bivalente sexual (XY) aparece indicado. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. La barra de medida en F corresponde a 10 μm .

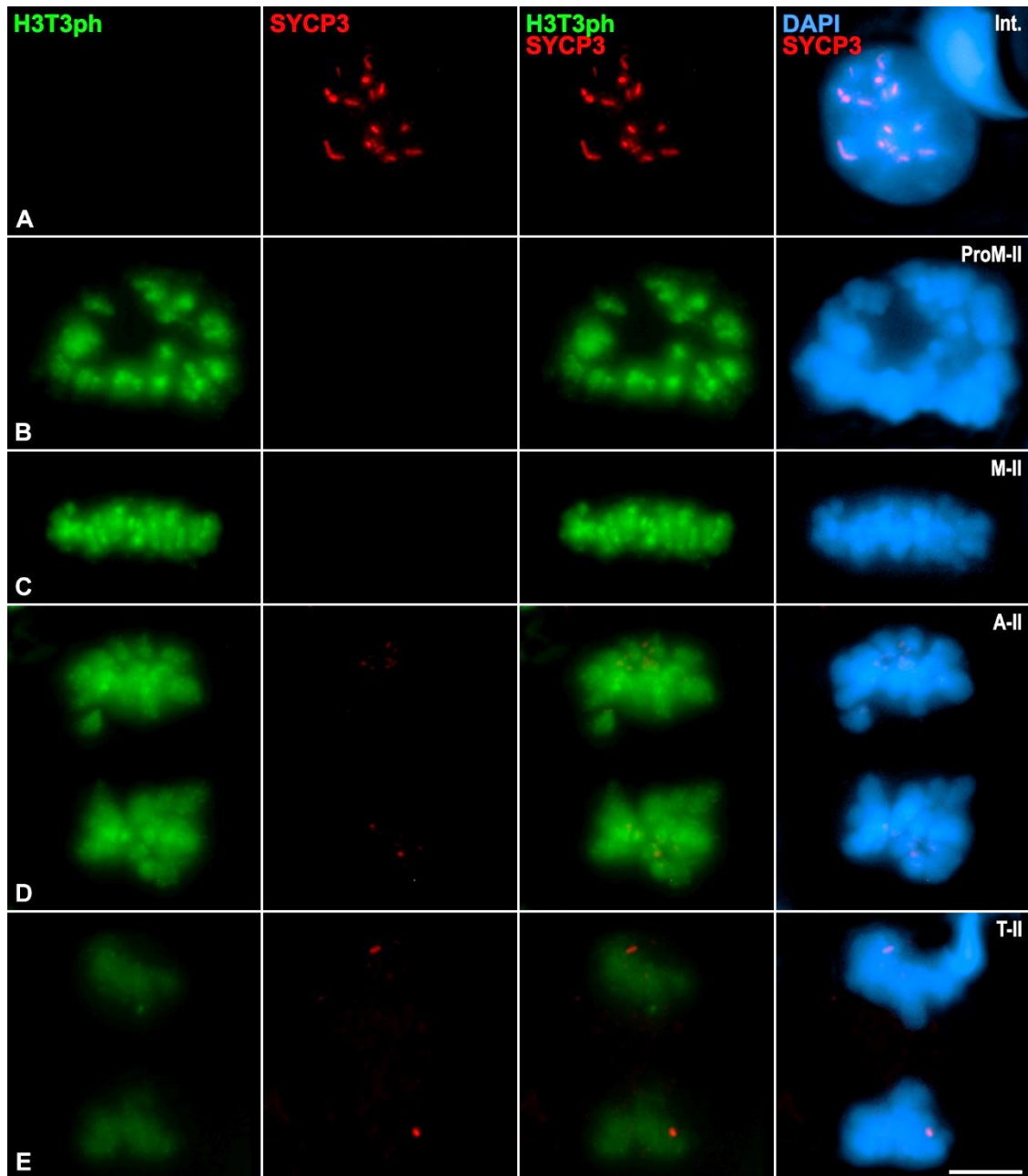


Figura 14. Patrón de distribución de la variante histónica H3T3ph desde intercinesis hasta telofase-II. Doble inmunolocalización de H3T3ph (verde) y SYCP3 (rojo) en aplastados de túbulos seminíferos de ratón. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A) Intercinesis. (B) Prometafase-II. (C) Metafase-II. (D) Anafase-II. (E) Telofase-II. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. La barra de medida en E corresponde a 10 μ m.

En aplastados de túbulos seminíferos, la variante H3T3ph comienza a observarse marcando la cromatina en diacinesis (Fig. 13A, B). En esta etapa, la señal presenta una distribución heterogénea, quedando más acumulada a nivel de los cromocentros (Fig. 13B). A medida que avanza la meiosis, H3T3ph se va acumulando progresivamente en la cromatina desde prometafase-I hasta metafase-I (Fig. 13C, D). Así, en prometafase-I puede observarse cómo la

distribución de H3T3ph se restringe a la cromatina próxima al DI, colocalizando con la señal parcheada de SYCP3 en esta misma región (Fig. 13C). Por el contrario, en metafase-I resulta más complicado distinguir claramente esta distribución de H3T3ph a nivel del DI (Fig. 13D). En anafase-I, H3T3ph comienza a difuminarse por la cromatina (Fig. 13E). Al final de telofase-I, deja de detectarse esta variante (Fig. 13F), no se detecta en las intercinesis (Fig. 14A), y vuelve a ser visible en prometafase-II acumulada en la heterocromatina centromérica (Fig. 14B). En metafase-II observamos cómo la acumulación en los centrómeros de H3T3ph colocaliza con las señales intensas del DAPI a nivel de los centrómeros (Fig. 14C). A partir de anafase-II, la señal centromérica de H3T3ph se redistribuye por toda la cromatina desapareciendo al final de telofase-II (Fig. 14D, E)

En esparcidos de espermatoцитos la variante H3T3ph se observa por primera vez durante la profase-I marcando los EAs de los cromosomas sexuales desde cigotena tardía hasta el final de la profase-I colocalizando con SYCP3 (Fig. 15A-F). Una vez sinapsados los cromosomas sexuales en paquitena, se puede observar cómo sus EAs no sinapsados mantienen el marcaje de H3T3ph, mientras que la región PAR no presenta señal (Fig. 15B). Este marcaje se mantiene hasta diacinesis, durante la cual comienza a aparecer señal de H3T3ph acumulada en las regiones centroméricas (Fig. 15F). En metafase-I, se detectan fuertemente marcados los centrómeros de todos los cromosomas a nivel del DCI, siendo esta señal redondeada y de menor tamaño que la de SYCP3 (Fig. 16A). A su vez, puede observarse señal de H3T3ph en el DI, coincidiendo de nuevo con la señal en los brazos cromosómicos de SYCP3, siendo algo más marcada a nivel de los telómeros (Fig. 16A). Al segregar los cromosomas homólogos en anafase-I, la señal de H3T3ph desaparece de los brazos cromosómicos, quedando restringida a los centrómeros (Fig. 16B). En telofase-I termina por desaparecer la señal de H3T3ph (Fig. 16C). Durante la profase-II vuelve a detectarse la variante H3T3ph en los centrómeros (Fig. 16D), y en metafase-II observamos dos señales redondeadas por centrómero (Fig. 16E) las cuales se desvanecen en telofase-II (Fig. 16F).

➤ Localización relativa de la variante H3T3ph en metafase-I y metafase-II

Tras conocer el patrón de distribución de la histona H3T3ph a lo largo de toda la meiosis de machos, procedimos a analizar su localización relativa tanto en bivalentes en metafase-I como en cromosomas en metafase-II con respecto a la de la proteína SYCP3, los cinetocoros y la

subunidad meiótica del CC REC8, ya que H3T3ph aparece en el DI en metafase-I al igual que las subunidades del CC (Suja y Barbero 2009).

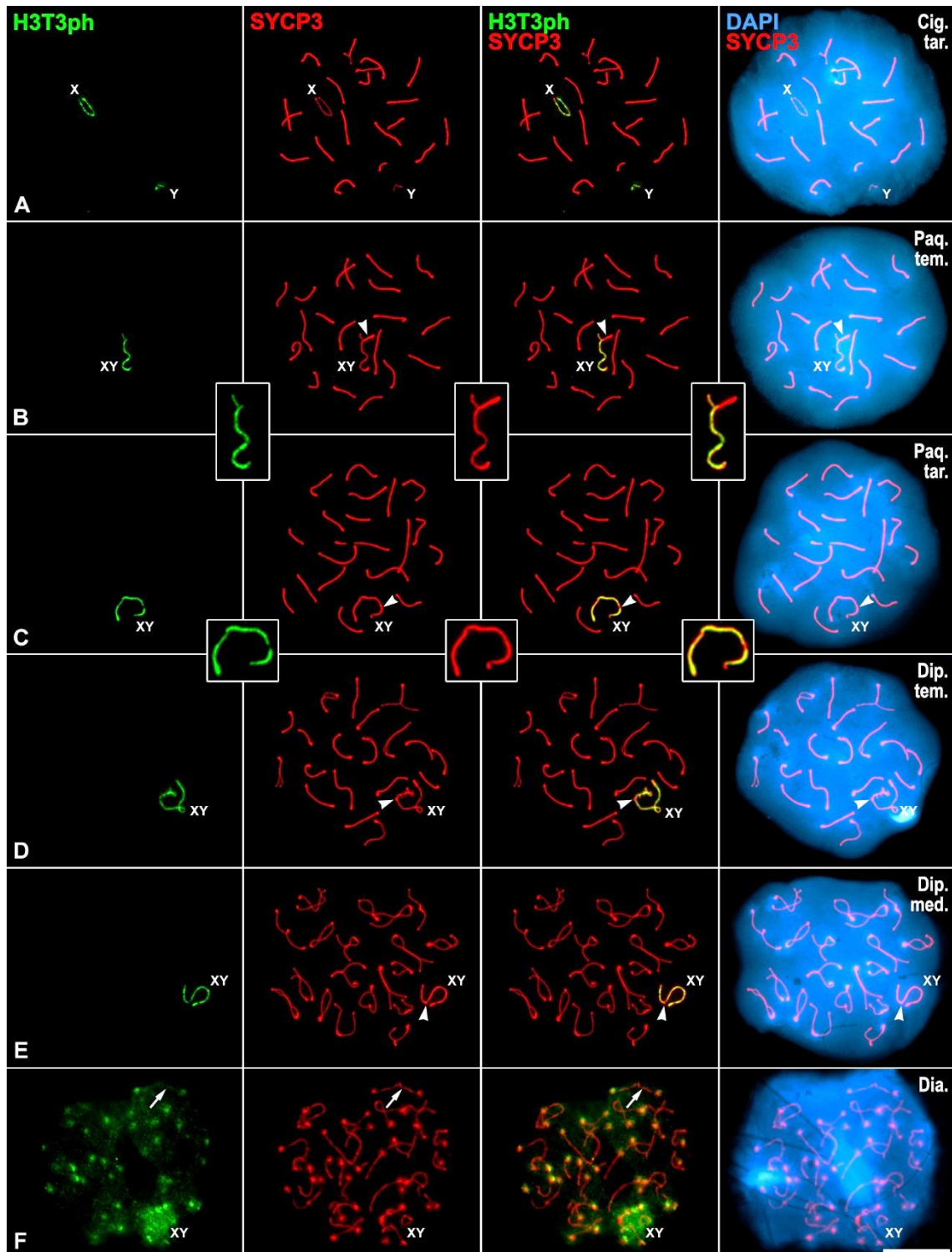


Figura 15. Patrón de distribución de la variante histónica H3T3ph durante la profase-I. Doble inmunolocalización de H3T3ph (verde) y SYCP3 (rojo) en esparcidos de espermatocitos de ratón. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A) Cigotena tardía. (B) Paquitena temprana. (C) Paquitena tardía. (D) Diplotena temprana. (E) Diplotena media. (F) Diacinesis. Los cromosomas sexuales (X, Y) y el bivalente sexual (XY) aparecen indicados. Las regiones de apareamiento entre los cromosomas sexuales aparecen señaladas con puntas de flecha blancas. Los detalles incrustados muestran a gran aumento algunos bivalentes sexuales. Las flechas blancas señalan un bivalente autosómico. La barra de medida en F corresponde a 10 μ m.

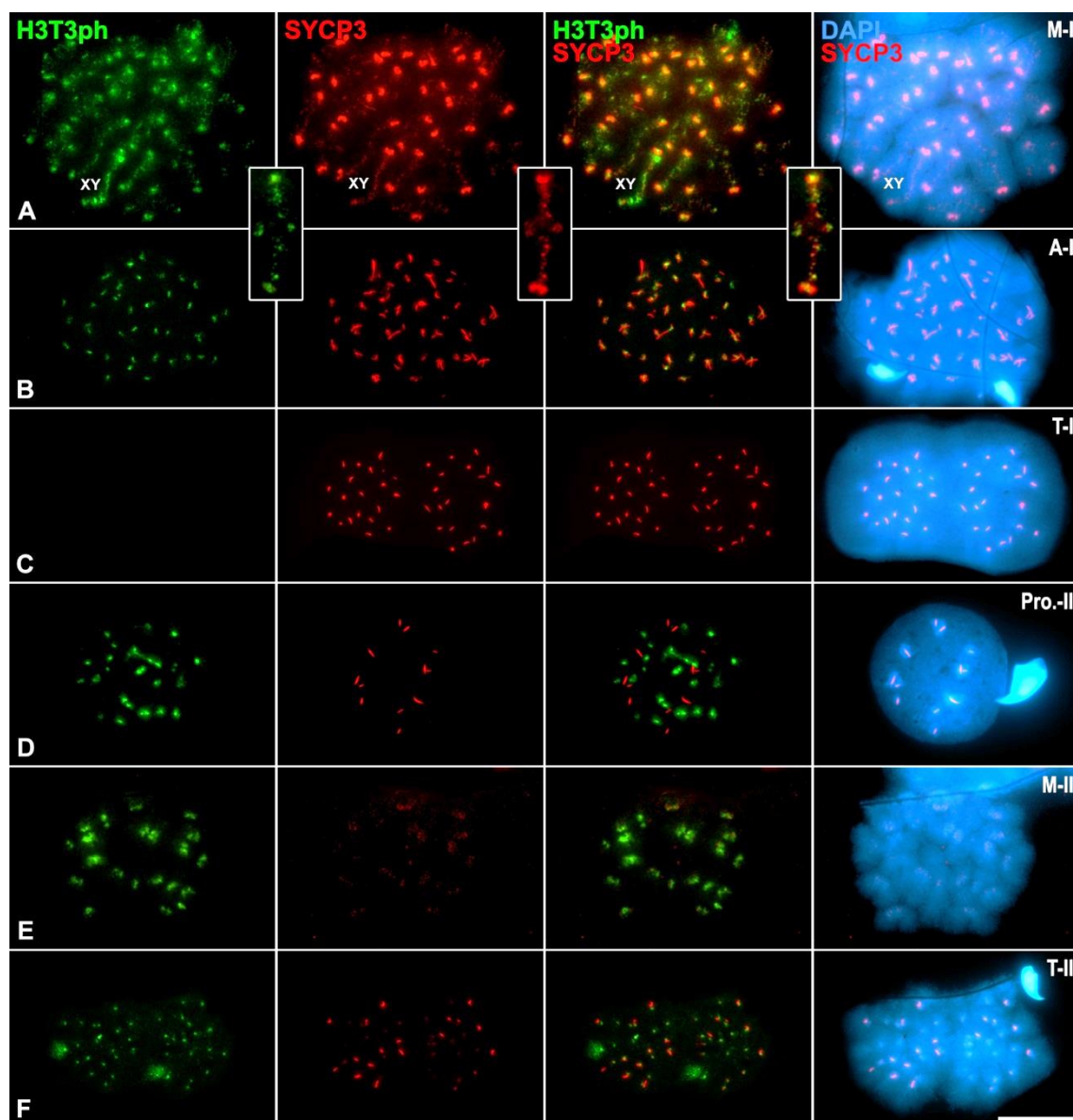


Figura 16. Patrón de distribución de la variante histórica H3T3ph desde metafase-I hasta telofase-II. Doble inmunolocalización de H3T3ph (verde) y SYCP3 (rojo) en esparcidos de espermatocitos de ratón. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A) Metafase-I. El detalle incrustado muestra un bivalente autosómico a mayor aumento. El bivalente sexual (XY) aparece indicado. (B) Anafase-I. (C) Telofase-I. (D) Profase-II. (E) Metafase-II. (F) Telofase-II. La barra de medida en F corresponde a 10 μm .

Utilizando la técnica de aplastado, en metafase-I H3T3ph aparece localizada a nivel del DI (Fig. 17A, B), colocalizando parcialmente con la señal parcheada de SYCP3 (Fig. 17C, D). A nivel del centrómero podemos observar cómo la señal de H3T3ph queda integrada en el DCI, inmediatamente por debajo de la señal de los cinetocoros hermanos (Fig. 17A, B). En conjunto, esta localización de H3T3ph recuerda a la observada para algunas subunidades de los CC. De este modo, realizamos una doble inmunolocalización de H3T3ph junto con la cohesina REC8,

específica de meiosis. Para ello utilizamos túbulos seminíferos de ratones transgénicos *REC8-myc*, facilitados por el Dr. Alberto M. Pendás (CIC/USAL, Salamanca). En metafase-I de estos espermatocitos pudimos observar cómo H3T3ph colocaliza con la cohesina REC8 tanto en el DI como a nivel del DCI (Fig. 17E, F). Dado que la variante H3T3ph es una histona y, por tanto, se localiza en la cromatina, y que los anillos de cohesina se disponen abrazando bucles de cromatina provenientes de ambas cromátidas hermanas en el DI, la señal de H3T3ph observada es más amplia que la de REC8, flanqueándola ligeramente hacia ambos lados. En metafase-II, H3T3ph se localiza en el DCI, en la región comprendida entre los cinetocoros hermanos presentando una única señal constituida por dos masas redondeadas que colocalizan con las señales intensas marcadas con DAPI (Fig. 17G, H).

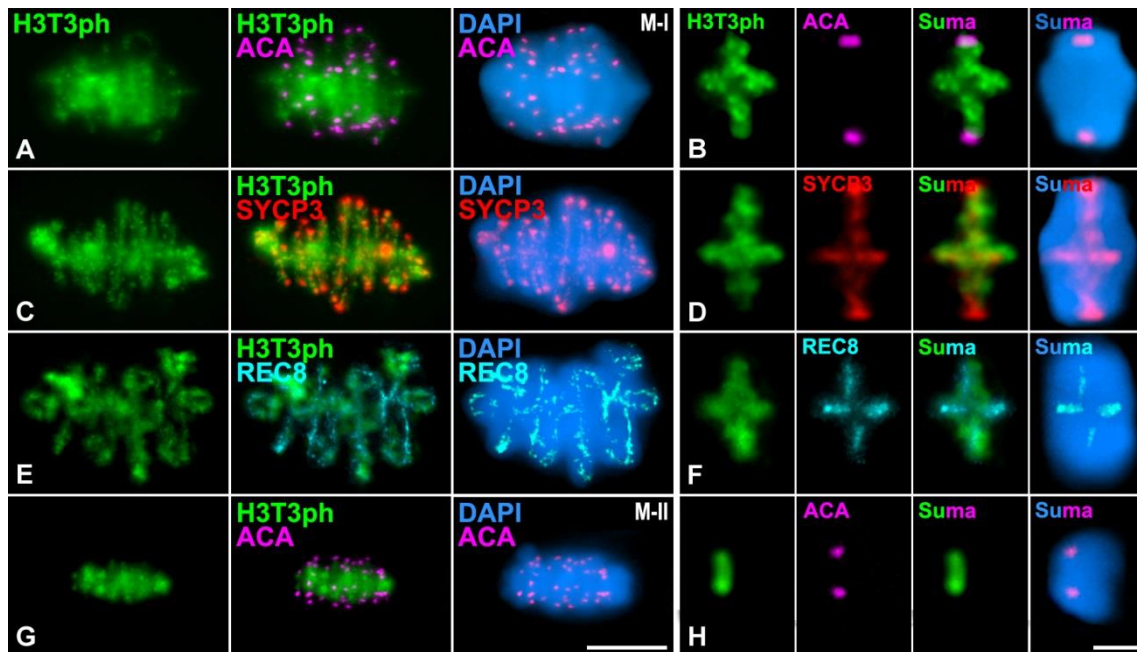


Figura 17. Distribución relativa de la variante histónica H3T3ph en metafase-I y metafase-II. Doble inmunolocalización de H3T3ph (verde) con los cinetocoros (ACA, rosa), SYCP3 (rojo) y la subunidad del complejo de cohesina REC8 (cian) en aplastados de túbulos seminíferos de ratón WT y de ratón transgénico *REC8-myc*. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. (A y B) Doble detección de H3T3ph y los cinetocoros en una metafase-I WT (A) y en un bivalente autosómico a mayor aumento (B). (C y D) Doble detección de H3T3ph y SYCP3 en una metafase-I WT (C) y en un bivalente autosómico a mayor aumento (D). (E y F) Doble detección de H3T3ph y REC8 en una metafase-I *REC8-myc* (E) y en un bivalente autosómico a mayor aumento (F). (G y H) Doble detección de H3T3ph y los cinetocoros en una metafase-II WT (G) y en un autosoma a mayor aumento (H). Las barras de medida corresponden a 5 μm (G) y 2 μm (H).

2.1.3. Localización de las proteínas del CPC

El CPC es un complejo multiproteico formado por las proteínas Borealina, Survivina, INCENP y Aurora B/C, esencial tanto en mitosis como en meiosis. Por un lado, a nivel del DCI, es el encargado de la corrección de errores de anclaje cinetocoro-MTs durante la congresión cromosómica en prometafase, asegurando la correcta segregación de los cromosomas a los polos. Por otro lado, una vez comenzada la segregación cromosómica, el CPC se deslocaliza del centrómero para relocalizarse sobre los MTs interzonales y participar en la citocinesis (Carmena *et al.*, 2012). A continuación, se describe la distribución a lo largo de meiosis de machos de ratón de los miembros del CPC Borealina, Survivina, INCENP y Aurora B/C.

➤ Distribución de Borealina durante la meiosis

En células somáticas, Borealina ha sido descrita como la subunidad que interacciona con SGO1 en los centrómeros (Tsukahara *et al.*, 2010). En la meiosis de ratón, se ha descrito la presencia de Borealina en la profase-I a partir de paquitena (Parra *et al.*, 2009). Sin embargo, se desconoce su distribución detallada a lo largo de toda la meiosis.

En la meiosis de ratones macho, Borealina comienza a detectarse en los cromocentros durante paquitena tardía (Fig. 18A-C), intensificándose su señal en diplotena (Fig. 18D, E). Al final de diplotena, empieza a observarse también marcada la cromatina del cuerpo sexual (Fig. 18E). En diacinesis, la señal del cuerpo XY desaparece mientras que la de los centrómeros se concentra en el DCI de todos los cromosomas (Fig. 18F). En metafase-I, la señal de Borealina del DCI es más definida y también se marca tenuemente el DI de todos los bivalentes, colocalizando con SYCP3 (Fig. 19A). En anafase-I temprana, la señal de Borealina disminuye en los centrómeros y empieza a detectarse sobre los MTs interzonales (Fig. 19B). En telofase-I, la intensidad de la señal de Borealina en los centrómeros se reduce drásticamente al tiempo que aparece un marcaje intenso en el cuerpo medio del huso (Fig. 19C). Durante la transición intercinesis/profase-II, Borealina vuelve a observarse en los cromocentros (Fig. 19D) quedando de nuevo concentrada en el DCI en metafase-II como dos señales redondeadas, una por cromátida (Fig. 19E). En anafase-II, la señal de los centrómeros vuelve a desaparecer y de nuevo se relocaliza sobre el cuerpo medio en telofase-II (Fig. 19F).

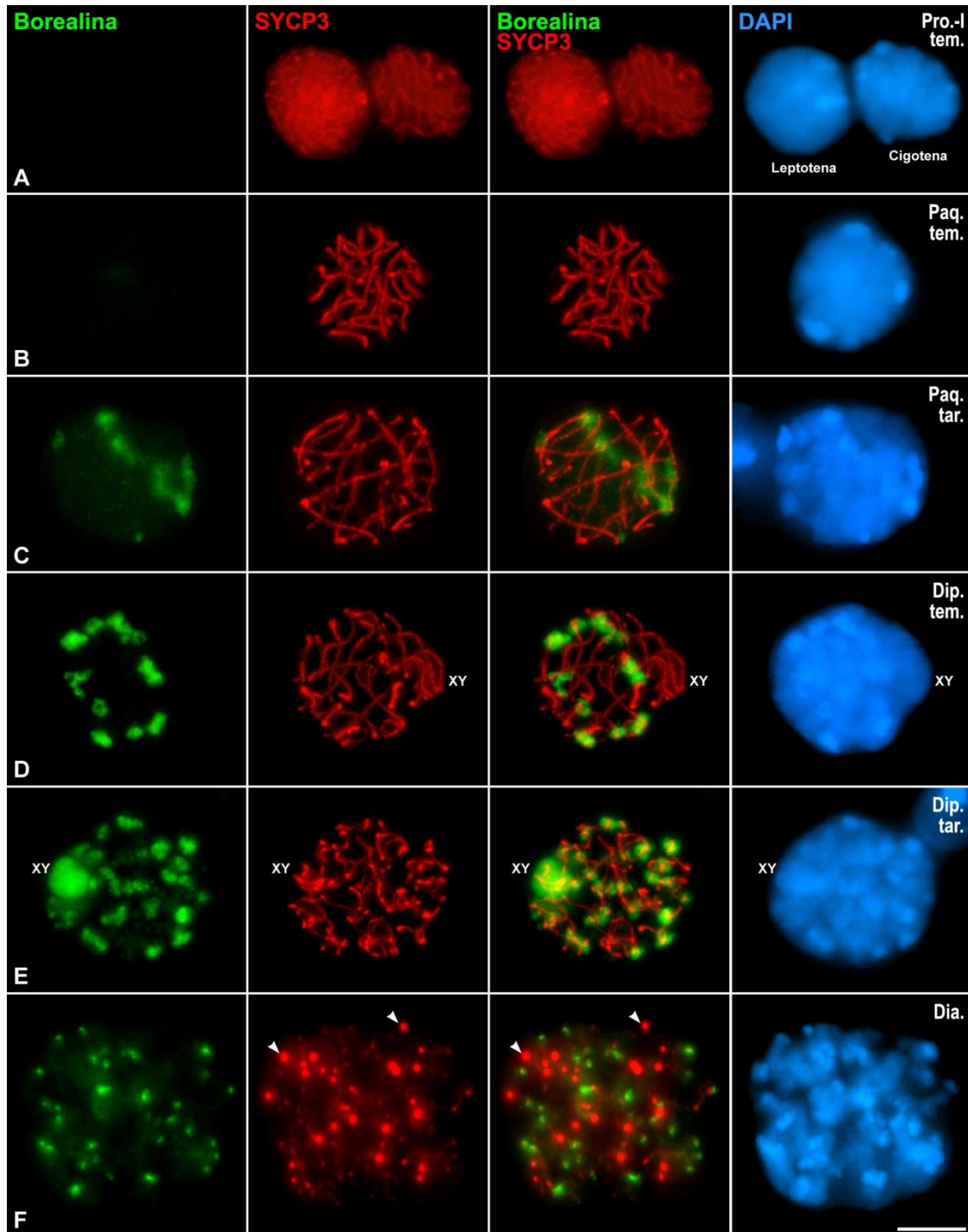


Figura 18. Patrón de distribución de la proteína Borealina durante la profase-I. Doble inmunolocalización de Borealina (verde) y SYCP3 (rojo) en aplastados de túbulos seminíferos de ratón. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A) Profases-I tempranas (leptotena y cigotena). (B y C) Paquitenas temprana y tardía. (D y E) Diplotenas temprana y tardía. (F) Diacinesis. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. El bivalente sexual (XY) aparece indicado en los espermatozoides en los que se llega a diferenciar. Las puntas de flecha blancas indican agregados nucleoplásmicos de SYCP3. La barra de medida en F indica 10 μ m.

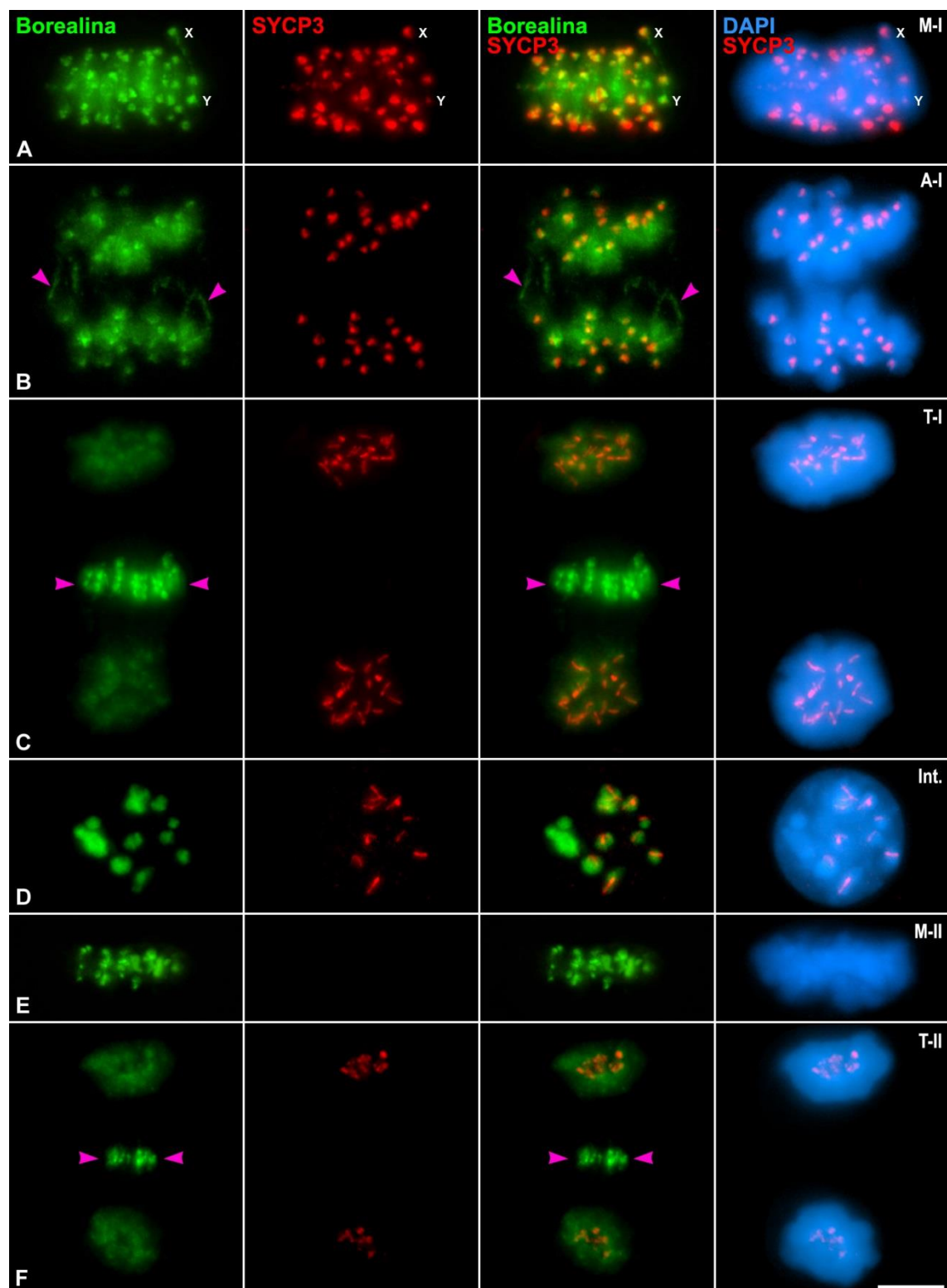


Figura 19. Patrón de distribución de la proteína Borealina desde metafase-I hasta telofase-II. Doble inmunolocalización de Borealina (verde) y SYCP3 (rojo) en aplastados de túbulos seminíferos de ratón. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A) Metafase-I. (B) Anafase-I. (C) Telofase-I. (D) Intercinesis. (E) Metafase-II. (F) Telofase-II. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. Los cromosomas sexuales (X, Y) aparecen indicados en (A). Las puntas de flecha rosas señalan microtúbulos interzonales (B), y el cuerpo medio del huso (C y F). La barra de medida en F corresponde a 10 μm .

➤ Distribución de Survivina durante la meiosis

En mitosis, Survivina ha sido descrita como la subunidad del CPC que interactúa de forma directa con la variante H3T3ph en el DCI (Kelly *et al.*, 2010). Sin embargo, se desconoce su dinámica a lo largo de la meiosis de mamíferos.

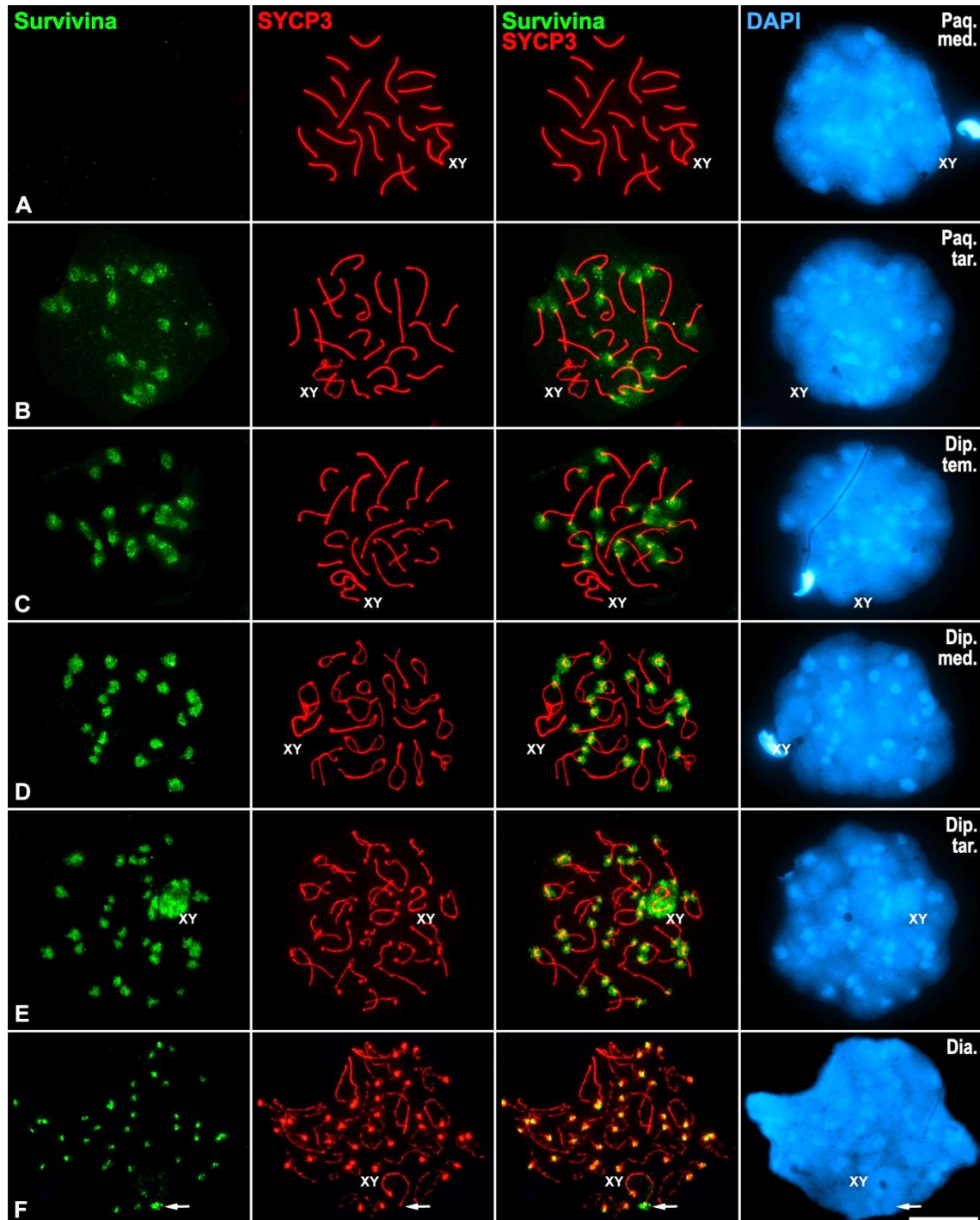


Figura 20. Patrón de distribución de la proteína Survivina durante la profase-I. Doble inmunolocalización de Survivina (verde) y SYCP3 (rojo) en espermátocitos de ratón. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A y B) Paquitenas media y tardía. (C-E) Diplotenas temprana, media y tardía. (D) Diacinesis. Los bivalentes sexuales (XY) aparecen indicados. Las flechas blancas señalan el centrómero del cromosoma Y. La barra de medida en F corresponde a 10 μ m.

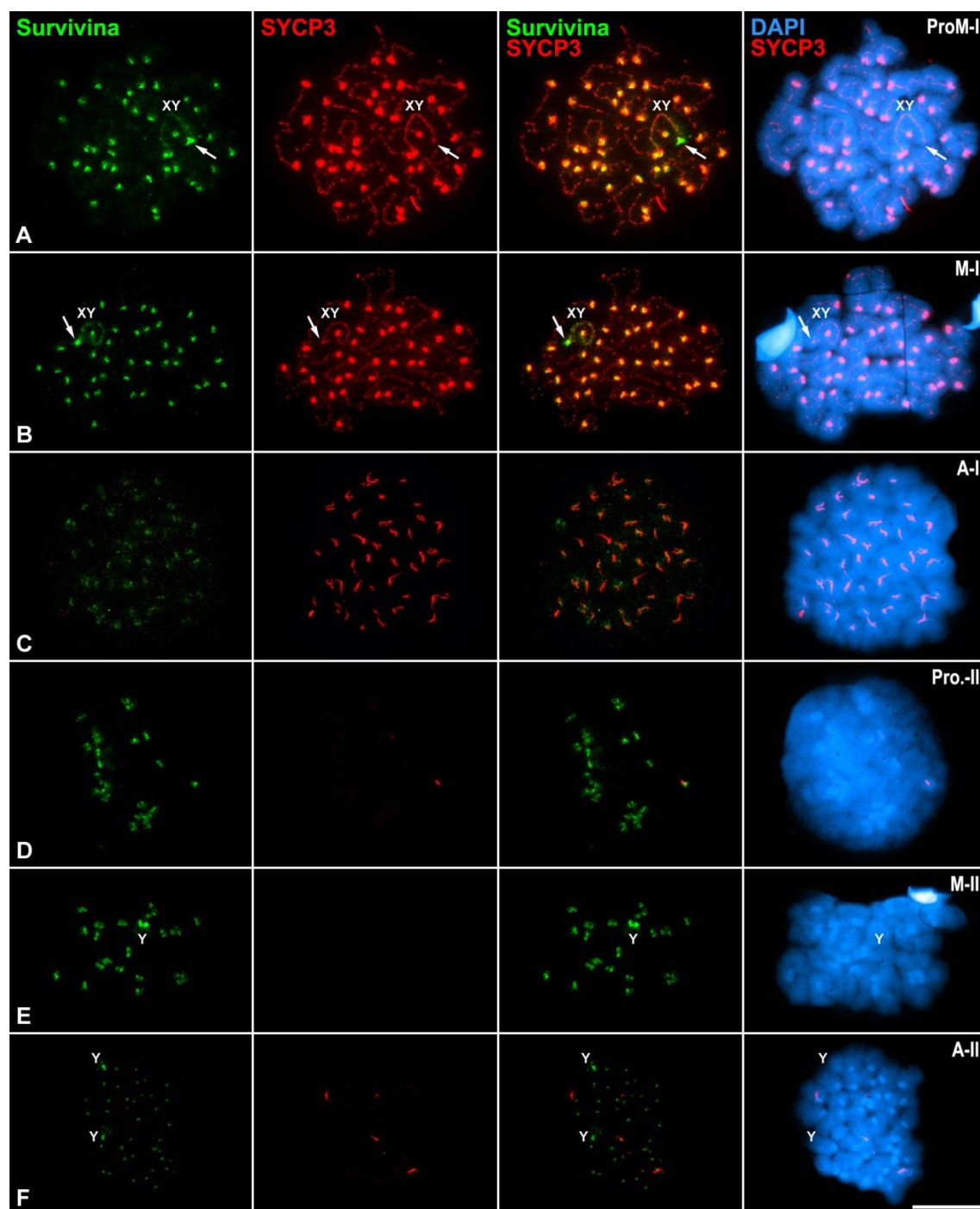


Figura 21. Patrón de distribución de la proteína Survivina desde prometafase-I hasta anafase-II. Doble inmunolocalización de Survivina (verde) y SYCP3 (rojo) en esparcidos de espermatocitos de ratón. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). **(A)** Prometafase-I. **(B)** Metafase-I. **(C)** Anafase-I. **(D)** Profase-II. **(E)** Metafase-II. **(F)** Anafase-II. Los bivalentes sexuales (XY) y los cromosomas sexuales (X, Y) aparecen indicados. Las flechas blancas señalan el centrómero del cromosoma Y. La barra de medida en **F** corresponde a 10 μ m.

Al igual que ocurre con Borealina, Survivina comienza a detectarse sobre los cromocentros autosómicos en paquitena tardía (Fig. 20A, B). Estas señales se hacen más intensas a medida que progresa la profase-I, y no es hasta el final de la etapa de diplotena cuando comienza a

marcarse también el cuerpo XY (Fig. 20C-E). En diacinesis la señal de Survivina se concentra en el DCI, mostrando señales redondeadas que colocalizan con las de SYCP3 (Fig. 20F). En prometafase-I y metafase-I se puede observar señal de Survivina en el DCI y también en el DI del bivalente sexual, colocalizando con la señal de SYCP3 en ambos casos, salvo en el cromosoma Y, en cuyo centrómero la señal de Survivina es más amplia que la de SYCP3 (Fig. 21A, B). En anafase-I la señal de Survivina pierde intensidad apareciendo como pares de señales redondeadas que colocalizan parcialmente con las “comas” de SYCP3 (Fig. 21C). Finalmente, en telofase-I no se observa señal de Survivina (datos no mostrados). En profase-II, Survivina vuelve a detectarse en los centrómeros, distinguiendo en metafase-II dos señales redondeadas por cromosoma, siendo las del cromosoma Y de mayor tamaño (Fig. 21D, E). Durante la anafase-II, se puede observar una señal centromérica de Survivina por cada cromátida hermana, señales que irán perdiendo intensidad hasta dejar de detectarse en telofase-II (Fig. 21F).

➤ Distribución de INCENP durante la meiosis

INCENP fue la primera proteína del CPC en descubrirse (Cooke *et al.*, 1987). Actualmente se sabe que actúa como subunidad estructural del CPC, haciendo de unión entre las demás subunidades (Carmena *et al.*, 2012). En cuanto a su distribución en meiosis, ya fue descrita por Parra *et al.* (2003) en espermatoцитos de ratón. No obstante, dada su relevancia en la constitución del CPC meiótico, se presenta su distribución detallada en el apartado Anexo I de esta Tesis Doctoral (Fig. S4).

➤ Distribución de Aurora B/C durante la meiosis

Por último, analizamos la distribución de la subunidad catalítica del CPC, las quinasas Aurora B/C (Krenn y Musacchio, 2015). En mitosis, la quinasa que constituye el CPC es Aurora B, mientras que en células meióticas parecen participar tanto Aurora B como Aurora C (Nguyen y Schindler, 2017). Dada la gran homología entre sus secuencias, actualmente no existen anticuerpos lo suficientemente específicos como para discernir entre ambas proteínas. Este motivo, junto con la poca información existente hasta el momento sobre la diferencia de funciones entre ellas, en este trabajo hablaremos de Aurora B/C.

Para llevar a cabo un estudio más detallado sobre la distribución de Aurora B/C en espermatoцитos de ratón, procedimos a analizar la distribución de sus formas activas. Para ello,

hemos utilizado un anticuerpo monoclonal que en células humanas y de ratón reconoce a las quinasas Aurora B fosforilada en la T232, Aurora C fosforilada en la T198, y Aurora A fosforilada en la T288, anticuerpo que hemos denominado Aurora Tph. Dado que tanto Aurora B como Aurora C aparecen en la región centromérica (Nguyen y Schindler, 2017) no podemos discernir si las señales centroméricas corresponden a una u a otra. No obstante, las señales en los polos celulares corresponderán a las de Aurora A fosforilada (Carmena y Earnshaw, 2003).

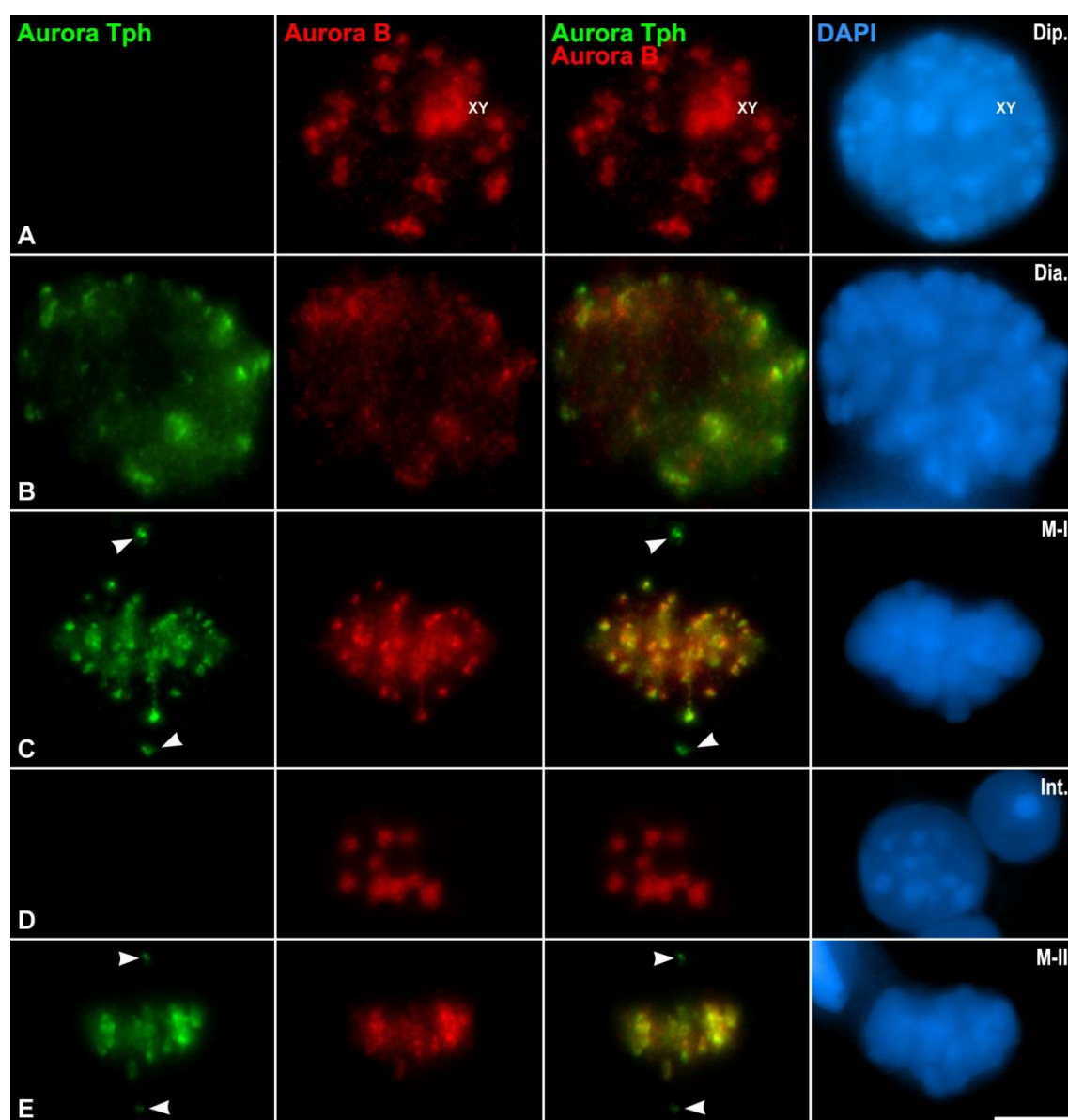
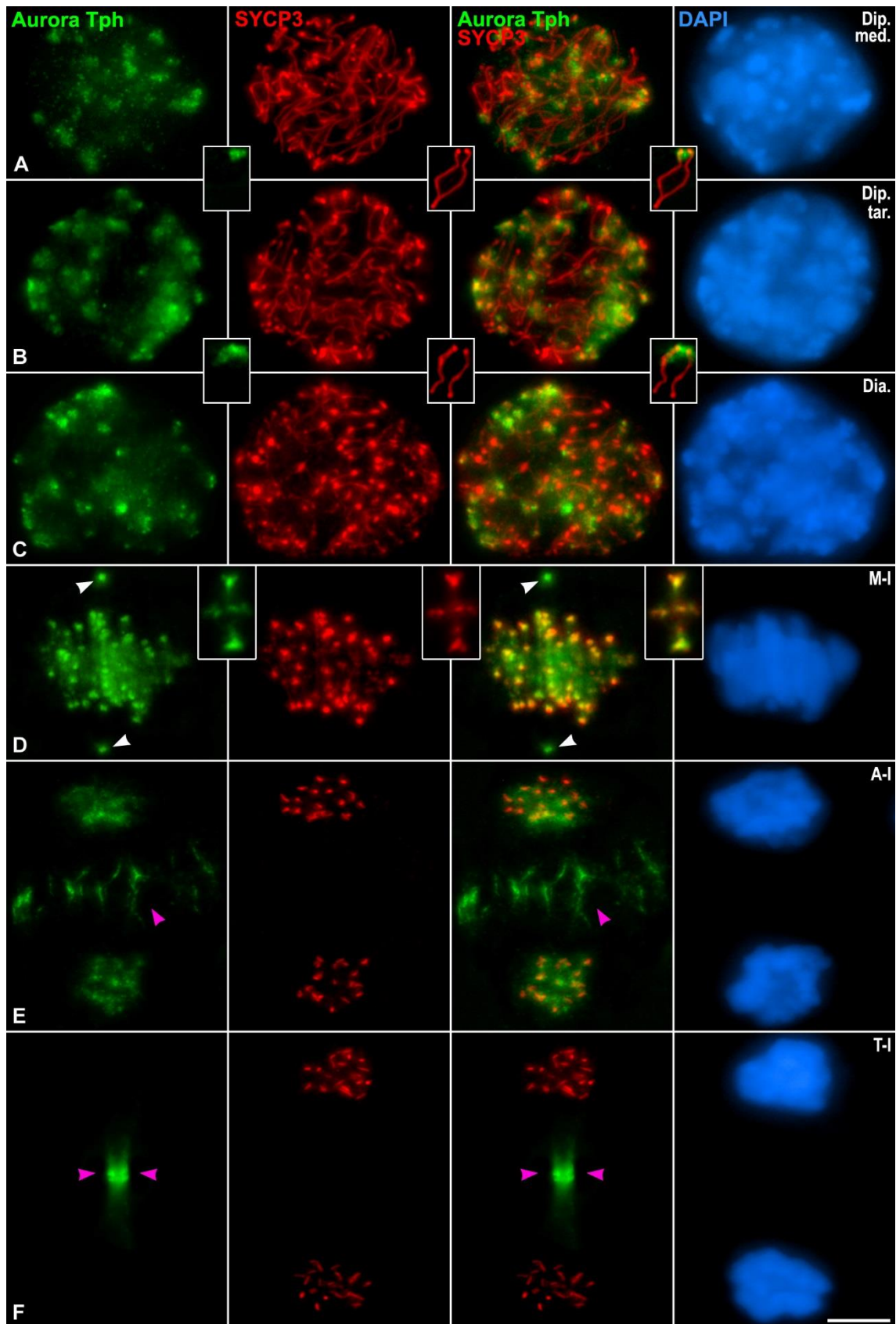


Figura 22. Distribución relativa de la quinasa Aurora B y de las quinasas Aurora B/C y Aurora A fosforiladas (Aurora Tph) de diplotena a metafase-II. Doble inmunolocalización de Aurora Tph (verde) y Aurora B (rojo) en aplastados de túbulos seminíferos de ratón. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. (A) Diplotena. (B) Diacinesis. (C) Metafase-I. (D) Intercinesis. (E) Metafase-II. El bivalente sexual (XY) aparece indicado. Las puntas de flecha blancas señalan los polos celulares, señal correspondiente a la quinasa Aurora A. La barra de medida en E corresponde a 10 µm.



