

**Universidad de la República**

**PEDECIBA**

**Área Biología - Subárea Biología Celular y Molecular**

**Tesis de Maestría**

**“Etiología y mecanismos de un tipo de  
infertilidad humana vinculada a una  
mutación en un gen codificante para un  
componente del complejo sinaptonémico”**

**Diego Hernández López**

**Directora de tesis:** Rosana Rodríguez Casuriaga

**Co-directora de tesis:** Adriana Geisinger Wschebor

**Tribunal:**

Dra. Roberta Sciurano

Dra. Rossana Sapiro

Dr. Alejo Menchaca

**Departamento de Biología Molecular, IIBCE**

**2021**



## **AGRADECIMIENTOS**

Especialmente a mi orientadora de Maestría, la Dra. Rosana Rodríguez Casuriaga por aceptarme como su estudiante, por su dedicación permanente, enseñanzas, paciencia y enorme contribución a mi formación.

A mi co-orientadora, la Dra. Adriana Geisinger por su dedicación constante, su guía y valiosos consejos.

A Federico Santiñaque y Gustavo folle del servicio de Citometría de Flujo del IIBCE por su colaboración constante y buena disposición.

A María Fernanda Trovero, Mónica Brauer y Ricardo Benavente por su invaluable colaboración en diferentes etapas de esta tesis.

A todos los integrantes del Departamento de Biología Molecular del IIBCE por el apoyo diario.

A los miembros del tribunal, Dra Roberta Sciurano, Dra Rossana Sapiro y Dr. Alejo Menchaca por formar parte de esta última etapa.

A todas las personas que de forma directa o indirecta me ayudaron a concretar este proyecto.

Al PEDECIBA, al Departamento de Biología Molecular del IIBCE y a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por hacer posible la realización de esta tesis y dar financiamiento.

## **TABLA DE CONTENIDOS**

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	7
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
1.1. Gametogénesis	9
1.1.1. Ovogénesis	9
Fases de la ovogénesis	11
1.1.2. Espermatogénesis	11
Fases de la espermatogénesis	12
1.2. Reproducción sexual y Meiosis.	14
1.2.1. Fases de la meiosis	16
1.2.2. Meiosis I	16
1.2.3. Meiosis II	17
1.3. Complejo sinaptonémico	19
1.4. Infertilidad	23
1.4.1. Infertilidad por falla meiótica y las dificultades para su estudio	25
1.4.2. Defectos meióticos en genes codificantes para componentes del CS, y sus consecuencias en la fertilidad	26
1.5. Mutaciones puntuales reportadas para el gen SYCE1 humano	29
1.6. Uso de CRISPR/Cas para la edición de genomas.	30
1.7. Justificación	32
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
2.1. Hipótesis	34
2.2. Objetivos	34
2.2.1. Objetivo general	34
2.2.2. Objetivos específicos	34
<b>3. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN Y MÉTODOS</b>	<b>35</b>
3.1. Animales y aprobación ética	35

3.2. Obtención de ratones Knock-in	36
3.2.1. Diseño de moléculas para mutagénesis y manipulación animal	36
3.3 Genotipado de ratones: amplificación por PCR estándar, purificación de bandas y secuenciación	37
3.4. Ensayos de fertilidad	39
3.5. Análisis Histológico	40
3.5.1 Inclusión en resina epóxica.	40
3.5.2 Cortes semifinos	40
3.6 Análisis por citometría de flujo (CMF)	41
3.6.1. Suspensión de células testiculares	41
3.7. Disección de ovarios fetales	42
3.8. Inmunofluorescencia	43
3.8.1. Esparcidos de células de testículo	43
3.8.2. Esparcidos de células de ovarios embrionarios	44
3.8.3. Anticuerpos	45
3.8.4. Microscopía de fluorescencia	46
3.9. Microscopía y análisis de imágenes	46
3.10. Western blots	47
3.11. Ensayos de RT-qPCR	47
3.12. Análisis estadístico	48
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>50</b>
4.1. Generación de un modelo murino con mutación equivalente a la encontrada en humanos.	50
4.2. La mutación homocigota Syce1 c.727C> T causa infertilidad en ratones macho y hembra.	53
4.3. La mutación homocigota Syce1 c.727C>T afecta el desarrollo gonadal.	55
4.4. Los testículos de mutantes homocigotos carecen de poblaciones celulares con contenido C de ADN.	58
4.5. Los estudios de inmunolocalización no detectaron SYCE1 cargada al CS de mutantes homocigotas.	60