→ **Figura 23. Patrón de distribución de las quinasas Aurora B/C y Aurora A fosforiladas (Aurora Tph) durante la meiosis-I.** Doble inmunolocalización de Aurora Tph (verde) y SYCP3 (rojo) en aplastados de túbulos seminíferos de ratón. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). **(A y B)** Diplotenas media y tardía. **(C)** Diacinesis. **(D)** Metafase-I. Las puntas de flecha blancas señalan los polos celulares, señal correspondiente a la quinaasa Aurora A. **(E)** Anafase-I. **(F)** Telofase-I. Los microtúbulos interzonales **(E)** y el cuerpo medio **(F)** están señalados con puntas de flecha rosas. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. La barra de medida en **F** corresponde a 10 μm .

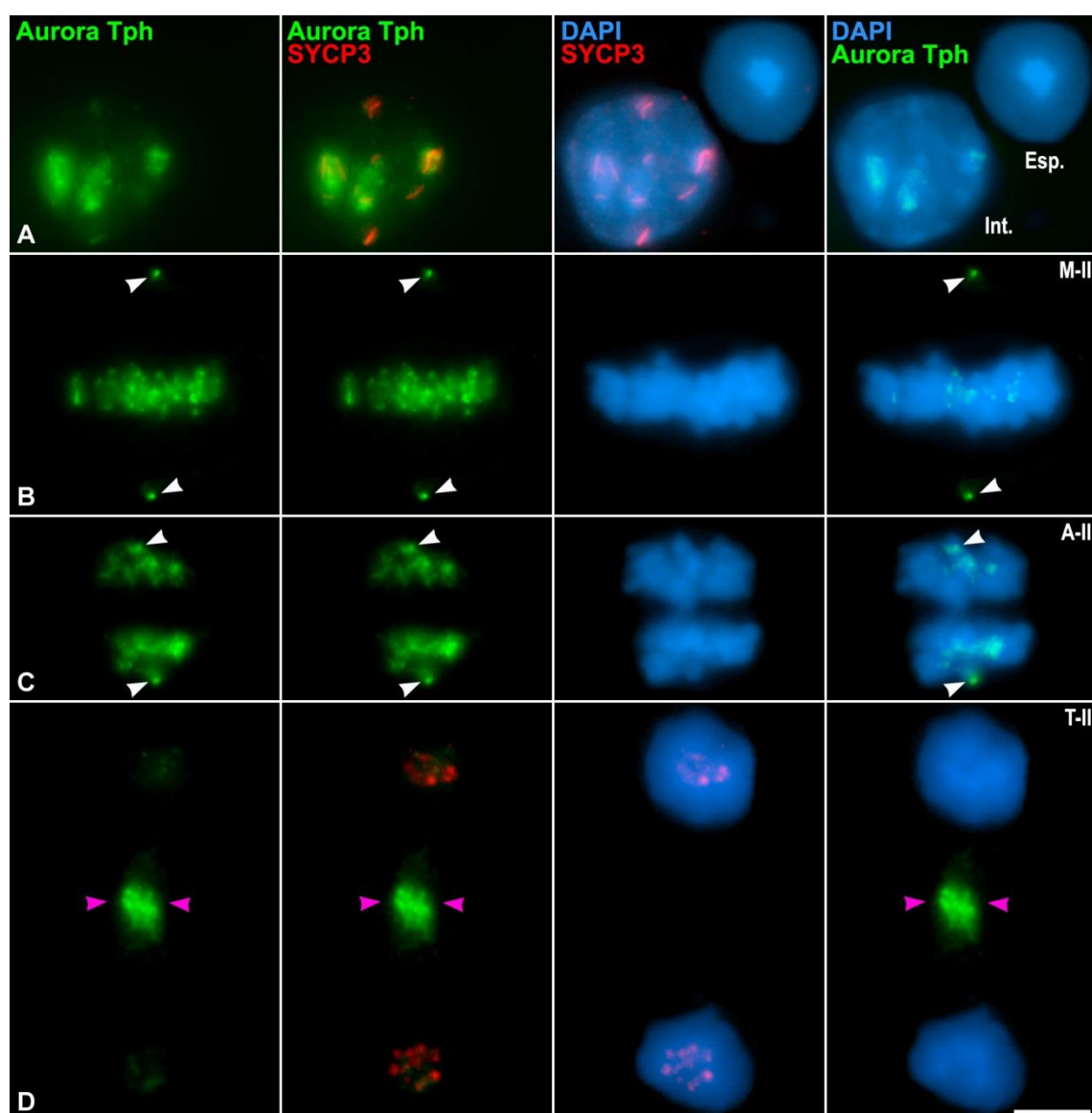


Figura 24. Patrón de distribución de las quinasas Aurora B/C y Aurora A fosforiladas (Aurora Tph) durante la meiosis-II. Doble inmunolocalización de Aurora Tph (verde) y SYCP3 (rojo) en aplastados de túbulos seminíferos de ratón. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). **(A)** Intercinesis (Int.) y espermatídica redonda (Esp.). **(B)** Metafase-II. **(C)** Anafase-II. **(D)** Telofase-II. Las puntas de flecha blancas señalan los polos celulares, señal correspondiente a la quinaasa Aurora A, mientras que las puntas de flecha rosas señalan el cuerpo medio. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. La barra de medida en **D** corresponde a 10 μm .

En primer lugar, quisimos comprobar si existían diferencias en cuanto al orden de reclutamiento y localización relativa entre las proteínas Aurora B (detectada con el suero AIM-1 anti-Aurora B) y su forma activa (Aurora Tph) en espermatoцитos de ratón, mediante una doble inmunodetección entre ambos anticuerpos (Fig. 22). Durante la profase-I, Aurora B aparece reclutada en los cromocentros en diplotena, mientras que su forma activa, Aurora Tph, comienza a detectarse al final de esta etapa, siendo más evidente su localización en diacinesis (Fig. 22A, B). En esta última etapa de la profase-I, tanto Aurora B como Aurora Tph colocalizan en el DCI. La señal de Aurora B es menos intensa que la de Aurora Tph en esta etapa, lo que puede ser debido a la competitividad entre ambos anticuerpos para reconocer la misma proteína, siendo el título del anticuerpo generado contra Aurora B inferior al de Aurora Tph. En metafase-I puede observarse como ambas proteínas colocalizan tanto a nivel del DCI de todos los cromosomas como a nivel de brazos en el DI (Fig. 22C). Además, pueden distinguirse los polos del huso marcados con Aurora Tph, correspondiendo esta señal a Aurora A (Fig. 22C). La señal de ambas proteínas en el DCI se pierde en anafase-I y se deslocaliza al cuerpo medio (Parra *et al.*, 2003). En intercinesis, de nuevo vuelve a detectarse primero la forma inactiva Aurora B (Fig. 22D), y seguidamente en profase-II se detecta también Aurora Tph (imagen no mostrada), volviendo a demostrar que es necesario que Aurora B esté localizada en el centrómero para que seguidamente sea fosforilada y, por tanto, activada. En metafase-II, ambas proteínas vuelven a colocalizar en el DCI (Fig. 22E). Ambas señales se pierden del DCI durante la segregación de las cromátidas hermanas a polos opuestos en anafase-II para relocalizarse en el cuerpo medio del huso (Parra *et al.*, 2003).

La dinámica de Aurora B fue descrita por Parra *et al.* (2003), mientras que la de su forma activa no se ha descrito hasta el momento en espermatoцитos de ratón. Como se ha indicado anteriormente, Aurora Tph comienza a detectarse en la etapa de diplotena en los cromocentros, momento a partir del cual va incrementando la intensidad de su señal (Fig. 23A, B). En diacinesis, la señal se concentra en el DCI y aumenta la señal a nivel de la cromatina (Fig. 23C). En metafase-I, se puede observar la señal centromérica de Aurora Tph en el DCI y la señal en los brazos concentrada en el DI, colocalizando con la señal de SYCP3 en ambas regiones (Fig. 23D). En esta etapa, pueden distinguirse marcados intensamente los polos, asumiendo que esa señal corresponde a la detección de Aurora A (Fig. 23D). En anafase-I, la señal centromérica de Aurora Tph comienza a desvanecerse y empiezan a aparecer marcados los MTs interzonales, los cuales, en telofase-I tardía, formarán el cuerpo medio del huso (Fig. 23E, F). En telofase-I no se aprecia

señal de Aurora Tph ni en los centrómeros ni en los polos (Fig. 23E, F). Durante la transición intercinesis/profase-II comienza a detectarse de nuevo Aurora Tph en los cromocentros (Fig. 24A), la cual termina acumulándose en el DCI de los cromosomas en metafase-II (Fig. 24B). De nuevo, en esta etapa pueden distinguirse marcados los polos, lugar donde se encuentra Aurora A (Fig. 24B). En anafase-II, la señal centromérica de Aurora Tph empieza a perderse hasta desaparecer en telofase-II, quedando relocalizada de nuevo en el cuerpo medio (Fig. 24C, D). Este patrón de distribución es similar al descrito previamente por nuestro grupo de investigación para la forma no activa de Aurora B en la meiosis de machos de ratón (Parra *et al.*, 2009).

Dado que el título del anticuerpo contra la quinasa Aurora B (AIM-1) es muy bajo, y que las diferencias en el centrómero respecto a Aurora Tph radican exclusivamente en el orden de aparición, el anticuerpo que utilizaremos a partir de ahora para detectar Aurora B/C en los siguientes análisis será el anticuerpo contra las tres Auroras activas: Aurora Tph.

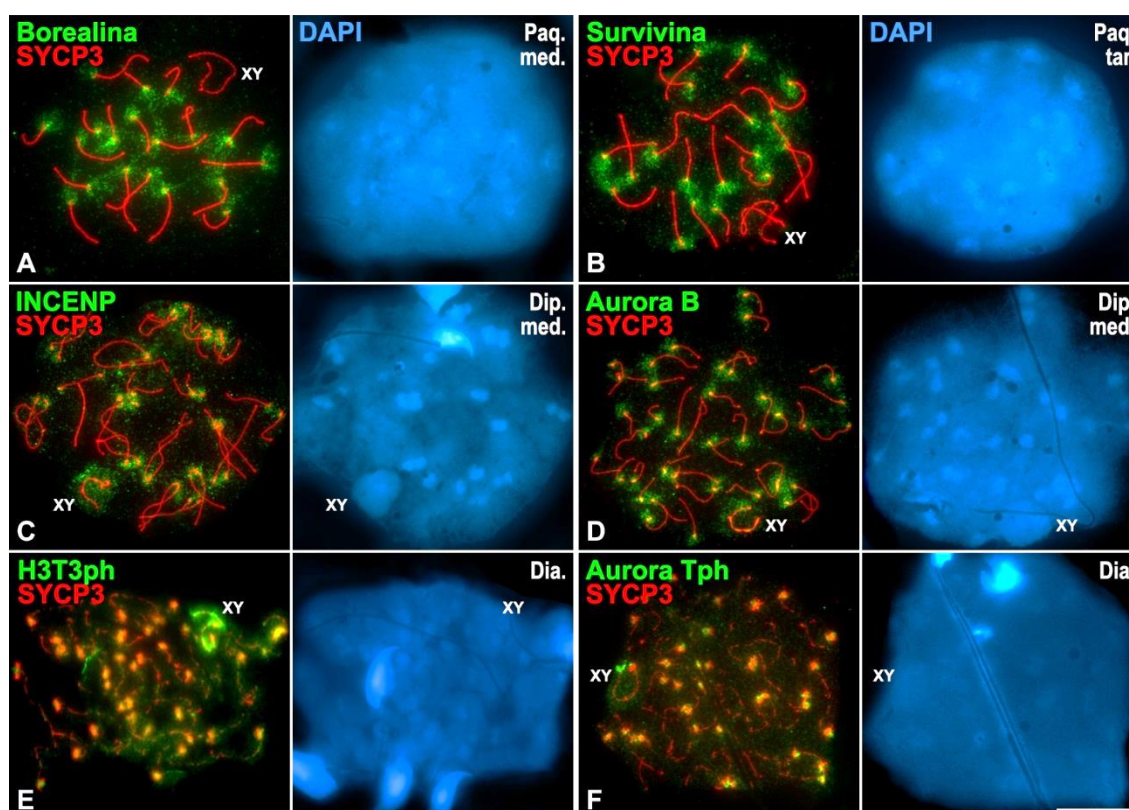


Figura 25. Orden de reclutamiento al centrómero de las proteínas de la vía de señalización de Haspina desde paquitena a diacinesis. Dobles inmunolocalizaciones de SYCP3 (rojo) con Borealina, Survivina, INCENP, Aurora B, H3T3ph y Aurora Tph (verde) en esparcidos de espermatocitos de ratón. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A) Paquitena media. (B) Paquitena tardía. (C y D) Diplotenas medias. (E y F) Diacinesis. Los bivalentes sexuales (XY) aparecen indicados. La barra de medida en F corresponde a 10 μm .

2.2. ORDEN DE RECLUTAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS DE LA VÍA HASPINA EN MEIOSIS

Según el orden de aparición en los centrómeros de las diferentes proteínas de la ruta Haspina-H3T3ph-CPC, podemos concluir que Borealina y Survivina son las primeras proteínas del CPC en ser reclutadas en los cromocentros a partir de paquitena tardía, siendo complicado discernir cuál es reclutada antes (Fig. 25A, B). Posteriormente, a partir de diplotena son reclutadas INCENP y Aurora B/C (Fig. 25C, D). En esta misma etapa, Haspina aparece en el DCI de todos los cromosomas (Fig. 11C, D). Por último, coincidiendo con una mayor acumulación de Haspina, la variante H3T3ph aparece en diacinesis (Fig. 25E), provocando la relocalización del CPC de la heterocromatina centromérica al DCI, donde empezamos a detectar la forma fosforilada, y por tanto activa, de Aurora B/C (Fig. 25F). Este orden de reclutamiento coincide con el descrito previamente para algunas de las proteínas del CPC en la meiosis de machos de ratón (Parra *et al.*, 2009).

2.3. DINÁMICA DE H3T3PH Y AURORA B/C EN LA MEIOSIS FEMENINA DE RATÓN

En cuanto a la localización de las proteínas de la vía Haspina en la meiosis de hembras de ratón, analizamos la variante histónica H3T3ph y la quinasa Aurora B/C. Estos resultados fueron obtenidos en el laboratorio de la Dra. Wassmann en el IBPS (París). Para ello, realizamos dobles inmunodetecciones utilizando los mismos anticuerpos contra H3T3ph y Aurora Tph empleados en espermatoцитos, junto con un marcaje de los cinetocoros.

La variante **H3T3ph** aparece localizada en toda la cromatina de los bivalentes en los oocitos esparcidos en metafase-I, apareciendo más concentrada en el DI (Fig. 26A). Esta distribución en oocitos es muy similar a la descrita previamente para espermatoцитos. La localización de H3T3ph a lo largo del DI se extiende hasta la región a nivel del DCI que queda inmediatamente por debajo de la señal de los cinetocoros hermanos. En metafase-II, H3T3ph queda localizada en el DCI, en forma de barra entre los dos cinetocoros hermanos (Fig. 26B).

Por otro lado, la localización de **Aurora B/C** (detectada con el anticuerpo Aurora Tph) en oocitos esparcidos también es similar a la descrita en espermatoцитos, aunque presenta ciertas diferencias. En metafase-I, Aurora B/C aparece localizada en el DI y en los centrómeros (Fig. 26C), como ocurre en machos. Sin embargo, esta señal centromérica en oocitos es más discreta, y parece colocalizar con los cinetocoros (Fig. 26C), mientras que en machos se localiza en el

subdominio en forma de “copa” (Fig. 23D). En metafase-II, Aurora B/C se localiza en el DCI entre las parejas de cinetocoros hermanos (Fig. 26D), de manera similar a la observada para H3T3ph.

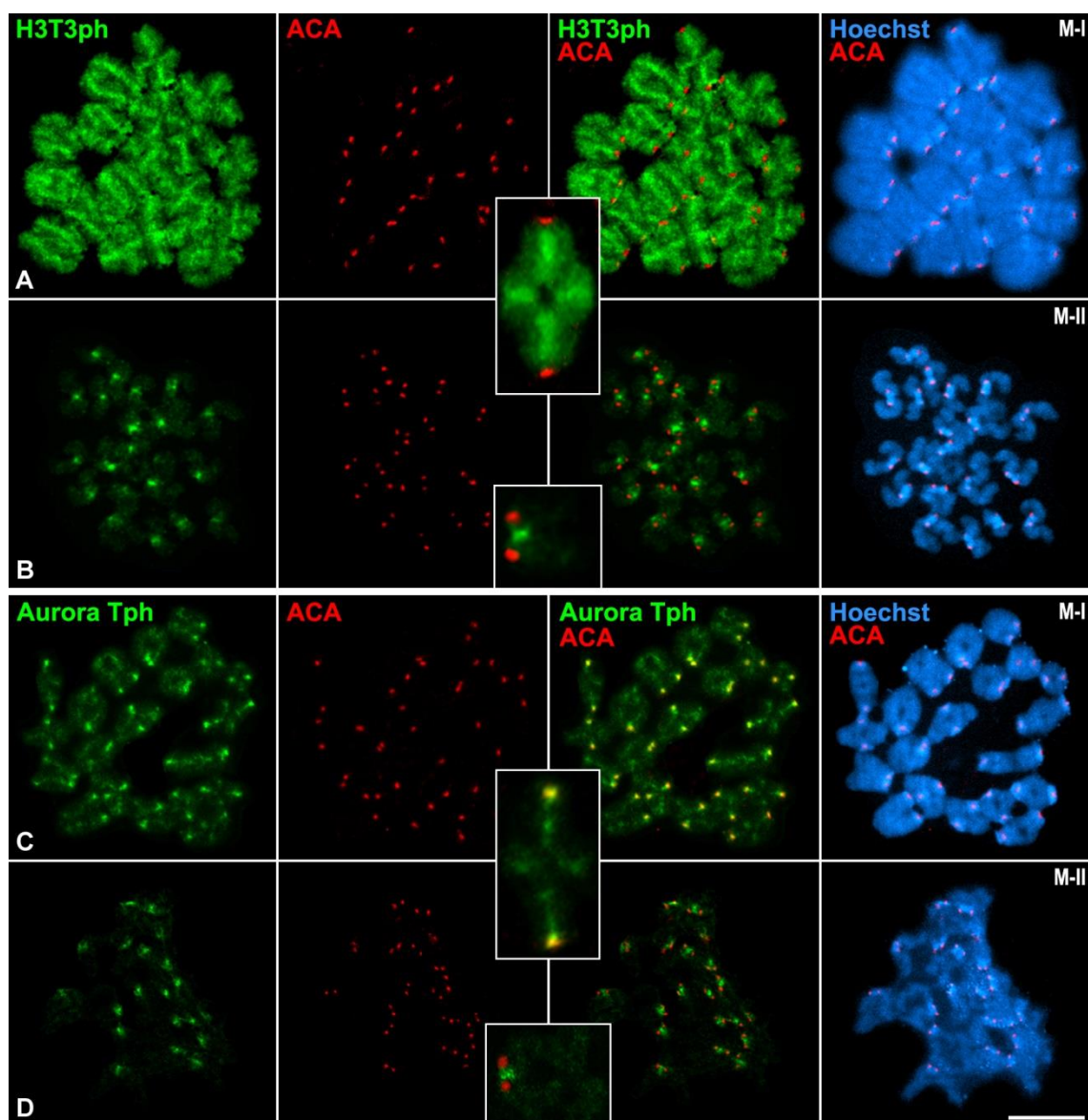


Figura 26. Localización de H3T3ph y la quinasa Aurora B/C fosforilada (Aurora Tph) en oocitos de ratón. Dobles inmunolocalizaciones de H3T3ph y Aurora Tph (verde) con los cinetocoros (ACA, rojo) en esparcidos de oocitos de ratón durante metafase-I y metafase-II. La cromatina se ha teñido con Hoechst (azul). (A y B) Doble localización de H3T3ph y los cinetocoros en metafase-I (A) y metafase-II (B). (C y D) Doble localización de Aurora Tph y los cinetocoros en metafase-I (C) y metafase-II (D). En las diferentes figuras aparecen detalles aumentados de bivalentes autosómicos en metafase-I y cromosomas en metafase-II. La barra de medida en D corresponde a 10 μ m.

3. Estudio del fenotipo meiótico de los mutantes *Bub1*^{KD/KD}

Una vez analizadas las distribuciones de los componentes de las vías de señalización del DCI a lo largo del proceso meiótico en ratón, procedimos al estudio funcional de la RCI. En primer lugar, realizamos el análisis de esta red en ausencia de la fosforilación de la histona H2A en el residuo T120, utilizando los ratones mutantes para el dominio quinasa de la proteína BUB1, la cual es la encargada de la generación de esta H-PTM. Estos ratones presentan el gen *Bub1* mutado en homocigosis, y se denominan mutantes *Bub1*^{KD/KD} (del inglés *Bub1* *K*inase *D*eath). Estos mutantes expresan la proteína BUB1, pero poseen una mutación puntual en el dominio quinasa que inhibe su actividad. Esta cepa de ratón fue generada en el laboratorio del Dr. Jan van Deursen (Clínica Mayo, USA) (Ricke *et al.*, 2012), y fueron cedidos a nuestro laboratorio para la realización de esta Tesis Doctoral.

3.1. FENOTIPO MEIÓTICO DE LOS RATONES *BUB1*^{KD/KD}

Los ratones *Bub1*^{KD/KD} son fértiles pero los cruces entre homocigotos producen camadas reducidas de entre 1 a 6 neonatos. Este problema en la fertilidad parece afectar sólo a los individuos macho, ya que los cruces entre machos *Bub1*^{KD/KD} con hembras WT, producen camadas reducidas, mientras que los cruces entre hembras *Bub1*^{KD/KD} con machos WT dan lugar a camadas de un tamaño normal (Ricke *et al.*, 2012). El hecho de que aun teniendo mutada la funcionalidad de una quinasa tan importante como BUB1 sólo genere subfertilidad, y que exista además una divergencia entre machos y hembras, hace que el estudio de estos mutantes suscite gran interés. En este sentido, procedimos al estudio de la meiosis de la línea *Bub1*^{KD/KD} tanto en machos como en hembras.

3.1.1. La meiosis-I en espermatoцитos *Bub1*^{KD/KD}: errores en el alineamiento y la segregación cromosómica

Como primera aproximación al estudio del fenotipo meiótico durante la meiosis-I, realizamos dobles inmunodetecciones entre SYCP3 y los cinetocoros, o entre los cinetocoros y el marcaje del huso acromático (detectando α -Tubulina) en espermatoцитos primarios de individuos *Bub1*^{KD/KD}.

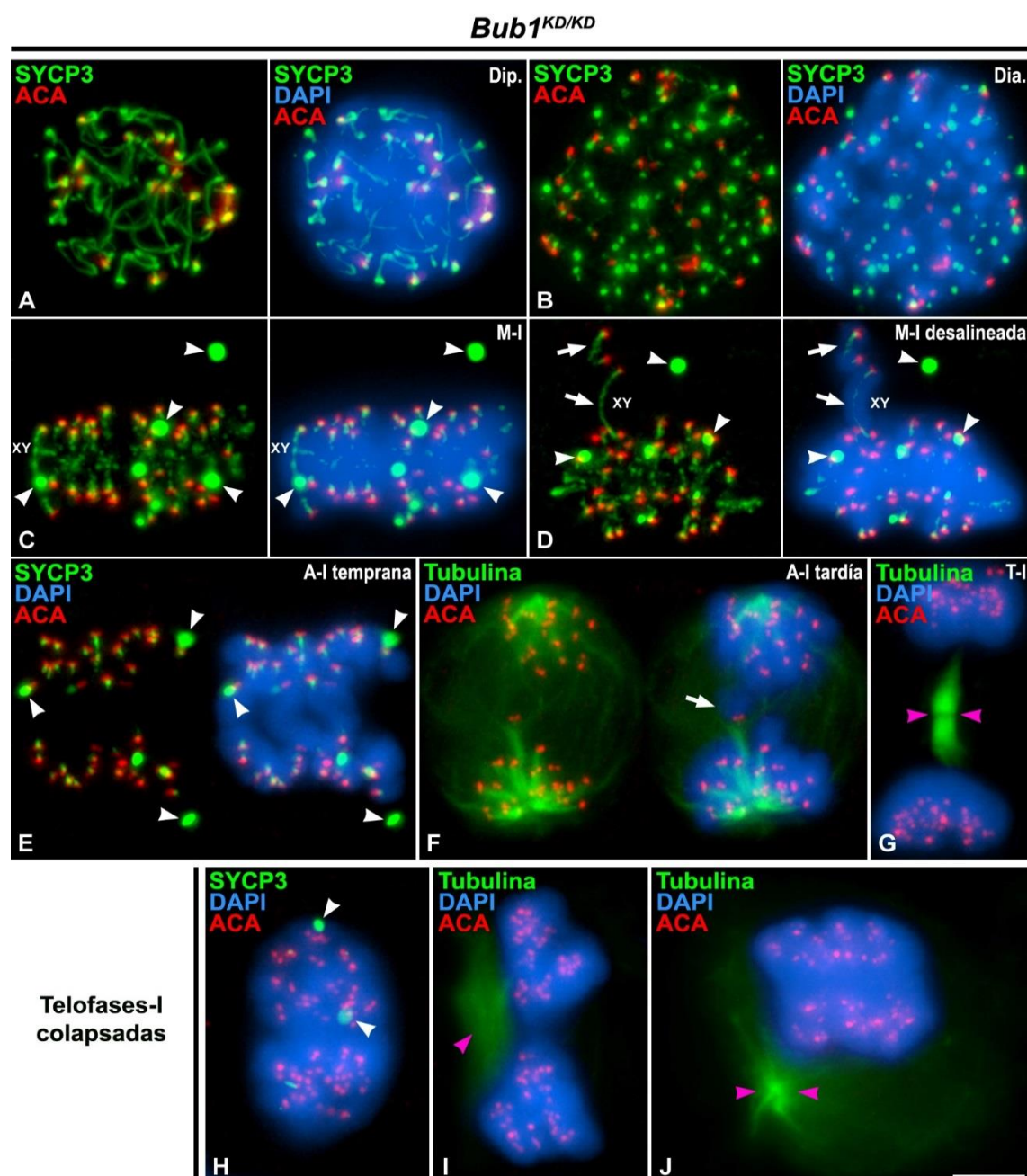


Figura 27. Problemas de alineamiento y segregación en la primera división meiótica en espermatocitos *Bub1^{KD/KD}*. Dobles inmunolocalizaciones de los cinetocoros (ACA, rojo) y SYCP3 o α -Tubulina (verde) en aplastados de túbulos seminíferos de ratón *Bub1^{KD/KD}*. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A-E y H) Doble detección de los cinetocoros y SYCP3. (A) Diplotena. (B) Diacinesis. (C) Metafase-I alineada. (D) Metafase-I desalineada. (E) Anafase-I temprana. (H) Telofase-I colapsada. (F, G, I y J) Doble detección de α -Tubulina y los cinetocoros. (F) Anafase-I tardía con cromosomas retrasados. (G) Telofase-I normal. (I y J) Telofases-I colapsadas. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. La flecha blanca en (F) señala un cromosoma retrasado y en (D) al bivalente sexual y un bivalente autosómico desalineados. Las puntas de flecha blancas señalan agregados citoplásmicos de SYCP3, y las rosas indican el cuerpo medio y restos de microtúbulos. El bivalente sexual (XY) aparece indicado. La barra de medida en J corresponde a 10 μ m.

Los espermatocitos *Bub1^{KD/KD}* muestran una profase-I aparentemente normal, siendo tanto la dinámica de SYCP3 como la de los cinetocoros igual que en los individuos WT (Fig. 27A, B). No es hasta la prometáfase-I/metafase-I cuando se empiezan a observar alteraciones tanto

en la distribución de SYCP3 como en el alineamiento de los bivalentes, apareciendo en un elevado porcentaje metafases-I en las que se observan bivalentes fuera de placa, a las que denominamos “metafases-I desalineadas” (Fig. 27C, D). En todas las metafases-I *Bub1^{KD/KD}*, independientemente de si presentan o no errores en el alineamiento, la señal de SYCP3 aparece reducida a nivel del DCI, observándose en forma de barra por debajo de los cinetocoros hermanos asociados, y no en forma de “T” o “Y” como en las metafases-I WT (Fig. 27C, D). Además, SYCP3 presenta una mayor acumulación en el DI en comparación con individuos WT (Fig. 27C, D). A su vez, tanto en las metafases-I alineadas (Fig. 27C) como en las desalineadas (Fig. 27D), se observan más agregados citoplásmicos de SYCP3 (Fig. 27C, D). Estos agregados de SYCP3 persisten hasta la telofase-I (Fig. 27E, H), hecho que no suele observarse en individuos WT. Durante la anafase-I temprana de *Bub1^{KD/KD}*, la señal de SYCP3 queda en forma de pequeñas barras, una por centrómero (Fig. 27E). En esta misma etapa los cinetocoros hermanos aparecen individualizados (Fig. 27E-F), mientras que en individuos WT esta separación de los cinetocoros tiene lugar en la telofase-I. Esto indica una pérdida prematura de la cohesión intercinetocórica en mutantes *Bub1^{KD/KD}*. En anafase-I tardía, se observan retrasos en la migración de algunos cromosomas homólogos (Fig. 27F). En telofase-I, no se observa señal de SYCP3 (Fig. 27H) y los cinetocoros hermanos se distinguen bien individualizados (Fig. 27G). En cambio, en individuos WT, las telofases-I siguen mostrando SYCP3 en forma de barras entre o cercanas a las parejas de cinetocoros hermanos. De entre las telofases-I *Bub1^{KD/KD}* se pueden distinguir tanto células que cursan correctamente esta etapa (Fig. 27G), como células que muestran problemas en la segregación y/o citocinesis quedando los dos polos hijos muy próximos entre sí, llegando a colapsar y bloquear el proceso de citocinesis (Fig. 27H-J).

Debido a los problemas en el alineamiento cromosómico observados en la primera división meiótica, continuamos con el estudio realizando un análisis cuantitativo de la proporción de metafases-I alineadas, desalineadas y apoptóticas (metafases-I con cromatina hipercondensada y no inmunoreactivas) observadas en estos mutantes (Fig. 28). Los resultados demuestran que en los mutantes *Bub1^{KD/KD}* hay un incremento significativo del porcentaje de metafases-I desalineadas (50%) con respecto a las observadas en individuos WT (16%) (Fig. 28). Asimismo, también hay un incremento significativo en el porcentaje de metafases-I apoptóticas en los mutantes *Bub1^{KD/KD}* (27%) frente a las encontradas en individuos WT (8%).

Para conocer la causa que provoca el incremento en los errores de alineamiento cromosómico y los problemas de segregación que observados en la primera división meiótica en espermaticitos *Bub1^{KD/KD}*, procedimos a analizar el estado del SAC en estos mutantes. Mediante el seguimiento de la proteína MAD2, la cual se acumula en los cinetocoros que no están correctamente biorientados, observamos una distribución normal que nos sugiere un correcto funcionamiento de dicho *checkpoint* en estos mutantes (Fig. S5). Tras observar que no hay alteración aparente del SAC meiótico, decidimos analizar las distribuciones de distintas proteínas presentes en el DCI en metafase-I, tanto en machos como en hembras.

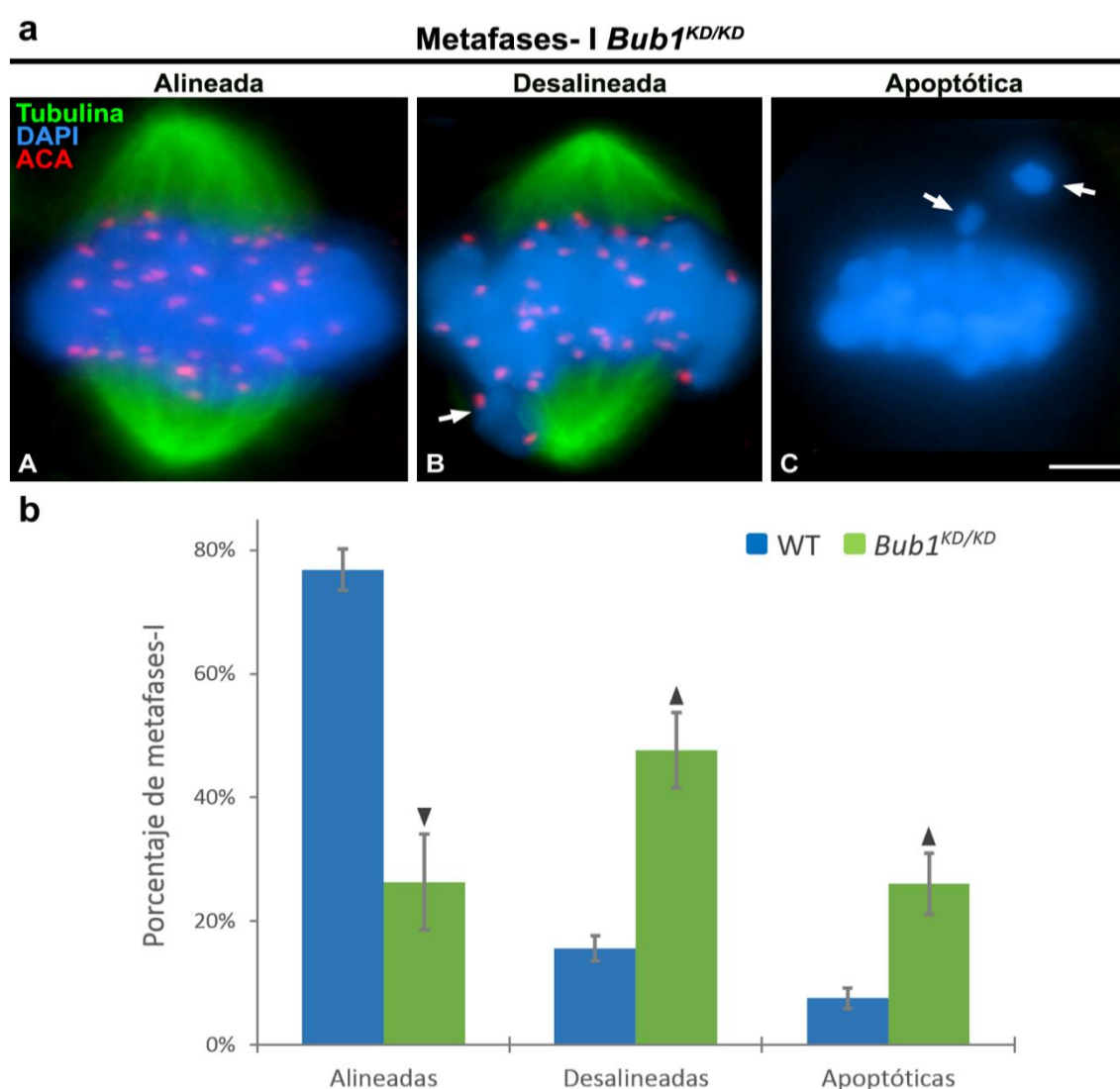


Figura 28. Cuantificación de los tipos de metafases-I encontradas en machos WT y *Bub1^{KD/KD}*. **a)** Doble inmunolocalización de cinetocoros (ACA, rojo) y α -Tubulina (verde) en aplastados de túbulos seminíferos de ratón *Bub1^{KD/KD}*. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). **(A)** Metafase-I alineada. **(B)** Metafase-I desalineada. **(C)** Metafase-I apoptótica. Los bivalentes/cromosomas desalineados se indican con flechas. La barra de medida en **C** corresponde a 10 μ m. **b)** Representación gráfica de los valores medios (M \pm EEM) obtenidos en los recuentos celulares. (▲) Incrementos y (▼) descensos significativos con respecto al control WT (p \leq 0,05).

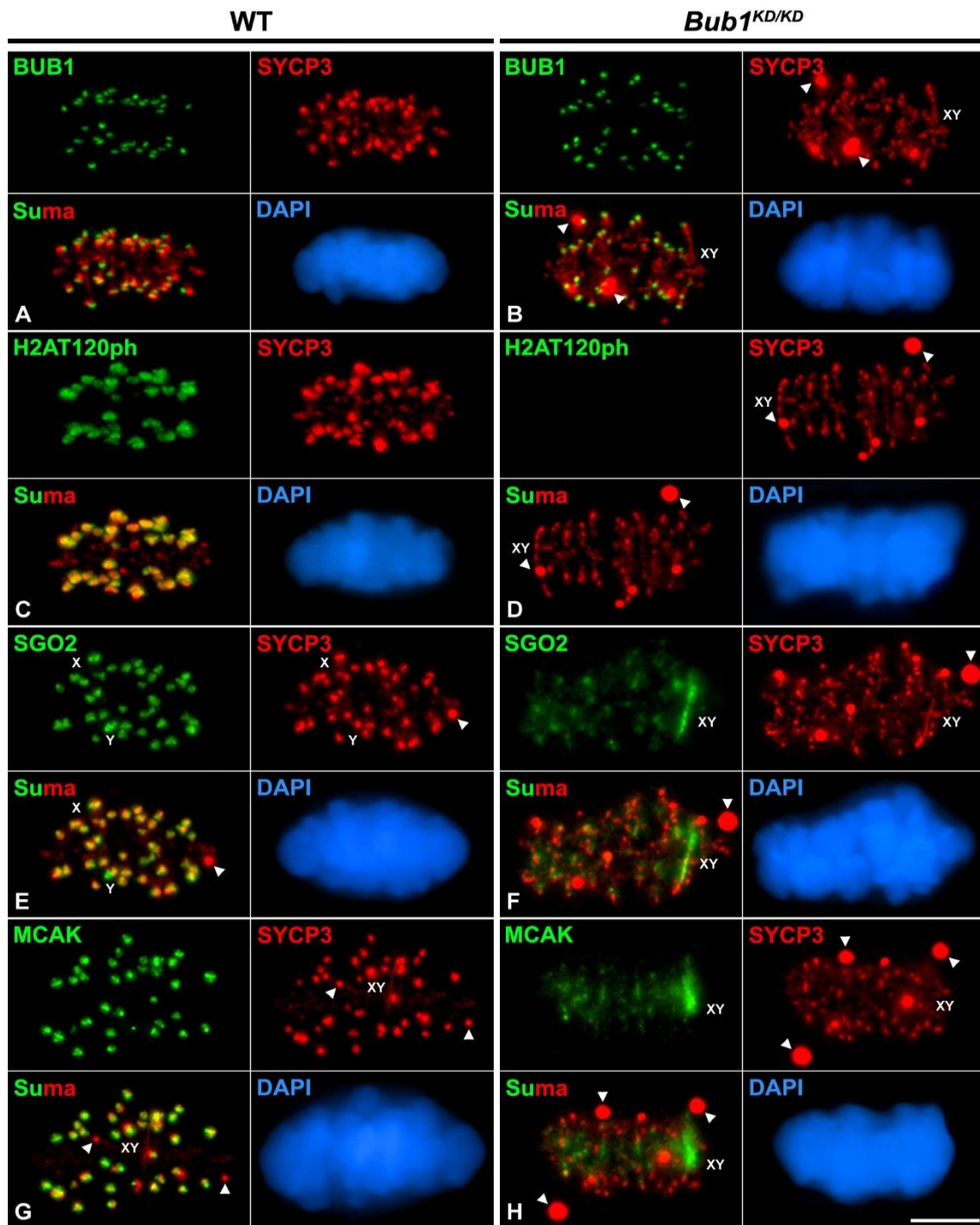


Figura 29. En ausencia de la actividad quinasa de BUB1, la variante histónica H2AT120ph desaparece, y SGO2 y MCAK muestran alterada su distribución en metafase-I. Dobles inmunolocalizaciones de SYCP3 (rojo) con BUB1, H2AT120ph, SGO2 o MCAK (verde) en metafases-I procedentes de aplastados de túbulos seminíferos de ratón silvestre (WT) (A, C, E y G) y *Bub1^{KD/KD}* (B, D, F y H). La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A y B) Doble detección de BUB1 y SYCP3. (C y D) Doble detección de H2AT120ph y SYCP3. (E y F) Doble detección de SGO2 y SYCP3. (G y H) Doble detección de MCAK y SYCP3. Los cromosomas sexuales (X, Y) y el bivalente sexual (XY) aparecen indicados. Las puntas de flechas blancas señalan agregados citoplásmicos de SYCP3. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. La barra de medida en H corresponde a 10 μ m.

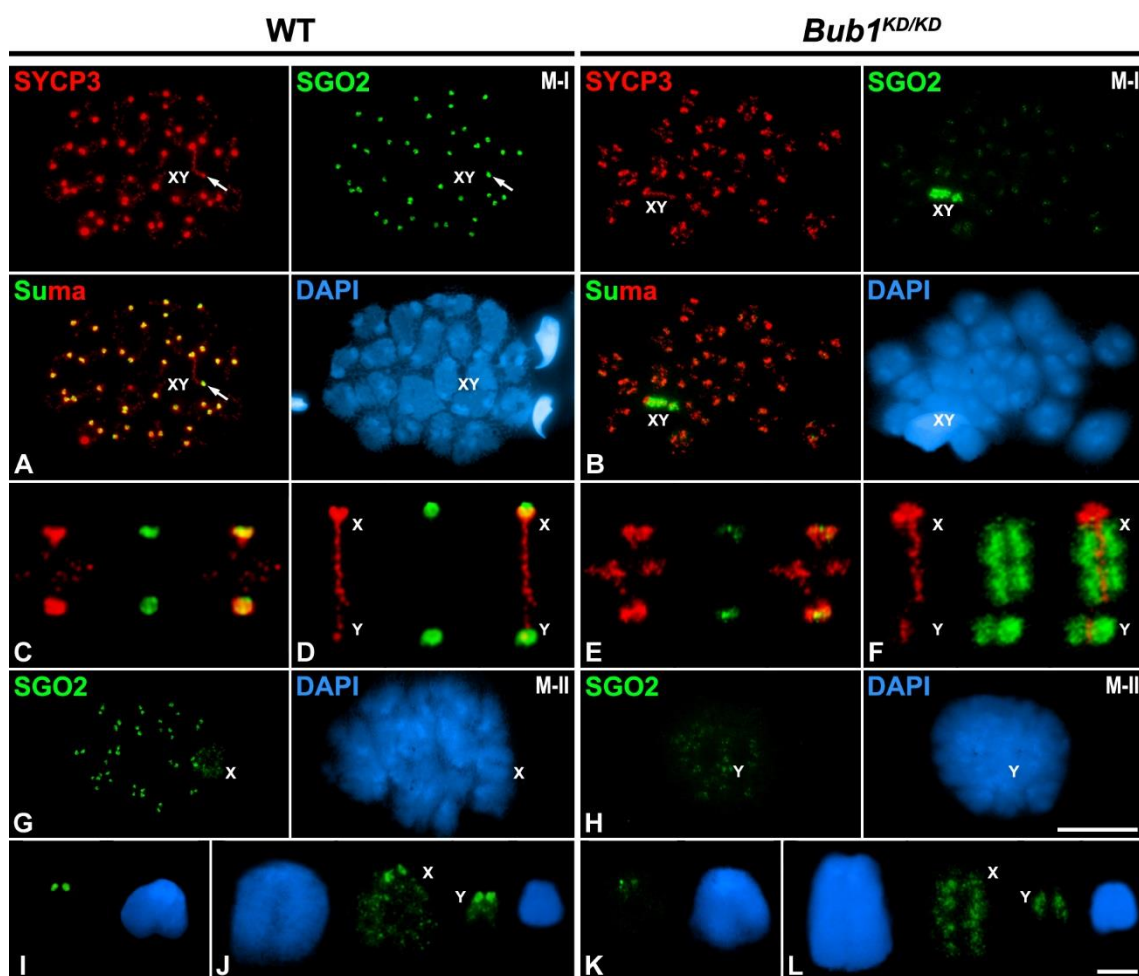


Figura 30. En ausencia de la actividad quinasa de BUB1, SGO2 disminuye en el centrómero y se acumula en la cromatina de los cromosomas sexuales. Doble inmunolocalización de SYCP3 (rojo) y SGO2 (verde) en metafases-I y metafases-II esparcidas WT (A, C, D, G, I y J) y *Bub1^{KD/KD}* (B, E, F, H, K y L). La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A y B) Metafases-I WT (A) y *Bub1^{KD/KD}* (B). La flecha blanca señala el centrómero del cromosoma Y. (C-F) Detalles de bivalentes aumentados WT (C y D) y *Bub1^{KD/KD}* (E y F). (G y H) Metafases-II WT (G) y *Bub1^{KD/KD}* (H). (C-F) Detalles de cromosomas WT (I y J) y *Bub1^{KD/KD}* (K y L). Los cromosomas sexuales (X, Y) y el bivalente sexual (XY) aparecen indicados. Las barras de medida en H y L corresponden a 10 y 2 μ m, respectivamente.

3.1.2. Distribución de las proteínas de la vía BUB1 en espermatocitos *Bub1^{KD/KD}* en metafase-I

En primer lugar, comprobamos que la ausencia de la actividad quinasa de BUB1 no impide su presencia en los cinetocoros en las metafases-I de los individuos mutantes (Fig. 29A, B). Dado que la actividad quinasa de BUB1 está anulada, como era de esperar, las metafases-I *Bub1^{KD/KD}* no presentan señal de H2AT120ph en el DCI (Fig. 29C, D). La ausencia de la actividad quinasa de BUB1 y, por tanto de H2AT120ph, provoca alteraciones en la distribución de las proteínas SGO2 y MCAK (Fig. 29E-H). En las metafases-I de individuos *Bub1^{KD/KD}*, tanto SGO2 como MCAK

aparecen disminuidas en el DCI al tiempo que aparecen acumuladas preferentemente en el DI del bivalente sexual (Fig. 29E-H, Fig. 30).

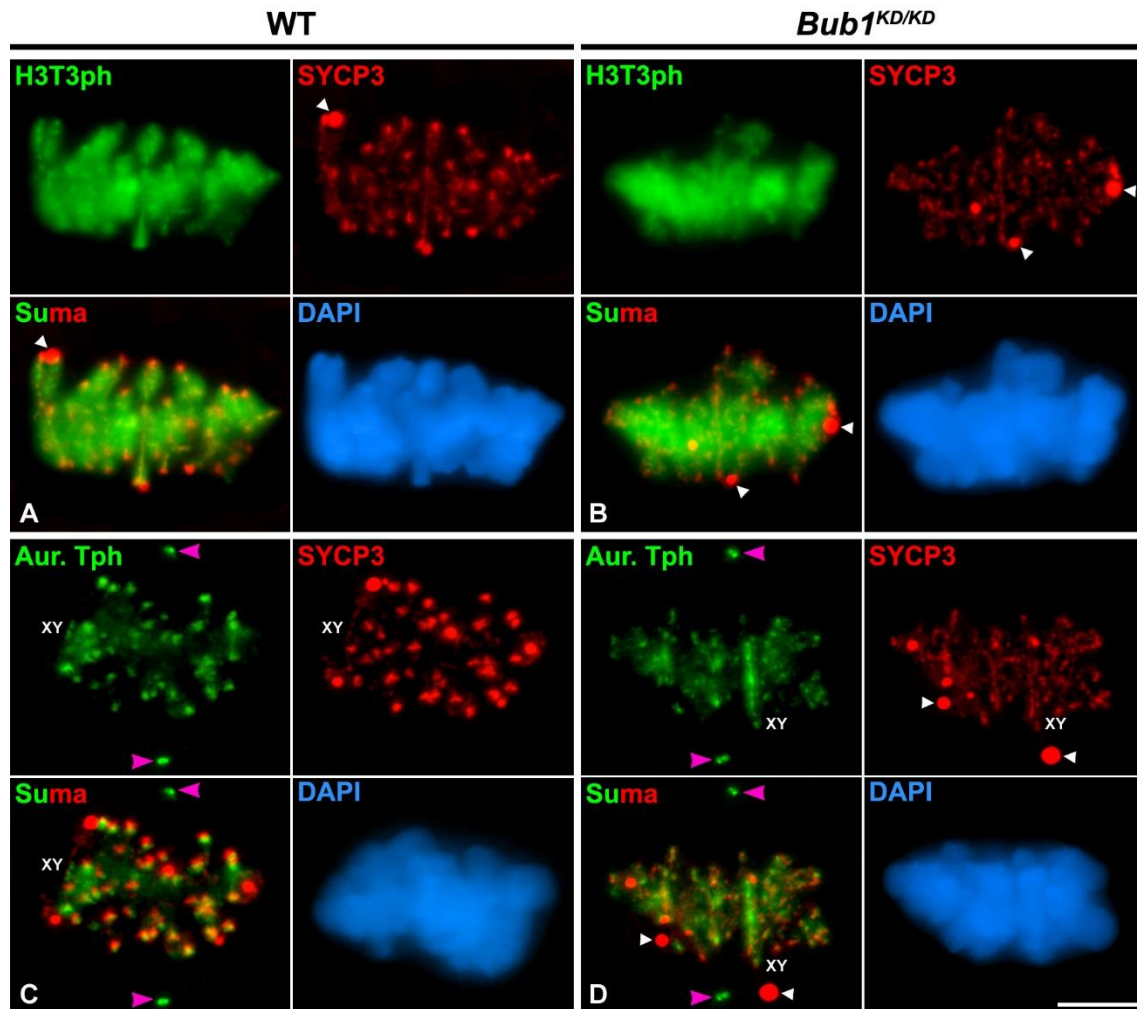


Figura 31. La quinasa Aurora B/C, pero no la variante histónica H3T3ph, presenta alterada su distribución en metafase-I en ausencia de la actividad quinasa de BUB1. Dobles inmunolocalizaciones de SYCP3 (rojo) con H3T3ph o Aurora Tph (verde) en metafases-I procedentes de aplastados de túbulos seminíferos de ratón WT (A y C) y *Bub1^{KD/KD}* (B y D). La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A y B) Doble detección de H3T3ph y SYCP3. (C y D) Doble detección de Aurora Tph y SYCP3. El bivalente sexual (XY) aparece indicado. Las puntas de flecha blancas señalan agregados citoplásmicos de SYCP3, y las rosas los polos celulares. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. La barra de medida en D corresponde a 10 μ m.

3.1.3. Distribución de las proteínas de la vía Haspina en espermatocitos *Bub1^{KD/KD}* en metafase-I

En cuanto a la ruta de la vía Haspina-H3T3ph-CPC, hemos observado que en las metafases-I *Bub1^{KD/KD}* la variante H3T3ph aparentemente no presenta alteración en su distribución. Así, H3T3ph se localiza en el DCI y en el DI de todos los bivalentes, como en la cromatina (Fig. 31A, B). Por el contrario, y a pesar de que la distribución de la variante H3T3ph no se encuentra afectada en los bivalentes, Aurora B/C muestra alterada su distribución (Fig. 31C, D) de una

forma similar a la observada para las proteínas SGO2 y MCAK (Fig. 30E-H). Así, en metafases-I *Bub1^{KD/KD}*, Aurora B/C se observa disminuida en el DCI y acumulada en el DI del bivalente sexual (Fig. 31C, D). En cuanto a Aurora A, ésta sigue detectándose en los polos celulares en las metafases-I *Bub1^{KD/KD}* (Fig. 31C, D).

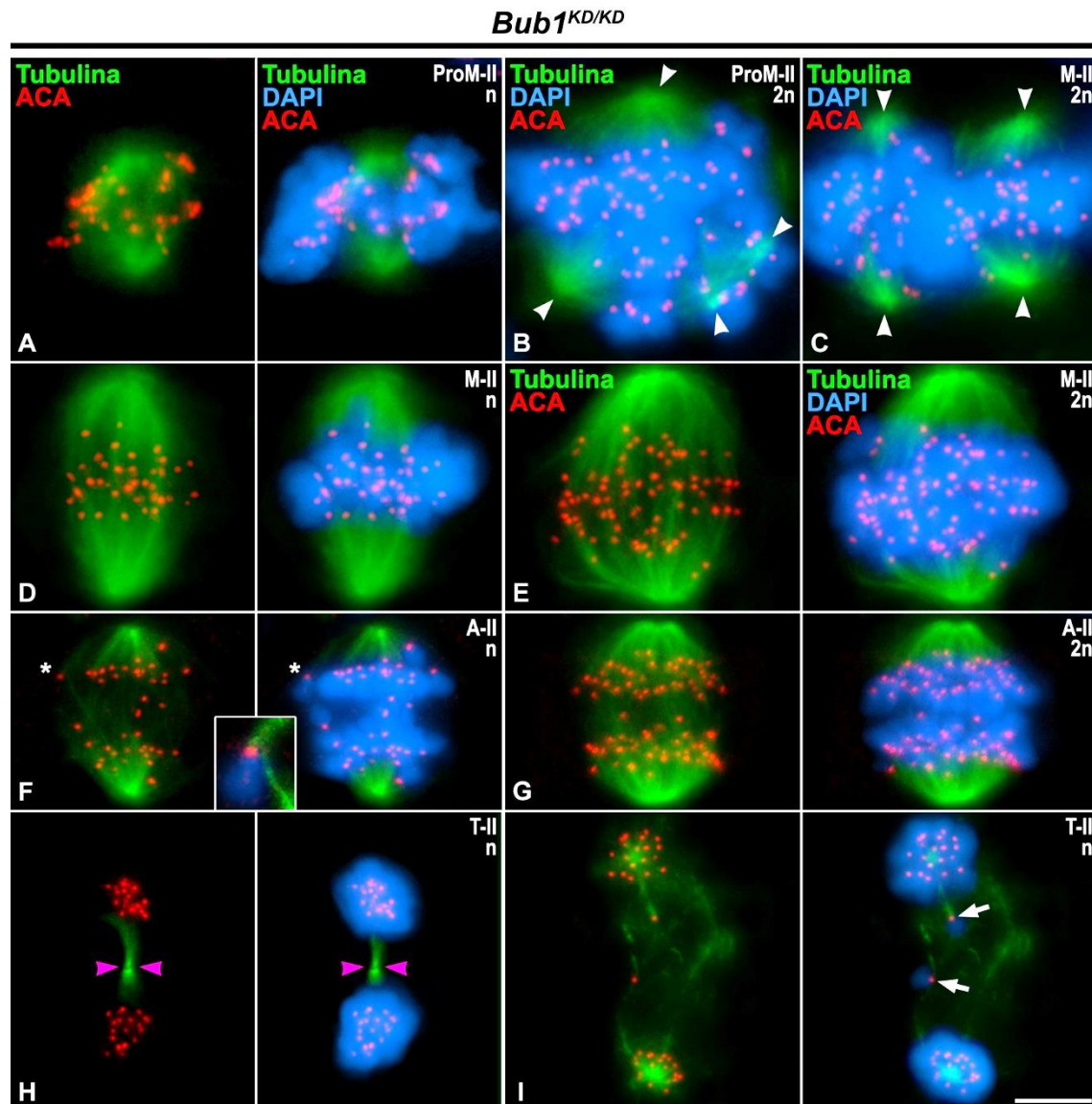


Figura 32. Problemas de alineamiento y ploidía en la segunda división meiótica en espermatocitos *Bub1^{KD/KD}*.

Doble inmunolocalización de α -Tubulina (verde) y los cinetocoros (ACA, rojo) en aplastados de túbulos seminíferos de ratón *Bub1^{KD/KD}*. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A-C) Prometafases-II haploide (n) bipolar (A) y diploides (2n) tripolar (B) y tetrapolar (C). (D y E) Metafases-II haploide (n) alineada (D) y diploide (2n) desalineada (E). (F y G) Anafases-II haploide (n) (F) y diploide (2n) (G). (H e I) Telofases-II haploides (n) normal (H) y con retrasos (I). Las puntas de flecha blancas en B y C señalan los polos celulares, y las rosas en H el cuerpo medio. Las flechas blancas en I señalan cromátidas retrasadas. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. La barra de medida en I corresponde a 10 μ m.

3.1.4. La meiosis-II en espermaticitos *Bub1^{KD/KD}*: errores en el alineamiento y aparición de diploidías

Para el estudio del fenotipo meiótico de espermaticitos *Bub1^{KD/KD}* durante la meiosis-II, realizamos, en primer lugar, dobles inmunodetecciones de los cinetocoros y del huso acromático (detectando α -Tubulina) en espermaticitos secundarios.

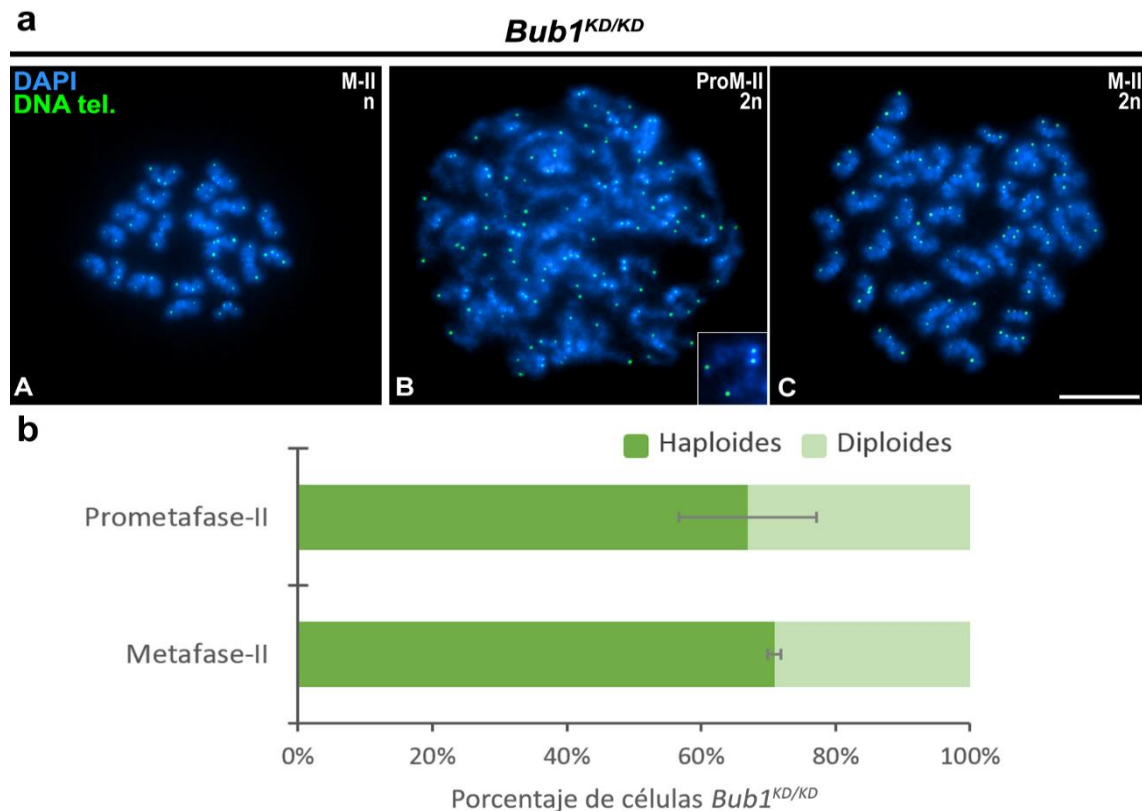


Figura 33. Presencia de espermaticitos diploides (2n) en la segunda división meiótica en ratones *Bub1^{KD/KD}*.
a) Hibridación *in situ* de las secuencias teloméricas (DNA tel., verde) en espermaticitos. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). **(A)** Prometáfase-II diploide. **(B)** Metafase-II diploide. La barra de medida en **B** corresponde a 10 μ m. **b)** Se representan los valores medios ($M \pm EEM$) obtenidos en los recuentos celulares. No hay diferencias significativas entre las etapas ($p \leq 0,05$).

Nuestros resultados mostraron la presencia de prometáfases-II haploides (n) con un número cromosómico normal (20 cromosomas) y husos bipolares (Fig. 32A), como resultado de una primera división meiótica normal. No obstante, también encontramos prometáfases-II diploides (2n) con 40 cromosomas y con tres o cuatro polos celulares (Fig. 32B, C). Esta situación de diploidía también se observó al analizar las metafases-II (Fig. 32D, E) y las anafases-II (Fig. 32F, G). La cuantificación de la ploidía en las prometáfases-II y metafases-II demuestra que alrededor del 30% de éstas son diploides en individuos *Bub1^{KD/KD}* (Fig. 33b). La presencia de prometáfases-II y metafases-II diploides fue confirmada mediante la detección de las secuencias teloméricas con la técnica de FISH en preparaciones de esparcido de espermaticitos (Fig. 33a). Es de

destacar que las metafases-II tanto haploides como diploides pueden mostrar cromosomas desalineados e incluso aparecer como apoptóticas (Fig. 32D, E, Fig. 34a). Su cuantificación indica que en los mutantes *Bub1^{KD/KD}* hay un incremento significativo en el porcentaje total de metafases-II desalineadas (37%) con respecto a las observadas en individuos WT (11%) (Fig. 34b). A su vez, el análisis del porcentaje total de prometafases-II y metafases-II en individuos mutantes y WT muestra que en los mutantes hay un porcentaje significativamente mayor de prometafases-II que de metafases-II (Fig. 35). Estos datos, junto con la presencia de errores de unión MTs-cinetocoro (Fig. 32F), indican problemas y/o retrasos en el alineamiento cromosómico en la segunda división meióticas en los mutantes.

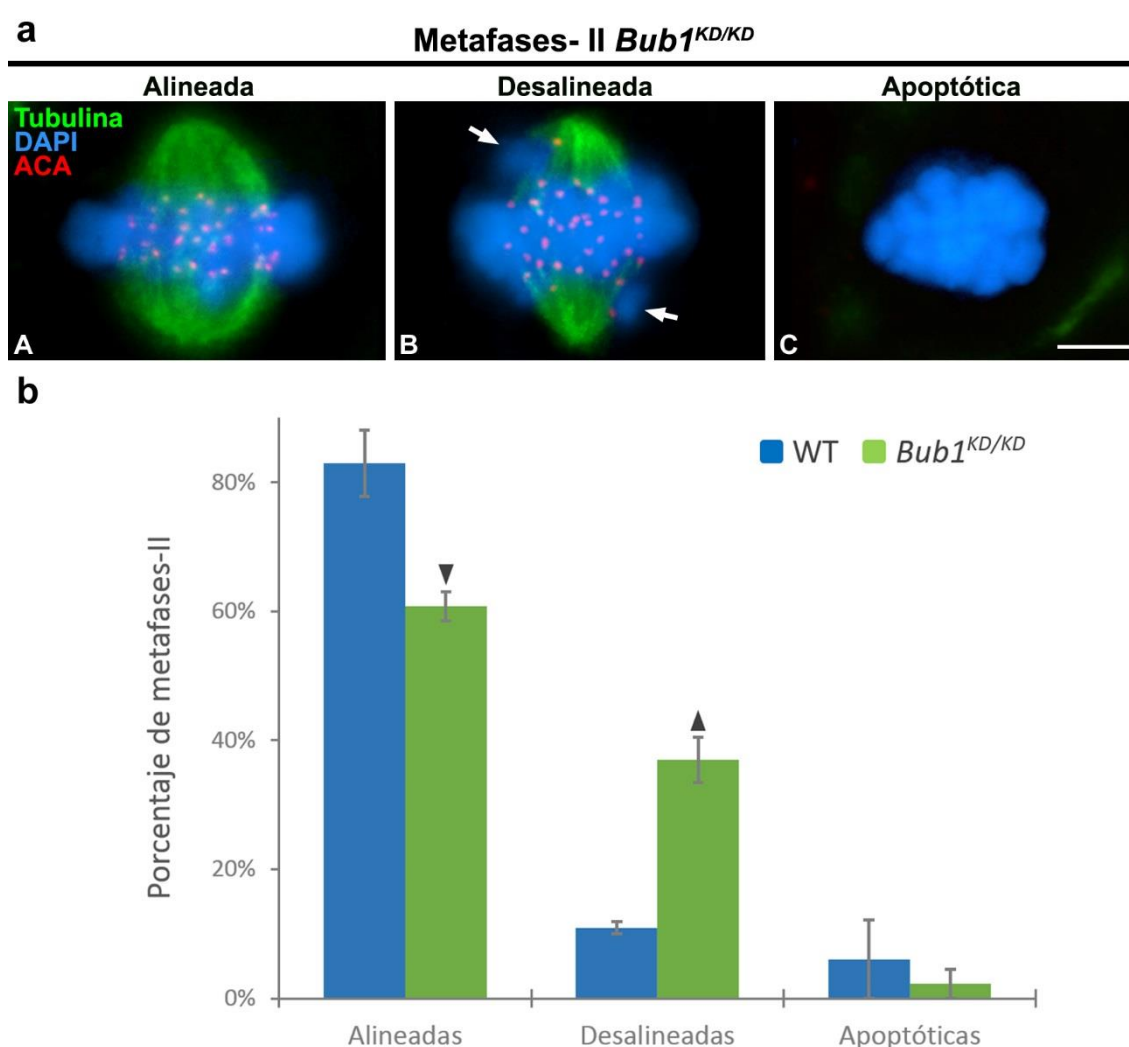


Figura 34. Cuantificación de los tipos de metafases-II encontradas en machos WT y *Bub1^{KD/KD}*. **a)** Doble inmunolocalización de los cinetocoros (ACA, rojo) y α -Tubulina (verde) en aplastados de túbulos seminíferos de ratón *Bub1^{KD/KD}*. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). **(A)** Metafase-II alineada. **(B)** Metafase-II desalineada. **(C)** Metafase-II apoptótica. Los bivalentes/cromosomas desalineados se indican con flechas. La barra de medida en **C** corresponde a 10 μ m. **b)** Representación gráfica de los valores medios ($M \pm EEM$) obtenidos en los recuentos celulares. (\blacktriangledown) Incrementos y (\blacktriangle) descensos significativos con respecto al control WT ($p \leq 0,05$).

Resultados

No sabemos si la mayoría de las metafases-II diploides llegan a completar la meiosis ya que el número de anafases-II diploides encontradas es muy reducido (Fig. 32G) y no se ha podido verificar la existencia de telofases-II diploides, ya que éstas pueden llegar a confundirse con telofases-I. No obstante, se han encontrado telofases-II haploides tanto normales (Fig. 32H), como con algunas cromátidas retrasadas (Fig. 32I).

a

| | Prometafases-II | Metafases-II | Nº células |
|-----------------------------|-----------------|--------------|------------|
| WT | 40,7 ± 4,7 | 59,3 ± 4,7 | 315 |
| <i>Bub1^{KD/KD}</i> | 64,6 ± 13,5 | 35,4 ± 13,5 | 354 |

b

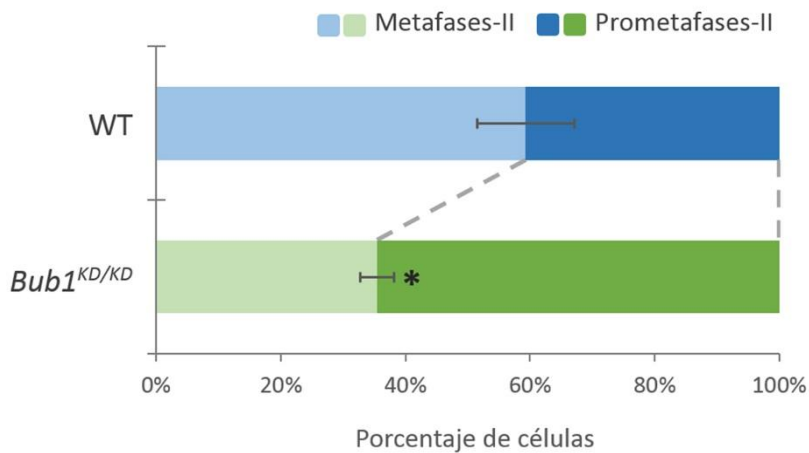


Figura 35. Incremento del número de prometafases-II en ratones *Bub1^{KD/KD}*. Se representan los valores medios (M ± EEM) obtenidos en los recuentos celulares. * Diferencias significativas con respecto al control WT ($p \leq 0,05$).

Para conocer la causa que provoca los fallos de alineamiento cromosómico observados en la segunda división meiótica en espermatoцитos *Bub1^{KD/KD}*, procedimos al análisis de las distribuciones de distintas proteínas presentes en el DCI en metafase-II, tanto en machos como en hembras.

3.1.5. Distribución de las proteínas de las vías BUB1 y Haspina en espermatoцитos *Bub1^{KD/KD}* en metafase-II

La quinasa BUB1 aparece en los cinetocoros en los cromosomas de las metafases-II *Bub1^{KD/KD}* al igual que en las metafases-II WT (Fig. 36A, B). Por otro lado, de forma similar a lo que ocurre en las metafases-I mutantes, SGO2 y MCAK presentan alterada su distribución en las

metafases-II *Bub1*^{KD/KD} (Fig. 36C-F). En este sentido, ambas proteínas quedan situadas en la región media entre los cinetocoros hermanos (Fig. 36D y F, respectivamente), en vez de redistribuirse a los cinetocoros como hemos observado en metafases-II de individuos WT (Fig. 36C y E, respectivamente) en sintonía con lo descrito con anterioridad (Gomez *et al.*, 2007).

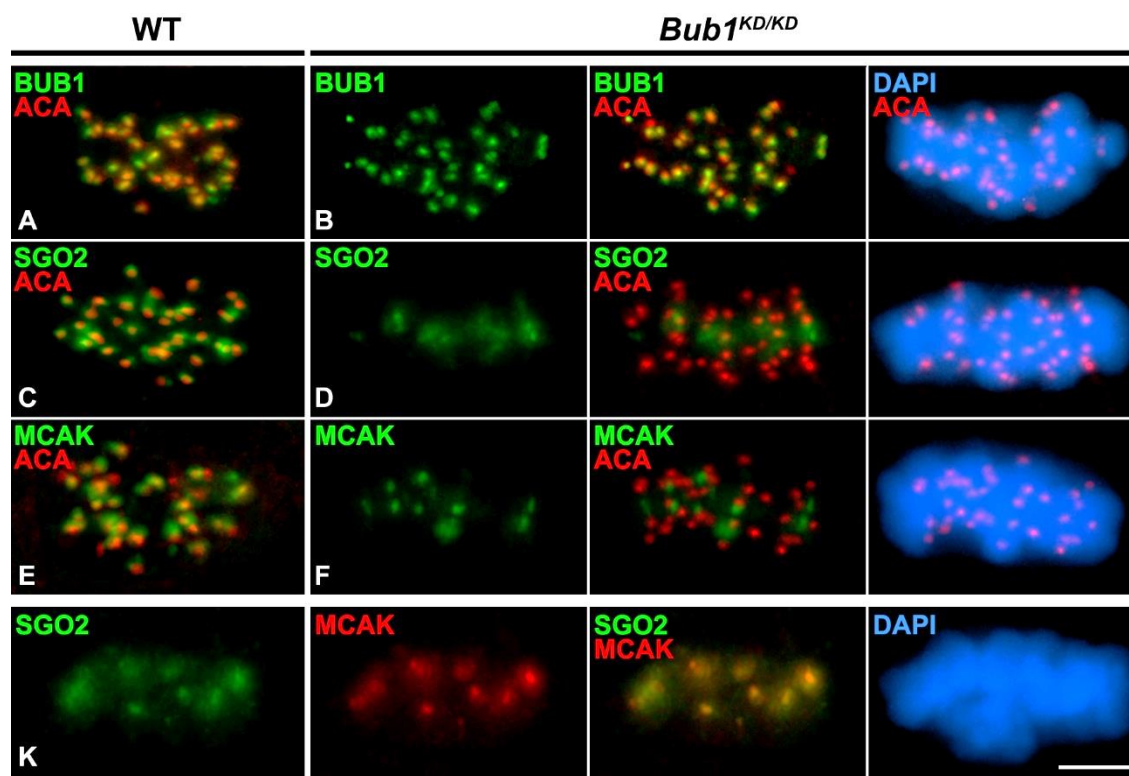


Figura 36. En ausencia de la actividad quinasa de BUB1, las proteínas SGO2 y MCAK muestran alterada su distribución en los centrómeros en metafase-II. Dobles inmunolocalizaciones de BUB1, SGO2 y MCAK (verde) con los cinetocoros (ACA, rojo) o MCAK (rojo) en metafases-II procedentes de aplastados de túbulos seminíferos de ratón WT (A, C y E) y *Bub1*^{KD/KD} (B, D, F, y K). La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A y B) Doble detección de BUB1 y ACA en metafases-II WT (A) y *Bub1*^{KD/KD} (B). (C y D) Doble detección de SGO2 y ACA en metafases-II *Bub1*^{KD/KD} (C) y WT (D). (E y F) Doble detección de MCAK y ACA en metafases-II WT (E) y *Bub1*^{KD/KD} (F). (K) Colocalización de SGO2 y MCAK en una metafase-II *Bub1*^{KD/KD}. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. La barra de medida en K corresponde a 10 μ m.

Dada la importancia de SGO2 en la segregación cromosómica meiótica (Llano *et al.*, 2008), procedimos a realizar un estudio más detallado de la alteración en la distribución de SGO2 en las metafases II y del proceso de redistribución que tiene lugar en la transición prometafase-II/metafase-II de individuos *Bub1*^{KD/KD}. Se ha descrito que las proteínas SGO2, MCAK y Aurora B se redistribuyen desde el DCI para aparecer inmediatamente por debajo de cada cinetocoro hermano, de manera dependiente de la tensión (Gomez *et al.*, 2007; Tanno *et al.*, 2010). Esta tensión intercinetocórica es generada cuando los cinetocoros hermanos se unen de manera

Resultados

anfitética a los MTs, favoreciendo la correcta congregación y alineamiento en la placa ecuatorial de los cromosomas en metafase-II. Teniendo en cuenta estos datos, en primer lugar, quisimos comprobar si SGO2 y MCAK colocalizan en la misma región en los cromosomas de las metafases-II *Bub1^{KD/KD}*. Para ello, realizamos una doble detección de SGO2 y MCAK, donde pudimos observar que ambas proteínas colocalizan en el DCI de los cromosomas en las metafases-II mutantes (Fig. 36K).

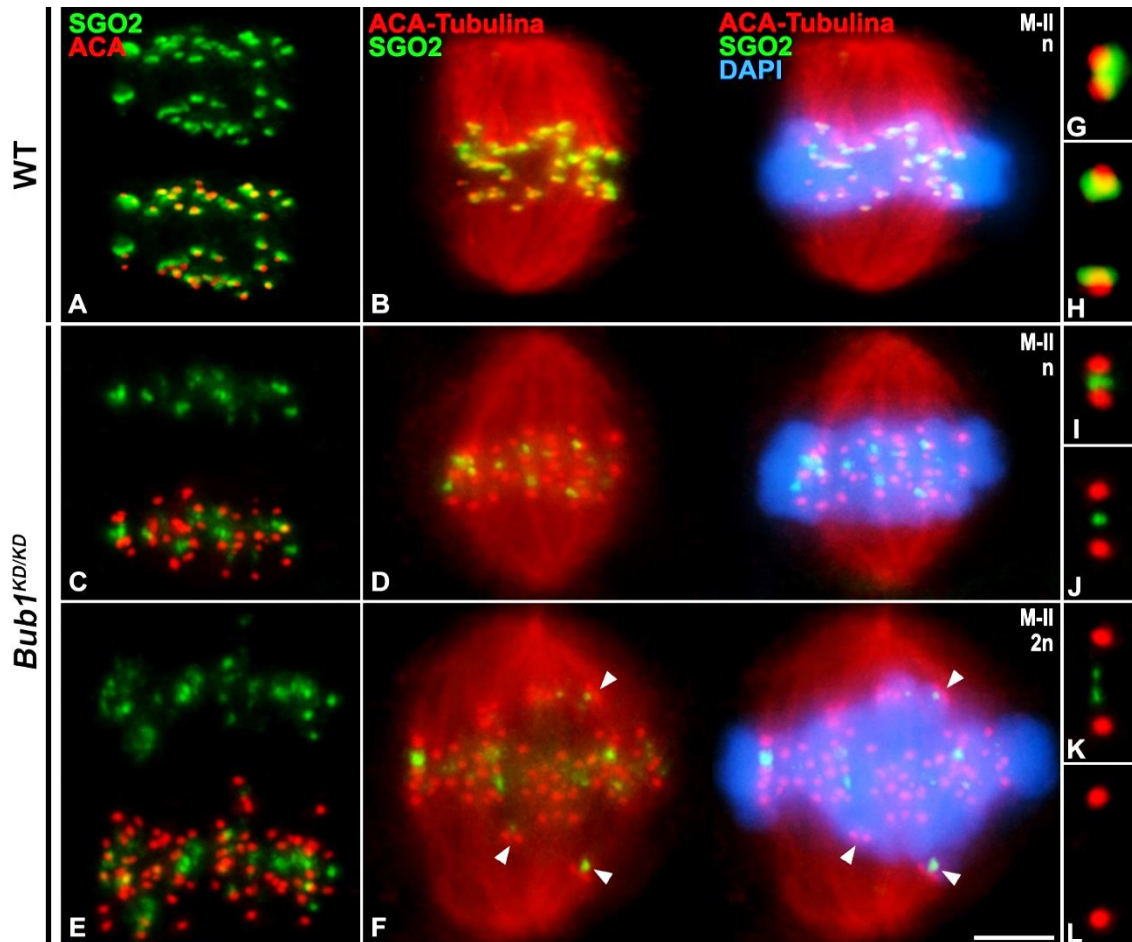


Figura 37. SGO2 no se redistribuye desde el DCI a los cinetocoros en metafase-II en ausencia de la actividad quinasa de BUB1. Dobles y triples inmunolocalizaciones de SGO2 (verde) y los cinetocoros (ACA, rojo) o α -Tubulina y los cinetocoros (ambas en rojo) en metafases-II procedentes de aplastados de túbulos seminíferos de ratón WT (A, B, G y H) y *Bub1^{KD/KD}* (C-F, e I-L). La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A-D) Metafases-II haploides. (E y F) Metafases-II diploides. (G-L) Detalles a mayor aumento de los centrómeros de los cromosomas en diferentes estadios de separación por tensión. Centrómeros WT sin tensión (G) y con tensión (H). Centrómeros *Bub1^{KD/KD}* sin tensión (I) y con tensión (J-L). Las puntas de flecha blancas señalan cromosomas desalineados. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. La barra de medida en F corresponde a 10 μ m.

A continuación, mediante una triple inmunodetección de SGO2, los cinetocoros y el huso, analizamos la dinámica de SGO2 en base a la tensión de los cinetocoros en las metafases-II de individuos WT (Fig. 37A, B) y *Bub1^{KD/KD}*, en este último caso tanto haploides (Fig. 37C, D) como diploides (Fig. 37E-F). Los resultados mostraron que en los centrómeros de cromosomas en metafase-II *Bub1^{KD/KD}* cuyos cinetocoros no están sometidos a tensión, la proteína SGO2 aparece en el DCI (Fig. 37I), siendo la cantidad de proteína inferior a la observada en el DCI de los cromosomas WT tampoco sometidos a tensión en metafase-II (Fig. 37G). Una vez los dos cinetocoros hermanos están anclados a MTs y a medida que aumenta la tensión, la distancia entre los cinetocoros hermanos aumenta y, en los cromosomas WT, la señal de SGO2 se redistribuye en dos pares de puntos, un par por cromátida, por debajo de cada cinetocoro (Fig. 37G, H). No obstante, en el caso de los cromosomas *Bub1^{KD/KD}*, y aun estando los cinetocoros anclados a MTs, asumiendo que presentan por tanto tensión en el centrómero, y mostrando sus cinetocoros hermanos bien separados, SGO2 permanece en el DCI hasta que termina por desaparecer, pero en ningún caso se redistribuye por debajo de los cinetocoros hermanos como en WT (Fig. 37I-L).

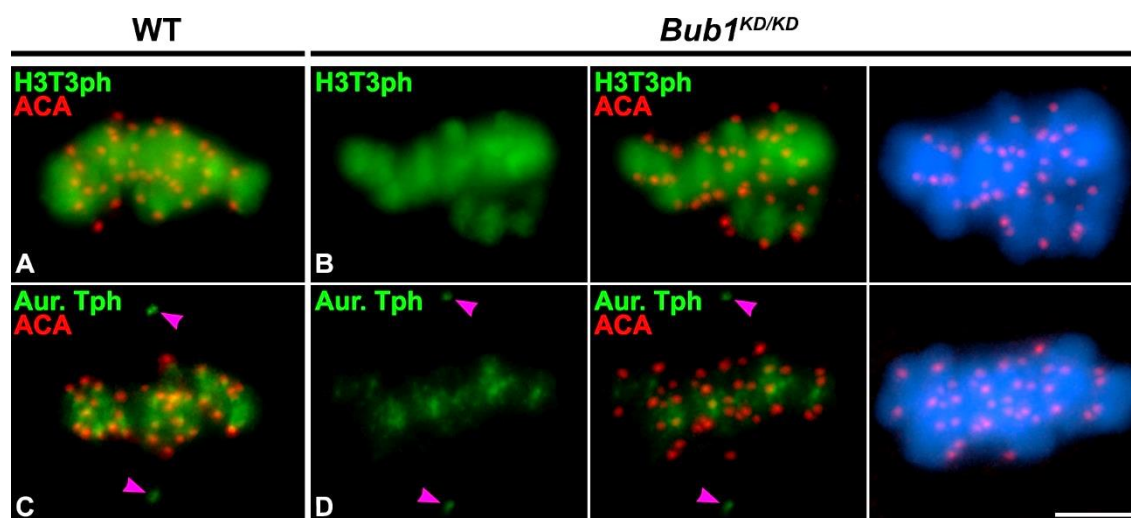


Figura 38. En ausencia de la actividad quinasa de BUB1, las proteínas SGO2 y MCAK muestran alterada su distribución en los centrómeros en metafase-II. Dobles inmunolocalizaciones de H3T3ph y Aurora Tph (verde) con los cinetocoros (ACA, rojo) en metafases-II procedentes de aplastados de túbulos seminíferos de ratón WT (A, y C) y *Bub1^{KD/KD}* (B y D). La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A y B) Doble detección de H3T3ph y ACA en metafases-II WT (A) y *Bub1^{KD/KD}* (B). (C y D) Doble detección de Aurora Tph y ACA en metafases-II *Bub1^{KD/KD}* (C) y WT (D). Las puntas de flecha rosas indican los polos celulares. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. La barra de medida en D corresponde a 10 μ m.

Por otro lado, en las metafases-II *Bub1^{KD/KD}*, la variante H3T3ph se mantiene en el DCI de los cromosomas, de la misma manera que en individuos WT (Fig. 38A, B). Sin embargo, a pesar de que la distribución de H3T3ph no está alterada, el patrón de localización de Aurora B/C muestra el mismo problema de redistribución que las proteínas SGO2 y MCAK. Aurora B/C permanece en el DCI de los cromosomas (Fig. 38D), en vez de redistribuirse en dos señales, una por cada cromátida hermana, quedando por debajo de los cinetocoros, como ocurre en WT (Fig. 38C). Por el contrario, Aurora A, no presenta ningún tipo de alteración en estos mutantes en comparación con los individuos WT (Fig. 38C, D).

3.1.6. Producción de espermátidas aberrantes en machos *Bub1^{KD/KD}*

Teniendo en cuenta que los machos *Bub1^{KD/KD}* tienen problemas de fertilidad, para finalizar nuestro estudio de la meiosis masculina, procedimos a analizar la producción de espermátidas redondas en estos mutantes.

En primer lugar, llevamos a cabo un análisis cualitativo basándonos en la observación del tamaño de las espermátidas redondas teñidas con DAPI, junto con diferentes marcadores que nos permitieran conocer el número de cromosomas que contiene cada espermátida, como son el conteo estimado de los cinetocoros en los cromocentros mediante la técnica de aplastado (Fig. 39aA), y el conteo de los telómeros mediante la técnica de FISH en preparaciones de esparcido (Fig. 39aB). En base a la primera metodología, distinguimos espermátidas de diferentes tamaños, siendo las más recurrentes las que presentaban un tamaño doble y un mayor número de cromocentros donde se concentran las señales cinetocóricas (Fig. 39aA). Mediante la técnica de FISH verificamos asimismo la existencia de espermátidas con carga cromosómica aberrante (Fig. 39aB). Dado que, en concreto las espermátidas cuádruples, presentan características similares a las intercinesis por tamaño y número cromosómico, realizamos un segundo análisis con α -Tubulina y marcadores de la espermiogénesis. Con la técnica de aplastado, marcamos por inmunodetección los MTs, los cuales forman una estructura dinámica alrededor del núcleo de la espermátida denominada *manchette* que facilita los cambios morfológicos que sufren estas células durante la espermiogénesis hasta formar el espermatozoide (Kierszenbaum y Tres, 2004; O'Donnell y O'Bryan, 2014; Lehti y Sironen, 2016) (Fig. 39aC). Por otro lado, en secciones histológicas de testículo procedimos a la tinción de la vesícula acrosómica, estructura característica de las espermátidas que contiene enzimas

hidrolíticas fundamentales para que el espermatozoide pueda fecundar al óvulo (Berruti, 2016; Flechon, 2016; Ito y Toshimori, 2016). En estas secciones de testículo observamos que las espermatidas dobles, a pesar de ser de mayor tamaño, presentaban una única vesícula acrosómica (Fig. 40). Con la combinación de los resultados de estos experimentos, corroboramos la presencia de espermatidas de diferentes tamaños, las cuales clasificamos en cuatro grupos: normales, dobles, cuádruples y microespermatidas.

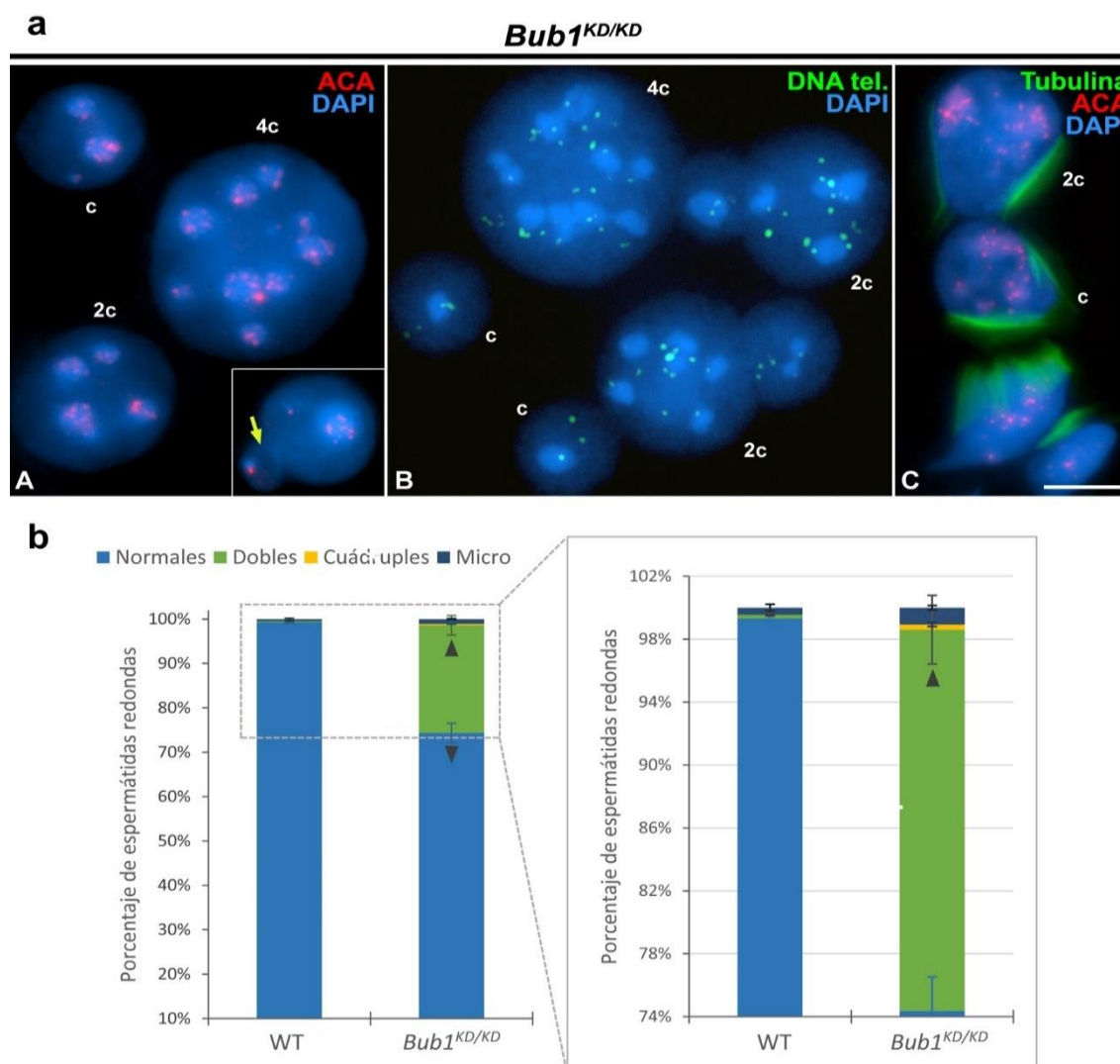


Figura 39. Los individuos macho *Bub1^{KD/KD}* producen un 25% de espermatidas aberrantes. a) Inmunolocalización de los cinetocoros (ACA, rojo), doble inmunolocalización de α -Tubulina (verde) y los cinetocoros (rojo), e hibridación *in situ* de las secuencias teloméricas (DNA tel., verde) en espermatidas procedentes de aplastados de túbulos seminíferos de ratón *Bub1^{KD/KD}*. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A) Detección de los cinetocoros en espermatidas redondas de tamaño normal (c), doble (2c) y cuádruple (4c). (B) Secuencias teloméricas en espermatidas redondas de tamaño normal (c), doble (2c) y cuádruple (4c). (C) Doble detección de los cinetocoros y α -Tubulina en espermatidas en diferentes estadios de la espermiogénesis. La flecha amarilla en la incrustación en A señala una microespermatida. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. La barra de medida en C corresponde a 10 μ m. b) Representación gráfica de los valores medios ($M \pm DEM$) obtenidos en los recuentos celulares. (\blacktriangle) Incrementos y (\blacktriangledown) descensos significativos con respecto al control WT ($p \leq 0,05$).

Resultados

Las espermátidas normales son aquellas que resultan tras el transcurso de las dos divisiones meióticas de forma normal, presentando la mitad de material genético (n , C) (20 cromátidas) que la célula original ($2n$, $4C$). Por otro lado, las espermátidas dobles constan del doble de material genético ($2C$) (40 cromátidas), que las espermátidas normales. Estas espermátidas dobles pueden ser tanto haploides (20 cromosomas, con dos cromátidas cada uno) como diploides (40 cromosomas, con una única cromátida cada uno). Las espermátidas cuádruples presentan la misma cantidad de material genético que la célula original ($2n$, $4C$), es decir, constan de 40 cromosomas con dos cromátidas cada uno. Por último, las microespermátidas son aquellas cuyo número de cromosoma es inferior a “ n ”, siendo lo común entre 1 y 3 cromosomas.

Una vez clasificadas, procedimos a analizar cuantitativamente el tipo de espermátidas de estos mutantes para comparar con las encontradas en individuos WT. Como resultado obtuvimos que alrededor de un 24% de las espermátidas redondas generadas en los mutantes *Bub1^{KD/KD}* tienen un tamaño doble. Estas espermátidas dobles (n , $2c$) pueden ser generadas a partir de errores en la segregación de la segunda división meiótica (Fig. 39b).

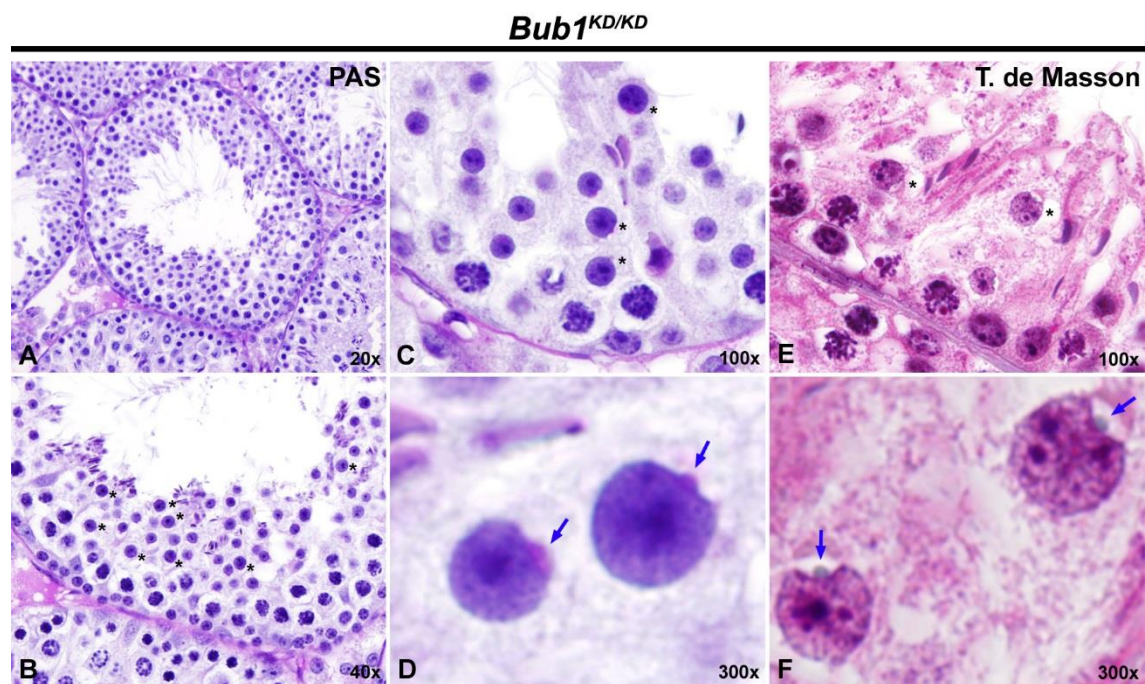


Figura 40. Los individuos macho *Bub1^{KD/KD}* producen espermátidas normales y aberrantes. Secciones histológicas de testículo de ratón *Bub1^{KD/KD}* teñidas con las técnicas PAS (A-D) y tricrómico de Masson (E y F) a diferentes aumentos donde se pueden observar próximas a la luz de los túbulos seminíferos espermátidas redondas de diferentes tamaños. Los asteriscos negros en C y E indican espermátidas redondas de tamaño doble ($2c$). Las flechas azules en D y F señalan las vesículas acrosómicas, las cuales contienen el gránulo acrosómico teñido de rosa (D) y verde azulado (F).

3.1.7. Fenotipo meiótico de los oocitos *Bub1*^{KD/KD}

La diferencia fenotípica en cuanto a la fertilidad en los ratones *Bub1*^{KD/KD} resulta de gran interés científico, ya que presenta indicios de diferencias en la regulación del proceso meiótico entre machos y hembras. De este modo, decidimos estudiar la meiosis también en oocitos *Bub1*^{KD/KD} en colaboración con el grupo de la Dra. Katja Wassmann. Estos resultados se obtuvieron en el laboratorio de la Dra. Wassmann en el IBPS (París), durante dos estancias de investigación (con duración total de 5 meses), y se han utilizado como parte de una publicación que se encuentra en revisión en la revista *Nature Communication* en el momento de depósito de esta Tesis Doctoral (en revisión, El Yakoubi *et al.*, 2017).

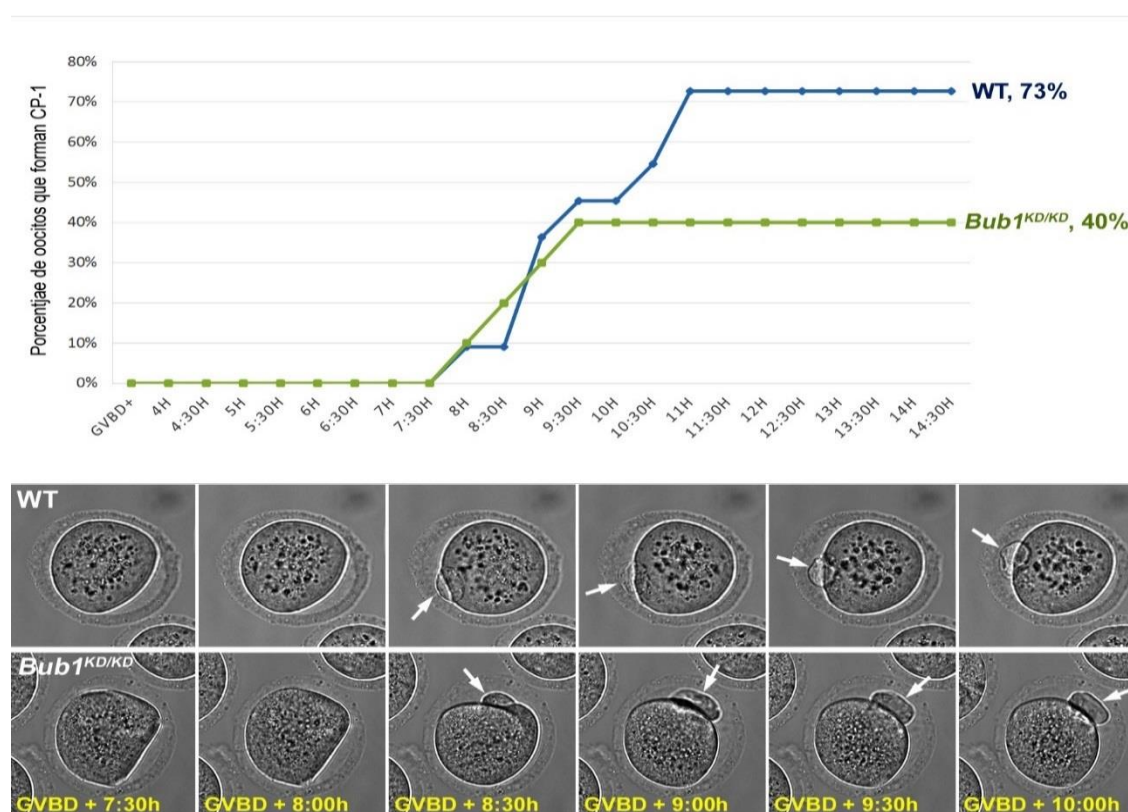


Figura 41. La actividad quinasa de BUB1 parece estar implicada parcialmente en el SAC de oocitos de ratón.

(A) Representación gráfica del porcentaje de oocitos WT y *Bub1*^{KD/KD} que forman el primer corpúsculo polar (CP-1) respecto al tiempo que tardan en formarlo a partir de GVBD + 4 horas. Oocitos *Bub1*^{KD/KD} (n=11) y oocitos WT (n=10). (B) Imágenes de oocitos en división capturadas a diferentes tiempos en contraste de fase. Las flechas blancas señalan los CP-1. La barra de medida corresponde a 20 μ m.

➤ Alteración del SAC y la cohesión en oocitos *Bub1*^{KD/KD}

Comenzamos con un análisis sobre el estado del SAC en estos mutantes. Para ello se evaluó el tiempo que tardan los oocitos *Bub1*^{KD/KD} en dividirse, teniendo en cuenta que la primera segregación meiótica en oocitos de ratón tiene lugar a partir de las 7,5 horas tras GVDB en

cultivo. Basándonos en el tiempo de formación del primer corpúsculo polar (CP-1), comprobamos que los oocitos *Bub1^{KD/KD}* forman el CP-1 entre las 7,5 y 8,5 horas, de la misma manera que los oocitos WT. Sin embargo, la tasa de división de los oocitos *Bub1^{KD/KD}* se reduce drásticamente a la mitad. Este bloqueo de los oocitos *Bub1^{KD/KD}* en metafase-I parece indicar que la actividad quinasa de BUB1 está implicada parcialmente en el SAC, siendo solo la mitad de los oocitos *Bub1^{KD/KD}* capaces de llevar a cabo la transición (Fig. 41).

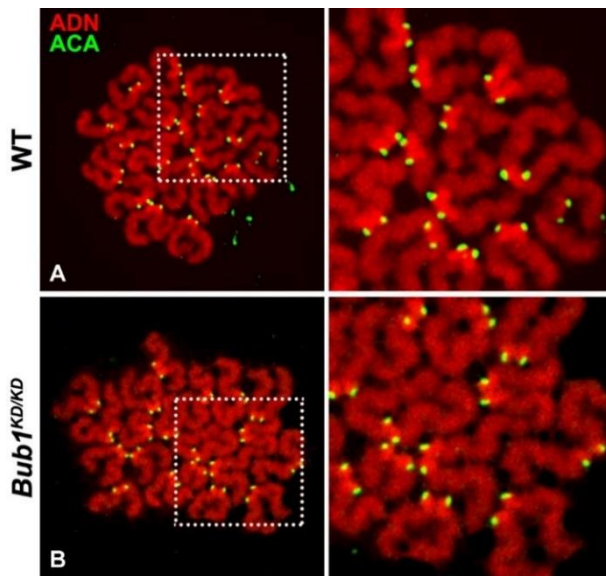


Figura 42. La actividad quinasa de BUB1 parece no ser relevante para la cohesión entre cromátidas hermanas de oocitos de ratón. Inmunodetección de los cinetocoros (verde) en oocitos esparcidos en metafase-II WT (A) y *Bub1^{KD/KD}* (B). La cromatina se ha teñido con yoduro de propidio (ADN). Oocitos WT (n=24) y oocitos *Bub1^{KD/KD}* (n=41). La barra de medida en B corresponde a 10 μ m. Figura extraída de El Yakoubi *et al.*, 2017 en preparación.

A continuación, quisimos comprobar si en ausencia de la actividad quinasa de BUB1 en oocitos se producía la separación prematura de las cromátidas hermanas en metafases-II. Mediante esparcidos de oocitos en metafase-II tardía (GVDB + 18h) corroboramos que las metafases-II de oocitos *Bub1^{KD/KD}* no presentaban problemas de cohesión, pues nunca aparecen cromátidas individualizadas (Fig. 42). Estos resultados sugieren que la actividad quinasa de BUB1 en oocitos no es necesaria para el mantenimiento de la cohesión entre las cromátidas hermanas.

➤ **Distribución de las proteínas H2AT120ph, SGO2 y Aurora B/C en oocitos *Bub1^{KD/KD}* en metafase-I**

A continuación, estudiamos la distribución en los oocitos de H2AT120ph, SGO2 y Aurora B/C mediante inmunodetecciones indirectas. En primer lugar, observamos que en los esparcidos de metafases-I *Bub1^{KD/KD}* no hay señal de H2AT120ph (Fig. 43A, B), del mismo modo que ocurría en espermatoцитos mutantes. Por el contrario, la proteína SGO2 no presenta alteración en su patrón de distribución, como ocurría en espermatoцитos, si bien mediante un análisis cuantitativo observamos una reducción significativa de alrededor de un 50% de la proteína

acumulada a nivel del centrómero (Fig. 43C, D). Al contrario de lo observado en machos, en oocitos *Bub1*^{KD/KD} no se han observado alteraciones en la localización de Aurora B/C, ni parece haber una reducción significativa en la cantidad de proteína acumulada en el centrómero (Fig. 43E, F). En conjunto, estos resultados parecen indicar diferencias en la relación entre las dos vías de señalización del DCI entre machos y hembras.

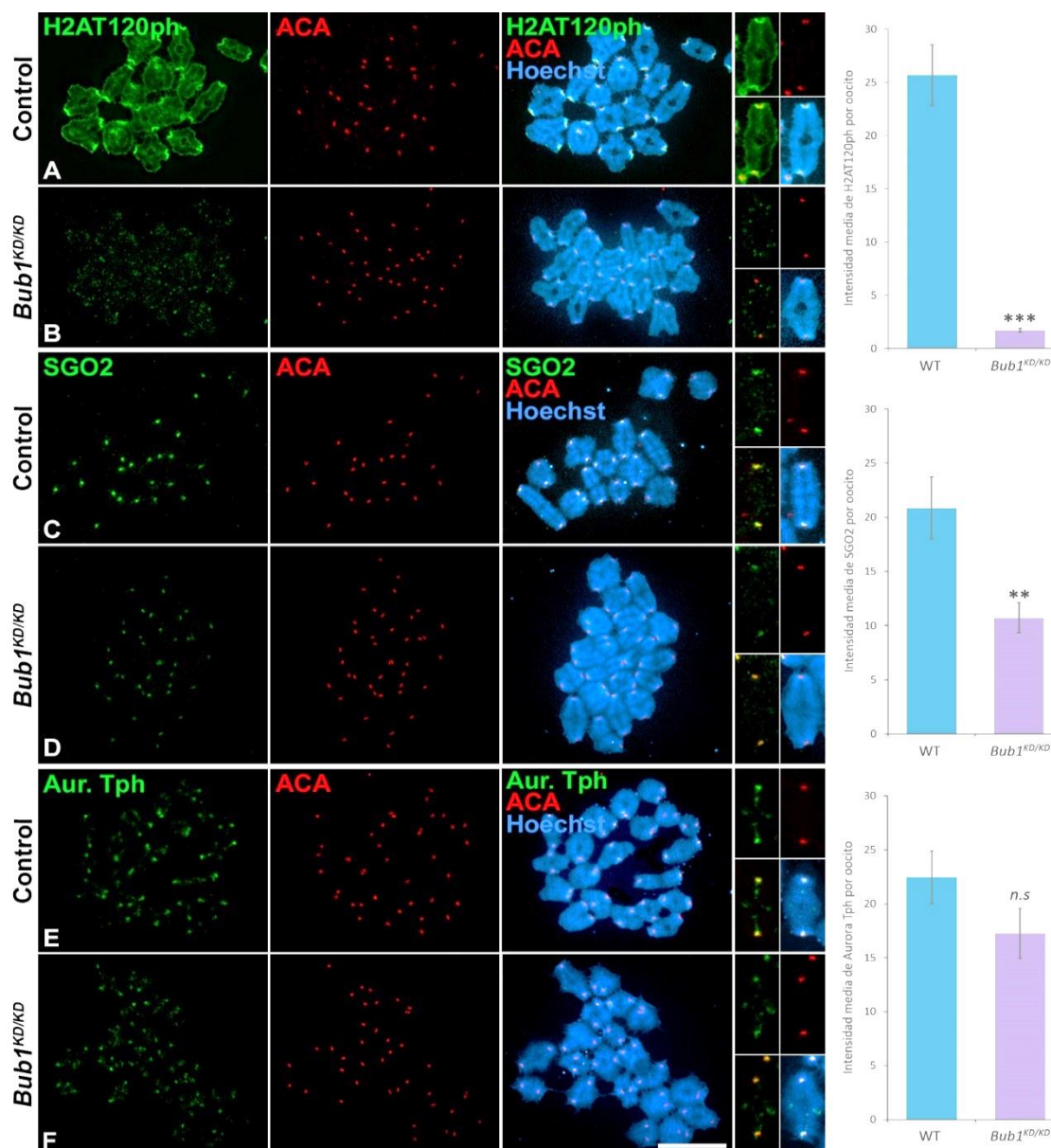


Figura 43. La ausencia de la actividad quinasa de BUB1 afecta parcialmente al reclutamiento de SGO2 al centrómero en metafase-I de oocitos. Dobles inmunolocalizaciones de H2AT120ph, SGO2 y Aurora Tph (verde) con los cinetocoros (ACA, rojo) en oocitos esparcidos de ratón WT y *Bub1*^{KD/KD} en metafase-I. La cromatina se ha teñido con Hoechst (azul). (A y B) Doble detección de H2AT120ph y cinetocoros en metafases-I WT (A) y *Bub1*^{KD/KD} (B). (C y D) Doble detección de SGO2 y cinetocoros en metafases-I WT (C) y *Bub1*^{KD/KD} (D). (E y F) Doble detección de Aurora Tph y cinetocoros en metafases-I WT (E) y *Bub1*^{KD/KD} (F). La barra de medida en F corresponde a 10 μ m. Las representaciones gráficas indican los valores medios por oocito de la intensidad de la señal centromérica de cada una de las proteínas con respecto a la intensidad de los cinetocoros. El número de oocitos analizados para cada experimento es superior a 10. ** ($p \leq 0,01$) *** ($p \leq 0,005$) Diferencias significativas y (n.s) no significativas con respecto al control WT.

4. Análisis del efecto de la inhibición de la quinasa Haspina en la meiosis de ratón

En mitosis la quinasa Haspina ha sido descrita como la responsable del reclutamiento del CPC al DCI mediante la fosforilación de la H3T3ph en este dominio (Higgins, 2010; Wang *et al.*, 2010). En células somáticas su interferencia provoca alteraciones en el alineamiento de los cromosomas (Dai *et al.*, 2005) y pérdida prematura de la cohesión entre cromátidas hermanas (Dai *et al.*, 2006; Dai *et al.*, 2009), hecho que parece relacionar esta quinasa con la protección de la cohesión centromérica en mitosis y, por tanto, con SGO1. La localización de Haspina ha sido observada tanto en células mitóticas (Dai *et al.*, 2005) como en oocitos de ratón (Nguyen *et al.*, 2014) acoplada a GFP, siendo su distribución difusa y poco específica. Recientemente, en oocitos de ratón se ha descrito la inmunolocalización de esta quinasa, de nuevo, en cromosomas condensados de manera difusa durante la meiosis-I (Wang *et al.*, 2016). En meiosis, se ha sugerido su implicación en el alineamiento de los bivalentes mediante la localización del CPC, en el proceso de condensación de la cromatina durante la meiosis-I de oocitos de ratón (Nguyen *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016) y en el proceso de citocinesis (Wang *et al.*, 2016). También en oocitos de ratón se ha propuesto recientemente la implicación de Haspina en la regulación de los centros organizadores de microtúbulos (MTOCs, del inglés *Microtubule-Organizing Centers*) mediando la localización de la Aurora C en dichas estructuras (Balboula *et al.*, 2016). Dada la escasa información sobre las funciones de Haspina en la meiosis femenina de mamíferos, y la ausencia total de publicaciones en relación a la meiosis en los machos, procedimos al estudio funcional de la actividad de Haspina en espermatocitos de ratón WT. Posteriormente, se procedió al estudio de la interacción de las dos vías de reclutamiento centroméricas abordadas en esta Tesis Doctoral mediante la inhibición de la quinasa Haspina en espermatocitos de ratones *Bub1^{KD/KD}*.

4.1. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN QUÍMICA DE LA ACTIVIDAD QUINASA DE HASPINA EN ESPERMATOCITOS WT

Para el estudio del efecto de la inhibición de la actividad quinasa de Haspina en la meiosis de ratón se realizó una inhibición química sobre cultivos de túbulos seminíferos de animales WT mediante el compuesto químico denominado LDN-192960, el cual ha sido previamente testado

en células somáticas (Wang *et al.*, 2012). La eficacia del inhibidor fue testada mediante la observación por inmunodetección de la principal diana de Haspina, la variante H3T3ph.

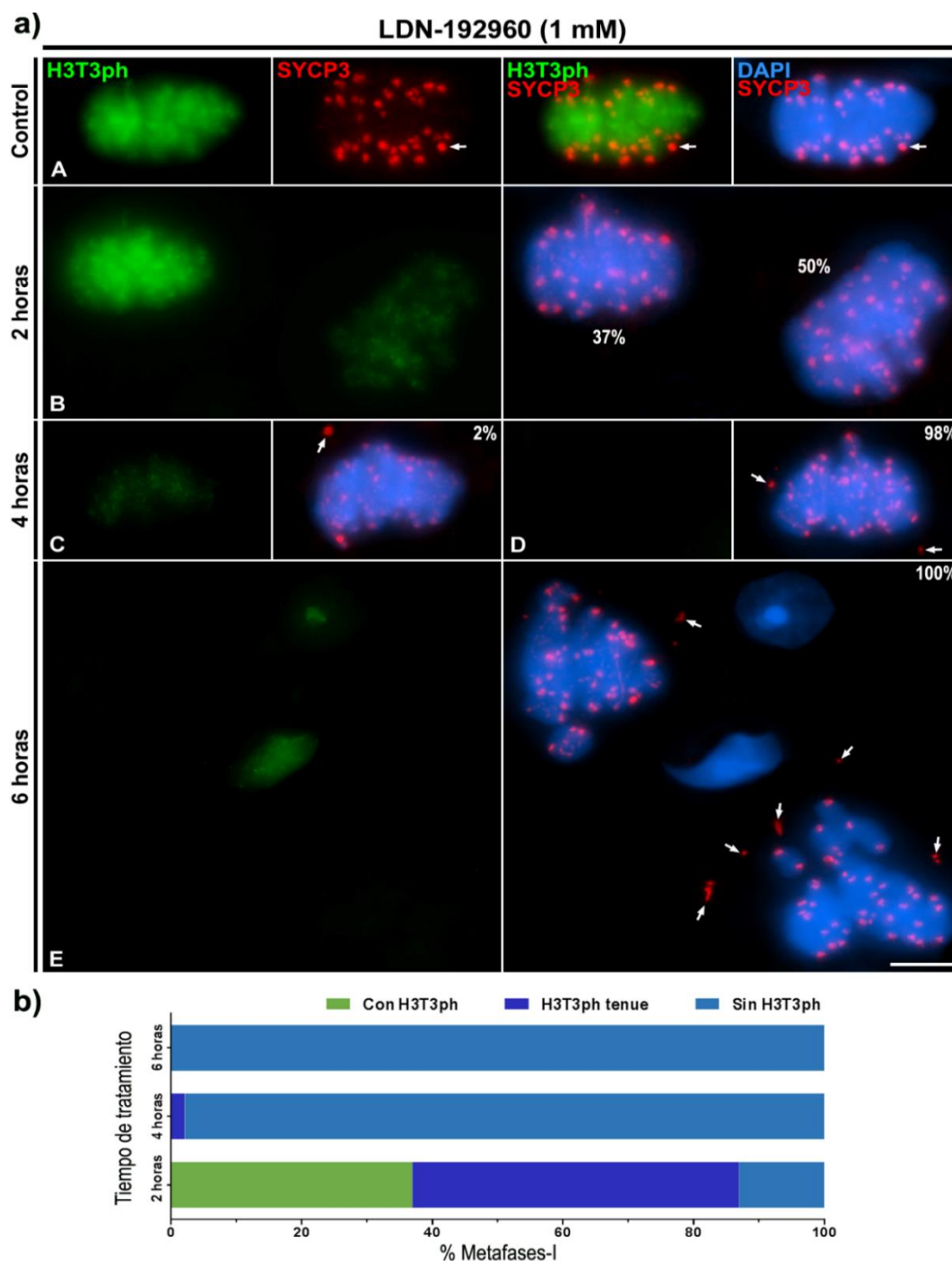


Figura 44. El inhibidor LDN-192960 alcanza su máxima eficacia a una concentración de 1 mM tras 6 horas de tratamiento. a) Doble inmunolocalización de H3T3ph (verde) y SYCP3 (rojo) en metafases-I procedentes de aplastados de túbulos seminíferos de ratón WT en cultivo tratados con LDN-192960 a diferentes tiempos de tratamiento. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). **(A)** Metafase-I control. **(B-E)** Metafases-I tratadas con LDN tras 2 horas **(B)**, 4 horas **(C y D)**, y 6 horas **(E)** de tratamiento. Los porcentajes de metafases-I con distintos tipos de señal de H3T3ph aparecen indicados. Las flechas blancas señalan agregados citoplásmicos de SYCP3. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. La barra de medida en **E** corresponde a 10 μ m. **b)** Representación gráfica del porcentaje de metafases-I observadas a los diferentes tiempos de tratamiento.

4.1.1. [Puesta a punto de la inhibición de Haspina con LDN-192960 en cultivos de túbulos seminíferos](#)

Para determinar la eficacia de la inhibición química de Haspina en espermatoцитos de ratón, en primer lugar ajustamos la concentración del inhibidor LDN-192960 (LDN) y la duración del tratamiento sobre el cultivo organotípico de túbulos seminíferos WT. En publicaciones previas con células somáticas de las líneas establecidas HeLa y U2OS se han empleado concentraciones de este inhibidor de 10 μM (Wang *et al.*, 2012). Dada la diferencia técnica entre el cultivo organotípico de túbulos seminíferos empleado y los cultivos somáticos, comenzamos la experimentación partiendo de una concentración de entre 70 y 100 veces más concentrada a la empleada en cultivos somáticos, es decir, entre 700 μM y 1 mM. Con estas concentraciones realizamos varias pruebas a distintos tiempos del tratamiento (2, 4 y 6 horas) sobre los cultivos de túbulos seminíferos. Como marcador de eficacia, realizamos inmunodetecciones de H3T3ph, asumiendo que en aquellas metafases-I que no muestran dicha H-PTM habrán estado expuestas al efecto del inhibidor. Como resultado, obtuvimos que la mayor eficacia del inhibidor sobre los túbulos seminíferos se obtenía a una concentración de 1 mM tras 6 horas de tratamiento (Fig. 44). Todos los datos mostrados a partir de este momento corresponden a esta concentración y tiempo optimizados.

4.1.2. [Análisis de la inhibición de Haspina en metafase-I](#)

Tras determinar la concentración y tiempo óptimos del tratamiento con LDN (1 mM, 6 horas), procedimos a estudiar el efecto de la inhibición de Haspina en la segregación cromosómica. Para ello, realizamos en primer lugar una clasificación de los tipos de metafases-I observadas sin señal de H3T3ph tras el tratamiento clasificándolas en tres categorías: alineadas, desalineadas y desorganizadas. Estas categorías se han determinado en base al alineamiento de los bivalentes y a la apariencia y distribución de nuestros marcajes de referencia SYCP3 y cinetocoros (Fig. 45). De esta manera, las **metafases-I alineadas** presentan un patrón de distribución normal de SYCP3 y cinetocoros, apreciándose una correcta biorientación de los bivalentes dispuestos en la placa ecuatorial (Fig. 45B). Las **metafases-I desalineadas** son aquellas que presentan gran parte de sus bivalentes alineados en la placa ecuatorial, quedando uno o varios bivalentes sueltos en el citoplasma (Fig. 45C). En la mayor parte de las metafases-I desalineadas SYCP3 muestra un patrón normal (Fig. 45C). Por último, las **metafases-I desorganizadas** son aquellas cuyos bivalentes están más condensados que en las

metafases-I control y no presentan ningún tipo de alineamiento cromosómico, quedando todos los bivalentes dispuestos sin ninguna organización aparente en el citoplasma (Fig. 45D). Estas metafases-I desorganizadas han perdido casi toda la señal de SYCP3 de los bivalentes quedando restringida a los centrómeros y en forma de agregados extracromosómicos redondeados o en forma de barras alargadas (Fig. 45D).

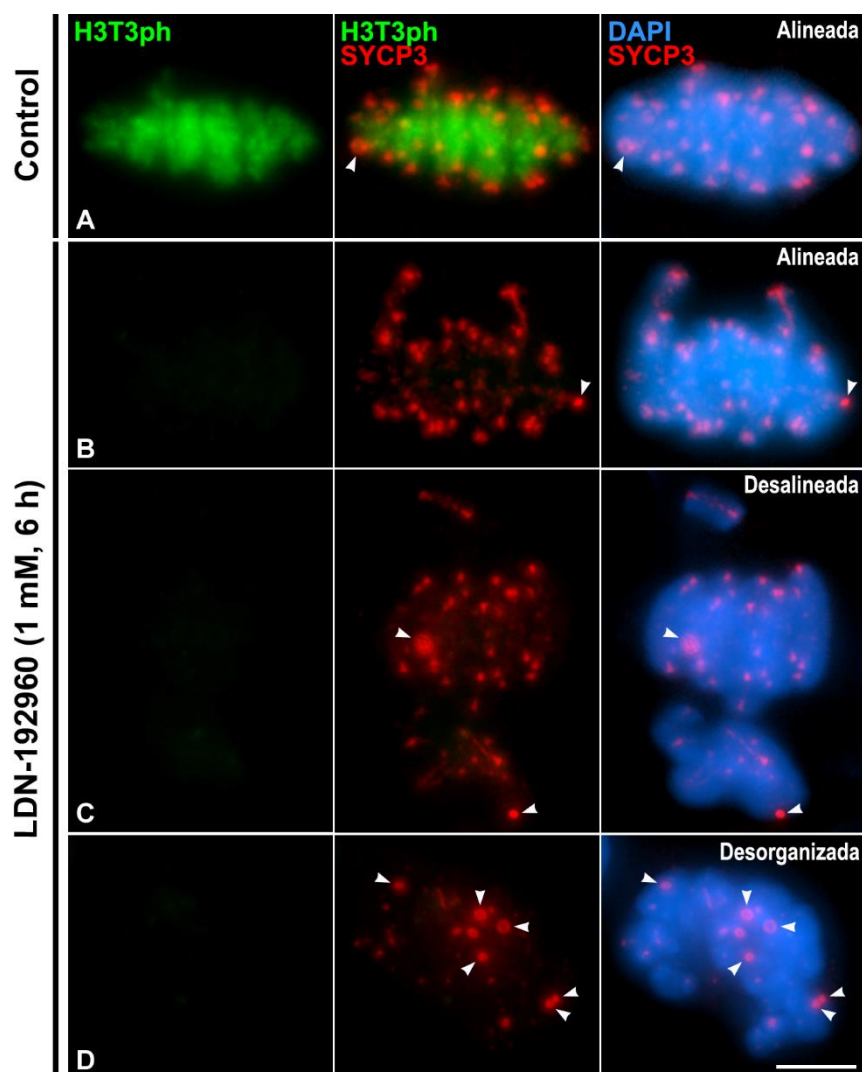


Figura 45. Tipos de metafases-I observadas tras 6 horas de tratamiento con LDN-192960 1 mM. Doble inmunolocalización de H3T3ph (verde) y SYCP3 (rojo) en metafases-I procedentes de aplastados de túbulos seminíferos de ratón WT en cultivo tratados con LDN-192960 1 mM durante 6 horas. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A) Metafase-I control. (B-D) Metafases-I alineada (B), desalineada (C) y desorganizadas (D). Las puntas de flecha blancas señalan agregados citoplásmicos de SYCP3. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. La barra de medida en D corresponde a 10 μ m.

A nivel cuantitativo, nuestros datos mostraron que en los cultivos control, la mayoría de las metafases-I se engloban dentro de la categoría de metafases-I alineadas, presentando en su mayoría una señal intensa de H3T3ph (Fig. 46). En menor proporción, se han encontrado metafases-I alineadas en los cultivos tratados con LDN, sin embargo, carecen de señal de H3T3ph. En cultivos control, un pequeño porcentaje de metafases-I no presenta marcaje de esta variante histónica (1,62%), lo cual podría deberse a problemas en la técnica de cultivo en

Resultados

la cual no llega por igual el suministro de nutrientes a todas las células de los túbulos seminíferos pudiendo estar estas células en proceso de apoptosis. En los cultivos tratados con LDN, la mayoría de las metafases-I pueden considerarse desalineadas o desorganizadas (71,01%), lo que revela una elevada tasa de errores en el alineamiento de los bivalentes en la placa ecuatorial. Entre las metafases-I desalineadas y desorganizadas, tan sólo un 3,26% presenta señal de H3T3ph, lo cual establece una directa correlación entre la ausencia de H3T3ph, y por tanto de la actividad quinasa de Haspina inhibida, y fallos en el alineamiento de los bivalentes en metafase-I. Finalmente, cabe destacar un ligero aumento de metafases-I apoptóticas en los cultivos con LDN (11,24%) con respecto al porcentaje de metafases-I apoptóticas presentes en los cultivos control (2,15%), lo cual podría deberse a la imposibilidad de resolución de los problemas de alineamiento (Fig. 46).

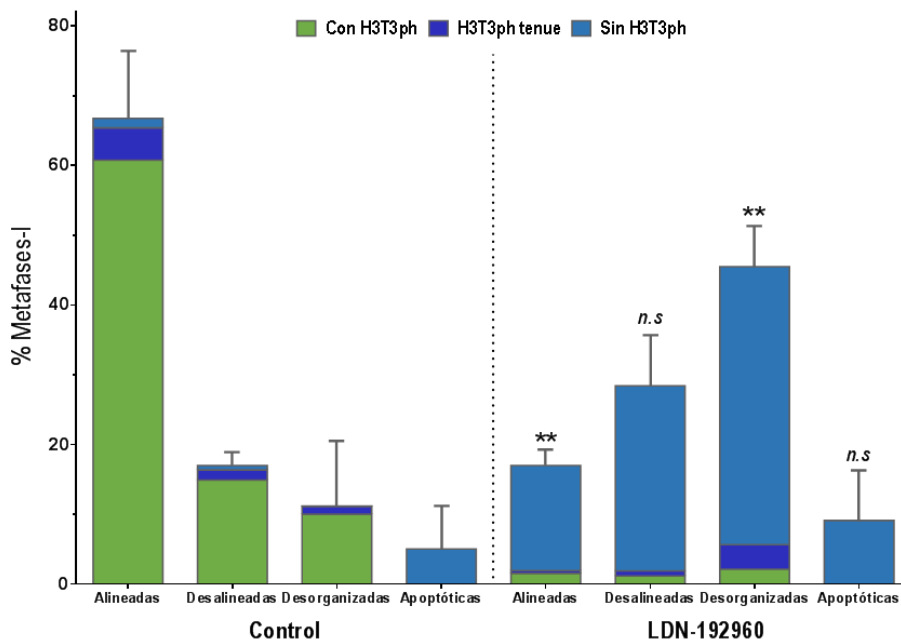


Figura 46. Representación gráfica de los tipos de metafases-I observadas tras 6 horas de tratamiento con LDN-192960 1 mM. Representación gráfica de los valores medios ($M \pm EEM$) obtenidos en los recuentos celulares. ** Diferencias significativas y (n.s) no significativas con respecto al control WT ($p \leq 0,01$).

Dado el alto grado de errores de alineamiento observados con el tratamiento con LDN y la relación de Haspina con los MTOCs descrita en oocitos (Balboula *et al.*, 2016), seguidamente procedimos a estudiar con más detenimiento los problemas de congregación y segregación cromosómica a través del análisis de la interacción de los MTs con los cinetocoros. Para ello, realizamos una doble inmunodetección marcando los husos meióticos con α -Tubulina y los

cinetocoros (Fig. 47). Los datos mostraron cómo en las metafases-I desalineadas, los bivalentes que no están dispuestos en placa no están correctamente anclados a los MTs, quedando en su mayoría unidos monotéticamente, es decir, uno de los centrómeros no está unido al huso acromático (Fig. 47B). Sin embargo, las metafases-I con más de uno o dos bivalentes desalineados presentan husos tripolares (Fig. 47C). En este tipo de metafases-I, aparentemente todos los bivalentes están correctamente unidos a los MTs, quedando dispuestos los centrómeros de manera anfitélica, siendo el problema de alineamiento debido posiblemente a la presencia de más de dos polos celulares (Fig. 47C). Por último, en el caso de las metafases-I desorganizadas todas presentan husos tripolares (Fig. 47D). Estos datos apoyarían la participación de Haspina en la dinámica de los centrosomas en la meiosis masculina de ratón.

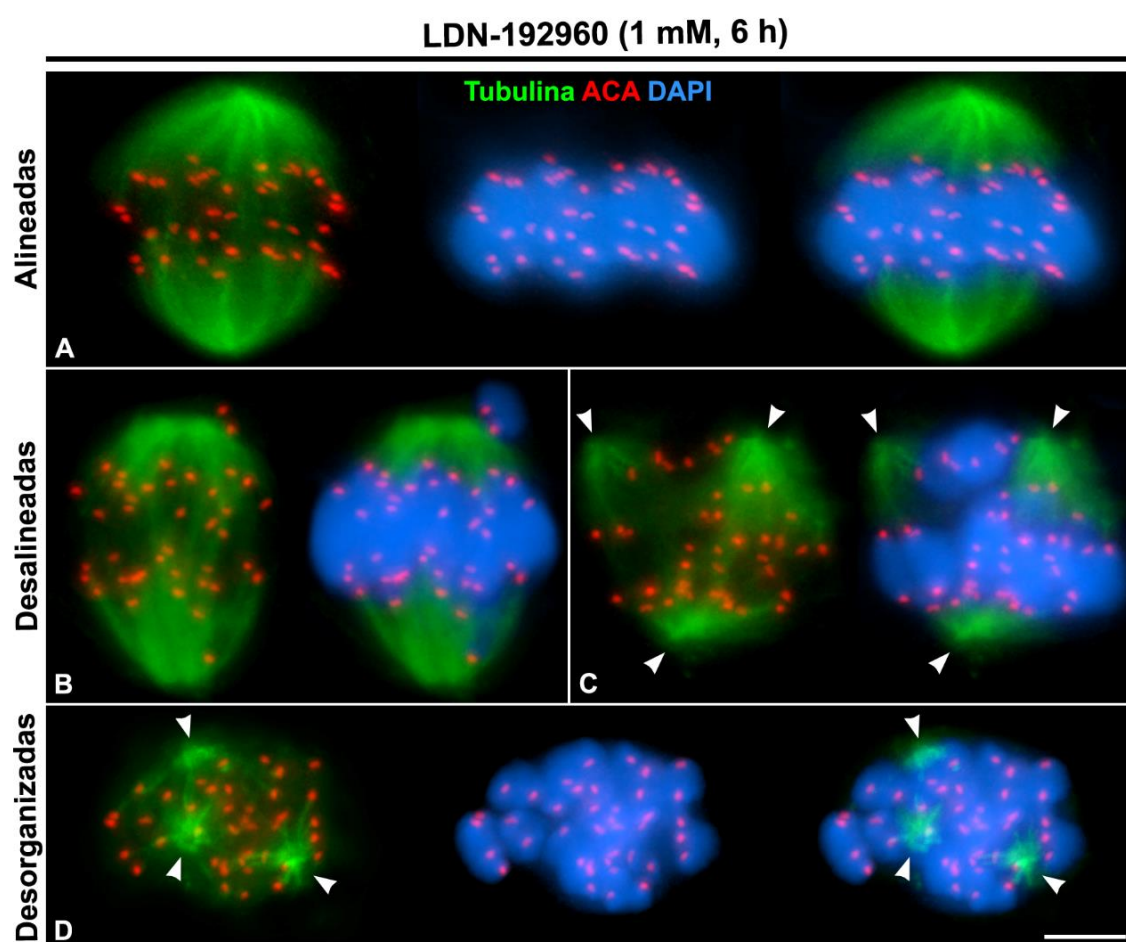


Figura 47. La inhibición de la actividad quinasa de Haspina mediante LDN provoca alteración en el número de polos celulares durante la primera división meiótica. Doble inmunolocalización de α -Tubulina (verde) y los cinetocoros (ACA, rojo) en metafases-I procedentes de aplastados de túbulos seminíferos de ratón WT en cultivo tratados con LDN-192960 1 mM durante 6 horas. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). **(A)** Metafase-I alineada. **(B y C)** Metafases-I desalineadas bipolar **(B)** y tripolar **(C)**. **(D)** Metafase-I desorganizada tripolar. Las puntas de flecha blancas señalan los polos celulares. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. La barra de medida en **D** corresponde a 10 μ m.

4.1.3. Efecto de la inhibición de Haspina sobre las proteínas del DCI en metafase-I

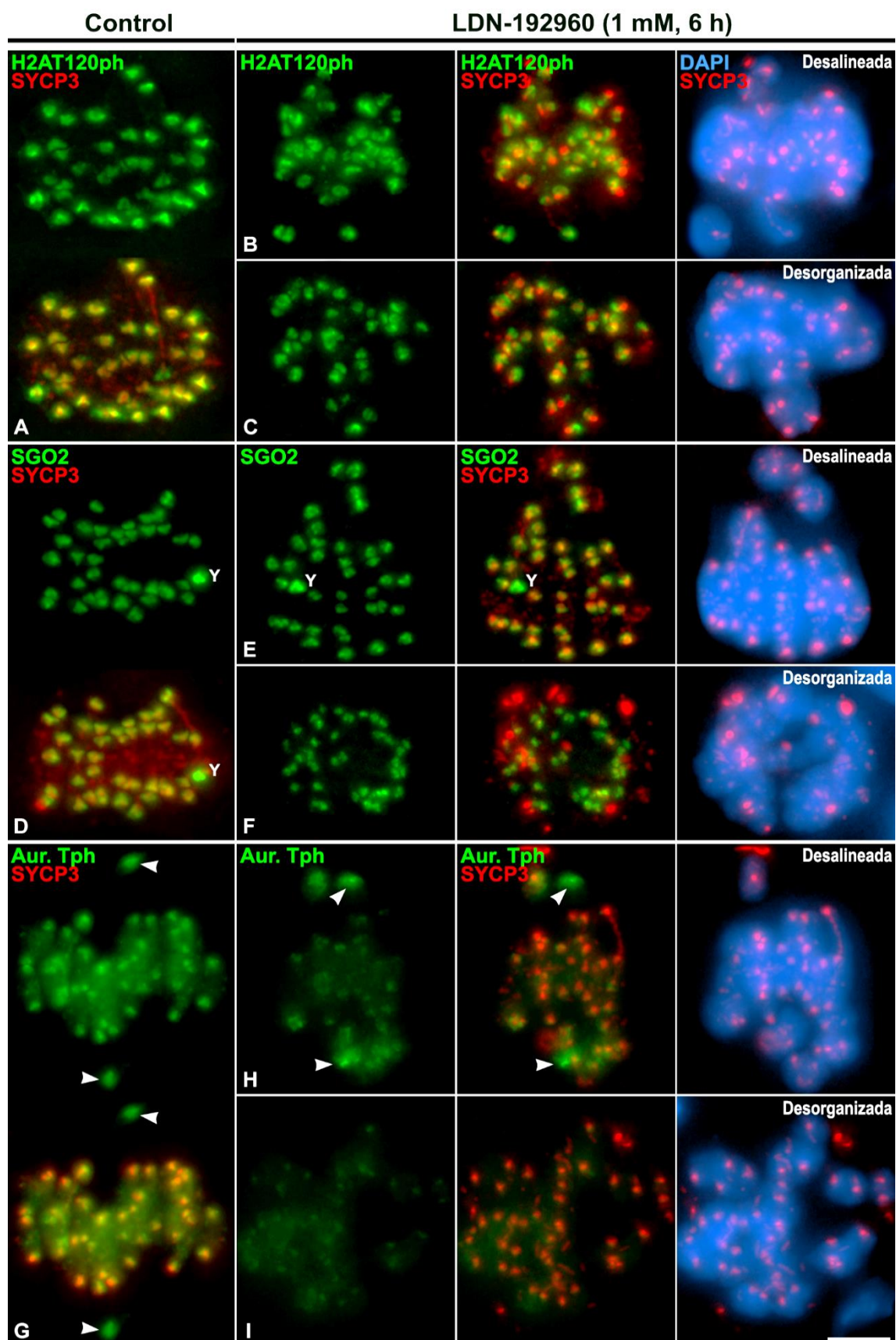
A continuación, procedimos a estudiar el efecto de la inhibición de la quinasa Haspina sobre el ensamblaje de las principales proteínas de la RCI, la variante H2AT120ph, SGO2 y Aurora B/C. Para la detección de estas últimas hemos utilizado el anticuerpo contra la forma activa de las tres Aurora quinasas (Aurora Tph), por lo que nos permite, además de a Aurora B/C, analizar la localización de Aurora A, y por tanto, indirectamente, estudiar también su dinámica de los centrosomas. Los resultados mostraron que la ausencia de H3T3ph parece alterar parcialmente el reclutamiento de Aurora B/C al DCI, mientras que H2AT120ph y SGO2 presentan un patrón aparentemente normal.

En las metafases-I de cultivos control, la variante **H2AT120ph** aparece localizada en el DCI de todos los cromosomas en forma de copa o cono colocándose con la señal centromérica en forma de "Y" de SYCP3 (Fig. 48A). Sin embargo, en las metafases-I tratadas con LDN, a pesar de presentar alteración en la distribución de SYCP3, la variante H2AT120ph presenta el mismo patrón de localización centromérica que en el control, tanto en las metafases-I desalineadas como en las desorganizadas (Fig. 48B, C).

La proteína **SGO2** también está presente en los centrómeros de todos los cromosomas en las metafases-I control, siendo más intensa su señal en el cromosoma Y, de la misma forma que H2AT120ph (Fig. 48D). En las metafases-I desalineadas y desorganizadas tratadas con LDN, puede observarse un patrón de distribución normal de SGO2 (Fig. 48E, F).

Sin embargo, en el caso de **Aurora B/C** se observó una disminución en la intensidad y amplitud de la señal presente en los centrómeros tanto en las metafases-I desalineadas como en las desorganizadas, siendo más acusada dicha disminución en este último tipo (Fig. 48G, I).

En cuanto a los centrosomas, en las metafases-I desalineadas se puede observar una señal intensa de Aurora Tph correspondiente a Aurora A, mientras que en las metafases-I desorganizadas la intensidad de la señal es mucho menor (Fig. 48H, I).



→ **Figura 48. La ausencia de actividad quinasa de Haspina provoca alteraciones en la distribución de las quinasas Aurora B/C y Aurora A fosforiladas, pero no en las de H2AT120ph y SGO2 en metafase-I.** Dobles inmunolocalizaciones de H2AT120ph, SGO2 y Aurora Tph (verde) y SYCP3 (rojo) en metafases-I procedentes de aplastados de túbulos seminíferos de ratón WT en cultivo tratados con LDN-192960 1 mM durante 6 horas. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). **(A-C)** Doble detección de H2AT120ph y SYCP3 en metafases-I control **(A)** y tratadas con LDN, desalineada **(B)** y desorganizada **(C)**. **(D-F)** Doble detección de SGO2 y SYCP3 en metafases-I control **(D)** y metafases-I tratadas con LDN, desalineada **(E)** y desorganizada **(F)**. Los centrómeros del cromosoma Y están indicados (Y). **(G-I)** Doble detección de Aurora Tph y SYCP3 en metafases-I control **(G)** y metafases-I tratadas con LDN, desalineada **(H)** y desorganizada **(I)**. Las puntas de flecha blancas en **G** y **H** señalan los polos celulares. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. La barra de medida en **I** corresponde a 10 μ m.

4.1.4. Análisis de la inhibición de Haspina en metafase-II

De la misma manera que con las metafases-I, realizamos una clasificación de los tipos de metafases-II encontradas tras el tratamiento con LDN 1 mM a 6 horas clasificándolas de nuevo en las mismas tres categorías: alineadas, desalineadas y desorganizadas (Fig. 49). En este caso, dado que SYCP3 no es detectable en metafase-II, basamos nuestra clasificación en la orientación de los cinetocoros hermanos y en la condensación y organización de los cromosomas. De este modo, las **metafases-II alineadas** muestran los cromosomas dispuestos en placa, con una condensación similar a la del control y una correcta orientación anfitélica de los cinetocoros hermanos (Fig. 49A, B). Las **metafases-II desalineadas** presentan una condensación aparentemente normal con todos los cromosomas biorientados en placa a excepción de uno o varios cromosomas que quedan sueltos (Fig. 49C). Finalmente, en las **metafases-II desorganizadas** se puede observar una mayor condensación de los cromosomas, los cuales no están correctamente alineados en placa (Fig. 49D).

A partir del análisis cuantitativo pudimos observar que alrededor del 55% de las metafases-II de los cultivos control están alineadas y presentan marcaje de H3T3ph, mientras que en los cultivos tratados con LDN tan sólo alrededor de un 20% de las metafases-II están alineadas pero, a diferencia del control, no tienen señal de esta variante histónica. De la misma manera que ocurría con las metafases-I, la mitad de las metafases-II presentan problemas de alineamiento y no tienen marcaje de H3T3ph (52,03%), por lo que parece haber de nuevo correlación entre la actividad de Haspina y el alineamiento cromosómico. También se puede observar alrededor de un 3% más de tasa de apoptosis en los cultivos tratados respecto al de los cultivos control. Este aumento podría tener lugar como consecuencia de la incapacidad de

algunas células de resolver los problemas de alineamiento observados tras la inhibición de Haspina (Fig. 50).

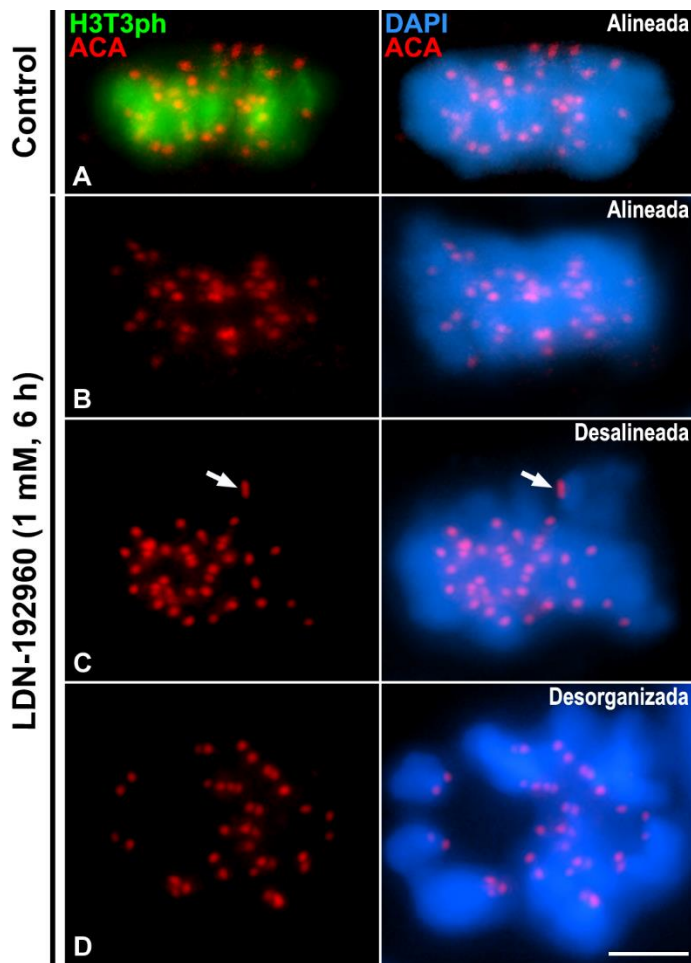


Figura 49. Tipos de metafases-II observadas tras 6 horas de tratamiento con LDN-192960 1 mM. Doble inmunolocalización de H3T3ph (verde) y los cinetocoros (ACA, rojo) en metafases-II procedentes de aplastados de túbulos seminíferos de ratón WT en cultivo tratados con LDN-192960 durante 6 horas. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A) Metafase-II control. (B) Metafase-II alineada. (C) Metafase-II desalineada. (D) Metafase-II desorganizada. Las flechas blancas en C señalan un cromosoma desalineado. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. La barra de medida en D corresponde a 10 μ m.

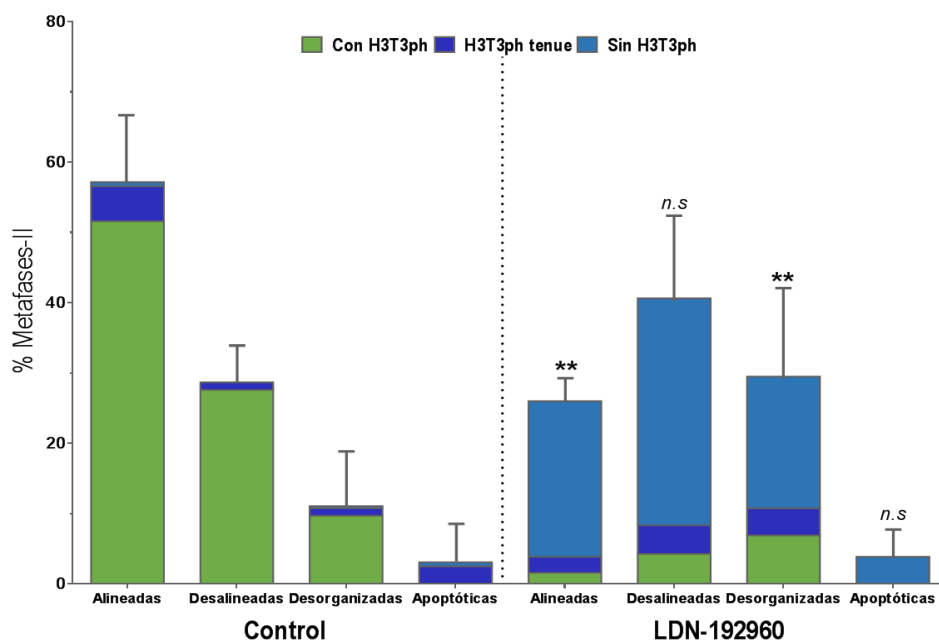


Figura 50. Representación gráfica de los tipos de metafases-II observadas tras 6 horas de tratamiento con LDN-192960 1 mM. Representación gráfica de los valores medios ($M \pm EEM$) obtenidos en los recuentos celulares. ** Diferencias significativas y (n.s) no significativas con respecto al control WT ($p \leq 0,01$).

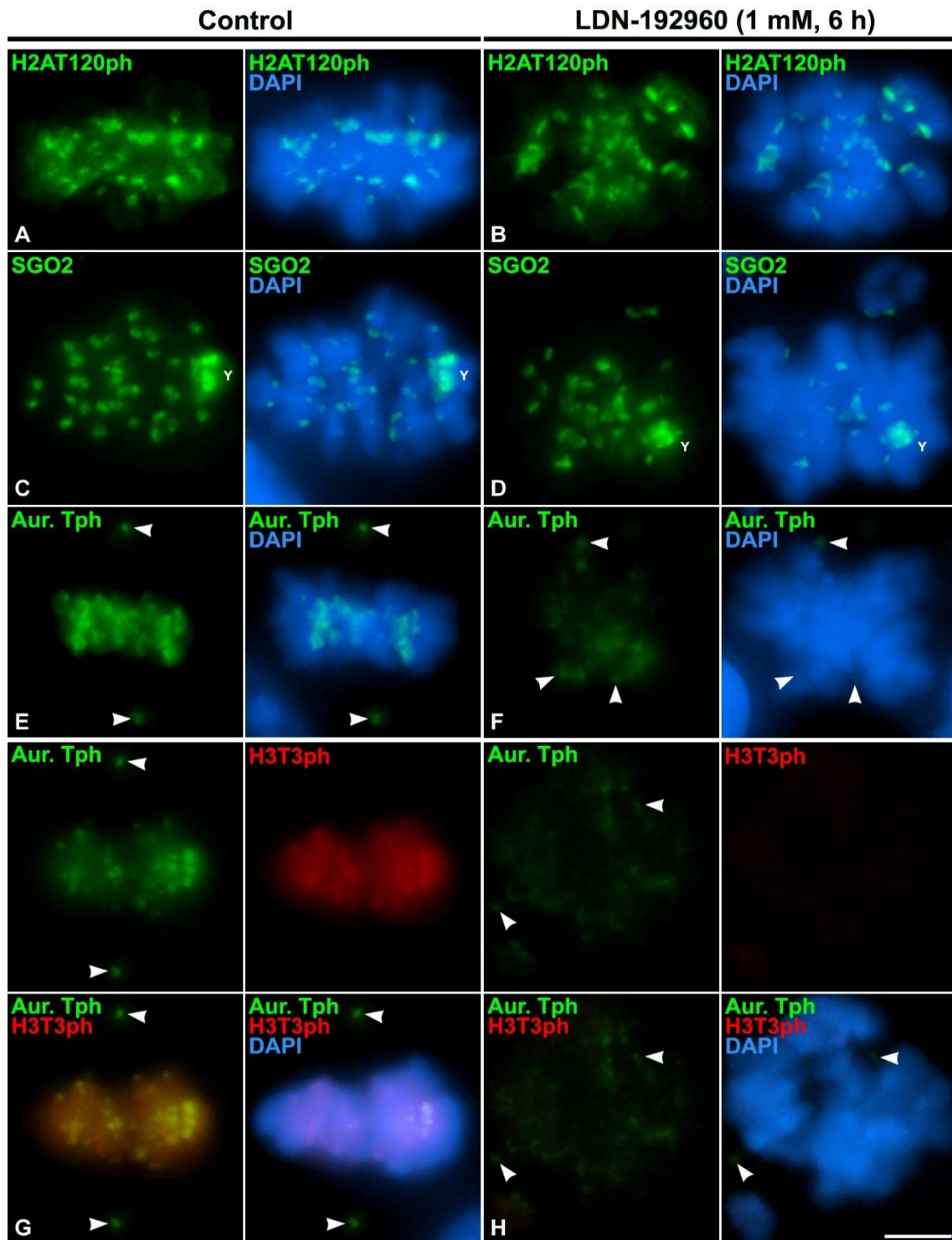


Figura 51. La ausencia de H3T3ph provoca alteraciones en la distribución de la quinasa Aurora B/C fosforilada, pero no en las de H2AT120ph y SGO2 en metafase-II. Inmunolocalizaciones de H2AT120ph, SGO2 y Aurora Tph (verde), y doble inmunodetección de Aurora Tph (verde) y H3T3ph (rojo) en metafases-II procedentes de aplastados de túbulos seminíferos de ratón WT en cultivo tratados con LDN-192960 1 mM durante 6 horas. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A y B) Inmunodetección de H2AT120ph en metafases-II control (A) y tratada con LDN (B). (C y D) Inmunodetección de SGO2 en metafases-II control (C) y tratada con LDN (D). (E y F) Inmunodetección de Aurora Tph en metafases-II control (E) y tratada con LDN (F). (G y H) Doble inmunodetección de Aurora Tph y H3T3ph en metafases-II control (G) y tratada con LDN (H). Las puntas de flecha blancas en (E-H) señalan los polos celulares. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. La barra de medida en H corresponde a 10 μ m.

4.1.5 Efecto de la inhibición de Haspina sobre las proteínas del DCI en metafase-II

En las metafases-II observadas tras el tratamiento con LDN tanto la variante **H2AT120ph** como **SGO2** presentan una distribución centromérica similar a la encontrada en las metafases-II control. Ambas proteínas se localizan en el DCI de los cromosomas formando un anillo pericinetocórico por cromátida, los cuales en vista lateral pueden apreciarse como dos masas redondeadas (Fig. 51A-D). En el caso de la variante H2AT120ph, además de en los centrómeros, puede observarse de manera más tenue por toda la cromatina (Fig. 51A, B). Por otro lado, SGO2 sólo se localiza en los centrómeros de los cromosomas estando más acumulada en el centrómero del cromosoma Y (Fig. 51C, D).

La proteína **Aurora B/C** se localiza en el DCI, por debajo de los cinetocoros en las metafases-II control (Fig. 51E, G). Sin embargo, en las metafases-II tratadas con LDN podemos observar como en ausencia de H3T3ph, Aurora B/C aparece atenuada en los centrómeros (Fig. 51F, H). **Aurora A**, que en las metafases-II control se localiza en los centrosomas (Fig. 51G), en las metafases-II tratadas con LDN presenta también una disminución en intensidad (Fig. 51H).

4.2. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN QUÍMICA DE LA ACTIVIDAD QUINASA DE HASPINA EN ESPERMATOCITOS *BUB1^{KD/KD}*

Para completar el estudio de la interacción de las dos vías de señalización de la RCI, realizamos un estudio de los espermatoцитos en los cuales las actividades quinasa de BUB1 y Haspina están inhibidas simultáneamente. Para ello, realizamos la inhibición de Haspina mediante el inhibidor químico LDN-192960 a 1 mM sobre cultivos de túbulos seminíferos de individuos *Bub1^{KD/KD}*. Tras 6 horas de tratamiento pudimos observar cómo en ausencia de ambas variantes histónicas (H2AT120ph y H3T3ph) ninguno de los componente de ambas rutas es capaz de ensamblarse en los centrómeros.

4.2.1. Análisis de la inhibición de la quinasa Haspina en espermatoцитos *Bub1^{KD/KD}*

En primer lugar, realizamos un análisis cualitativo y cuantitativo de las metafases-I y -II *Bub1^{KD/KD}* observadas tras el tratamiento con LDN. Basándonos en el aspecto de la cromatina, la distribución de SYCP3 y de los cinetocoros, pudimos distinguir tres tipos de metafases-I de *Bub1^{KD/KD}* + LDN, similares a las observadas en WT + LDN. Por ello, decidimos clasificarlas en las

Resultados

mismas categorías: alineadas, desalineadas y desorganizadas. A nivel cuantitativo, se observó un incremento en el número de metafases-I desalineadas y desorganizadas en los cultivos de espermatocitos *Bub1^{KD/KD}* tratados con LDN, en comparación con los cultivos tratados de individuos WT. A su vez, el incremento significativo en el número de apoptosis nos hace suponer que la doble inhibición provoca alteraciones más graves, que las observadas independientemente con las inhibiciones sencillas (Fig. 52).

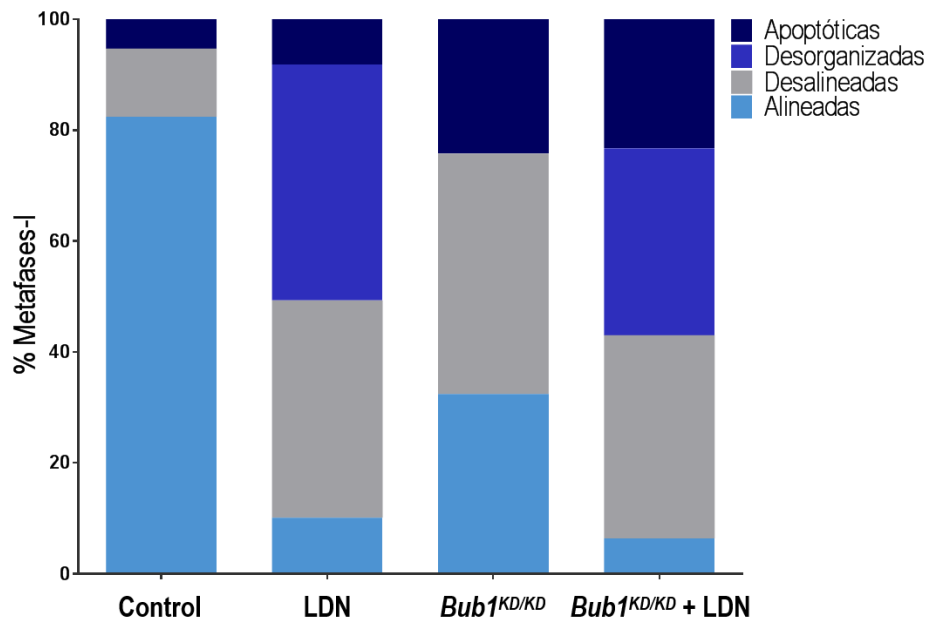


Figura 52. Representación gráfica de los tipos de metafases-II observadas tras 6 horas de tratamiento con LDN-192960 1 mM en individuos WT y *Bub1^{KD/KD}*. Representación gráfica de los porcentajes medios obtenidos en los recuentos celulares.

Teniendo en cuenta que tanto la inhibición de Haspina como la de BUB1 parecen afectar a la dinámica de los centrosomas, realizamos un análisis del número de polos celulares presentes tanto en metafases-I como en metafases-II de ratones *Bub1^{KD/KD}* tratadas con LDN (Fig. 53). Como resultado, se observaron un gran número de metafases-I con múltiples polos celulares (Fig. 53A-C). Sin embargo, en las metafases-II tan sólo hemos observado alteraciones aparentes en las metafases-II de *Bub1^{KD/KD}* diploides tratadas con LDN, subtipo en el que ya en los cultivos control *Bub1^{KD/KD}* se podían presentar entre tres y cuatro polos celulares (Fig. 53D).

4.2.2. Efecto de la inhibición de Haspina sobre espermatocitos *Bub1^{KD/KD}* en la dinámica de las proteínas del DCI en metafase-I

Una vez analizado el efecto de la doble inhibición sobre las divisiones meióticas, continuamos con el efecto sobre el ensamblaje de las principales proteínas de la RCI en el DCI, las variantes H2AT120ph y H3T3ph, y las proteínas SGO2 y Aurora B/C.

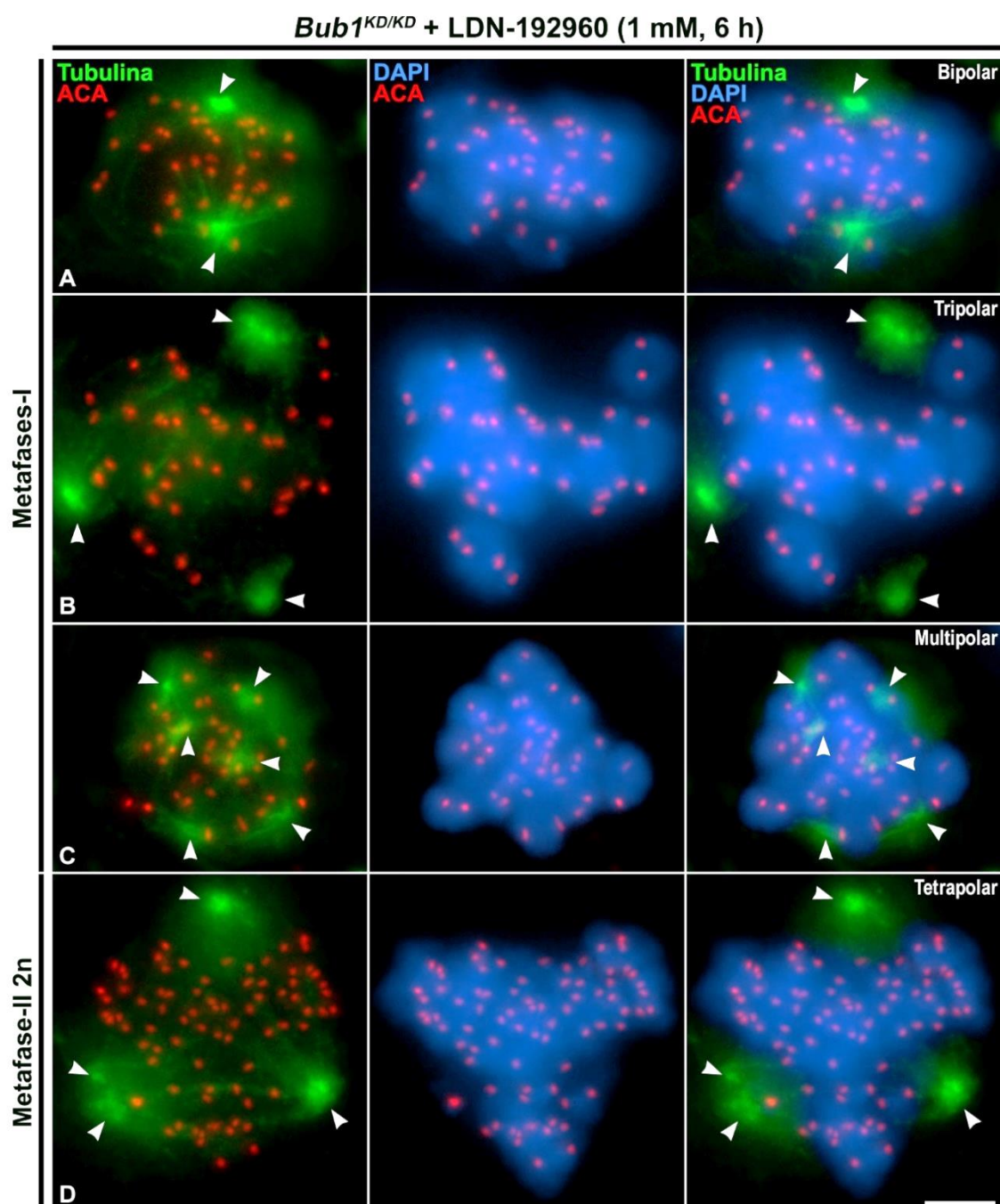
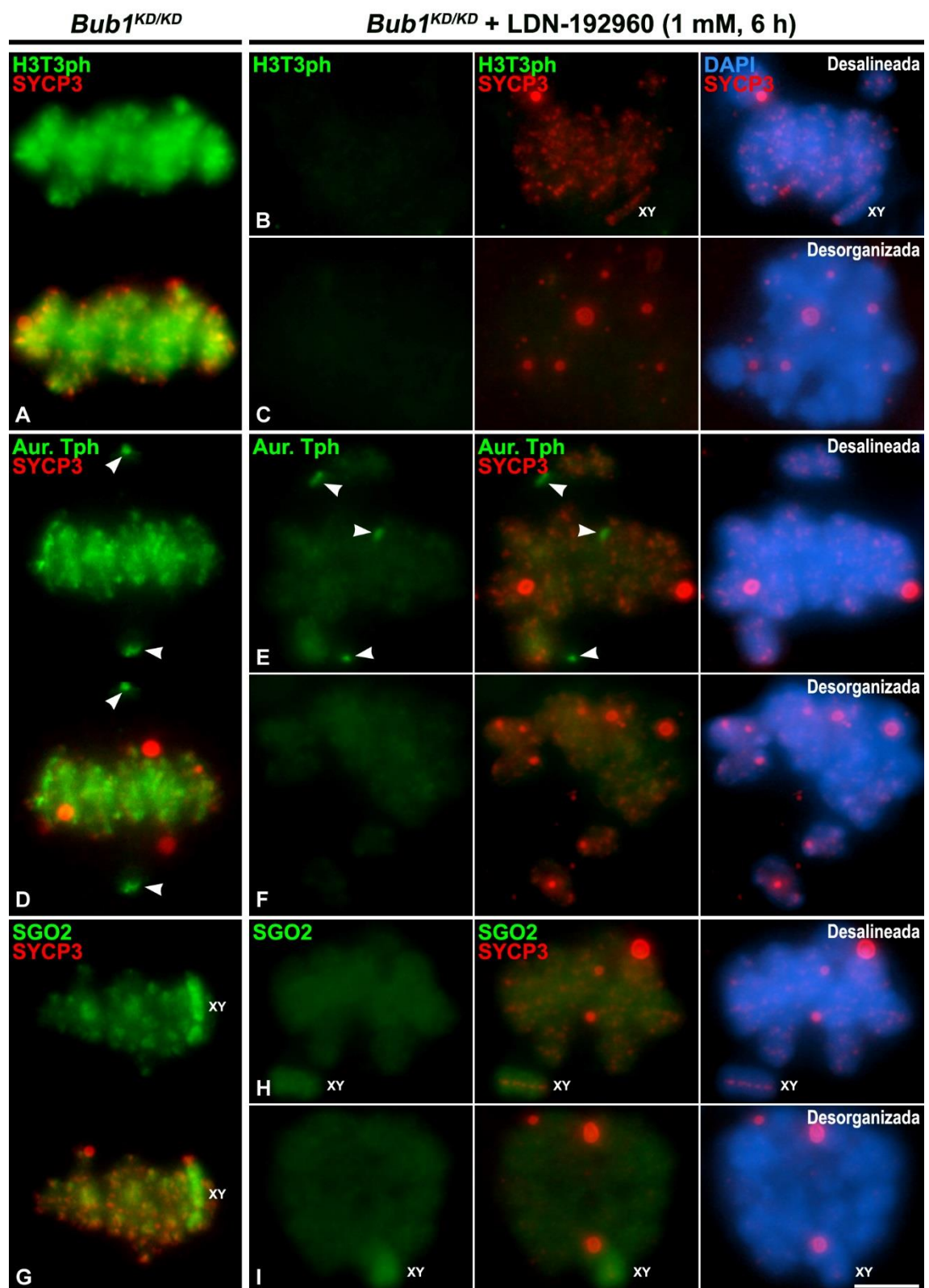


Figura 53. La inhibición de la actividad quinasa de Haspina con LDN provoca alteración en el número de polos celulares en las metafases-I y metafases-II diploides de individuos *Bub1*^{KD/KD}. Doble inmunolocalización de α -Tubulina (verde) y los cinetocoros (ACA, rojo) en metafases-I procedentes de aplastados de túbulos seminíferos *Bub1*^{KD/KD} en cultivo tratados con LDN-192960 a 1 mM durante 6 horas. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A-C) Metafases-I desalineada bipolar (A), desalineada tripolar (B), y desorganizada multipolar (C). (D) Metafase-II diploide tetrapolar. Las puntas de flecha blancas señalan los polos celulares. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. La barra de medida en D corresponde a 10 μ m.



→ **Figura 54. La quinasa Aurora B/C y la Shugoshina SGO2 necesitan la presencia simultánea de las dos variantes de histonas H2AT120ph y H3T3ph para ensamblarse en el centrómero en metafase-I.** Dobles inmunolocalizaciones de H3T3ph, Aurora Tph y SGO2 (verde) y SYCP3 (rojo) en metafases-I procedentes de aplastados de túbulos seminíferos *Bub1^{KD/KD}* en cultivo durante 6 horas sin o con el tratamiento con LDN-192960 1 mM. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). **(A-C)** Doble detección de H3T3ph y SYCP3 en metafases-I *Bub1^{KD/KD}* control **(A)** y *Bub1^{KD/KD}* tratadas con LDN, desalineada **(B)** y desorganizada **(C)**. **(D-F)** Doble detección de Aurora Tph y SYCP3 en metafases-I *Bub1^{KD/KD}* control **(D)** y *Bub1^{KD/KD}* tratadas con LDN, desalineada **(E)** y desorganizada **(F)**. **(G-I)** Doble detección de SGO2 y SYCP3 en metafases-I *Bub1^{KD/KD}* control **(G)** y *Bub1^{KD/KD}* tratadas con LDN, desalineada **(H)** y desorganizada **(I)**. Los bivalentes sexuales (XY) aparecen indicados. Las puntas de flecha blancas en **D** y **E** señalan los polos celulares. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. La barra de medida en **I** corresponde a 10 μ m.

En los cultivos control *Bub1^{KD/KD}* la variante **H3T3ph** presenta una distribución similar a la observada en los individuos WT, es decir, tanto en el DCI como en el DI (Fig. 54A). En las metafases-I *Bub1^{KD/KD}* tratadas con LDN el marcaje de H3T3ph se pierde por completo (Fig. 54B, C). No obstante, parece que el efecto del LDN sobre espermatoцитos *Bub1^{KD/KD}* es más acusado que en espermatoцитos WT, ya que en al tratar los túbulos seminíferos *Bub1^{KD/KD}* con LDN observamos una mayor condensación de los bivalentes y una completa pérdida de marcaje de H3T3ph tanto en las metafases-I desalineadas como en las desorganizadas (Fig. 54B, C). En este último tipo de metafases-I, la señal de SYCP3 se pierde totalmente de brazos quedando acumulada parte de la proteína en masas extracromosómicas redondeadas (Fig. 54C).

Con el anticuerpo Aurora Tph podemos observar como en los cultivos control *Bub1^{KD/KD}* **Aurora B/C** aparece acumulada en el DI, quedando poca proteína a nivel del centrómero, mientras que la **Aurora A** marca los polos celulares (Fig. 54D). Tras el tratamiento con LDN se pierde el marcaje de Aurora B/C tanto en el centrómero como en el DI, observándose tenuemente la cromatina marcada en los dos tipos de metafases-I tratadas (Fig. 54E, F). Aurora A aparece marcando los polos celulares en las metafases-I desalineadas (Fig. 54E), mientras que en las metafases-I desorganizadas dejan de observarse o quedan tenuemente marcados (Fig. 54F).

Finalmente, la última proteína analizada ha sido **SGO2**. En las metafases-I de los cultivos control *Bub1^{KD/KD}*, SGO2 presenta un patrón de distribución donde la proteína se ha reducido en el DCI, quedando acumulada a nivel del DI de todos los bivalentes, con una mayor acumulación en el bivalente sexual (Fig. 54G). En las metafases-I desalineadas y desorganizadas de los cultivos *Bub1^{KD/KD}* tratados con LDN, SGO2 no es detectada ni en los centrómeros ni en el

DI de los bivalentes, quedando marcada toda la cromatina de manera muy tenue a excepción del bivalente sexual, cuya cromatina presenta un marcaje más intenso (Fig. 54H, I).

4.2.3. Efecto de la inhibición de Haspina sobre espermatocitos *Bub1*^{KD/KD} en la dinámica de las proteínas del DCI en metafase-II

Por último, analizamos el efecto de la doble inhibición de las dos rutas de reclutamiento sobre el ensamblaje de las proteínas del DCI en metafase-II. En espermatocitos *Bub1*^{KD/KD} tratados con LDN los resultados son similares a los descritos para las metafases-I, quedando todas las proteínas alteradas en su localización centromérica tras la doble inhibición.

De la misma manera que en metafase-I, la variante **H3T3ph** presenta una distribución normal en el DCI en las metafases-II del cultivo control *Bub1*^{KD/KD}, mientras que en las metafases-II tratadas con LDN no observamos ningún marcaje de la variante histónica (Fig. 55A-C). Este hecho nos indica que el tratamiento con LDN y, por tanto, la inhibición de Haspina ha funcionado también en espermatocitos *Bub1*^{KD/KD} en metafase-II.

En las metafases-II de los cultivos control *Bub1*^{KD/KD} la quinasa **Aurora B/C** queda localizada entre los dos cinetocoros hermanos (Fig. 55D), mientras que en las metafases-II (haploides y diploides) *Bub1*^{KD/KD} tratadas con LDN se pierde por completo la señal centromérica. De nuevo, como en el caso de las metafases-I, la cromatina queda marcada tenuemente (Fig. 55E, F). La proteína **Aurora A** (detectada con Aurora Tph) marca los polos celulares tanto en las metafases-II de *Bub1*^{KD/KD} control, como en las metafases-II *Bub1*^{KD/KD} tratadas con LDN, independientemente de su ploidía o del grado de alineamiento cromosómico (Fig. 55D-F).

La distribución de **SGO2** presenta el mismo patrón que Aurora B/C en las metafases-II control *Bub1*^{KD/KD}, quedando localizada entre los cinetocoros hermanos (Fig. 55G). Del mismo modo que la proteína anterior, en los cultivos *Bub1*^{KD/KD} tratados con LDN se pierde la señal centromérica de SGO2, quedando la cromatina marcada tenuemente a excepción de la cromatina de los cromosomas sexuales, que muestran un mayor marcaje (Fig. 55H, I).

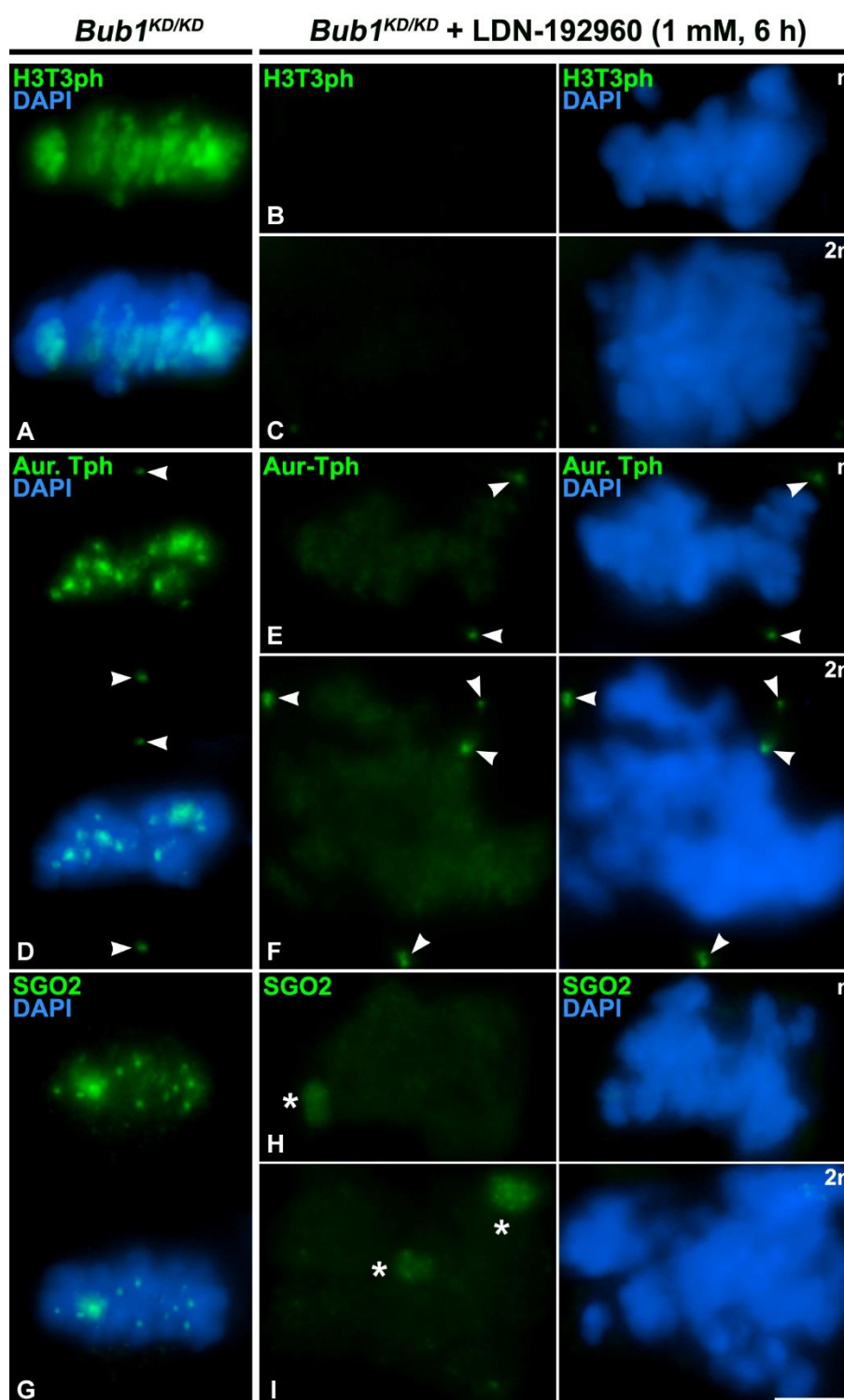


Figura 55. La quinasa Aurora B/C y la Shugoshina SGO2 necesitan la presencia simultánea de las dos variantes de histonas H2AT120ph y H3T3ph para ensamblarse en el centrómero en metafase-II. Inmunolocalizaciones de H3T3ph, Aurora Tph y SGO2 (verde) en metafases-II procedentes de aplastados de túbulos seminíferos *Bub1^{KD/KD}* en cultivo durante 6 horas sin o con el tratamiento con LDN-192960 1 mM. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A-C) Inmunodetección de H3T3ph en metafases-II *Bub1^{KD/KD}* control (A) y *Bub1^{KD/KD}* tratadas con LDN haploide (B) y diploide (C). (D-F) Inmunodetección de Aurora Tph en metafases-II *Bub1^{KD/KD}* control (D) y *Bub1^{KD/KD}* tratadas con LDN haploide (E) y diploide (F). (G-I) Inmunodetección de SGO2 en metafases-II *Bub1^{KD/KD}* control (G) y tratadas con LDN haploide (H) y diploide (I). Las puntas de flecha blancas señalan los polos celulares. Los asteriscos blancos indican los cromosomas sexuales X o Y. Todas las imágenes son proyecciones en el eje Z de varios planos focales. La barra de medida en I corresponde a 10 μm .

D I S C U S I Ó N

Discusión

La Red del Centrómero Interno (RCI) integra la interacción de dos vías de señalización necesarias para el reclutamiento de dos complejos proteicos fundamentales para que tenga lugar correctamente la segregación de los cromosomas en mitosis: el CPC y SGO1/PP2A. En esta Tesis Doctoral se presentan los resultados del estudio de la RCI en los centrómeros meióticos de mamíferos, utilizando el ratón de laboratorio como modelo experimental. Para poder discutir los resultados con mayor claridad, se ha dividido la discusión en cuatro apartados. Los dos primeros apartados tratarán la distribución y localización relativa en el centrómero de las principales proteínas de la RCI durante la meiosis en machos y hembras de ratón. El tercer apartado englobará los resultados obtenidos en el estudio funcional de la RCI. Finalmente, en el último apartado se expondrá un modelo de establecimiento e interacción de las proteínas de la RCI en la meiosis de ratón.

1. Ensamblaje del DCI en la meiosis masculina de ratón

1.1. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE BUB1 EN LA MEIOSIS DE RATÓN

La relevancia del papel de las Shugoshinas en el mantenimiento de la cohesión a nivel del centrómero y su relación con la aparición de aneuploidías ha sido foco de estudio durante años (Kitajima *et al.*, 2004; Watanabe, 2005; Rivera y Losada, 2006; Llano *et al.*, 2008; Watanabe, 2012). Hasta ahora, la mayor parte de los trabajos han sido realizados en mitosis, y han permitido proponer que la quinasa BUB1 es la responsable de generar la variante histónica H2AT120ph, la cual parece ser la señal para el reclutamiento de SGO1 al centrómero (Kawashima *et al.*, 2010; Ricke *et al.*, 2012; Asghar *et al.*, 2015). Sin embargo, poco se sabe sobre esta vía de señalización para el reclutamiento de SGO2 en la meiosis de mamíferos (Gomez *et al.*, 2007; Llano *et al.*, 2008; Parra *et al.*, 2009; Rattani *et al.*, 2013).

1.1.1. Distribución de la quinasa BUB1 en espermatocitos

Nuestros resultados muestran un reclutamiento temprano de la quinasa BUB1 en los cinetocoros en paquitena (Esquemas 6 y S1), el cual podría estar relacionado con su función mitótica en el SAC, donde participa principalmente como plataforma para el reclutamiento de otras proteínas (Elowe, 2011; Overlack *et al.*, 2015; Vleugel *et al.*, 2015). Sin embargo, en la meiosis de ratón el reclutamiento de proteínas del SAC tiene lugar en etapas más tardías, como es el caso de BUBR1 en diacinesis (Parra *et al.*, 2009), siendo el reclutamiento de BUB1 el más

temprano observado hasta el momento. De este modo, esta localización temprana podría estar relacionada con su actividad quinasa sobre la histona H2A, como ocurre en mitosis (Ricke *et al.*, 2012). Respecto a la actividad quinasa de BUB1, se ha descrito recientemente en células somáticas la relación entre la activación de BUB1 mediante autofosforilación con un incremento en su acumulación en los cinetocoros durante la transición G2/M (Asghar *et al.*, 2015). En este sentido, en espermatoцитos observamos un incremento en la cantidad de proteína en los centrómeros en diacinesis pudiendo estar relacionado con su actividad quinasa sobre la histona H2A (Esquema S1).

1.1.1. Distribución de la variante H2AT120ph en espermatoцитos

La variante H2AT120ph aparece desde paquitena hasta diplotena tardía en el cuerpo XY (Baarends *et al.*, 2005) pudiendo estar implicada en el silenciamiento de los cromosomas sexuales en machos de ratón. Nuestros resultados apuntan a que no es hasta el final de diplotena, cuando se detecta esta variante H2AT120ph en los centrómeros de todos los cromosomas (Esquemas 6 y S1). Esta señal centromérica abarca el DCI, tal y como se había observado previamente en mitosis (Yamagishi *et al.*, 2010). Sin embargo, en espermatoцитos en metafase-I y metafase-II la variante H2AT120ph presenta una distribución similar a la descrita para las proteínas SGO2 y MCAK en forma de anillo pericinetocórico que, en las metafases-I en vista lateral, recuerda a una copa o cono (Parra *et al.*, 2006; Gomez *et al.*, 2007). Esta concordancia en localización, respaldaría la supuesta función de H2AT120ph como plataforma para el reclutamiento de SGO2 y MCAK en la meiosis de ratón (Kawashima *et al.*, 2010; Ricke *et al.*, 2012) (Esquema S1).

Por otro lado, la detección de una histona a nivel de los polos celulares durante las divisiones meióticas es un hecho que observamos de manera recurrente con la utilización de anticuerpos policlonales de conejo, lo que nos hace suponer que se trata de un marcaje meramente inespecífico. Sin embargo, se ha descrito recientemente que la presencia de histonas en los polos celulares durante la mitosis podría estar relacionada con degradación en los proteasomas, localizados generalmente cerca de los polos celulares (Wike *et al.*, 2016).

1.1.2. Distribución de SGO2 y MCAK-MCAKph en espermatoцитos

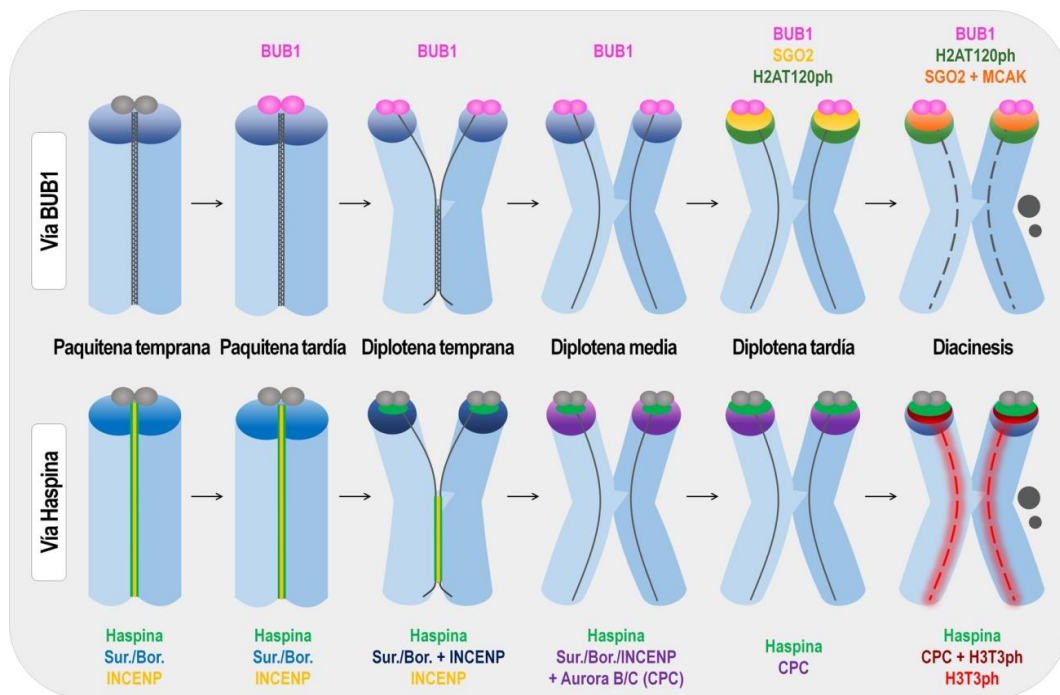
En cuanto a las distribuciones y localizaciones relativas en el centrómero de las proteínas SGO2 y MCAK no hemos observado diferencias con respecto a lo descrito previamente en espermatoцитos de ratón (Parra *et al.*, 2006; Gomez *et al.*, 2007) (Esquemas 6 y S1). Sin embargo,

en este trabajo hemos utilizado además un anticuerpo contra una forma activa de MCAK, la MCAKS95ph, la cual parece ser generada en células somáticas de mamíferos por la quinasa Aurora A (Ritter *et al.*, 2015) y en *Xenopus* por la quinasa Aurora B (Zhang *et al.*, 2007). En *Xenopus* se ha descrito que esta fosforilación es necesaria para el reclutamiento de MCAK al centrómero (Zhang *et al.*, 2007; Ritter *et al.*, 2015). Este hecho se asemeja a nuestros resultados pues no somos capaces de discernir el orden de aparición entre MCAK y MCAKS95ph, pudiendo ser necesaria dicha fosforilación para su reclutamiento en el DCI en espermatoцитos de ratón. Esta fosforilación de MCAK marca toda la cromatina hasta diacinesis, donde comienza a acumularse a nivel del DCI de todos los centrómeros (Esquema S1). Este patrón de distribución es similar al observado en mitosis, apareciendo MCAK distribuida por todo el núcleo en interfase y acumulándose en los centrómeros en prometafase (Wordeman y Mitchison, 1995; Ritter *et al.*, 2015). En meiosis, a partir de diacinesis, la distribución de MCAKS95ph en el DCI es igual a la observada para la proteína no fosforilada incluyendo una mayor acumulación en el centrómero del cromosoma Y (Parra *et al.*, 2006) (Esquema S1). Sin embargo, no hemos observado señal a nivel del DI en metafase-I, lugar donde esta fosforilación ha sido identificada en células somáticas de *Xenopus* (Zhang *et al.*, 2007). Dado que MCAK es regulada principalmente por Aurora B, ambas presentan un patrón de distribución similar a nivel de los centrómeros y en el cuerpo medio del huso (Lan *et al.*, 2004; Vogt *et al.*, 2010). En esta Tesis Doctoral, se muestra por primera vez la presencia de la fosforilación de MCAKS95ph en el cuerpo medio. En células somáticas de *Xenopus*, Aurora B fosforila a MCAK en el residuo S196 regulando su localización en el cuerpo medio (Lan *et al.*, 2004). Por otro lado, en oocitos de mamíferos se ha localizado la quinasa Aurora A fosforilada en el cuerpo medio, donde participa en la regulación del proceso de citocinesis (Uzbekova *et al.*, 2008). En base a estos datos, no podemos concluir qué quinasa es la encargada de la deslocalización de MCAKS95ph al cuerpo medio ni su relación con la regulación de la citocinesis en espermatoцитos de ratón, siendo las Auroras B y A las principales candidatas. Respecto a la localización a nivel del cuerpo medio, sólo la forma fosforilada se detecta en dicha estructura, por lo que la fosforilación de la MCAK en la S95 podría estar implicada en la citocinesis. Por el contrario, la forma no fosforilada de MCAK no se ha detectado en el cuerpo medio, hecho que podría deberse a la presencia de fosforilaciones en el epítipo que reconoce el anticuerpo frente a MCAK no fosforilada impidiendo su interacción con la proteína en esta región. En este sentido, sería interesante realizar un estudio más exhaustivo sobre la relación de MCAKS95ph y las diferentes Aurora

quinasas y su implicación el proceso de citocinesis tanto en células somáticas como en el proceso meiótico.

1.1.3. Orden de reclutamiento de las proteínas de la vía de BUB1

En conjunto, nuestros resultados demuestran que las proteínas de la vía BUB1 siguen en la meiosis de ratón un orden de reclutamiento al centrómero similar al descrito en mitosis (Yamagishi *et al.*, 2010; Tanno *et al.*, 2015; Trivedi y Stukenberg, 2016). BUB1 aparece localizada en los cinetocoros en fases tempranas (paquítenu tardía) desde donde genera en el DCI la modificación H2AT120ph en diplotenu tardía. A lo largo de esta etapa son reclutadas, en primer lugar, SGO2 y, posteriormente, MCAK-MCAKph. Este orden de aparición en el centrómero, junto con la colocalización en el DCI en forma de anillo pericinetocórico en todos los cromosomas aportan evidencias sobre la estrecha relación entre la H2AT120ph y el complejo SGO2-MCAK/MCAKph en la meiosis de machos de ratón (Esquemas 6 y S1).



Esquema 6. Orden de reclutamiento de las proteínas de la RCI durante la profase-I de ratón.

Representación gráfica del orden de reclutamiento y distribución de las proteínas de las dos vías de señalización de la RCI a lo largo de la profase-I. Esquema basado en el diseñado por la Dra. Mayte Parra (Parra *et al.*, 2009).

1.2. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE HASPINA EN LA MEIOSIS DE RATÓN

En mitosis, se ha descrito que el reclutamiento del CPC al centrómero está relacionado con la actividad de la quinasa Haspina (Higgins, 2010; Cuny *et al.*, 2012; Huertas *et al.*, 2012; Wang

et al., 2012) a través de la generación de la variante histórica H3T3ph (Kelly *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). Sin embargo, poco se sabe sobre esta vía de señalización en la meiosis.

1.2.1. Distribución de la quinasa Haspina en espermatocitos

Uno de los datos más novedosos de esta Tesis Doctoral es la distribución de la quinasa Haspina en la meiosis de espermatocitos de ratón (Esquema S2). Sorprendentemente, hemos observado la presencia de esta quinasa en los CS de los bivalentes autosómicos y en los EAs de los cromosomas sexuales a partir de paquitena (Esquemas 6 y S2). En mitosis, la interferencia de Haspina provoca la pérdida prematura de cohesión entre las cromátidas hermanas, mientras que su sobreexpresión estabiliza la cohesión en brazos (Dai *et al.*, 2006). Además, la variante H3T3ph, generada principalmente por Haspina (Dai *et al.*, 2005), colocaliza en mitosis con subunidades de cohesinas como SA2 (Dai *et al.*, 2006). Estos datos, junto con la interacción de Haspina con la proteína reguladora de cohesinas PDS5 descrita en *S. pombe* (Dai *et al.*, 2006; Higgins, 2010; Yamagishi *et al.*, 2010), sugieren la implicación de Haspina en la regulación de la cohesión a través de su actividad sobre la modificación H3T3ph (Dai *et al.*, 2006; Higgins, 2010). Del mismo modo, la localización de Haspina a nivel de los CS a partir de paquitena resulta similar a la distribución observada para algunas subunidades de cohesina (Biswas *et al.*, 2016) y de sus proteínas reguladoras (Gomez *et al.*, 2016), hecho que podría relacionar esta quinasa con el proceso de regulación de la cohesión en meiosis. Por otro lado, en células somáticas se ha descrito la regulación de Haspina por la quinasa PLK1 (Zhou *et al.*, 2014). Dada la aparente implicación de PLK1 en la regulación del desensamblaje del CS (Jordan *et al.*, 2012), esta localización de Haspina en espermatocitos de ratón podría tener relación con dicho proceso. En este sentido la quinasa Haspina comienza a acumularse en los centrómeros en diplotena, al comenzar el desensamblaje del CS, quedando localizada en el DCI en metafase-I del mismo modo que algunas proteínas del CS como SYCP2 y SYCP3 (Moens *et al.*, 1987; Lammers *et al.*, 1994; Parra *et al.*, 2004; Jordan *et al.*, 2012).

Finalmente, tanto en metafase-I como en metafase-II Haspina aparece localizada a nivel de los polos celulares (Esquema S2). Estos datos coincidirían con lo publicado en células HeLa, donde Haspina-GFP marca los polos celulares (Dai *et al.*, 2005). A su vez, la ausencia de Haspina provoca la formación de husos multipolares en mitosis (Dai *et al.*, 2009) y en meiosis, donde provoca alteraciones en la constitución del MTOC en oocitos de ratón (Balboula *et al.*, 2016). Dada la relación de Haspina con la quinasa PLK1 (Zhou *et al.*, 2014), la cual participa en la

regulación de los centrosomas (Schmucker y Sumara, 2014), y con la regulación de las cohesinas (Dai *et al.*, 2006; Higgins, 2010), las cuales a su vez parecen participar en la cohesión de los centriolos en mitosis (Wang *et al.*, 2008; Schockel *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2012), Haspina podría tener un papel común en la regulación de los centrosomas tanto en mitosis como en la meiosis de mamíferos.

1.2.2. Distribución de la variante H3T3ph en espermatocitos

En mitosis, H3T3ph es detectada a partir de la profase temprana a lo largo de los brazos cromosómicos, concentrándose en el DCI en metafase (Dai *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2006). En este sentido, en meiosis la acumulación de la modificación H3T3ph en los centrómeros en diacinesis, profase-I meiótica tardía, difiere con respecto a la acumulación en profase temprana observada en mitosis (Esquemas 6 y S2). En cuanto a la distribución en metafase-I, observamos una redistribución de H3T3ph desde el centrómero a brazos, quedando localizada en una región del DCI de menor tamaño que la señal de SYCP3, y en forma de parches en el DI (Esquema S2), similar a la descrita en oocitos de ratón (Nguyen *et al.*, 2014). Esta distribución recuerda a la observada para las subunidades de cohesina en la meiosis de ratón (Parra *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2007; Biswas *et al.*, 2016), y coincide con la colocalización observada en mitosis entre la modificación H3T3ph y la subunidad de cohesina SA2 (Dai *et al.*, 2006). En conjunto, estos datos aportan evidencias sobre la posible implicación de Haspina, a través de la generación de la H3T3ph, en la regulación la cohesión en la meiosis de ratón, de forma similar a la descrita en mitosis (Higgins, 2010).

1.2.3. Distribución y ensamblaje en el DCI de las proteínas del CPC en espermatocitos

Nuestros datos sobre la distribución de las proteínas del CPC en meiosis, resultan acordes con los ya descritos previamente en la meiosis de ratón (Parra *et al.*, 2009) pero difieren ligeramente de lo descrito en células somáticas (Carmena *et al.*, 2012), tal como se explica a continuación. Del mismo modo que en células somáticas, nuestros resultados muestran que el reclutamiento al centrómero de las cuatro subunidades del CPC es previo a la fosforilación de la histona H3T3ph y tiene lugar en la HC (Cooke *et al.*, 1987; Carmena *et al.*, 2012). De esta forma, en espermatocitos de ratón las subunidades del CPC son reclutadas a la HC durante la profase-I, siendo Borealina y Survivina las primeras en reclutarse durante la etapa de paquitena, seguidas de INCENP y, finalmente, la quinasa Aurora B/C, ambas durante diplotena (Esquemas

6 y S2). Este orden de reclutamiento coincide con los datos aportados previamente por nuestro grupo de investigación (Parra et al., 2003; 2009) y difieren respecto a los publicados en mitosis, donde INCENP parece ser la primera proteína del CPC en reclutarse (Carmena et al., 2012). En mitosis, se ha descrito que este reclutamiento del CPC a la HC es dependiente de la proteína HP1 (del inglés, *Heterochromatin Protein 1*), con la cual la subunidad INCENP establece una interacción directa (Ainsztein et al., 1998; Vader et al., 2006; Carmena et al., 2012). Dada la escasa bibliografía sobre la distribución de HP1 durante la meiosis de mamíferos (Wang et al., 2008), podría ser interesante intentar establecer la relación entre las variantes de esta proteína y el reclutamiento del CPC a la HC durante la profase-I meiótica de ratón.

Finalmente, en mitosis, el CPC se concentra en el DCI a partir de la colocalización de las dos H-PTMs, H3T3ph y H2AT120ph, en dicho dominio (Yamagishi et al., 2010), estableciéndose una interacción directa entre H3T3ph y Survivina (Kelly et al., 2010; Wang et al., 2010). Nuestros resultados muestran cómo en meiosis, esta concentración del CPC en el DCI tiene lugar a partir de diacinesis, coincidiendo con la generación de la variante H3T3ph en todos los bivalentes (Esquemas 6 y S2). Estos datos sugieren la participación de Haspina y H3T3ph en la concentración del CPC al DCI, y no en su reclutamiento a la HC, cuya vía de señalización en meiosis se desconoce. En este sentido, resulta interesante que el reclutamiento de Haspina en el DCI tenga lugar en la etapa de paquitena, momento en el que los componentes del CPC comienzan a reclutarse a la HC, y no es hasta la etapa de diacinesis cuando genera la variante H3T3ph. Esta concordancia en la aparición del CPC y la quinasa Haspina podría estar relacionada con el circuito de retroalimentación positiva entre Aurora B y Haspina que ocurre en mitosis (Wang et al., 2011). De este modo, en meiosis, en la etapa de diplotena, Aurora B/C podría estar fosforilando a la quinasa Haspina favoreciendo su actividad sobre la variante H3T3ph en la etapa de diacinesis, generando así el sustrato para la concentración del CPC en el DCI a través de la interacción de la H3T3ph con Survivina. A su vez, la localización de Haspina en el DI durante paquitena se asemeja a la observada para la proteína INCENP (Parra et al., 2003; 2009), hecho que apoyaría una posible relación entre Haspina y el CPC previo a la fosforilación de H3T3ph.

Por otro lado, el uso del anticuerpo que reconoce las formas activas de las tres Aurora quinasas (Aurora Tph) nos ha permitido detectar que la autofosforilación de la Aurora B/C tiene lugar en el DCI, tanto en la primera como en la segunda división meiótica (Esquema S2), lugar donde colocaliza con la proteína Aurora B sin fosforilar (Parra et al., 2003; 2009). Este dato

aportarías evidencias sobre la activación de la Aurora B/C en el DCI en meiosis, como se ha descrito en mitosis (Kelly *et al.*, 2010).

2. Distribución de las proteínas del DCI en la meiosis femenina de ratón

A pesar de la gran diferencia entre los procesos de gametogénesis masculina y femenina, pocos son los estudios que contrasten los diferentes eventos meióticos entre espermatoцитos y oocitos. En este contexto, nuestros resultados muestran que ni las H-PTMs H2AT120ph y H3T3ph ni Aurora B/C presentan diferencias significativas con respecto a la localización observada en el DCI en espermatoцитos. Sin embargo, en las metafases-I de oocitos, SGO2 aparece localizada a nivel de los cinetocoros hermanos. Tanto en levaduras como en células somáticas de mamíferos, se ha observado la redistribución de SGO1 desde el DCI a los cinetocoros durante la etapa de metafase de manera dependiente de tensión y de la presencia de la variante H2AT120ph (Higgins, 2013; Liu *et al.*, 2013; Nerusheva *et al.*, 2014; Marston, 2015). Esta redistribución dependiente de tensión también ha sido descrita en meiosis, sin embargo sólo se ha observado durante la meiosis-II de ratón, quedando localizada en el DCI durante la primera división meiótica (Gomez *et al.*, 2007) (Esquema S3). La localización de SGO2 a nivel de los cinetocoros en los bivalentes de oocitos se asemeja a la observada en mitosis para SGO1. Dado que en esta Tesis Doctoral hemos usado la técnica de esparcido sobre oocitos, no podemos concluir si en este material SGO2 sufre una distribución dependiente de tensión. Sin embargo, nuestros resultados reflejan una diferencia en la localización de SGO2 entre machos y hembras en metafase-I. Una posible explicación a tal divergencia podría ser la ausencia de la etapa de intercinesis durante la oogénesis. Durante esta etapa en espermatoцитos de ratón, tiene lugar un proceso de desensamblaje de las proteínas centroméricas y un posterior reclutamiento de las mismas en la transición intercinesis/profase-II, quedando de este modo dos divisiones celulares claramente diferenciadas. Sin embargo, el proceso meiótico de hembras carece de esta etapa de intercinesis y, por tanto, no tiene lugar dicho desensamblaje de las proteínas del centrómero al finalizar la primera división meiótica. Dado que la redistribución de SGO1/2 parece ser necesaria para la degradación de los CC centroméricos en la transición metafase-II/anafase-II, este proceso de redistribución podría tener lugar en la primera división meiótica en oocitos de ratón de manera que SGO2 pueda quedar localizada en los cinetocoros directamente durante la meiosis-II.

3. Interacción de las vías de la RCI en la meiosis de ratón

Mediante la combinación de ratones mutantes para el dominio quinasa de BUB1 (*Bub1^{KD/KD}*) y un inhibidor químico de la actividad quinasa de Haspina (LDN-192960) hemos intentado inferir la interacción entre las dos vías de señalización de la RCI en la meiosis de ratón.

3.1. *BUB1^{KD/KD}*: EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD QUINASA DE BUB1 EN ESPERMATOCITOS

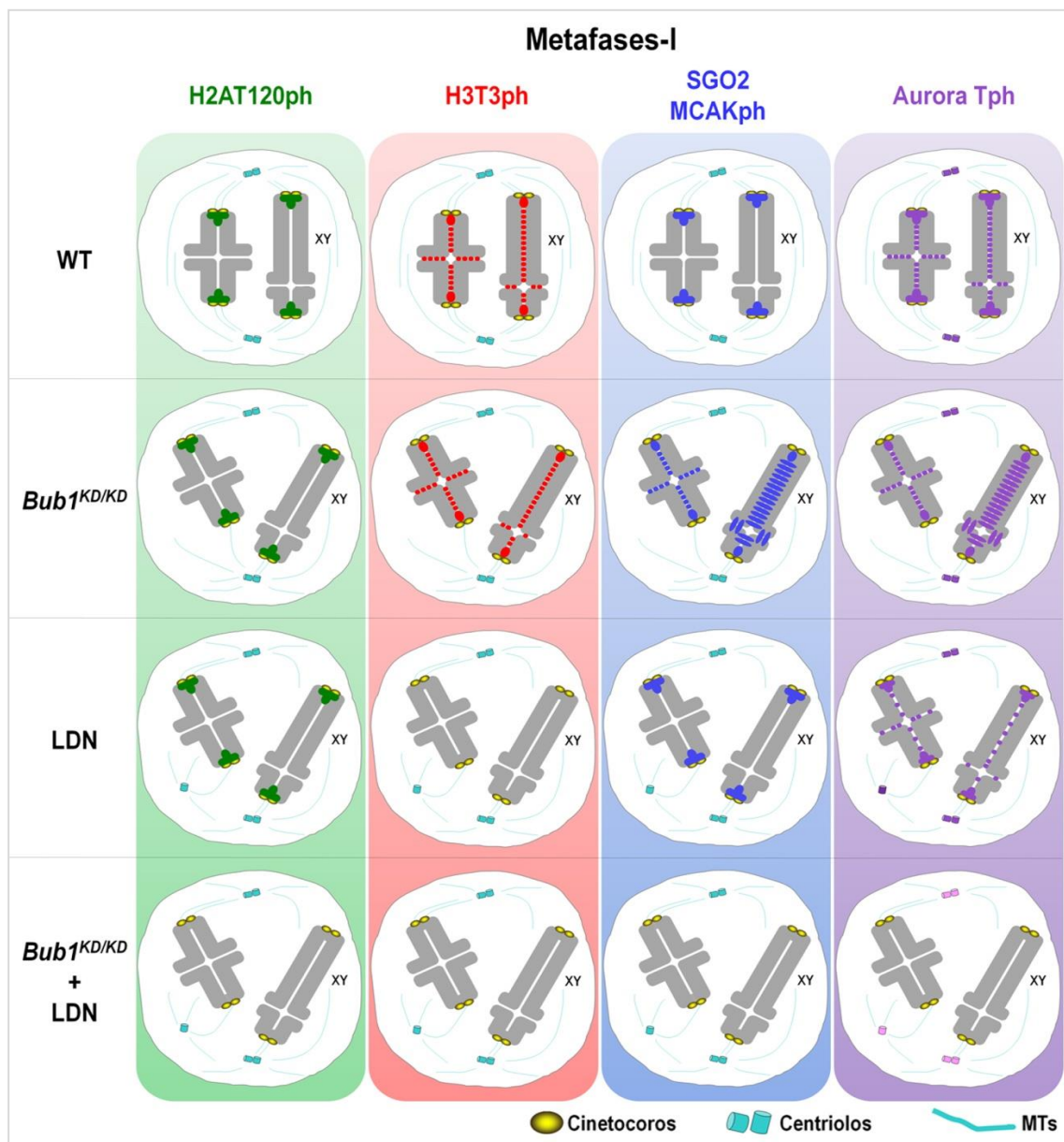
El estudio de la meiosis de los ratones *Bub1^{KD/KD}* resulta de gran interés científico debido, principalmente, a la diferencia fenotípica entre machos y hembras, donde sólo los machos presentan problemas de fertilidad (Ricke *et al.*, 2012).

En los espermatoцитos *Bub1^{KD/KD}* hemos corroborado que la actividad quinasa de BUB1 es necesaria para la aparición de la variante H2AT120ph en el DCI de los cromosomas meióticos en metafase-I y metafase-II, como ya se describió en células somáticas en trabajos anteriores (Kawashima *et al.*, 2010; Ricke *et al.*, 2012). Del mismo modo que ocurre en mitosis, en los espermatoцитos *Bub1^{KD/KD}* se observa alterado el patrón de distribución de las proteínas SGO2-MCAK y el complejo CPC (Ricke *et al.*, 2012). Sin embargo, no se produce separación prematura de las cromátidas hermanas en metafase-II. Este dato coincidiría con lo observado hasta el momento en mitosis, donde la inhibición de la actividad quinasa de BUB1 no causa separación prematura de las cromátidas hermanas, mientras que sí ocurre tras la interferencia de la proteína (Kitajima *et al.*, 2004; Kitajima *et al.*, 2005) (Esquemas 7 y 8).

3.1.1. Alteración en la dinámica de SGO2 en metafases-I y -II

En las metafases-I de los espermatoцитos *Bub1^{KD/KD}*, SGO2 aparece reducida en el centrómero y se redistribuye a los brazos cromosómicos a nivel del DI (Esquema 2). Este mismo fenotipo se ha observado en células humanas para SGO1 tanto en mutantes para la proteína BUB1 (Kitajima *et al.*, 2005; Asghar *et al.*, 2015) como mediante la inhibición de la actividad quinasa de BUB1 con inhibidores químicos (Baron *et al.*, 2016). En conjunto, estos datos indicarían que la actividad quinasa de BUB1 no es la única vía para el reclutamiento de SGO1/2 al centrómero, pues cierta cantidad de proteína permanece en este dominio en ausencia de actividad quinasa de BUB1. En este sentido, se ha descrito la participación de otros elementos en el reclutamiento de SGO1 al centrómero. Por un lado, en células somáticas, la interferencia de la proteína del SAC MAD2 mediante, deslocaliza SGO2 del centrómero (Tang *et al.*, 2004; Orth *et al.*, 2011). A su vez, se ha descrito recientemente que, en *Xenopus*, la presencia de la

proteína BUB1 en el centrómero, y no sólo su actividad quínasa, parece ser necesaria para el reclutamiento de SGO1 a dicho dominio (Williams *et al.*, 2017). Probablemente, como consecuencia de esta posible interacción BUB1-SGO1, la interferencia de la proteína BUB1 en células HeLa, provoca la separación prematura de las cromátidas hermanas en profase (Tang *et al.*, 2004). Este fenotipo se asemeja al observado para los mutantes *Sgo2^{-/-}* en meiosis, donde se produce una separación prematura de las cromátidas hermanas provocando infertilidad en estos individuos (Llano *et al.*, 2008).



Esquema 7. Comparativa de la distribución de las principales proteínas de la RCI en las diferentes condiciones experimentales durante metafase-I.

Representación gráfica de la distribución de las proteínas H2AT120ph, H3T3ph, SGO2, MCAKph y las quinasas Aurora A y Aurora B/C (Aurora Tph) en un bivalente autosómico y el bivalente sexual (XY) durante metafase-I.

Por otro lado, en las metafases-II *Bub1^{KD/KD}* observamos problemas en la redistribución de SGO2 desde el DCI a los cinetocoros (Esquemas 7 y S3). Esta redistribución dependiente de tensión, descrita tanto en mitosis (Haase *et al.*, 2012), como en meiosis (Gomez *et al.*, 2007) parece ser necesaria para dejar expuestos los CC para su degradación por Separasa en la transición metafase-II/anafase-II (Kitajima *et al.*, 2004). Sin embargo, en las metafases-II *Bub1^{KD/KD}* no se observa una correcta redistribución de la pequeña cantidad de SGO2 que queda en el DCI. Este hecho podría deberse a la ausencia de H2AT120ph, la cual en mitosis parece estar implicada en la redistribución de SGO1 (Haase *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013), pudiendo ser necesaria del mismo modo para la redistribución de SGO2 en la meiosis-II. Además, la permanencia de SGO2 en la región central del DCI entre las cromátidas hermanas, podría estar evitando la degradación de los CC, impidiendo así la correcta transición metafase-II/anafase-II (Esquema S3). Este fenómeno podría compararse con el incremento en la protección de los CC en brazos de cromosomas mitóticos descrito en células somáticas cuando SGO1 queda redistribuida a brazos en ausencia de BUB1 (Kitajima *et al.*, 2005) o de su actividad quinasa mediante inhibidores químicos (Baron *et al.*, 2016).

3.1.2. Problemas de alineamiento y segregación en metafases-I y -II

Los espermatocitos *Bub1^{KD/KD}* presentan problemas de alineamiento tanto en metafase-I como en metafase-II. Este incremento en errores de alineamiento podría deberse a la alteración en la estructura del DCI en estos mutantes y, en concreto, a la alteración en la distribución de la proteína MCAK y el complejo CPC (Esquemas 7 y 8), ambos implicados en la regulación del alineamiento de los cromosomas (Moore y Wordeman, 2004; Illingworth *et al.*, 2010). En las metafases-I *Bub1^{KD/KD}*, tanto MCAK como el CPC quedan reducidos en el centrómero y aparecen redistribuidas en el DI de los bivalentes, del mismo modo que SGO2. Dado que MCAK es reclutada al DCI por SGO2 tanto en mitosis como en meiosis (Huang *et al.*, 2007; Llano *et al.*, 2008; Tanno *et al.*, 2010; Rattani *et al.*, 2013), la alteración del patrón de distribución de MCAK resulta esperable en estos mutantes. A su vez, la actividad de MCAK como quinesina depolimerizadora de MTs puede verse afectada por la alteración en la distribución de Aurora B/C, como ocurre en mitosis (Andrews *et al.*, 2004). En el caso del CPC, la alteración de su patrón de distribución de manera similar a la de SGO2, nos indica su dependencia con respecto a la presencia de SGO2 en el centrómero, de la misma manera que ocurre en mitosis entre SGO1 y el CPC (Kawashima *et al.*, 2007; Vanoosthuyse *et al.*, 2007). Dado que H3T3ph no muestra

alterada su distribución en los mutantes *Bub1^{KD/KD}*, su presencia y, por ende, la actividad quinasa de Haspina, parece centrarse en el reclutamiento del CPC al DCI pero no en su mantenimiento, donde SGO2 parece ser el principal responsable. Por tanto, la disminución de Aurora B/C y MCAK a nivel del centrómero en estos mutantes, podría estar afectando a la correcta unión de los MTs al cinetocoro y, en consecuencia, en la biorientación de los bivalentes/cromosomas en la placa ecuatorial en meiosis como ocurre en mitosis al alterar la distribución de Aurora B (Lampson y Cheeseman, 2011; Carmena *et al.*, 2012; Krenn y Musacchio, 2015; Shao *et al.*, 2015). Estos resultados podrían explicar el aumento en el número de metafases-I y -II desalineadas, las cuales podrían llegar no obstante a alinear y segregarse correctamente sus cromosomas. Sin embargo, nuestra metodología no nos permite demostrar si ese alineamiento tarda más tiempo en ocurrir en comparación con individuos WT y es por ello que se observa un mayor porcentaje de metafases-I y -II desalineadas. Además, la presencia de retrasos en las segregaciones de los cromosomas/cromátidas podría estar relacionada tanto con fallos en el anclaje MTs-cinetocoro debidos a la disminución de Aurora B/C y MCAK en los centrómeros y, por tanto, reducción de su actividad; como con los fallos en la degradación de los CC por los problemas en la redistribución de SGO2 a los cinetocoros (Esquemas 7, 8 y S3).

Del mismo modo que el reclutamiento de los CPC aparece alterado a nivel de los centrómeros en los mutantes *Bub1^{KD/KD}*, hemos detectado problemas en la redistribución de este complejo al cuerpo medio, pudiendo afectar al proceso de citocinesis. En este sentido, se ha descrito en mitosis que la presencia de alteraciones en la distribución de las proteínas del CPC en los centrómeros inducen problemas de alineamiento, mientras que los errores en la redistribución del CPC al cuerpo medio desembocan en citocinesis incompletas que dan lugar a células hijas poliploides (Honda *et al.*, 2003; Vader *et al.*, 2006; Steigemann *et al.*, 2009; Carmena *et al.*, 2012; Kitagawa y Lee, 2015; Afonso *et al.*, 2017). Estos datos podrían explicar la formación en estos individuos *Bub1^{KD/KD}* de espermatocitos secundarios diploides y espermátidas aberrantes (Esquema S4).

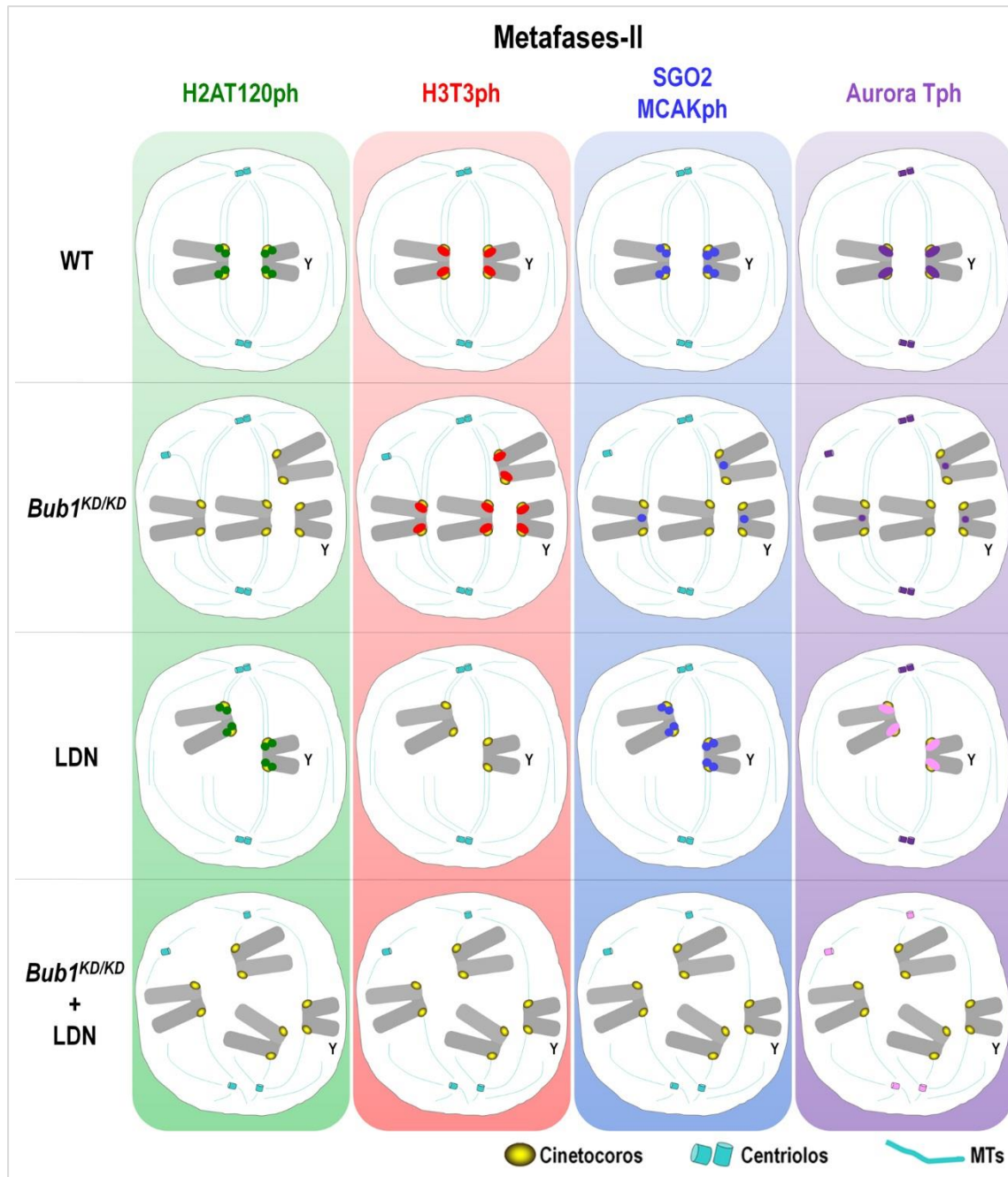
3.1.3. [Espermatocitos secundarios diploides y espermátidas aberrantes](#)

Como consecuencia de los problemas de alineamiento, segregación y, posiblemente, citocinesis en el transcurso de la meiosis, los individuos *Bub1^{KD/KD}* producen espermátidas aberrantes. Estas espermátidas redondas aberrantes podrían ser el resultado de errores de segregación y/o fallos en la citocinesis durante la meiosis-I y -II. En el caso de los espermatocitos

Bub1^{KD/KD}, observamos la formación de espermátocitos secundarios diploides. A su vez, parte de los espermátocitos secundarios diploides presentan alteraciones en el número de centrosomas, del mismo modo que ocurre en las células poliploides como consecuencia de una citocinesis incompleta (Storchova y Kuffer, 2008; Cortez *et al.*, 2016). Estos espermátocitos secundarios diploides, que presentan una carga de ADN cuádruple ($2n, 4C$) y con alteración en el número de centrosomas, podrían tener problemas para segregarse y, por tanto, volver a sufrir una citocinesis incompleta, generándose así las espermátidas cuádruples ($2n, 4C$). Sin embargo, la mayor parte de las espermátidas aberrantes observadas son de menor tamaño, las denominadas dobles. Estas espermátidas presentan una carga de ADN doble ($2C$), las cuales parecen ser el resultado de errores en la meiosis-I o en la meiosis-II. Por un lado, tras una citocinesis incompleta durante la primera división meiótica, los cromosomas de los espermátocitos secundarios diploides podrían ser capaces de continuar con la meiosis, alinearse en placa y sufrir una segunda división ecuacional dando lugar, de este modo, a espermátidas diploides ($2n$) con 40 cromátidas ($2C$). Sin embargo, la formación de las espermátidas dobles podría ser debido a fallos en la meiosis-II tras una correcta primera división. En este sentido, se formarían espermátidas dobles formadas por 20 cromosomas cada uno con dos cromátidas ($n, 2C$). En esta segunda división, además de problemas de alineamiento, observamos errores en la redistribución de las proteínas del DCI a pesar de que los cinetocoros están sometidos a tensión. En este sentido, la incapacidad de la proteína SGO2 para redistribuirse, podría ser la principal causa de la formación de estas espermátidas aberrantes dobles. Si SGO2 permanece protegiendo los CC de su degradación, las cromátidas hermanas tendrán problemas para separarse dando lugar a segregaciones colapsadas. Este hecho, junto con la alteración en la distribución de la Aurora B/C tanto a nivel del centrómero como del cuerpo medio, podrían ser las causas de la formación de las espermátidas haploides dobles ($n, 2C$) (Esquema S4).

Teniendo en cuenta todos los resultados, podemos concluir por un lado que los problemas de alineamiento que aparecen durante las dos divisiones meióticas en los mutantes *Bub1^{KD/KD}* parecen ser debidos a la alteración en la distribución de MCAK y del CPC. Mientras que, por otro lado, la presencia de espermátidas aberrantes, podrían deberse a fallos en la segregación por no poder separar correctamente los cromosomas a causa de la redistribución de SGO2 a brazos en metafase-I, pero principalmente por la no redistribución de SGO2 en metafase-II (Esquema S4).

Finalmente, tras el análisis del fenotipo meiótico en espermatocitos *Bub1^{KD/KD}* podemos afirmar que una de las causas de la subfertilidad de estos individuos, discutida con anterioridad por Ricke *et al.* (2012), pero cuya explicación citológica no ha sido presentada hasta ahora, parece deberse a la formación de espermátidas redondas aberrantes.



Esquema 8. Comparativa de la distribución de las principales proteínas de la RCI en las diferentes condiciones experimentales durante metafase-II.

Representación gráfica de la distribución de las proteínas H2AT120ph, H3T3ph, SGO2, MCAKph y las quinasas Aurora A y Aurora B/C (Aurora Tph) en un autosoma y en el cromosoma Y durante metafase-II.

3.2. *BUB1*^{KD/KD}: EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD QUINASA DE BUB1 EN OOCITOS

A diferencia de lo que ocurre en espermatocitos, la ausencia de actividad quinasa de BUB1 en los oocitos *Bub1*^{KD/KD} parece afectar de manera parcial al SAC meiótico, observándose una disminución del número de oocitos capaces de segregarse durante la meiosis-I. Estos datos, apoyarían la hipótesis sobre la implicación de la actividad quinasa de BUB1 en las funciones del SAC en oocitos de ratón, pero no en espermatocitos.

Del mismo modo que en las células MEFs y en los espermatocitos de individuos *Bub1*^{KD/KD}, la actividad quinasa de BUB1 parece ser la responsable de generar la variante H2AT120ph también en oocitos (Ricke *et al.*, 2012). Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre en mitosis y en espermatocitos, las proteínas SGO2 y Aurora B/C no muestran alterada su distribución en metafase-I, aunque la cantidad de SGO2 en el cinetocoro se ve reducida a la mitad. De este modo, en los oocitos *Bub1*^{KD/KD} el reclutamiento de SGO2 a los cinetocoros parece ser independiente de la variante H2AT120ph. Estos datos demuestran que existen divergencias en la RCI entre machos y hembras. En este sentido, la meiosis en hembras podría presentar un mayor grado de regulación al tener que asegurarse la correcta generación de unos pocos óvulos por ciclo menstrual.

Todos los resultados presentados en esta Tesis Doctoral sobre el estudio de oocitos *Bub1*^{KD/KD}, junto con los obtenidos por el equipo de la Dra. Wassmann, han sido recopilados en un artículo de investigación que lleva por título "*Mps1 kinase-dependent Sgo2 centromere localization mediates cohesin protection in mouse oocyte meiosis I*" que está en proceso de revisión. Dicho artículo se presenta como Anexo por si pudiera esclarecer alguno de los resultados que, por problemas de espacio, no han podido discutirse en esta Tesis.

3.3. EFECTO DE LA INHIBICIÓN QUÍMICA DE LA ACTIVIDAD QUINASA DE HASPINA EN CULTIVOS DE TÚBULOS SEMINÍFEROS

3.3.1. Problemas de alineamiento y reclutamiento de Aurora B/C

Para conocer el efecto de la inhibición de la quinasa Haspina en la RCI utilizamos el inhibidor químico LDN-192960 (Wang *et al.*, 2012) sobre los cultivos de túbulos seminíferos de ratones WT. A partir de este estudio observamos que, al igual que en células somáticas, la ausencia de la variante H3T3ph parece afectar al alineamiento de los cromosomas (Dai *et al.*, 2005; Wang

et al., 2010), tanto en metafase-I como en metafase-II (Esquemas 7 y 8). Del mismo modo que ocurre en mitosis y en la meiosis-I de oocitos, estos problemas de alineamiento parecen estar directamente relacionados con una disminución en los centrómeros de la quinasa Aurora B/C (Wang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012). Sin embargo, a pesar de no haber H3T3ph, parte de Aurora B/C queda acumulada en el centrómero, del mismo modo que ocurre en oocitos de ratón (Nguyen *et al.*, 2014), demostrándose así que H3T3ph no es la única vía de reclutamiento del CPC al DCI en la meiosis de ratón. De hecho, se ha propuesto en mitosis la participación conjunta de H3T3ph y H2AT120ph para el reclutamiento y mantenimiento del CPC en el DCI (Yamagishi *et al.*, 2010; Kawashima *et al.*, 2010). En este sentido, las proteínas H2AT120ph y SGO2 se muestran intactas en ausencia de la actividad quinasa de Haspina en espermatocitos de ratón. Sin embargo, existen estudios contradictorios sobre la dependencia entre Haspina y SGO1 en mitosis. En células humanas U2OS se ha descrito que Aurora B, y no Haspina, es necesaria para el reclutamiento de SGO1 al centrómero (Dai *et al.*, 2006), mientras que Wang *et al.* (2011) relacionan directamente a Haspina con el reclutamiento de SGO1 en células HeLa. A su vez, se ha descrito en mitosis que tanto la presencia de H2AT120ph como la de SGO2, son necesarias para el reclutamiento del CPC en el DCI (Kawashima *et al.*, 2007; Vanoosthuysse *et al.*, 2007; Yamagishi *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta que ambas proteínas de la vía BUB1 están presentes en el centrómero en ausencia de la actividad de Haspina, nosotros proponemos que podrían ejercer como factores para el reclutamiento y/o mantenimiento del CPC en los centrómeros en meiosis.

3.3.2. Alteración en el número de polos celulares

Tanto en las metafases-I como en las metafases-II hemos detectado alteraciones en el número de polos celulares tras el tratamiento con LDN (Esquemas 7 y 8). Este fenotipo a nivel de centrosomas en ausencia de la actividad quinasa de Haspina ha sido descrito en células somáticas (Dai *et al.*, 2009), afectando así al correcto establecimiento del MTOC en oocitos de ratón (Balboula *et al.*, 2016). Dada la relación de Haspina con PLK1 (Zhou *et al.*, 2014), la cual participa en la regulación de la dinámica de los centrosomas en mitosis (Schmucker y Sumara, 2014), nuestros resultados tanto a nivel de localización en los polos en metafases-I y -II de espermatocitos como a nivel funcional aportaría indicios sobre una posible participación de Haspina en la regulación de la dinámica de los polos/centrosomas en la meiosis de ratón. A su vez, se ha observado la presencia de cohesinas y proteínas reguladoras de cohesinas en los polos

celulares de células somáticas en división (Gregson *et al.*, 2001; Dai *et al.*, 2009; Schockel *et al.*, 2011). En este sentido, se ha descrito en células somáticas con Haspina inhibida la presencia de múltiples focos acentriolares denominados centrosomas-like (Dai *et al.*, 2009). Este resultado sería similar a la formación de varios focos MTOC en oocitos de ratón (Balboula *et al.*, 2016). Para completar este estudio sobre el papel de Haspina en la dinámica de los polos celulares/centrosomas, se realizarán análisis complementarios futuros que verificarán si en espermatoцитos de ratón se ve alterada la duplicación de los centrosomas o si se trata de focos acentriolares.

3.3.3. Efecto de la doble inhibición de las quinasas BUB1 y Haspina en cultivos de túbulos seminíferos

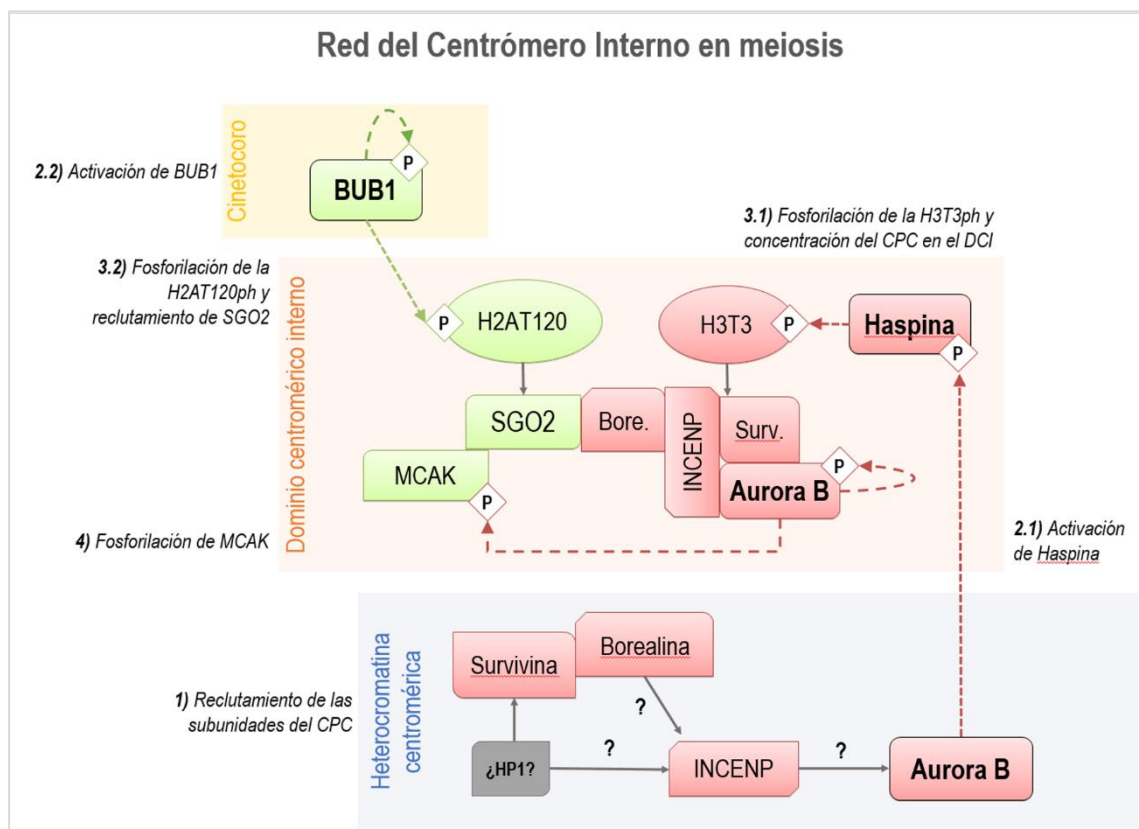
Finalmente, para inferir la función de ambas H-PTMs, H2AT120ph y H3T3ph, en la RCI, inhibimos la actividad de la quinasa Haspina en los túbulos seminíferos *Bub1^{KD/KD}*. En este último estudio comprobamos que la doble inhibición de las principales quinasas de la RCI, BUB1 y Haspina, provoca efectos más graves que la inhibición de cada una de las quinasas por separado.

Por un lado, la ausencia de las dos H-PTMs provoca la alteración del DCI, corroborando así que ambas H-PTMs son necesarias para el establecimiento del DCI en meiosis (Esquemas 7 y 8), del mismo modo que ocurre en mitosis (Yamagishi *et al.*, 2010). La ausencia de las proteínas efectoras de la RCI (SGO2 y Aurora B/C) por la ausencia de ambas H-PTMs demostraría la interdependencia de ambas proteínas efectoras a nivel del centrómero en meiosis, al igual que ocurre en mitosis (Rivera y Losada, 2006; Vanoosthuysen *et al.*, 2007; Kawashima *et al.*, 2010; Yamagishi *et al.*, 2010; Rivera *et al.*, 2012). Sin embargo, estos experimentos no son suficientes para poder concretar la relación exacta entre SGO2 y Aurora B/C en espermatoцитos de ratón, a menos que tengamos en cuenta los datos obtenidos en el análisis del mutante *Sgo2^{-/-}*, el cual, por problemas de espacio, no hemos podido incluir en esta Tesis Doctoral (Fig. S7). En este análisis observamos que en ausencia de SGO2, ninguna de las H-PTMs se ven afectadas, pero sí Aurora B/C, cuya señal en el DCI disminuye y se deslocaliza a los brazos cromosómicos en metafase-I, del mismo modo que en mitosis (Yamagishi *et al.*, 2010; Ricke *et al.*, 2012) y en oocitos *Sgo2^{-/-}* (Rattani *et al.*, 2013). Por tanto, nuestros resultados corroboran que en la meiosis de ratón, Aurora B/C necesita la presencia de SGO2 y no la de H2AT120ph para reclutarse y/o mantenerse en el DCI. Por otro lado, se ha descrito en mitosis que la localización de SGO1 está mediada por la presencia de proteínas como MAD2 y BUB1 en el centrómero (Williams *et al.*,

2017). Sin embargo, nuestros datos muestran que en espermatoцитos de ratón, la ausencia de las dos H-PTMs no parece afectar a la localización de BUB1 pero sí a la localización de SGO2 (Fig. S6). Este resultado indica que la presencia en el centrómero de proteínas como BUB1 no parece tener la misma relevancia en el reclutamiento de SGO2 en meiosis que en el reclutamiento de SGO1 en mitosis.

4. Modelo de reclutamiento e interacción de las proteínas de la RCI en la meiosis de ratón

En base a los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, hemos diseñado un modelo sencillo de reclutamiento e interacción de las proteínas de la RCI en la meiosis de machos de ratón que más se ajusta a las observaciones citológicas aquí mostradas.



Esquema 9. Modelo de establecimiento de la RCI en la meiosis de ratón.

Representación gráfica de las posibles interacciones entre los miembros de las vías de señalización de la RCI y su localización relativa en el centrómero en la meiosis de machos de ratón. Se indican con números (1-4) el orden propuesto de las diferentes interacciones. **1)** Reclutamiento de las subunidades del CPC a la HC. **2)** Activación de las quinasas Haspina (2.1) y BUB1 (2.2). **3)** Generación de las H-PTMs, H3T3ph (3.1) y H2AT120ph (3.2). **4)** Reclutamiento y fosforilación de MCAKph.

Al principio de la etapa de paquitena, Survivina y Borealina son reclutadas a la HC. De manera simultánea, la quinasa Haspina junto con la proteína INCENP, aparecen localizadas en los CS de todos los bivalentes pudiendo participar en la regulación de los CC. Al final de esta etapa, Haspina comienzan a acumularse en el DCI y la quinasa BUB1 es reclutada en los cinetocoros, donde podría comenzar a actuar como plataforma para el reclutamiento de otras proteínas. Al comienzo de diplotena, tanto Haspina como INCENP comienzan a deslocalizarse del CS, quedando INCENP redistribuido en la HC, actuando como plataforma para el reclutamiento de Aurora B/C. Al final de diplotena, BUB1 se activa incrementándose la cantidad de proteína en el cinetocoro desde donde genera la variante H2AT120ph en el DCI e, inmediatamente, SGO2 es reclutada. Al mismo tiempo, la quinasa Aurora B/C se activa y comienza a fosforilar a Haspina promoviendo su activación. Una vez activa, en diacinesis, Haspina genera la variante H3T3ph en el DCI, promoviéndose así la concentración del CPC desde la HC al DCI. Una vez en el DCI, la quinasa Aurora B/C se autofosforila y actúa sobre la proteína SGO2 (Rattani *et al.*, 2013; Tanno *et al.*, 2015), permitiendo su interacción con MCAK (Llano *et al.*, 2008). Inmediatamente, MCAK es presumiblemente activada por la acción de Aurora B/C. Una vez establecidos ambos complejos SGO2-MCAKph y CPC-Aurora B/Cph en el DCI, comenzarán a actuar regulando la cohesión y el alineamiento de los bivalentes y cromosomas (Esquemas 6 y 9).

C O N C L U S I O N S

Conclusions

All issues considered, the results shown within this Thesis allow us to conclude the following:

Related to the establishment of the BUB1 and Haspin signaling pathways:

- 1) The recruitment of the BUB1 pathway proteins to the centromeres during mouse meiosis presents a similar pattern to mitosis. During male mouse meiosis BUB1 is the first protein to be recruited to the kinetochores, then the histone variant H2AT120ph is detected at the ICD and finally, the effector proteins SGO2 and MCAK colocalize with H2AT120ph at the ICD at metaphase-I and metaphase-II.
- 2) During mouse meiosis, the distribution pattern of Haspin pathway proteins to the centromeres shows a similar pattern to mitosis. First of all, the CPC proteins are recruited to the centromeric heterochromatin during prophase-I. Once the CPC is recruited to the centromeric heterochromatin, Haspin kinase generates the H3T3ph variant at the ICD, regulating the recruitment of the CPC to the centromeres. When the CPC is located at the ICD it regulates the bivalent and chromosome congression, alignment and segregation during both meiotic divisions. However, the CPC proteins present a different recruitment order to the centromeric heterochromatin than that observed in mitosis, being Survivin and Borealin the first subunits to be recruited in male mouse meiosis.
- 3) The kinase Haspin appears at the synaptonemal complex during pachytene where it could be playing a role in the synapsis and/or cohesion processes. Haspin is located at the ICD during metaphase-I and metaphase-II, which is consistent with the CPC pattern. Haspin also appears at the cell poles in both divisions, where it could participate in the centrosomes dynamics during male mouse meiosis.

Related to the interaction between Inner Centromere Network pathways:

- 4) BUB1 kinase activity and by consequence, the H2AT120ph generation at the centromeres, are necessary for the accurate SGO2 and CPC recruitment to the ICD during male mouse meiosis. The H2AT120ph absence leads to chromosome congression and segregation alterations during both meiotic divisions. Moreover, SGO2

redistribution from the ICD to the kinetochores is abolished in secondary spermatocytes, which could prevent the accurate sister chromatid separation during anaphase II.

- 5) The absence of BUB1 kinase activity leads to errors in both meiotic divisions and by consequence, to the production of 24% of aberrant doubled spermatids with 2C DNA charge. The generation of those aberrant spermatids seems to be the main reason of male *Bub1*^{KD/KD} subfertility.
- 6) The absence of Haspin kinase activity and therefore, the generation of H3T3ph, is necessary for the accurate CPC recruitment to the ICD in meiosis. The absence of H3T3ph causes chromosome misalignments and cell poles dynamic failures during both meiotic divisions.
- 7) The CPC recruitment to the ICD seems to be H3T3ph- and SGO2-dependent, but H2AT120ph-independent, while SGO2 recruitment is H3T3ph-independent along with H2AT120ph and other factors-dependent, being the role of that alternative pathway more relevant in female meiosis than in male meiosis.
- 8) Finally, the interplay between the two signaling pathways of the Inner Centromere Network is necessary for SGO2 and CPC recruitment, allowing the accurate male mouse meiosis progression.

C O N C L U S I O N E S

Conclusiones

El conjunto de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral nos ha permitido establecer las siguientes conclusiones:

Con respecto al ensamblaje en el centrómero de las proteínas de las vías de señalización BUB1 y Haspina:

- 1) El reclutamiento al DCI de las proteínas de la vía de señalización de BUB1 durante la meiosis de ratón sigue un patrón similar al propuesto en mitosis, siendo BUB1 la primera proteína en reclutarse en los cinetocoros, la variante H2AT120ph la siguiente en aparecer en el DCI y, a continuación, las proteínas efectoras SGO2 y MCAK, las cuales colocalizan con H2AT120ph en el DCI tanto en metafase-I como en metafase-II.
- 2) La distribución de las proteínas de la ruta de señalización de Haspina en los centrómeros durante la meiosis de ratón sigue un patrón similar al propuesto en mitosis. En primer lugar, las proteínas del CPC son reclutadas durante la profase-I a la heterocromatina centromérica. Una vez reclutado el CPC en los centrómeros, la quinasa Haspina genera la variante H3T3ph, la cual actúa como señal para la concentración del CPC al DCI en diacinesis, desde donde regulará la congregación, el alineamiento y la segregación de los bivalentes y cromosomas durante las dos divisiones meióticas. Sin embargo, el orden de reclutamiento de los componentes del CPC a la heterocromatina centromérica difiere con respecto al observado en células somáticas, siendo las subunidades Borealina y Survivina las primeras en reclutarse en la meiosis masculina de ratón.
- 3) La quinasa Haspina aparece en el CS en paquítena pudiendo estar implicada en los procesos de sinapsis y/o cohesión. Haspina se localiza en el DCI tanto en metafase-I como en metafase-II, siendo por tanto congruente su localización con respecto a las proteínas del CPC. Haspina también se localiza en los polos celulares en ambas divisiones pudiendo participar en la dinámica de los centrosomas durante la meiosis de ratón.

Con respecto a la interacción de las vías de señalización de la RCI:

- 4) La actividad quinasa de BUB1 y, por tanto, la generación de la modificación H2AT120ph, es necesaria para el correcto reclutamiento de SGO2 y del CPC al DCI en la meiosis de ratón.

La ausencia de H2AT120ph promueve alteraciones en los procesos de congresión y segregación cromosómica durante las dos divisiones meióticas. Además, en espermatocitos secundarios se impide la redistribución de SGO2 desde el DCI a los cinetocoros durante la congresión cromosómica pudiendo impedir la correcta degradación de los complejos de cohesina centroméricos y, por tanto, alterando la separación de las cromátidas hermanas durante la segunda división meiótica.

- 5) La ausencia de la actividad quinasa de BUB1 promueve fallos en las dos divisiones meióticas induciendo la aparición de un 24% de espermátidas aberrantes dobles con carga 2C, las cuales parecen ser la principal causa de la subfertilidad encontrada en los machos *Bub1^{KD/KD}*.
- 6) La actividad quinasa de Haspina y, por tanto, la generación de la variante H3T3ph, es necesaria para el correcto reclutamiento del CPC al DCI durante la meiosis. La ausencia de H3T3ph provoca fallos en el alineamiento cromosómico y en la dinámica de los polos celulares durante las dos divisiones meióticas.
- 7) El reclutamiento del CPC al DCI parece ser dependiente de H3T3ph y de SGO2, pero no de la modificación H2AT120ph, mientras que el reclutamiento de SGO2 es independiente de la presencia de H3T3ph, y parece estar regulado por la modificación H2AT120ph y otros factores, siendo de mayor relevancia el papel de esta vía alternativa en la meiosis de hembras que en la de machos de ratón.
- 8) Por último, la intersección de las dos vías de señalización que componen la RIC es necesaria para el reclutamiento de SGO2 y el CPC, permitiendo así la correcta progresión de la meiosis masculina de ratón.

B I B L I O G R A F Í A

Bibliografía

Afonso, O., A. C. Figueiredo and H. Maiato (2017). Late mitotic functions of Aurora kinases. *Chromosoma* 126(1): 93-103.

Aihara, H., T. Nakagawa, K. Yasui, T. Ohta, S. Hirose, N. Dhomae, K. Takio, M. Kaneko, Y. Takeshima, M. Muramatsu and T. Ito (2004). Nucleosomal histone kinase-1 phosphorylates H2A Thr 119 during mitosis in the early *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 18(8): 877-888.

Ainsztein, A. M., S. E. Kandels-Lewis, A. M. Mackay and W. C. Earnshaw (1998). INCENP centromere and spindle targeting: identification of essential conserved motifs and involvement of heterochromatin protein HP1. *J Cell Biol* 143(7): 1763-1774.

Andrews, P. D., Y. Ovechkina, N. Morrice, M. Wagenbach, K. Duncan, L. Wordeman and J. R. Swedlow (2004). Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev Cell* 6(2): 253-268.

Asghar, A., A. Lajeunesse, K. Dulla, G. Combes, P. Thebault, E. A. Nigg and S. Elowe (2015). Bub1 autophosphorylation feeds back to regulate kinetochore docking and promote localized substrate phosphorylation. *Nat Commun* 6: 8364.

Assou, S., T. Anahory, V. Pantesco, T. Le Carrou, F. Pellestor, B. Klein, L. Reyftmann, H. Dechaud, J. De Vos and S. Hamamah (2006). The human cumulus--oocyte complex gene-expression profile. *Hum Reprod* 21(7): 1705-1719.

Baarends, W. M., E. Wassenaar, R. van der Laan, J. Hoogerbrugge, E. Sleddens-Linkels, J. H. Hoeijmakers, P. de Boer and J. A. Grootegoed (2005). Silencing of unpaired chromatin and histone H2A ubiquitination in mammalian meiosis. *Mol Cell Biol* 25(3): 1041-1053.

Baker, D. J., F. Jin, K. B. Jeganathan and J. M. van Deursen (2009). Whole chromosome instability caused by Bub1 insufficiency drives tumorigenesis through tumor suppressor gene loss of heterozygosity. *Cancer Cell* 16(6): 475-486.

Balboula, A. Z., A. L. Nguyen, A. S. Gentilello, S. M. Quartuccio, D. Drutovic, P. Solc and K. Schindler (2016). Haspin kinase regulates microtubule-organizing center clustering and stability through Aurora kinase C in mouse oocytes. *J Cell Sci* 129(19): 3648-3660.

Balboula, A. Z. and K. Schindler (2014). Selective disruption of aurora C kinase reveals distinct functions from aurora B kinase during meiosis in mouse oocytes. *PLoS Genet* 10(2): e1004194.

Baron, A. P., C. von Schubert, F. Cubizolles, G. Siemeister, M. Hitchcock, A. Mengel, J. Schroder, A. Fernandez-Montalvan, F. von Nussbaum, D. Mumberg and E. A. Nigg (2016). Probing the catalytic functions of Bub1 kinase using the small molecule inhibitors BAY-320 and BAY-524. *Elife* 5.

Berdnik, D. and J. A. Knoblich (2002). *Drosophila* Aurora-A is required for centrosome maturation and actin-dependent asymmetric protein localization during mitosis. *Curr Biol* 12(8): 640-647.

Berruti, G. (2016). Towards defining an 'origin'-The case for the mammalian acrosome. *Semin Cell Dev Biol* 59: 46-53.

Bhaumik, S. R., E. Smith and A. Shilatifard (2007). Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 14(11): 1008-1016.

Biswas, U., K. Hempel, E. Llano, A. Pendas and R. Jessberger (2016). Distinct Roles of Meiosis-Specific Cohesin Complexes in Mammalian Spermatogenesis. *PLoS Genet* 12(10): e1006389.

Blower, M. D., B. A. Sullivan and G. H. Karpen (2002). Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans. *Dev Cell* 2(3): 319-330.

Bolanos-Garcia, V. M. (2005). Aurora kinases. *Int J Biochem Cell Biol* 37(8): 1572-1577.

Bolanos-Garcia, V. M. and T. L. Blundell (2011). BUB1 and BUBR1: multifaceted kinases of the cell cycle. *Trends Biochem Sci* 36(3): 141-150.

Borum, K. (1961). Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Exp Cell Res* 24: 495-507.

Caldas, G. V. and J. G. DeLuca (2014). KNL1: bringing order to the kinetochore. *Chromosoma* 123(3): 169-181.

Carmena, M. and W. C. Earnshaw (2003). The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(11): 842-854.

Carmena, M., M. Wheelock, H. Funabiki and W. C. Earnshaw (2012). The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(12): 789-803.

Carretero, M., M. Ruiz-Torres, M. Rodriguez-Corsino, I. Barthelemy and A. Losada (2013). Pds5B is required for cohesion establishment and Aurora B accumulation at centromeres. *EMBO J* 32(22): 2938-2949.

Cerutti, H. and J. A. Casas-Mollano (2009). Histone H3 phosphorylation: universal code or lineage specific dialects? *Epigenetics* 4(2): 71-75.

Cooke, C. A., M. M. Heck and W. C. Earnshaw (1987). The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *J Cell Biol* 105(5): 2053-2067.

Cortez, B. A., P. Rezende-Teixeira, S. Redick, S. Doxsey and G. M. Machado-Santelli (2016). Multipolar mitosis and aneuploidy after chrysolite treatment: a consequence of abscission failure and cytokinesis regression. *Oncotarget* 7(8): 8979-8992.

Cuny, G. D., N. P. Ulyanova, D. Patnaik, J. F. Liu, X. Lin, K. Auerbach, S. S. Ray, J. Xian, M. A. Glicksman, R. L. Stein and J. M. Higgins (2012). Structure-activity relationship study

of beta-carboline derivatives as haspin kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 22(5): 2015-2019.

Cheeseman, I. M., J. S. Chappie, E. M. Wilson-Kubalek and A. Desai (2006). The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell* 127(5): 983-997.

Cheeseman, I. M. and A. Desai (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(1): 33-46.

Churikov, D., I. A. Zalenskaya and A. O. Zalensky (2004). Male germline-specific histones in mouse and man. *Cytogenet Genome Res* 105(2-4): 203-214.

Dai, J. and J. M. Higgins (2005). Haspin: a mitotic histone kinase required for metaphase chromosome alignment. *Cell Cycle* 4(5): 665-668.

Dai, J., A. V. Kateneva and J. M. Higgins (2009). Studies of haspin-depleted cells reveal that spindle-pole integrity in mitosis requires chromosome cohesion. *J Cell Sci* 122(Pt 22): 4168-4176.

Dai, J., S. Sultan, S. S. Taylor and J. M. Higgins (2005). The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev* 19(4): 472-488.

Dai, J., B. A. Sullivan and J. M. Higgins (2006). Regulation of mitotic chromosome cohesion by Haspin and Aurora B. *Dev Cell* 11(5): 741-750.

Dalal, Y., T. Furuyama, D. Vermaak and S. Henikoff (2007). Structure, dynamics, and evolution of centromeric nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(41): 15974-15981.

De Antoni, A., S. Maffini, S. Knapp, A. Musacchio and S. Santaguida (2012). A small-molecule inhibitor of Haspin alters the kinetochore functions of Aurora B. *J Cell Biol* 199(2): 269-284.

DeLuca, J. G., W. E. Gall, C. Ciferri, D. Cimini, A. Musacchio and E. D. Salmon (2006). Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1. *Cell* 127(5): 969-982.

Di Cerbo, V. and R. Schneider (2013). Cancers with wrong HATs: the impact of acetylation. *Brief Funct Genomics* 12(3): 231-243.

Dobson, M. J., R. E. Pearlman, A. Karaiskakis, B. Spyropoulos and P. B. Moens (1994). Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J Cell Sci* 107 (Pt 10): 2749-2760.

Dumont, J. (2015). Aurora B/C in Meiosis: Correct Me If I'm Right. *Dev Cell* 33(5): 499-501.

Dunleavy, E. M., D. Roche, H. Tagami, N. Lacoste, D. Ray-Gallet, Y. Nakamura, Y. Daigo, Y. Nakatani and G. Almouzni-Pettinotti (2009). HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell* 137(3): 485-497.

Dutta, S., D. M. Burks and M. E. Pepling (2016). Arrest at the diplotene stage of meiotic prophase I is delayed by progesterone but is not required for primordial follicle formation in mice. *Reprod Biol Endocrinol* 14(1): 82.

Earnshaw, W. C. (2015). Discovering centromere proteins: from cold white hands to the A, B, C of CENPs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16(7): 443-449.

Earnshaw, W. C. and R. L. Bernat (1991). Chromosomal passengers: toward an integrated view of mitosis. *Chromosoma* 100(3): 139-146.

Earnshaw, W. C. and B. R. Migeon (1985). Three related centromere proteins are absent from the inactive centromere of a stable isodicentric chromosome. *Chromosoma* 92(4): 290-296.

Earnshaw, W. C. and N. Rothfield (1985). Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma* 91(3-4): 313-321.

Eberharter, A. and P. B. Becker (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep* 3(3): 224-229.

Elowe, S. (2011). Bub1 and BubR1: at the interface between chromosome attachment and the spindle checkpoint. *Mol Cell Biol* 31(15): 3085-3093.

Eyers, P. A., M. E. Churchill and J. L. Maller (2005). The Aurora A and Aurora B protein kinases: a single amino acid difference controls intrinsic activity and activation by TPX2. *Cell Cycle* 4(6): 784-789.

Fernandez-Capetillo, O., S. K. Mahadevaiah, A. Celeste, P. J. Romanienko, R. D. Camerini-Otero, W. M. Bonner, K. Manova, P. Burgoyne and A. Nussenzweig (2003). H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell* 4(4): 497-508.

Fernandez-Miranda, G., M. Trakala, J. Martin, B. Escobar, A. Gonzalez, N. B. Ghyselinck, S. Ortega, M. Canamero, I. Perez de Castro and M. Malumbres (2011). Genetic disruption of aurora B uncovers an essential role for aurora C during early mammalian development. *Development* 138(13): 2661-2672.

Fernius, J. and K. G. Hardwick (2007). Bub1 kinase targets Sgo1 to ensure efficient chromosome biorientation in budding yeast mitosis. *PLoS Genet* 3(11): e213.

Flechon, J. E. (2016). The acrosome of eutherian mammals. *Cell Tissue Res* 363(1): 147-157.

Foltz, D. R. and P. T. Stukenberg (2012). A new histone at the centromere? *Cell* 148(3): 394-396.

Fullgrabe, J., E. Kavanagh and B. Joseph (2011). Histone onco-modifications. *Oncogene* 30(31): 3391-3403.

Gassmann, R., A. Carvalho, A. J. Henzing, S. Ruchaud, D. F. Hudson, R. Honda, E. A. Nigg, D. L. Gerloff and W. C. Earnshaw (2004). Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J Cell Biol* 166(2): 179-191.

Gervasi, M. G. and P. E. Visconti (2017). Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology* 5(2): 204-218.

Ghongane, P., M. Kapanidou, A. Asghar, S. Elowe and V. M. Bolanos-Garcia (2014). The dynamic protein Knl1 - a kinetochore rendezvous. *J Cell Sci* 127(Pt 16): 3415-3423.

Giet, R. and D. M. Glover (2001). *Drosophila* aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J Cell Biol* 152(4): 669-682.

Gomez, R., A. Valdeolmillos, M. T. Parra, A. Viera, C. Carreiro, F. Roncal, J. S. Rufas, J. L. Barbero and J. A. Suja (2007). Mammalian SGO2 appears at the inner centromere domain and redistributes depending on tension across centromeres during meiosis II and mitosis. *EMBO Rep* 8(2): 173-180.

Gomez, R., A. Viera, I. Berenguer, E. Llano, A. M. Pendas, J. L. Barbero, A. Kikuchi and J. A. Suja (2013). Cohesin removal precedes topoisomerase II α -dependent decatenation at centromeres in male mammalian meiosis II. *Chromosoma*.

Gopalan, G., C. S. Chan and P. J. Donovan (1997). A novel mammalian, mitotic spindle-associated kinase is related to yeast and fly chromosome segregation regulators. *J Cell Biol* 138(3): 643-656.

Gregson, H. C., J. A. Schmiesing, J. S. Kim, T. Kobayashi, S. Zhou and K. Yokomori (2001). A potential role for human cohesin in mitotic spindle aster assembly. *J Biol Chem* 276(50): 47575-47582.

Griswold, M. D. (2016). Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev* 96(1): 1-17.

Gu, L., Q. Wang and Q. Y. Sun (2010). Histone modifications during mammalian oocyte maturation: dynamics, regulation and functions. *Cell Cycle* 9(10): 1942-1950.

Guenatri, M., D. Bailly, C. Maison and G. Almouzni (2004). Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *J Cell Biol* 166(4): 493-505.

Guerra, M., G. Cabral, M. Cuacos, M. Gonzalez-Garcia, M. Gonzalez-Sanchez, J. Vega and M. J. Puertas (2010). Neocentrics and holokinetics (holocentrics): chromosomes out of the centromeric rules. *Cytogenet Genome Res* 129(1-3): 82-96.

Gutierrez-Caballero, C., Y. Herran, M. Sanchez-Martin, J. A. Suja, J. L. Barbero, E. Llano and A. M. Pendas (2011). Identification and molecular characterization of the mammalian alpha-kleisin RAD21L. *Cell Cycle* 10(9): 1477-1487.

Haase, J., A. Stephens, J. Verdaasdonk, E. Yeh and K. Bloom (2012). Bub1 kinase and Sgo1 modulate pericentric chromatin in response to altered microtubule dynamics. *Curr Biol* 22(6): 471-481.

Hayashi-Takanaka, Y., K. Yamagata, N. Nozaki and H. Kimura (2009). Visualizing histone modifications in living cells: spatiotemporal dynamics of H3 phosphorylation during interphase. *J Cell Biol* 187(6): 781-790.

Henikoff, S. and T. Furuyama (2012). The unconventional structure of centromeric nucleosomes. *Chromosoma* 121(4): 341-352.

Higgins, J. M. (2003). Structure, function and evolution of haspin and haspin-related proteins, a distinctive group of eukaryotic protein kinases. *Cell Mol Life Sci* 60(3): 446-462.

Higgins, J. M. (2010). Haspin: a newly discovered regulator of mitotic chromosome behavior. *Chromosoma* 119(2): 137-147.

Higgins, J. M. (2013). Chromosome segregation: learning to let go. *Curr Biol* 23(19): R883-885.

Honda, R., R. Korner and E. A. Nigg (2003). Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol Biol Cell* 14(8): 3325-3341.

Hori, T., M. Amano, A. Suzuki, C. B. Backer, J. P. Welburn, Y. Dong, B. F. McEwen, W. H. Shang, E. Suzuki, K. Okawa, I. M. Cheeseman and T. Fukagawa (2008). CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore. *Cell* 135(6): 1039-1052.

Hori, T. and T. Fukagawa (2012). Establishment of the vertebrate kinetochores. *Chromosome Res* 20(5): 547-561.

Huang, H., J. Feng, J. Famulski, J. B. Rattner, S. T. Liu, G. D. Kao, R. Muschel, G. K. Chan and T. J. Yen (2007). Tripin/hSgo2 recruits MCAK to the inner centromere to correct defective kinetochore attachments. *J Cell Biol* 177(3): 413-424.

Huertas, D., M. Soler, J. Moreto, A. Villanueva, A. Martinez, A. Vidal, M. Charlton, D. Moffat, S. Patel, J. McDermott, J. Owen, D. Brotherton, D. Krige, S. Cuthill and M. Esteller (2012). Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of the histone kinase Haspin. *Oncogene* 31(11): 1408-1418.

Illingworth, C., N. Pirmadjid, P. Serhal, K. Howe and G. Fitzharris (2010). MCAK regulates chromosome alignment but is not necessary for preventing aneuploidy in mouse oocyte meiosis I. *Development* 137(13): 2133-2138.

Ito, C. and K. Toshimori (2016). Acrosome markers of human sperm. *Anat Sci Int* 91(2): 128-142.

Ivanovska, I., T. Khandan, T. Ito and T. L. Orr-Weaver (2005). A histone code in meiosis: the histone kinase, NHK-1, is required for proper chromosomal architecture in *Drosophila* oocytes. *Genes Dev* 19(21): 2571-2582.

Javerzat, J. P. (2010). Molecular biology. Directing the centromere guardian. *Science* 327(5962): 150-151.

Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). Translating the histone code. *Science* 293(5532): 1074-1080.

Jeong, M. W., T. H. Kang, W. Kim, Y. H. Choi and K. T. Kim (2013). Mitogen-activated protein kinase phosphatase 2 regulates histone H3 phosphorylation via interaction with vaccinia-related kinase 1. *Mol Biol Cell* 24(3): 373-384.

Jin, H., M. Avey and H. G. Yu (2012). Is cohesin required for spindle-pole-body/centrosome cohesion? *Commun Integr Biol* 5(1): 26-29.

Jokelainen, P. T. (1967). The ultrastructure and spatial organization of the metaphase kinetochore in mitotic rat cells. *J Ultrastruct Res* 19(1): 19-44.

Jordan, P. W., J. Karppinen and M. A. Handel (2012). Polo-like kinase is required for synaptonemal complex disassembly and phosphorylation in mouse spermatocytes. *J Cell Sci* 125(Pt 21): 5061-5072.

Kamakaka, R. T. and S. Biggins (2005). Histone variants: deviants? *Genes Dev* 19(3): 295-310.

Karpen, G. H. and R. C. Allshire (1997). The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet* 13(12): 489-496.

Kawashima, S. A., T. Tsukahara, M. Langegger, S. Hauf, T. S. Kitajima and Y. Watanabe (2007). Shugoshin enables tension-generating attachment of kinetochores by loading Aurora to centromeres. *Genes Dev* 21(4): 420-435.

Kawashima, S. A., Y. Yamagishi, T. Honda, K. Ishiguro and Y. Watanabe (2010). Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin. *Science* 327(5962): 172-177.

Kelly, A. E., C. Ghenoiu, J. Z. Xue, C. Zierhut, H. Kimura and H. Funabiki (2010). Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine 3 to activate the mitotic kinase Aurora B. *Science* 330(6001): 235-239.

Khalil, A. M., F. Z. Boyar and D. J. Driscoll (2004). Dynamic histone modifications mark sex chromosome inactivation and reactivation during mammalian spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(47): 16583-16587.

Kierszenbaum, A. L. and L. L. Tres (2004). The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol* 67(4): 271-284.

Kim, J., K. Ishiguro, A. Nambu, B. Akiyoshi, S. Yokobayashi, A. Kagami, T. Ishiguro, A. M. Pendas, N. Takeda, Y. Sakakibara, T. S. Kitajima, Y. Tanno, T. Sakuno and Y. Watanabe (2015). Meikin is a conserved regulator of meiosis-I-specific kinetochore function. *Nature* 517(7535): 466-471.

Kimura, M., Y. Matsuda, T. Yoshioka and Y. Okano (1999). Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3. *J Biol Chem* 274(11): 7334-7340.

Kipling, D., H. E. Ackford, B. A. Taylor and H. J. Cooke (1991). Mouse minor satellite DNA genetically maps to the centromere and is physically linked to the proximal telomere. *Genomics* 11(2): 235-241.

Kitagawa, M. and S. H. Lee (2015). The chromosomal passenger complex (CPC) as a key orchestrator of orderly mitotic exit and cytokinesis. *Front Cell Dev Biol* 3: 14.

Kitajima, T. S., S. A. Kawashima and Y. Watanabe (2004). The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* 427(6974): 510-517.

Kitajima, T. S., S. Hauf, M. Ohsugi, T. Yamamoto and Y. Watanabe (2005). Human Bub1 defines the persistent cohesion site along the mitotic chromosome by affecting Shugoshin localization. *Curr Biol* 15(4): 353-359.

Komlodi-Pasztor, E., D. L. Sackett and A. T. Fojo (2012). Inhibitors targeting mitosis: tales of how great drugs against a promising target were brought down by a flawed rationale. *Clin Cancer Res* 18(1): 51-63.

Kourmouli, N., P. Jeppesen, S. Mahadevhaiah, P. Burgoyne, R. Wu, D. M. Gilbert, S. Bongiorno, G. Prantera, L. Fanti, S. Pimpinelli, W. Shi, R. Fundele and P. B. Singh (2004). Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. *J Cell Sci* 117(Pt 12): 2491-2501.

Krenn, V. and A. Musacchio (2015). The Aurora B Kinase in Chromosome Bi-Orientation and Spindle Checkpoint Signaling. *Front Oncol* 5: 225.

Krenn, V., K. Overlack, I. Primorac, S. van Gerwen and A. Musacchio (2014). KI motifs of human Knl1 enhance assembly of comprehensive spindle checkpoint complexes around MELT repeats. *Curr Biol* 24(1): 29-39.

Kudo, N. R., K. Wassmann, M. Anger, M. Schuh, K. G. Wirth, H. Xu, W. Helmhart, H. Kudo, M. McKay, B. Maro, J. Ellenberg, P. de Boer and K. Nasmyth (2006). Resolution of chiasmata in oocytes requires separase-mediated proteolysis. *Cell* 126(1): 135-146.

Kummar, S., A. Chen, R. E. Parchment, R. J. Kinders, J. Ji, J. E. Tomaszewski and J. H. Doroshow (2012). Advances in using PARP inhibitors to treat cancer. *BMC Med* 10: 25.

Lam, I. and S. Keeney (2014). Mechanism and regulation of meiotic recombination initiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(1): a016634.

Lammers, J. H., H. H. Offenberg, M. van Aalderen, A. C. Vink, A. J. Dietrich and C. Heyting (1994). The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol* 14(2): 1137-1146.

Lampson, M. A. and I. M. Cheeseman (2011). Sensing centromere tension: Aurora B and the regulation of kinetochore function. *Trends Cell Biol* 21(3): 133-140.

Lan, W., X. Zhang, S. L. Kline-Smith, S. E. Rosasco, G. A. Barrett-Wilt, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, C. E. Walczak and P. T. Stukenberg (2004). Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr Biol* 14(4): 273-286.

Latham, J. A. and S. Y. Dent (2007). Cross-regulation of histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* 14(11): 1017-1024.

Lee, J., T. S. Kitajima, Y. Tanno, K. Yoshida, T. Morita, T. Miyano, M. Miyake and Y. Watanabe (2008). Unified mode of centromeric protection by shugoshin in mammalian oocytes and somatic cells. *Nat Cell Biol* 10(1): 42-52.

Lehti, M. S. and A. Sironen (2016). Formation and function of the manchette and flagellum during spermatogenesis. *Reproduction* 151(4): R43-54.

Li, R. and D. F. Albertini (2013). The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(3): 141-152.

Liu, H., L. Jia and H. Yu (2013). Phospho-H2A and cohesin specify distinct tension-regulated Sgo1 pools at kinetochores and inner centromeres. *Curr Biol* 23(19): 1927-1933.

Liu, H., S. Rankin and H. Yu (2013). Phosphorylation-enabled binding of SGO1-PP2A to cohesin protects sororin and centromeric cohesion during mitosis. *Nat Cell Biol* 15(1): 40-49.

Liu, S. T., J. B. Rattner, S. A. Jablonski and T. J. Yen (2006). Mapping the assembly pathways that specify formation of the trilaminar kinetochore plates in human cells. *J Cell Biol* 175(1): 41-53.

Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389(6648): 251-260.

Llano, E., R. Gomez, C. Gutierrez-Caballero, Y. Herran, M. Sanchez-Martin, L. Vazquez-Quinones, T. Hernandez, E. de Alava, A. Cuadrado, J. L. Barbero, J. A. Suja and A. M. Pendas (2008). Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Genes Dev* 22(17): 2400-2413.

MacLennan, M., J. H. Crichton, C. J. Playfoot and I. R. Adams (2015). Oocyte development, meiosis and aneuploidy. *Semin Cell Dev Biol* 45: 68-76.

Maiolica, A., M. de Medina-Redondo, E. M. Schoof, A. Chaikuad, F. Villa, M. Gatti, S. Jeganathan, H. J. Lou, K. Novy, S. Hauri, U. H. Toprak, F. Herzog, P. Meraldi, L. Penengo, B. E. Turk, S. Knapp, R. Linding and R. Aebersold (2014). Modulation of the chromatin phosphoproteome by the Haspin protein kinase. *Mol Cell Proteomics* 13(7): 1724-1740.

Maney, T., A. W. Hunter, M. Wagenbach and L. Wordeman (1998). Mitotic centromere-associated kinesin is important for anaphase chromosome segregation. *J Cell Biol* 142(3): 787-801.

Markaki, Y., A. Christogianni, A. S. Politou and S. D. Georgatos (2009). Phosphorylation of histone H3 at Thr3 is part of a combinatorial pattern that marks and configures mitotic chromatin. *J Cell Sci* 122(Pt 16): 2809-2819.

Marshall, O. J., A. C. Chueh, L. H. Wong and K. H. Choo (2008). Neocentromeres: new insights into centromere structure, disease development, and karyotype evolution. *Am J Hum Genet* 82(2): 261-282.

Marston, A. L. (2015). Shugoshins: tension-sensitive pericentromeric adaptors safeguarding chromosome segregation. *Mol Cell Biol* 35(4): 634-648.

Marumoto, T., D. Zhang and H. Saya (2005). Aurora-A - a guardian of poles. *Nat Rev Cancer* 5(1): 42-50.

McGhee, J. D. and G. Felsenfeld (1980). Nucleosome structure. *Annu Rev Biochem* 49: 1115-1156.

McKinley, K. L. and I. M. Cheeseman (2016). The molecular basis for centromere identity and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17(1): 16-29.

Melters, D. P., L. V. Paliulis, I. F. Korf and S. W. Chan (2012). Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. *Chromosome Res* 20(5): 579-593.

Mellone, B. G. and R. C. Allshire (2003). Stretching it: putting the CEN(P-A) in centromere. *Curr Opin Genet Dev* 13(2): 191-198.

Moens, P. B., C. Heyting, A. J. Dietrich, W. van Raamsdonk and Q. Chen (1987). Synaptonemal complex antigen location and conservation. *J Cell Biol* 105(1): 93-103.

Moore, A. and L. Wordeman (2004). The mechanism, function and regulation of depolymerizing kinesins during mitosis. *Trends Cell Biol* 14(10): 537-546.

Munshi, A., G. Shafi, N. Aliya and A. Jyothy (2009). Histone modifications dictate specific biological readouts. *J Genet Genomics* 36(2): 75-88.

Nechemia-Arbely, Y., D. Fachinetti, K. H. Miga, N. Sekulic, G. V. Soni, D. H. Kim, A. K. Wong, A. Y. Lee, K. Nguyen, C. Dekker, B. Ren, B. E. Black and D. W. Cleveland (2017). Human centromeric CENP-A chromatin is a homotypic, octameric nucleosome at all cell cycle points. *J Cell Biol* 216(3): 607-621.

Nerusheva, O. O., S. Galander, J. Fernius, D. Kelly and A. L. Marston (2014). Tension-dependent removal of pericentromeric shugoshin is an indicator of sister chromosome biorientation. *Genes Dev* 28(12): 1291-1309.

Nguyen, A. L., A. S. Gentilello, A. Z. Balboula, V. Shrivastava, J. Ohring and K. Schindler (2014). Phosphorylation of threonine 3 on histone H3 by haspin kinase is required for meiosis I in mouse oocytes. *J Cell Sci* 127(Pt 23): 5066-5078.

Nguyen, A. L. and K. Schindler (2017). Specialize and Divide (Twice): Functions of Three Aurora Kinase Homologs in Mammalian Oocyte Meiotic Maturation. *Trends Genet* 33(5): 349-363.

Nishino, T., F. Rago, T. Hori, K. Tomii, I. M. Cheeseman and T. Fukagawa (2013). CENP-T provides a structural platform for outer kinetochore assembly. *EMBO J* 32(3): 424-436.

Nishino, T., K. Takeuchi, K. E. Gascoigne, A. Suzuki, T. Hori, T. Oyama, K. Morikawa, I. M. Cheeseman and T. Fukagawa (2012). CENP-T-W-S-X forms a unique centromeric chromatin structure with a histone-like fold. *Cell* 148(3): 487-501.

O'Donnell, L. and M. K. O'Bryan (2014). Microtubules and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 30: 45-54.

Oakberg, E. F. (1956). Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat* 99(3): 507-516.

Oliver, S. S. and J. M. Denu (2011). Dynamic interplay between histone H3 modifications and protein interpreters: emerging evidence for a "histone language". *Chembiochem* 12(2): 299-307.

Orth, M., B. Mayer, K. Rehm, U. Rothweiler, D. Heidmann, T. A. Holak and O. Stemmann (2011). Shugoshin is a Mad1/Cdc20-like interactor of Mad2. *EMBO J* 30(14): 2868-2880.

Overlack, K., I. Primorac, M. Vleugel, V. Krenn, S. Maffini, I. Hoffmann, G. J. Kops and A. Musacchio (2015). A molecular basis for the differential roles of Bub1 and BubR1 in the spindle assembly checkpoint. *Elife* 4: e05269.

Page, J., S. Berrios, J. S. Rufas, M. T. Parra, J. A. Suja, C. Heyting and R. Fernandez-Donoso (2003). The pairing of X and Y chromosomes during meiotic prophase in the marsupial species *Thylamys elegans* is maintained by a dense plate developed from their axial elements. *J Cell Sci* 116(Pt 3): 551-560.

Page, J., J. A. Suja, J. L. Santos and J. S. Rufas (1998). Squash procedure for protein immunolocalization in meiotic cells. *Chromosome Res* 6(8): 639-642.

Page, S. L. and R. S. Hawley (2004). The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 525-558.

Parra, M. T., J. Page, T. J. Yen, D. He, A. Valdeolmillos, J. S. Rufas and J. A. Suja (2002). Expression and behaviour of CENP-E at kinetochores during mouse spermatogenesis. *Chromosoma* 111(1): 53-61.

Parra, M. T., R. Gomez, A. Viera, E. Llano, A. M. Pendas, J. S. Rufas and J. A. Suja (2009). Sequential assembly of centromeric proteins in male mouse meiosis. *PLoS Genet* 5(3): e1000417.

Parra, M. T., R. Gomez, A. Viera, J. Page, A. Calvente, L. Wordeman, J. S. Rufas and J. A. Suja (2006). A perikinetochoric ring defined by MCAK and Aurora-B as a novel centromere domain. *PLoS Genet* 2(6): e84.

Parra, M. T., A. Viera, R. Gomez, J. Page, R. Benavente, J. L. Santos, J. S. Rufas and J. A. Suja (2004). Involvement of the cohesin Rad21 and SCP3 in monopolar attachment of sister kinetochores during mouse meiosis I. *J Cell Sci* 117(Pt 7): 1221-1234.

Parra, M. T., A. Viera, R. Gomez, J. Page, M. Carmena, W. C. Earnshaw, J. S. Rufas and J. A. Suja (2003). Dynamic relocalization of the chromosomal passenger complex proteins inner centromere protein (INCENP) and aurora-B kinase during male mouse meiosis. *J Cell Sci* 116(Pt 6): 961-974.

Perera, D., V. Tilston, J. A. Hopwood, M. Barchi, R. P. Boot-Handford and S. S. Taylor (2007). Bub1 maintains centromeric cohesion by activation of the spindle checkpoint. *Dev Cell* 13(4): 566-579.

Peters, A. H., A. W. Plug, M. J. van Vugt and P. de Boer (1997). A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome Res* 5(1): 66-68.

Peters, J. M. and T. Nishiyama (2012). Sister chromatid cohesion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(11).

Peters, J. M., A. Tedeschi and J. Schmitz (2008). The cohesin complex and its roles in chromosome biology. *Genes Dev* 22(22): 3089-3114.

Petrovic, A., S. Pasqualato, P. Dube, V. Krenn, S. Santaguida, D. Cittaro, S. Monzani, L. Massimiliano, J. Keller, A. Tarricone, A. Maiolica, H. Stark and A. Musacchio (2010). The MIS12 complex is a protein interaction hub for outer kinetochore assembly. *J Cell Biol* 190(5): 835-852.

Pilch, D. R., O. A. Sedelnikova, C. Redon, A. Celeste, A. Nussenzweig and W. M. Bonner (2003). Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem Cell Biol* 81(3): 123-129.

Pluta, A. F., A. M. Mackay, A. M. Ainsztein, I. G. Goldberg and W. C. Earnshaw (1995). The centromere: hub of chromosomal activities. *Science* 270(5242): 1591-1594.

Przewloka, M. R., Z. Venkei, V. M. Bolanos-Garcia, J. Debski, M. Dadlez and D. M. Glover (2011). CENP-C is a structural platform for kinetochore assembly. *Curr Biol* 21(5): 399-405.

Qian, J., B. Lesage, M. Beullens, A. Van Eynde and M. Bollen (2011). PP1/Repo-man dephosphorylates mitotic histone H3 at T3 and regulates chromosomal aurora B targeting. *Curr Biol* 21(9): 766-773.

Quartuccio, S. M. and K. Schindler (2015). Functions of Aurora kinase C in meiosis and cancer. *Front Cell Dev Biol* 3: 50.

Rattani, A., M. Wolna, M. Ploquin, W. Helmhart, S. Morrone, B. Mayer, J. Godwin, W. Xu, O. Stemmann, A. Pendas and K. Nasmyth (2013). Sgol2 provides a regulatory platform that coordinates essential cell cycle processes during meiosis I in oocytes. *Elife* 2: e01133.

Rattner, J. B. and D. P. Bazett-Jones (1989). Kinetochore structure: electron spectroscopic imaging of the kinetochore. *J Cell Biol* 108(4): 1209-1219.

Remeseiro, S. and A. Losada (2013). Cohesin, a chromatin engagement ring. *Curr Opin Cell Biol* 25(1): 63-71.

Ricke, R. M., K. B. Jeganathan, L. Malureanu, A. M. Harrison and J. M. van Deursen (2012). Bub1 kinase activity drives error correction and mitotic checkpoint control but not tumor suppression. *J Cell Biol* 199(6): 931-949.

Rischitor, P. E., K. M. May and K. G. Hardwick (2007). Bub1 is a fission yeast kinetochore scaffold protein, and is sufficient to recruit other spindle checkpoint proteins to ectopic sites on chromosomes. *PLoS One* 2(12): e1342.

Ritter, A., N. N. Kreis, F. Louwen, L. Wordeman and J. Yuan (2015). Molecular insight into the regulation and function of MCAK. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 51(4): 228-245.

Rivera, T., C. Ghenoiu, M. Rodriguez-Corsino, S. Mochida, H. Funabiki and A. Losada (2012). Xenopus Shugoshin 2 regulates the spindle assembly pathway mediated by the chromosomal passenger complex. *EMBO J* 31(6): 1467-1479.

Rivera, T. and A. Losada (2006). Shugoshin and PP2A, shared duties at the centromere. *Bioessays* 28(8): 775-779.

Ruchaud, S., M. Carmena and W. C. Earnshaw (2007). The chromosomal passenger complex: one for all and all for one. *Cell* 131(2): 230-231.

Ruchaud, S., M. Carmena and W. C. Earnshaw (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(10): 798-812.

Sanhaji, M., C. T. Friel, L. Wordeman, F. Louwen and J. Yuan (2011). Mitotic centromere-associated kinesin (MCAK): a potential cancer drug target. *Oncotarget* 2(12): 935-947.

Santaguida, S. and A. Musacchio (2009). The life and miracles of kinetochores. *EMBO J* 28(17): 2511-2531.

Sasai, K., H. Katayama, D. L. Stenoien, S. Fujii, R. Honda, M. Kimura, Y. Okano, M. Tatsuka, F. Suzuki, E. A. Nigg, W. C. Earnshaw, W. R. Brinkley and S. Sen (2004). Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 59(4): 249-263.

Sato, T., K. Katagiri, A. Gohbara, K. Inoue, N. Ogonuki, A. Ogura, Y. Kubota and T. Ogawa (2011). In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 471(7339): 504-507.

Screpanti, E., A. De Antoni, G. M. Alushin, A. Petrovic, T. Melis, E. Nogales and A. Musacchio (2011). Direct binding of Cenp-C to the Mis12 complex joins the inner and outer kinetochore. *Curr Biol* 21(5): 391-398.

Scully, R. and A. Xie (2013). Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutat Res* 750(1-2): 5-14.

Schalk, J. A., A. J. Dietrich, A. C. Vink, H. H. Offenberger, M. van Aalderen and C. Heyting (1998). Localization of SCP2 and SCP3 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Chromosoma* 107(8): 540-548.

Schleiffer, A., M. Maier, G. Litos, F. Lampert, P. Hornung, K. Mechtler and S. Westermann (2012). CENP-T proteins are conserved centromere receptors of the Ndc80 complex. *Nat Cell Biol* 14(6): 604-613.

Schmucker, S. and I. Sumara (2014). Molecular dynamics of PLK1 during mitosis. *Mol Cell Oncol* 1(2): e954507.

Schober, C. S., F. Aydiner, C. J. Booth, E. Seli and V. Reinke (2011). The kinase VRK1 is required for normal meiotic progression in mammalian oogenesis. *Mech Dev* 128(3-4): 178-190.

Schockel, L., M. Mockel, B. Mayer, D. Boos and O. Stemmann (2011). Cleavage of cohesin rings coordinates the separation of centrioles and chromatids. *Nat Cell Biol* 13(8): 966-972.

Schotta, G., M. Lachner, K. Sarma, A. Ebert, R. Sengupta, G. Reuter, D. Reinberg and T. Jenuwein (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* 18(11): 1251-1262.

Shao, H., Y. Huang, L. Zhang, K. Yuan, Y. Chu, Z. Dou, C. Jin, M. Garcia-Barrio, X. Liu and X. Yao (2015). Spatiotemporal dynamics of Aurora B-PLK1-MCAK signaling axis orchestrates kinetochore bi-orientation and faithful chromosome segregation. *Sci Rep* 5: 12204.

Sharif, B., J. Na, K. Lykke-Hartmann, S. H. McLaughlin, E. Laue, D. M. Glover and M. Zernicka-Goetz (2010). The chromosome passenger complex is required for fidelity of chromosome transmission and cytokinesis in meiosis of mouse oocytes. *J Cell Sci* 123(Pt 24): 4292-4300.

Sharp-Baker, H. and R. H. Chen (2001). Spindle checkpoint protein Bub1 is required for kinetochore localization of Mad1, Mad2, Bub3, and CENP-E, independently of its kinase activity. *J Cell Biol* 153(6): 1239-1250.

Shimada, M., T. Goshima, H. Matsuo, Y. Johmura, M. Haruta, K. Murata, H. Tanaka, M. Ikawa, K. Nakanishi and M. Nakanishi (2016). Essential role of autoactivation circuitry on Aurora B-mediated H2AX-pS121 in mitosis. *Nat Commun* 7: 12059.

Shimada, M. and M. Nakanishi (2016). Aurora B twists on histones for activation. *Cell Cycle* 15(24): 3321-3322.

Shuda, K., K. Schindler, J. Ma, R. M. Schultz and P. J. Donovan (2009). Aurora kinase B modulates chromosome alignment in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 76(11): 1094-1105.

Soh, Y. Q. S., M. M. Mikedis, M. Kojima, A. K. Godfrey, D. G. de Rooij and D. C. Page (2017). Meioc maintains an extended meiotic prophase I in mice. *PLoS Genet* 13(4): e1006704.

Steigemann, P., C. Wurzenberger, M. H. Schmitz, M. Held, J. Guizetti, S. Maar and D. W. Gerlich (2009). Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell* 136(3): 473-484.

Storchova, Z. and C. Kuffer (2008). The consequences of tetraploidy and aneuploidy. *J Cell Sci* 121(Pt 23): 3859-3866.

Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403(6765): 41-45.

Suja, J. A. and J. L. Barbero (2009). Cohesin complexes and sister chromatid cohesion in mammalian meiosis. *Genome Dyn* 5: 94-116.

Sullivan, B. A. and G. H. Karpen (2004). Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nat Struct Mol Biol* 11(11): 1076-1083.

Sun, S. C. and N. H. Kim (2012). Spindle assembly checkpoint and its regulators in meiosis. *Hum Reprod Update* 18(1): 60-72.

Svingen, T. and P. Koopman (2013). Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes Dev* 27(22): 2409-2426.

Tan, L. and T. M. Kapoor (2011). Examining the dynamics of chromosomal passenger complex (CPC)-dependent phosphorylation during cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(40): 16675-16680.

Tanaka, H., N. Iguchi, Y. Nakamura, J. Kohroki, C. E. de Carvalho and Y. Nishimune (2001). Cloning and characterization of human haspin gene encoding haploid germ cell-specific nuclear protein kinase. *Mol Hum Reprod* 7(3): 211-218.

Tanaka, H., Y. Yoshimura, M. Nozaki, K. Yomogida, J. Tsuchida, Y. Tosaka, T. Habu, T. Nakanishi, M. Okada, H. Nojima and Y. Nishimune (1999). Identification and characterization of a haploid germ cell-specific nuclear protein kinase (Haspin) in spermatid nuclei and its effects on somatic cells. *J Biol Chem* 274(24): 17049-17057.

Tang, Z., Y. Sun, S. E. Harley, H. Zou and H. Yu (2004). Human Bub1 protects centromeric sister-chromatid cohesion through Shugoshin during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(52): 18012-18017.

Tanno, Y., T. S. Kitajima, T. Honda, Y. Ando, K. Ishiguro and Y. Watanabe (2010). Phosphorylation of mammalian Sgo2 by Aurora B recruits PP2A and MCAK to centromeres. *Genes Dev* 24(19): 2169-2179.

Tanno, Y., H. Susumu, M. Kawamura, H. Sugimura, T. Honda and Y. Watanabe (2015). The inner centromere-shugoshin network prevents chromosomal instability. *Science* 349(6253): 1237-1240.

Teletin, M., N. Vernet, N. B. Ghyselinck and M. Mark (2017). Roles of Retinoic Acid in Germ Cell Differentiation. *Curr Top Dev Biol* 125: 191-225.

Trivedi, P. and P. T. Stukenberg (2016). A Centromere-Signaling Network Underlies the Coordination among Mitotic Events. *Trends Biochem Sci* 41(2): 160-174.

Tsukahara, T., Y. Tanno and Y. Watanabe (2010). Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation. *Nature* 467(7316): 719-723.

Turner, J. M., O. Aprelikova, X. Xu, R. Wang, S. Kim, G. V. Chandramouli, J. C. Barrett, P. S. Burgoyne and C. X. Deng (2004). BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Curr Biol* 14(23): 2135-2142.

Turner, J. M., S. K. Mahadevaiah, O. Fernandez-Capetillo, A. Nussenzweig, X. Xu, C. X. Deng and P. S. Burgoyne (2005). Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat Genet* 37(1): 41-47.

Uzbekova, S., Y. Arlot-Bonnemains, J. Dupont, R. Dalbies-Tran, P. Papillier, S. Pennetier, A. Thelie, C. Perreau, P. Mermillod, C. Prigent and R. Uzbekov (2008). Spatio-temporal expression patterns of aurora kinases a, B, and C and cytoplasmic polyadenylation-element-binding protein in bovine oocytes during meiotic maturation. *Biol Reprod* 78(2): 218-233.

Vader, G., J. J. Kauw, R. H. Medema and S. M. Lens (2006). Survivin mediates targeting of the chromosomal passenger complex to the centromere and midbody. *EMBO Rep* 7(1): 85-92.

van der Horst, A. and S. M. Lens (2014). Cell division: control of the chromosomal passenger complex in time and space. *Chromosoma* 123(1-2): 25-42.

Vanoosthuysse, V., S. Prykhozhiy and K. G. Hardwick (2007). Shugoshin 2 regulates localization of the chromosomal passenger proteins in fission yeast mitosis. *Mol Biol Cell* 18(5): 1657-1669.

Verdaasdonk, J. S. and K. Bloom (2011). Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(5): 320-332.

Vleugel, M., T. A. Hoek, E. Tromer, T. Sliedrecht, V. Groenewold, M. Omerzu and G. J. Kops (2015). Dissecting the roles of human BUB1 in the spindle assembly checkpoint. *J Cell Sci* 128(16): 2975-2982.

Vogt, E., M. Sanhaji, W. Klein, T. Seidel, L. Wordeman and U. Eichenlaub-Ritter (2010). MCAK is present at centromeres, midspindle and chiasmata and involved in silencing of the spindle assembly checkpoint in mammalian oocytes. *Mol Hum Reprod* 16(9): 665-684.

Wang, F., J. Dai, J. R. Daum, E. Niedzialkowska, B. Banerjee, P. T. Stukenberg, G. J. Gorbsky and J. M. Higgins (2010). Histone H3 Thr-3 phosphorylation by Haspin positions Aurora B at centromeres in mitosis. *Science* 330(6001): 231-235.

Wang, F., N. P. Ulyanova, J. R. Daum, D. Patnaik, A. V. Kateneva, G. J. Gorbsky and J. M. Higgins (2012). Haspin inhibitors reveal centromeric functions of Aurora B in chromosome segregation. *J Cell Biol* 199(2): 251-268.

Wang, F., N. P. Ulyanova, M. S. van der Waal, D. Patnaik, S. M. Lens and J. M. Higgins (2011). A positive feedback loop involving Haspin and Aurora B promotes CPC accumulation at centromeres in mitosis. *Curr Biol* 21(12): 1061-1069.

Wang, Q., J. S. Ai, S. Idowu Ola, L. Gu, Y. Z. Zhang, D. Y. Chen and Q. Y. Sun (2008). The spatial relationship between heterochromatin protein 1 alpha and histone modifications during mouse oocyte meiosis. *Cell Cycle* 7(4): 513-520.

Wang, Q., H. Wei, J. Du, Y. Cao, N. Zhang, X. Liu, X. Liu, D. Chen and W. Ma (2016). H3 Thr3 phosphorylation is crucial for meiotic resumption and anaphase onset in oocyte meiosis. *Cell Cycle* 15(2): 213-224.

Wang, X., Y. Yang, Q. Duan, N. Jiang, Y. Huang, Z. Darzynkiewicz and W. Dai (2008). sSgo1, a major splice variant of Sgo1, functions in centriole cohesion where it is regulated by Plk1. *Dev Cell* 14(3): 331-341.

Warren, C. D., D. M. Brady, R. C. Johnston, J. S. Hanna, K. G. Hardwick and F. A. Spencer (2002). Distinct chromosome segregation roles for spindle checkpoint proteins. *Mol Biol Cell* 13(9): 3029-3041.

Watanabe, Y. (2005). Shugoshin: guardian spirit at the centromere. *Curr Opin Cell Biol* 17(6): 590-595.

Watanabe, Y. (2010). Temporal and spatial regulation of targeting aurora B to the inner centromere. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 75: 419-423.

Watanabe, Y. (2012). Geometry and force behind kinetochore orientation: lessons from meiosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(6): 370-382.

Watanabe, Y. and T. S. Kitajima (2005). Shugoshin protects cohesin complexes at centromeres. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360(1455): 515-521, discussion 521.

Welburn, J. P., M. Vleugel, D. Liu, J. R. Yates, 3rd, M. A. Lampson, T. Fukagawa and I. M. Cheeseman (2010). Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface. *Mol Cell* 38(3): 383-392.

Westergaard, M. and D. von Wettstein (1972). The synaptonemal complex. *Annu Rev Genet* 6: 71-110.

Wike, C. L., H. K. Graves, A. Wason, R. Hawkins, J. Gopalakrishnan, J. Schumacher and J. K. Tyler (2016). Excess free histone H3 localizes to centrosomes for proteasome-mediated degradation during mitosis in metazoans. *Cell Cycle* 15(16): 2216-2225.

Williams, S. J., A. Abrieu and A. Losada (2017). Bub1 targeting to centromeres is sufficient for Sgo1 recruitment in the absence of kinetochores. *Chromosoma* 126(2): 279-286.

Wordeman, L. and T. J. Mitchison (1995). Identification and partial characterization of mitotic centromere-associated kinesin, a kinesin-related protein that associates with centromeres during mitosis. *J Cell Biol* 128(1-2): 95-104.

Xu, D., J. Bai, Q. Duan, M. Costa and W. Dai (2009). Covalent modifications of histones during mitosis and meiosis. *Cell Cycle* 8(22): 3688-3694.

Yamagishi, Y., T. Honda, Y. Tanno and Y. Watanabe (2010). Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation. *Science* 330(6001): 239-243.

Ye, A. A., J. Torabi and T. J. Maresca (2016). Aurora A Kinase Amplifies a Midzone Phosphorylation Gradient to Promote High-Fidelity Cytokinesis. *Biol Bull* 231(1): 61-72.

Yoshida, S., M. Kaido and T. S. Kitajima (2015). Inherent Instability of Correct Kinetochore-Microtubule Attachments during Meiosis I in Oocytes. *Dev Cell* 33(5): 589-602.

Zhang, X., W. Lan, S. C. Ems-McClung, P. T. Stukenberg and C. E. Walczak (2007). Aurora B phosphorylates multiple sites on mitotic centromere-associated kinesin to spatially and temporally regulate its function. *Mol Biol Cell* 18(9): 3264-3276.

Zhou, H., L. P. Song, D. W. Li, R. M. Liu, J. T. Chen and X. T. Huang (2006). Dynamic distribution of Thr3-phosphorylated histone H3 in CHO cells in mitosis. *Folia Biol (Praha)* 52(5): 156-160.

Zhou, L., X. Tian, C. Zhu, F. Wang and J. M. Higgins (2014). Polo-like kinase-1 triggers histone phosphorylation by Haspin in mitosis. *EMBO Rep* 15(3): 273-281.

A N E X O S

ANEXO I. Figuras suplementarias

Anexo I. Figuras suplementarias

| | |
|---|-----|
| Figura S1. Caracterización del suero C-105. | 190 |
| Figura S2. Distribución de SGO2 con el suero C-105 (I) | 191 |
| Figura S3. Distribución de SGO2 con el suero C-105 (II) | 192 |
| Figura S4. Distribución de INCENP | 193 |
| Figura S5. MAD2 en espermatoцитos <i>Bub1^{KD/KD}</i> | 194 |
| Figura S6. BUB1 en metafases-I <i>Bub1^{KD/KD}</i> tratadas con LDN-192960..... | 195 |
| Figura S7. Distribución de las proteínas H2AT120ph, H3T3ph y Aurora B/C en metafases-I <i>Sgo2^{-/-}</i> | 196 |

Figura S1. Caracterización del suero C-105

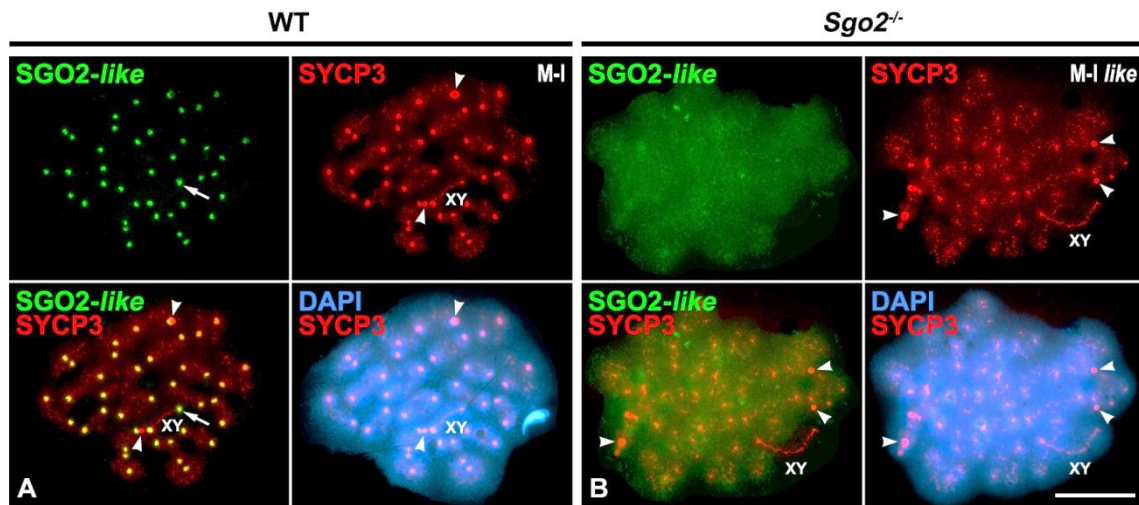


Figura S1. Análisis del anticuerpo C-105 en espermatoцитos de ratón. Doble inmunolocalización de SGO2 con el suero C-105 (*SGO2-like*, verde) y SYCP3 (rojo) en espermatoцитos esparcidos en metafase-I de ratones WT (**A**) y *Sgo2*^{-/-} (**B**). La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). El bivalente sexual aparece indicado (XY). La flecha blanca en **A** indica el centrómero del cromosoma Y. Las puntas de flecha blanca señalan agregados citoplásmicos de SYCP3 en ambas metafases-I. La barra de medida en **B** corresponde a 10 μ m.

Figura S2. Distribución de SGO2 con el suero C-105 (I)

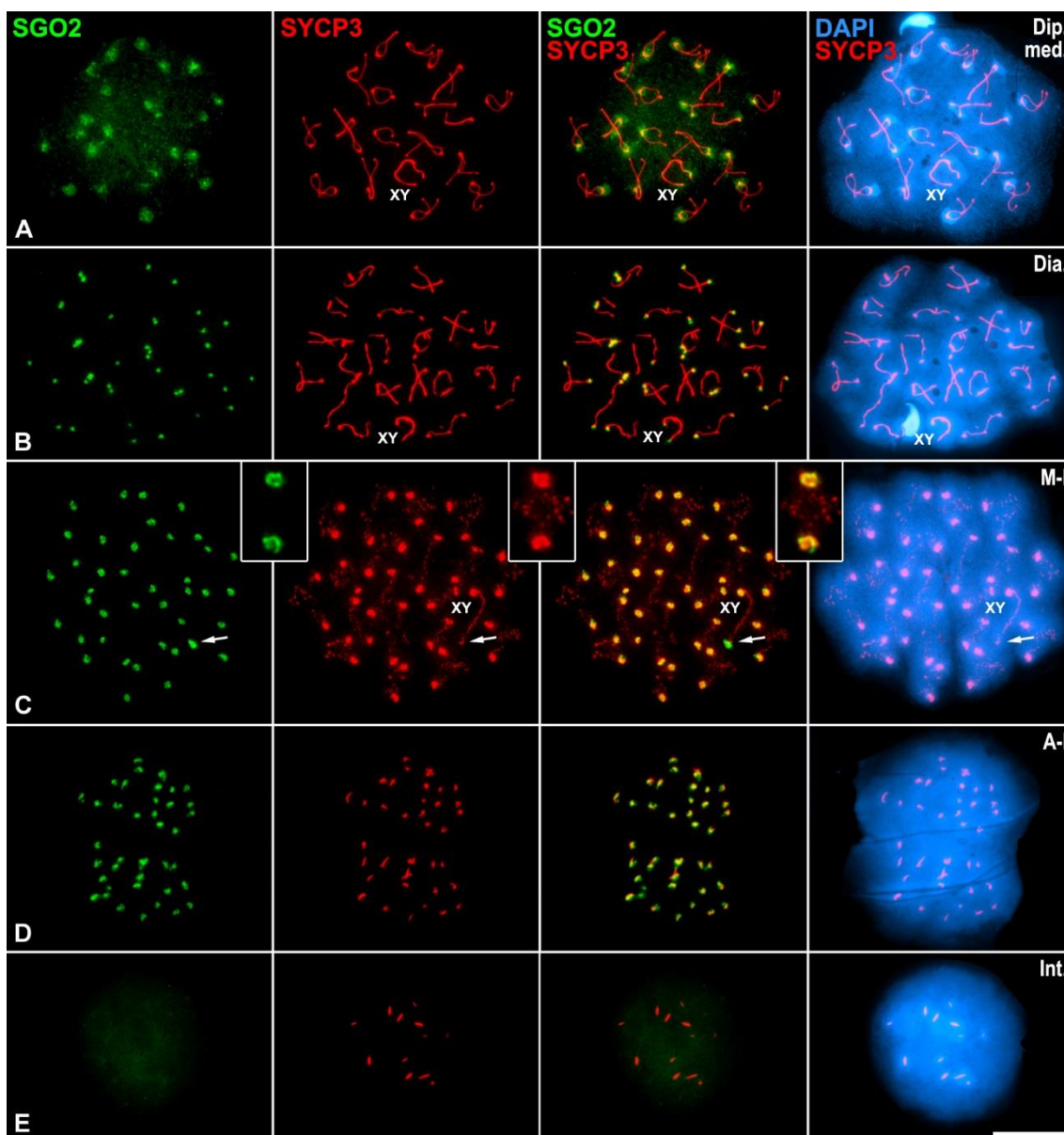


Figura S2. Patrón de distribución de la proteína SGO2 desde diplotena hasta intercinesis. Doble inmunolocalización de SGO2 (verde) y SYCP3 (rojo) en esparcidos de espermatocitos de ratón WT. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A) Diplotena media. (B) Diacinesis. (C) Metafase-I. (D) Anafase-I. (E) Intercinesis. El bivalente sexual (XY) aparece indicado en las etapas donde ha sido posible su identificación. Se indica el centrómero del cromosoma Y (flecha). La barra de medida en E corresponde a 10 μ m.

Figura S3. Distribución de SGO2 con el suero C-105 (II)

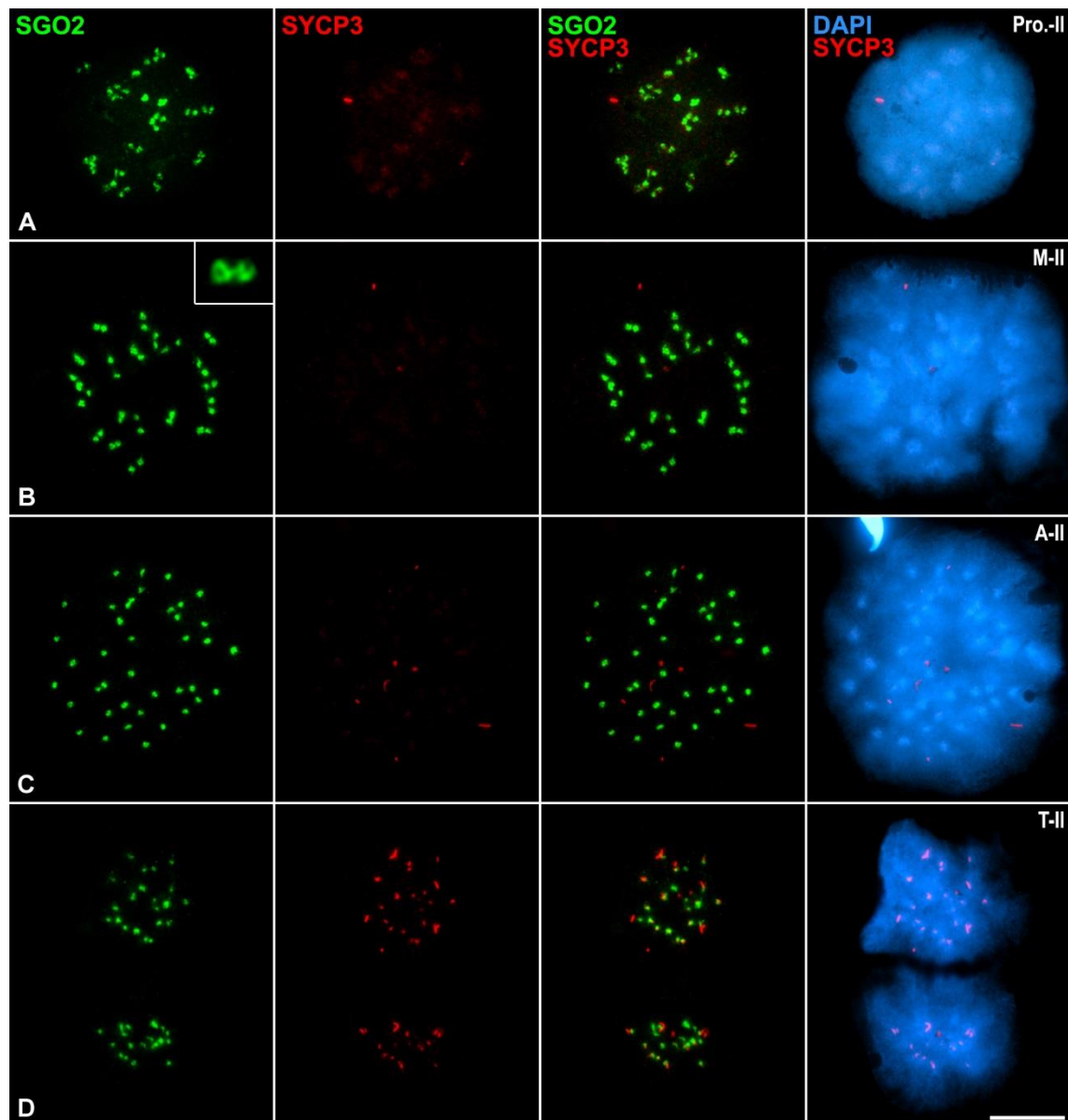


Figura S3. Patrón de distribución de la proteína SGO2 en la meiosis-II. Doble inmunolocalización de SGO2 (verde) y SYCP3 (rojo) en esparcidos de espermatocitos de ratón WT. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). **(A)** Profase-II. **(B)** Metafase-II. **(C)** Anafase-II. **(D)** Telofase-II. La barra de medida en **D** corresponde a 10 μ m.

Figura S4. Distribución de INCENP

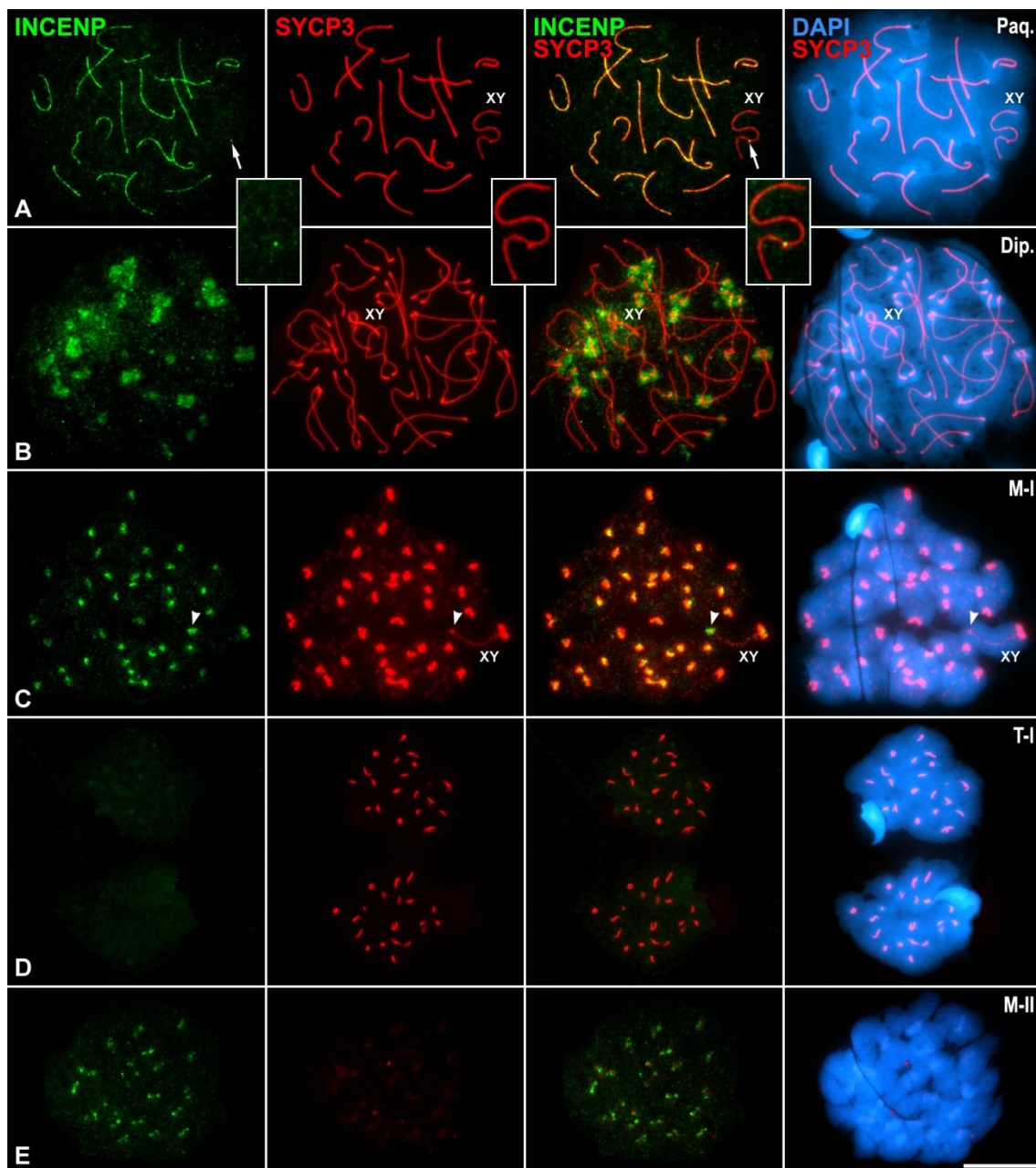


Figura S4. Patrón de distribución de la proteína INCENP a lo largo de la meiosis. Doble inmunolocalización de INCENP (verde) y SYCP3 (rojo) en esparcidos de espermatocitos de ratón. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). **(A)** Paquitena. Las flechas blancas indican la región PAR del bivalente sexual. **(B)** Diplotena. **(C)** Metafase-I. Las puntas de flecha blancas señalan el centrómero del cromosoma Y. **(D)** Telofase-I. **(E)** Metafase-II. Los bivalentes sexuales (XY) aparecen indicados. La barra de medida en F corresponde a 10 μ m.

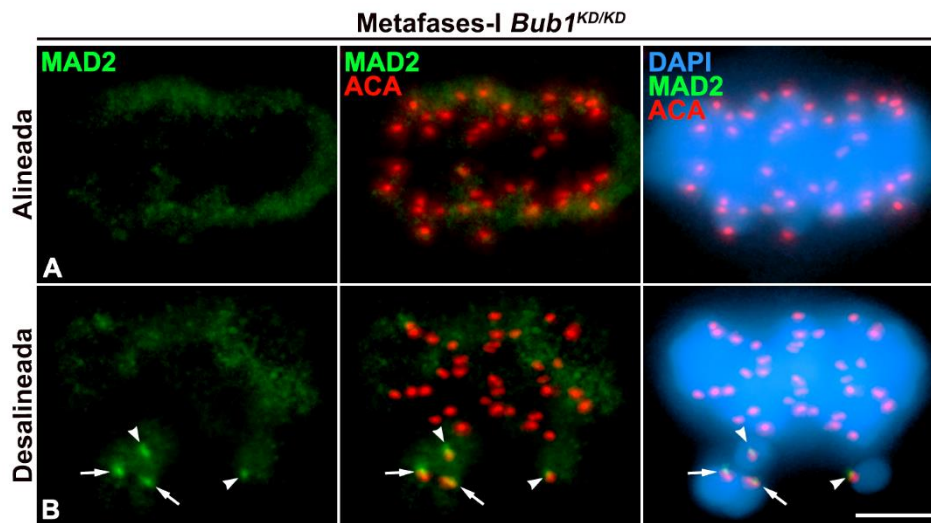
Figura S5. MAD2 en espermatocitos *Bub1^{KD/KD}*

Figura S5. La proteína de *checkpoint* MAD2 presenta un patrón de distribución normal en espermatocitos *Bub1^{KD/KD}*. Doble inmunolocalización de MAD2 (verde) y ACA (rojo) en aplastados de túbulos seminíferos *Bub1^{KD/KD}*. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). (A) Metafase-I alineada. Los cinetocoros se disponen biorientados sintéticamente y no se observa señal de MAD2 en ningún cinetocoro. (B) Metafase-I desalineada. Se observa señal de MAD2 en los cinetocoros de los bivalentes (flechas blancas) y univalentes (puntas de flecha blancas) que no están orientados sintéticamente y se encuentran fuera de la placa ecuatorial. Todas las imágenes son proyecciones de varios planos focales. La barra de medida en B corresponde a 10 μm .

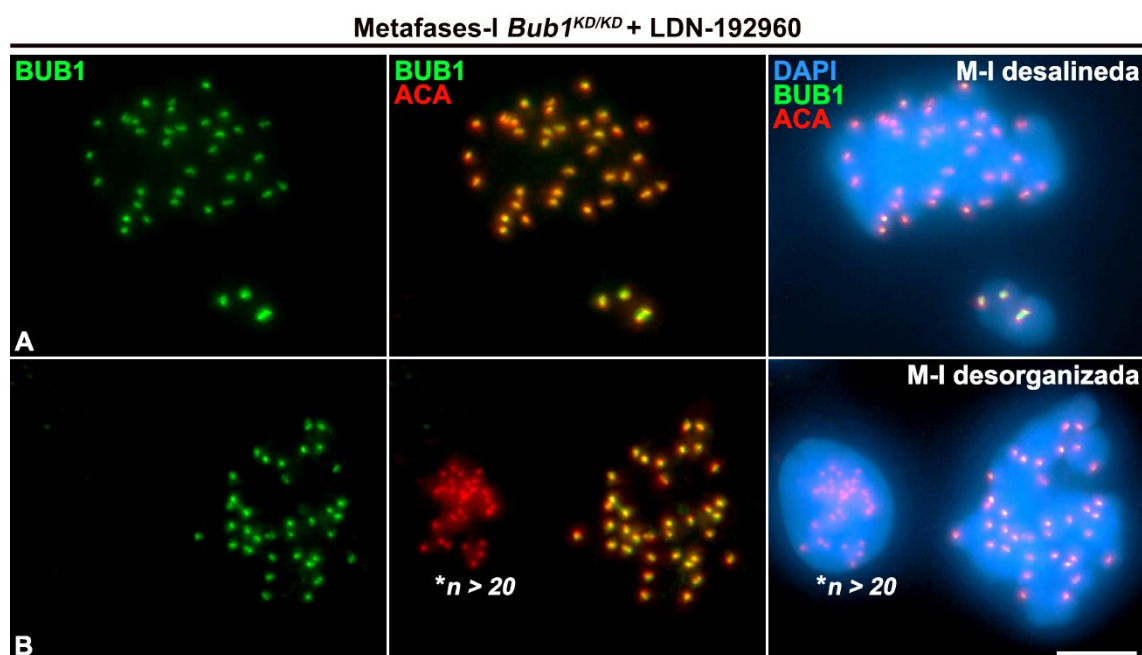
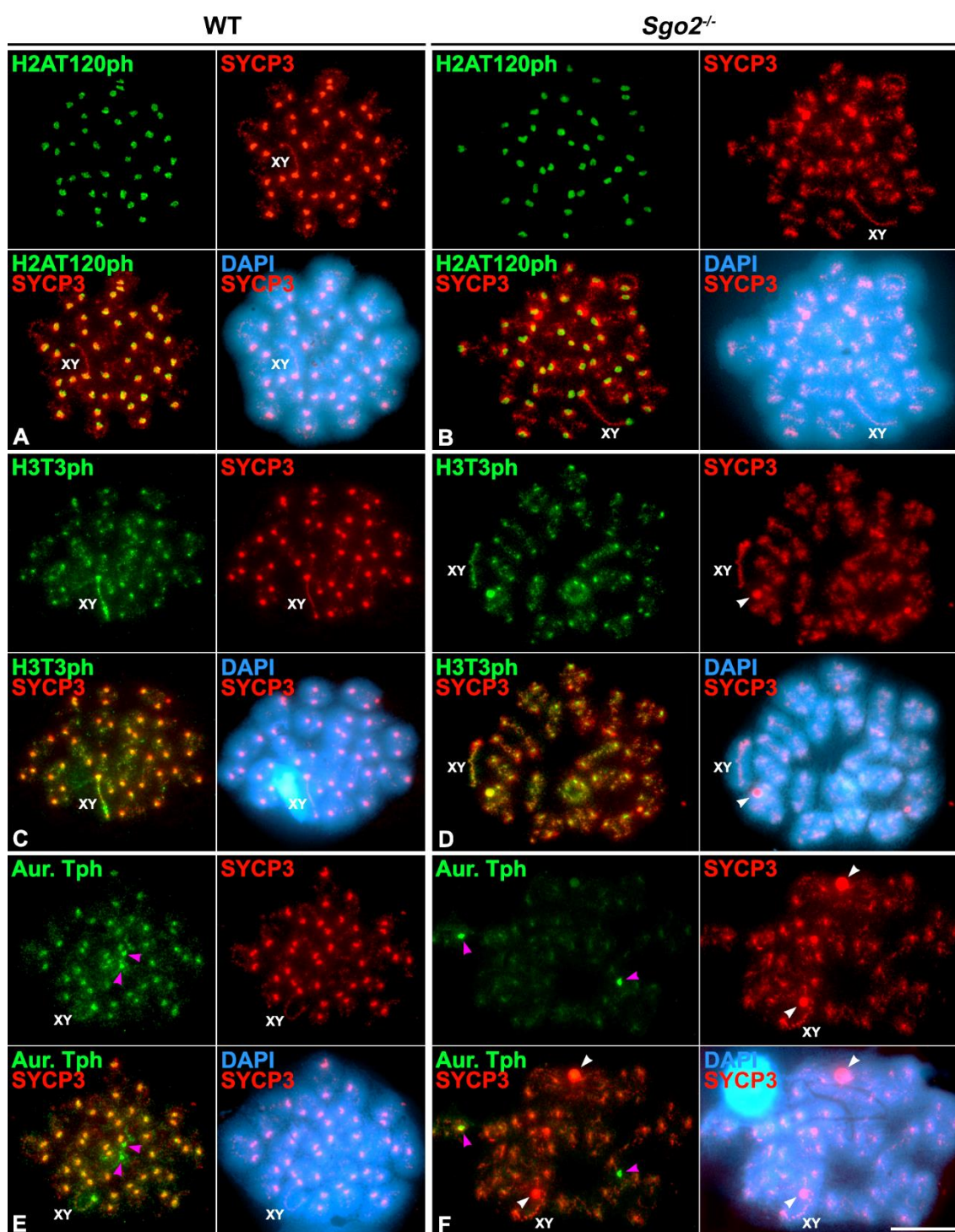
Figura S6. BUB1 en metafases-I *Bub1*^{KD/KD} tratadas con LDN-192960

Figura S6. La proteína de checkpoint BUB1 está presente en los cinetocoros en metafases-I *Bub1*^{KD/KD} tratados con LDN-192960. Doble inmunolocalización de BUB1 (verde) y ACA (rojo) en aplastados de túbulos seminíferos *Bub1*^{KD/KD} tras 6 horas de tratamiento con LDN-192960 (1 mM). La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). **(A)** Metafase-I desalineada. BUB1 aparece en todos los cinetocoros, siendo mayor su intensidad en los cinetocoros de los bivalentes que se encuentran dispuestos fuera de la placa metafásica. Los cinetocoros se disponen biorientados sintéticamente y no se observa señal de MAD2 en ningún cinetocoro. **(B)** Metafase-I desorganizada. Se observa señal de BUB1 en todos los cinetocoros. En esta imagen se muestra una espermatida doble en proceso de elongación donde se han identificado un número de cinetocoros (n) mayor que 20 (*n > 20). Todas las imágenes son proyecciones de varios planos focales. La barra de medida en **B** corresponde a 10 μ m.

Figura S7. Distribución de las proteínas H2AT120ph, H3T3ph y Aurora B/C en metafases-I *Sgo2*^{-/-}



→ **Figura S7. La localización de Aurora B/C en el centrómero es dependiente de la presencia de SGO2 pero no de la variante H2AT120ph en meiosis.** Doble inmunolocalizaciones de H2AT120ph, H3T3ph y Aurora Tph (Aur. Tph) (verde) junto con SYCP3 (rojo) en esparcidos de espermatocitos de ratón WT y *Sgo2*^{-/-}. La cromatina se ha teñido con DAPI (azul). La señal de SYCP3 aparece alterada en las metafases-I de estos mutantes, observándose una señal centromérica menos compacta y una mayor acumulación en el DI. **(A-B)** Doble localización de H2AT120ph y SYCP3 en metafases-I WT **(A)** y *Sgo2*^{-/-} **(B)**. A pesar del cambio de compactación del centrómero con SYCP3, no se observan diferencias en el patrón de distribución de la variante H2AT120ph. **(C-D)** Doble localización de H3T3ph y SYCP3 en metafases-I WT **(C)** y *Sgo2*^{-/-} **(D)**. De nuevo, no parece haber diferencia en la distribución de la variante H3T3ph en ausencia de SGO2. **(E-F)** Doble localización de Aurora Tph (Aur. Tph) y SYCP3 en metafases-I WT **(E)** y *Sgo2*^{-/-} **(F)**. La señal centromérica correspondiente a la quinasa Aurora B/C se ve drásticamente reducida en las metafases-I *Sgo2*^{-/-}, mientras que la señal de polos (puntas de flecha rosa) parece no verse alterada. Los bivalentes sexuales (XY) aparecen indicados. Las puntas de flecha blancas indican los agregados citoplásmicos de SYCP3. La barra de medida en **F** corresponde a 10 μm .

ANEXO II. Tablas

Anexo III. Esquemas suplementarios

| | |
|---|-----|
| Recuentos celulares del bloque 3 de resultados (Fenotipo <i>Bub1^{KD/KD}</i>)..... | 199 |
| Tabla 1. Errores de alineamiento en metafases-I. | 199 |
| Tabla 2. Errores de alineamiento en metafases-II. | 199 |
| Tabla 3. Problemas de segregación y ploidía (I)..... | 200 |
| Tabla 4. Problemas de segregación y ploidía (II)..... | 200 |
| Tabla 5. Espermatidas aberrantes <i>Bub1^{KD/KD}</i> | 200 |
| Recuentos celulares del bloque 4 de resultados (Tratamiento con LDN)..... | 201 |
| Tabla 6. Efecto del tratamiento con LDN en metafases-I de túbulos seminíferos WT | 201 |
| Tabla 7. Efecto del tratamiento con LDN en metafases-II de túbulos seminíferos WT. | 201 |
| Tabla 8. Efecto del tratamiento con LDN en metafases-II de túbulos seminíferos <i>Bub1^{KD/KD}</i> | 202 |

Recuentos celulares del bloque 3 de resultados (Fenotipo *Bub1^{KD/KD}*)

Tabla 1. Errores de alineamiento en metafases-I.

| | Metafases-I | | | | | |
|------------------------------------|--------------------|---------------|---------------------|---------------|--------------------|---------------|
| | Alineadas | | Desalineadas | | Apoptóticas | |
| | n | M ± EEM | n | M ± EEM | n | M ± EEM |
| WT | 193 | 0,769 ± 0,033 | 39 | 0,156 ± 0,021 | 17 | 0,075 ± 0,017 |
| <i>Bub1^{KD/KD}</i> | 99 | 0,321 ± 0,121 | 161 | 0,419 ± 0,081 | 97 | 0,260 ± 0,050 |

Tabla 2. Errores de alineamiento en metafases-II.

| | Metafases-II | | | | | |
|------------------------------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------|--------------------|---------------|
| | Alineadas | | Desalineadas | | Apoptóticas | |
| | n | M ± EEM | n | M ± EEM | n | M ± EEM |
| WT | 90 | 0,830 ± 0,051 | 12 | 0,110 ± 0,009 | 4 | 0,061 ± 0,061 |
| <i>Bub1^{KD/KD}</i> | 95 | 0,608 ± 0,023 | 53 | 0,370 ± 0,034 | 7 | 0,022 ± 0,022 |

Tabla 3. Problemas de segregación y ploidía (I)

| | Bub1^{KD/KD} | | | |
|-----------------------|-----------------------------|---------------|---------------------|---------------|
| | Prometafases-II | | Metafases-II | |
| | n | M ± EEM | n | M ± EEM |
| Haploides (n) | 241 | 0,670 ± 0,010 | 97 | 0,709 ± 0,102 |
| Diploides (2n) | 113 | 0,330 ± 0,010 | 35 | 0,291 ± 0,102 |
| Total | 354 | | 132 | |

Tabla 4. Problemas de segregación y ploidía (II)

| | Prometafases-II | | Metafases-II | | Total |
|-----------------------------|------------------------|--------------|---------------------|--------------|--------------|
| | n | M ± EEM | n | M ± EEM | |
| WT | 130 | 0,407 ± 0,27 | 185 | 0,593 ± 0,27 | 315 |
| Bub1^{KD/KD} | 241 | 0,646 ± 0,08 | 97 | 0,354 ± 0,08 | 354 |

Tabla 5. Espermátidas aberrantes *Bub1^{KD/KD}*

| | WT | | BUB1^{KD/KD} | |
|----------------------------|-------------|---------------|-----------------------------|---------------|
| | n | M ± EEM | n | M ± EEM |
| Normales (n, C) | 3154 | 0,993 ± 0,003 | 5805 | 0,743 ± 0,022 |
| Dobles (n, 2C) | 8 | 0,002 ± 0,001 | 1782 | 0,242 ± 0,022 |
| Cuádruples (2n, 4C) | 0 | 0,000 ± 0,000 | 28 | 0,000 ± 0,001 |
| Microespermátidas | 15 | 0,004 ± 0,011 | 80 | 0,002 ± 0,001 |
| Total | 3177 | | 7794 | |

Recuentos celulares del bloque 4 de resultados (Tratamiento con LDN)

Tabla 6. Efecto del tratamiento con LDN en metafases-I de túbulos seminíferos WT

| Metafases-I | Con H3T3ph | | H3T3ph tenue | | Sin H3T3ph | | TOTAL (N=4) | |
|-----------------------|------------|-----|--------------|-----|------------|------|----------------------|------------------|
| | Control | LDN | Control | LDN | Control | LDN | Control (M ± EEM) | LDN (M ± EEM) |
| Alineadas | 57,8 | 0,0 | 5,9 | 0,3 | 1,6 | 17,5 | 0,707 ± 0,990 | 0,169 ± 0,019 |
| Desalineadas | 15,6 | 0,3 | 1,7 | 1,2 | 8,1 | 29,8 | 0,127 ± 0,042 | 0,284 ± 0,073 |
| Desorganizadas | 11,9 | 0,0 | 2,1 | 1,8 | 0,1 | 37,9 | 0,112 ± 0,093 | 0,455 ± 0,091 |
| Apoptóticas | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,1 | 11,2 | 0,055 ± 0,054 | 0,091 ± 0,063 |
| Total (n) | 635 | 1 | 73 | 11 | 35 | 326 | 743 | 338 |

Tabla 7. Efecto del tratamiento con LDN en metafases-II de túbulos seminíferos WT.

| Metafases-II | Con H3T3ph | | H3T3ph tenue | | Sin H3T3ph | | TOTAL (N=4) | |
|-----------------------|---------------|------------|--------------|-------------|------------|---------------|----------------------|------------------|
| | Control | LDN | Control | LDN | Control | LDN | Control (M ± EEM) | LDN (M ± EEM) |
| Alineadas | 103 55,68% | 3 0,61% | 10 5,41% | 22 4,47% | 2 1,08% | 96 19,51% | 0,707 ± 0,990 | 0,169 ± 0,019 |
| Desalineadas | 43 23,24% | 9 1,83% | 4 2,16% | 43 8,74% | 0 0,00% | 158 32,11% | 0,127 ± 0,042 | 0,284 ± 0,073 |
| Desorganizadas | 15 8,11% | 5 1,02% | 4 2,16% | 31 6,30% | 1 0,54% | 98 19,92% | 0,112 ± 0,093 | 0,455 ± 0,091 |
| Apoptóticas | 0 0,00% | 0 0,00% | 0 0,00% | 0 0,00% | 3 1,62% | 27 5,49% | 0,055 ± 0,054 | 0,091 ± 0,063 |
| Total (n) | 161 | 17 | 18 | 96 | 6 | 379 | 743 | 338 |

Tabla 8. Efecto del tratamiento con LDN en metafases-II de túbulos seminíferos *Bub1^{KD/KD}*.

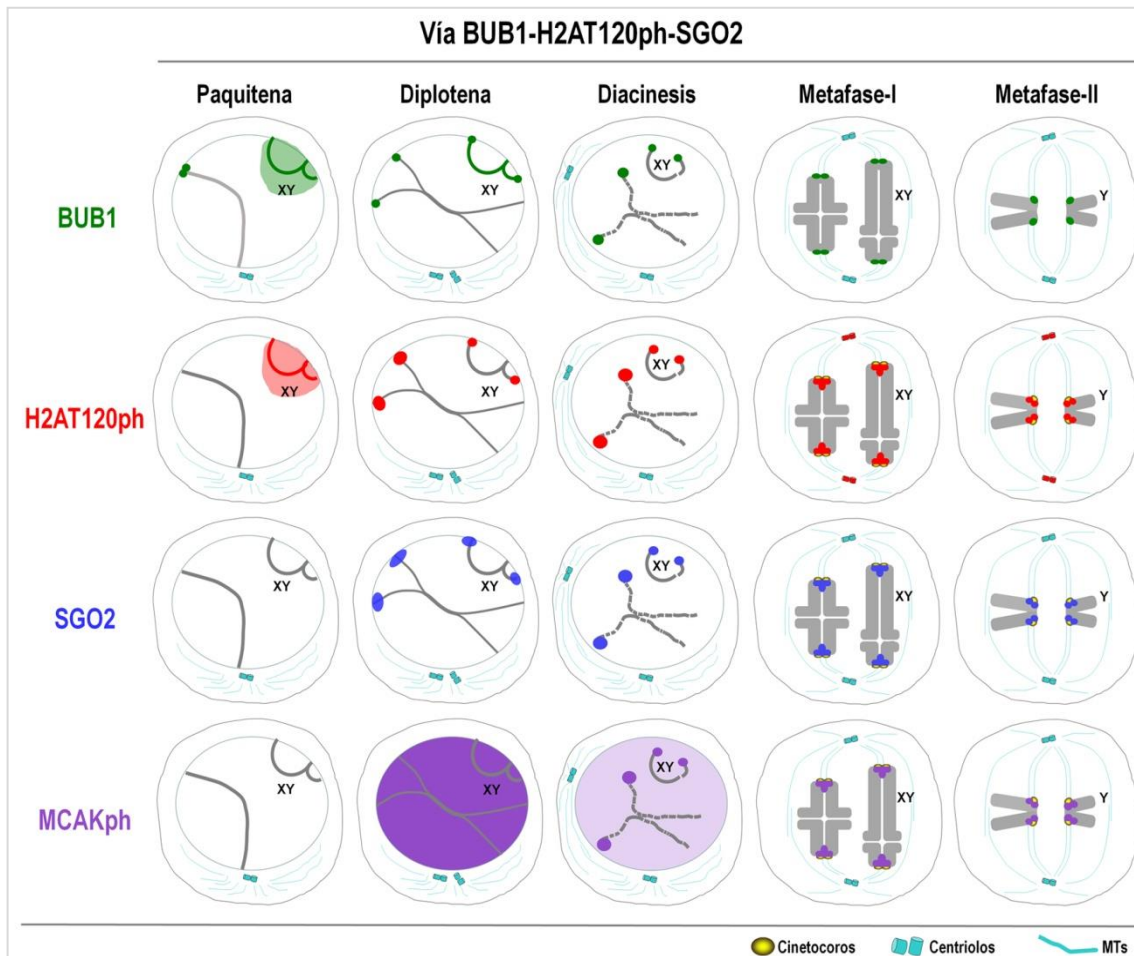
| | Metafases-I | | | |
|-----------------------|--------------|--------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| | Control WT | WT + LDN | <i>BUB1^{KD/KD}</i> | <i>BUB1^{KD/KD}</i> + LDN |
| <i>Alineadas</i> | 47 82,46% | 15 10,14% | 71 32,42% | 11 6,40% |
| <i>Desalineadas</i> | 7 12,28% | 58 39,19% | 95 43,38% | 63 36,63% |
| <i>Desorganizadas</i> | 0 0,00% | 63 42,57% | 0 0,00% | 58 33,72% |
| <i>Apoptóticas</i> | 3 5,26% | 12 8,11% | 53 24,20% | 40 23,26% |
| <i>Total</i> | 57 | 148 | 219 | 172 |

ANEXO III. Esquemas suplementarios

Anexo III. Esquemas suplementarios

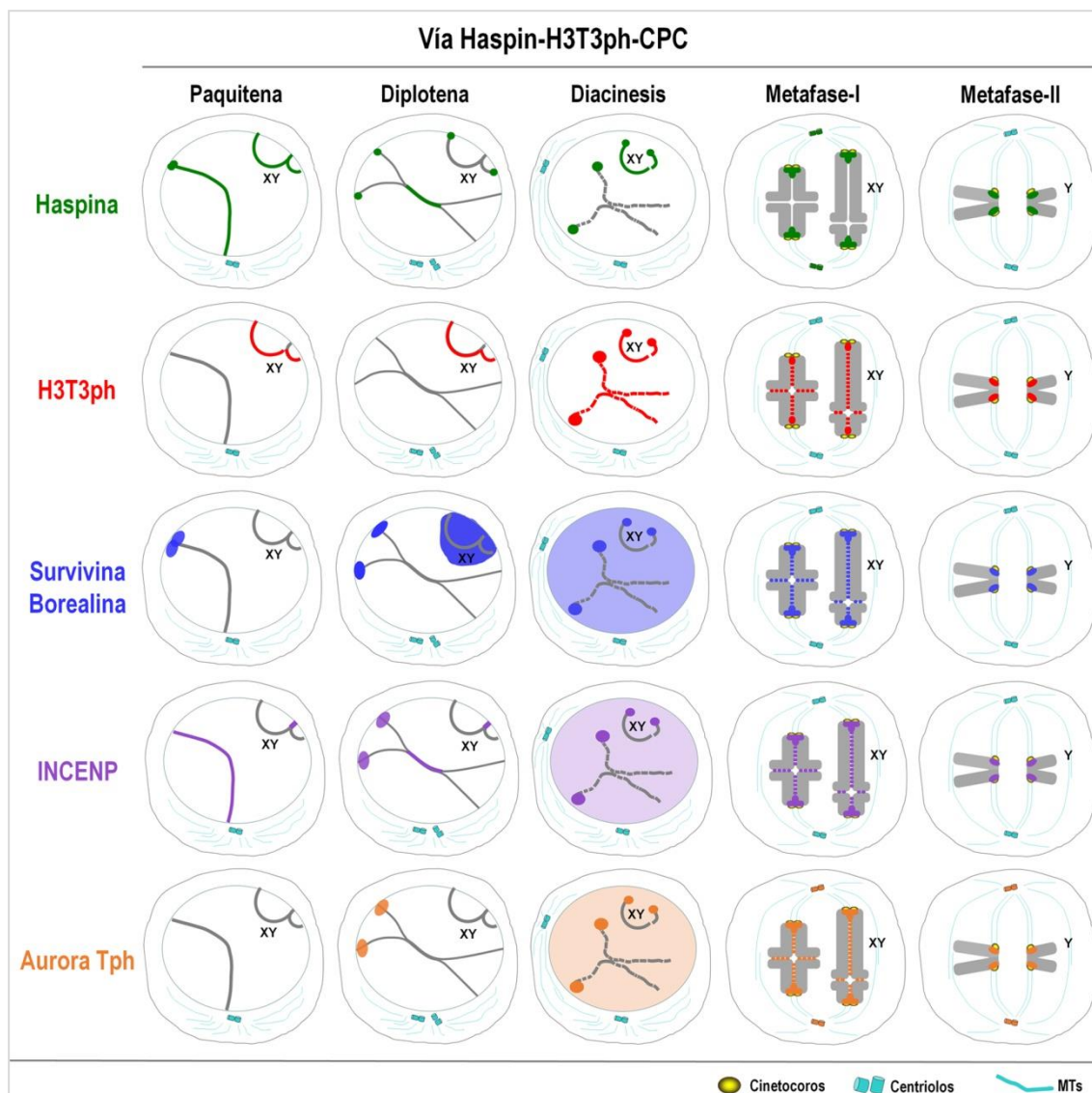
| | |
|---|-----|
| Esquema S1. Distribución de las proteínas de la vía BUB1. | 204 |
| Esquema S2. Distribución de la vía Haspina..... | 205 |
| Esquema S3. Alteración en la redistribución de SGO2 en metafases-II <i>Bub1^{KD/KD}</i> | 206 |
| Esquema S4. Generación de espermátidas aberrantes en individuos <i>Bub1^{KD/KD}</i> | 207 |

Esquema S1. Distribución de las proteínas de la vía BUB1.



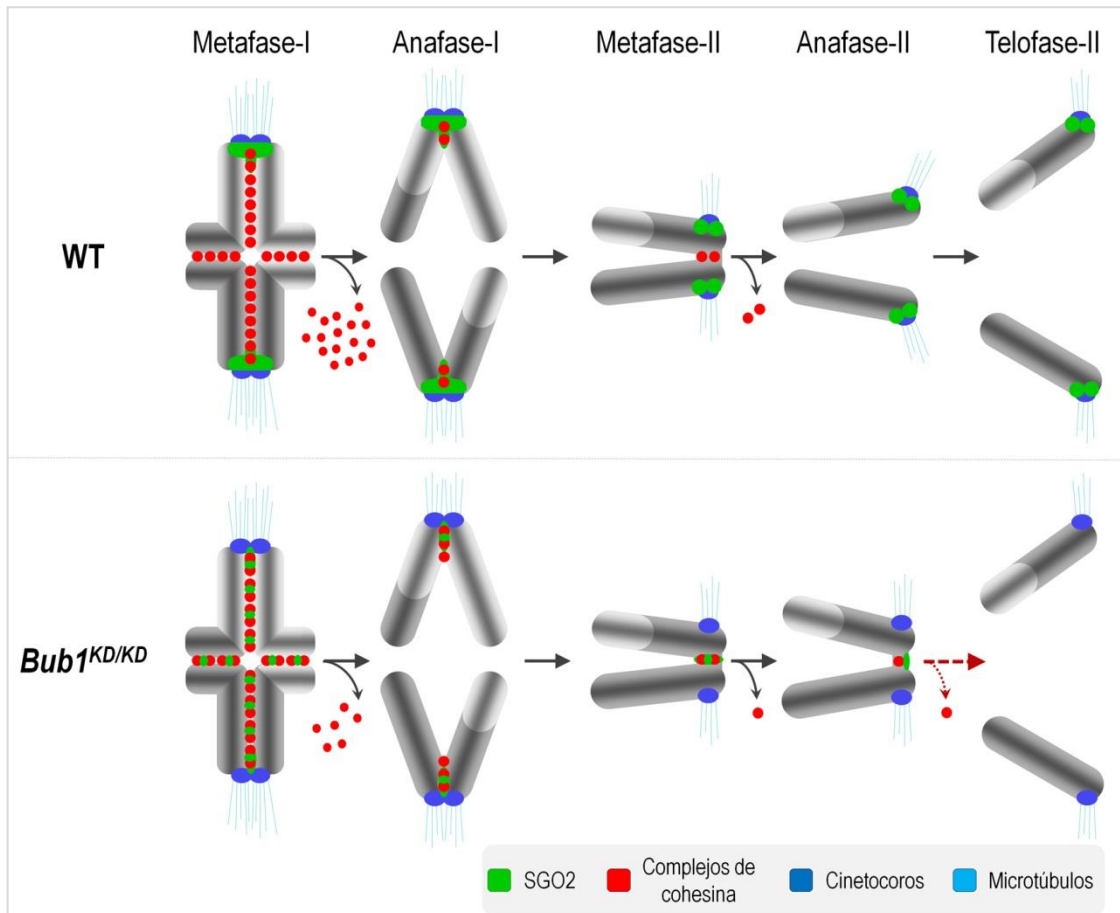
Esquema S1. Representación gráfica de la distribución de las proteínas de la vía Haspin desde la etapa de paquitena hasta metafase-II.

Esquema S2. Distribución de la vía Haspina



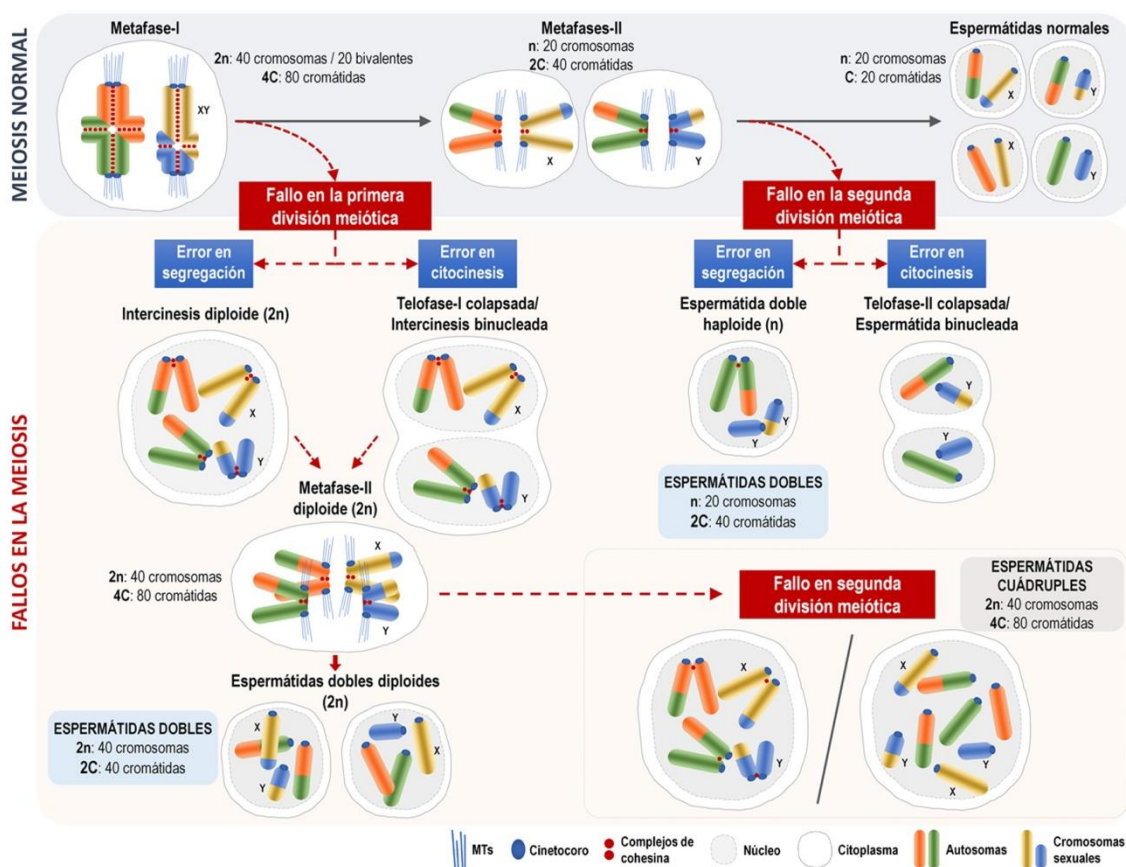
Esquema S2. Representación gráfica de la distribución de las proteínas de la vía Haspina desde la etapa de paquitena hasta metafase-II.

Esquema S3. Alteración en la redistribución de SGO2 en metafases-II
Bub1^{KD/KD}



Esquema S3. Modelo de distribución de la proteína SGO2 en espermatocitos *Bub1^{KD/KD}*. Representación gráfica de la distribución de SGO2 con respecto a los complejos de cohesina durante las dos segregaciones meióticas en espermatocitos de ratón.

Esquema S4. Generación de espermátidas aberrantes en individuos *Bub1^{KD/KD}*



Esquema S4. Modelo de producción de espermátidas aberrantes en *Bub1^{KD/KD}*.

Representación gráfica de las posibles vías por las cuales se generan las espermátidas aberrantes dobles y cuádruples en los ratones macho *Bub1^{KD/KD}*. Se esquematiza la dinámica de una pareja de autosomas (representados en verde y naranja) y el par sexual (cromosomas X en amarillo y el cromosoma Y en azul). Cuando la meiosis transcurre de manera normal, se generan espermátidas redondas haploides (n) y con carga C (20 cromátidas). Si se producen fallos en la primera división meiótica se obtienen metafases-II diploides (2n). Éstas pueden ser generadas por problemas en la segregación o por alteraciones en la citocinesis. Las metafases-II diploides (2n) pueden alinear y segregarse dando lugar a dos espermátidas dobles diploides con carga de ADN 2C (40 cromátidas). Fallos en la segunda división meiótica pueden dar lugar a la formación de una espermátida doble haploide con carga de ADN 2C (20 cromosomas, con dos cromátidas cada uno). Cuando se producen fallos en las dos divisiones meióticas consecutivas, pueden generarse espermátidas cuádruples, las cuales pueden estar constituidas por cromosomas con las dos cromátidas unidas por el centrómero o por cromátidas sueltas.