4.6. La proteína putativa SYCE1 truncada no se detecta en los testículos de ratones mutantes.	68
4.7. El nivel de ARNm de Syce1 disminuye significativamente en los mutantes homocigotos.	70
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>71</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>78</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>80</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>90</b>

## RESUMEN

En humanos la infertilidad afecta al 10-15% de las parejas en edad reproductiva, un 60% de los casos tienen causas genéticas. Más del 50% de los casos de insuficiencia ovárica primaria (POI) y azoospermia no obstructiva (NOA) en humanos se clasifican como infertilidad idiopática o de causa desconocida. Los errores meióticos estarían involucrados en al menos parte de estos casos de infertilidad.

El complejo sinaptonémico (CS) se ensambla durante la profase meiótica y es una estructura proteica fundamental para la progresión de la meiosis. En los últimos años se han identificado mutaciones en genes que codifican componentes del CS en humanos y se ha planteado la hipótesis de que estarían relacionadas con el fenotipo infértil observado. La primera mutación de este tipo encontrada en un gen codificante para un componente del elemento central de CS, fue *SYCE1\_c.721C>T*, una mutación *non-sense* familiar, informada en dos hermanas con amenorrea primaria. La mayoría de los eventos fundamentales de ovogénesis en mamíferos ocurren durante la fase embrionaria, y los posibles defectos se identifican muchos años después, dejando pocas posibilidades de estudiar la etiología y patogenia de la enfermedad.

Con el fin de validar un enfoque para sortear esta dificultad y aportar información sobre las bases de la infertilidad en estos casos, en esta tesis se utilizó la tecnología de edición genómica CRISPR/Cas9 y se generó una línea modelo de ratones *knock-in (KI)* humanizados con una alteración del genoma equivalente a *SYCE1\_c.721C>T*. Una vez obtenida la línea, se caracterizó para ambos sexos el fenotipo de ratones mutantes homocigotos, comparado a sus compañeros de camada de tipo salvaje y heterocigotos. Los análisis realizados incluyeron ensayos de fertilidad, análisis histológicos, inmunolocalizaciones proteicas, ensayos de Western blot, RTqPCR, entre otros.

Los ratones homocigotos resultaron infértiles en todos los casos. Sus gónadas mostraron importantes diferencias de tamaño y contenido celular en comparación con los heterocigotos y controles WT. Esto se corroboró en machos mediante análisis citométricos en flujo, con perfiles carentes de poblaciones celulares posmeióticas en los mutantes homocigotos. La evaluación por inmunofluorescencia de los componentes del CS de ovarios embrionarios y testículos adultos mutantes, mostraron defectos meióticos, alteraciones en la

sinapsis cromosómica y en el ensamblaje del CS. No se detectó proteína SYCE1 trunca, ni presencia de otras proteínas que suelen cargarse posteriormente en los CSs. Los análisis de Western blot no lograron detectar la supuesta proteína trunca en testículos de ratones mutantes homocigotos ni heterocigotos, y la cuantificación de transcripción del gen *Syce1* en el ARN de testículo adulto y ovario embrionario mostraron niveles significativamente bajos de *Syce1* en homocigotos, e intermedios en heterocigotos, sugiriendo degradación de los transcritos *Syce1* aberrantes. En conclusión, los resultados obtenidos apoyaron fuertemente un papel causal de esta mutación para el fenotipo POI en pacientes humanos, y los mecanismos involucrados se relacionarían con defectos en la sinapsis de cromosomas homólogos.

El trabajo desarrollado representó el primer informe sobre la generación de una línea de ratones humanizados *KI* para el estudio de una mutación en un gen codificante para un componente de CS y relacionada a la infertilidad, constituyendo una prueba de principio.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Gametogénesis

La gametogénesis es el proceso que comprende la formación de las células reproductoras o gametos a partir de las células germinales. En los mamíferos, el proceso que da formación a los gametos femeninos u ovocitos es conocido como ovogénesis y se lleva a cabo en el ovario. En el caso del proceso que conduce a la formación de los espermatozoides, se conoce como espermatogénesis y tiene lugar en los testículos.

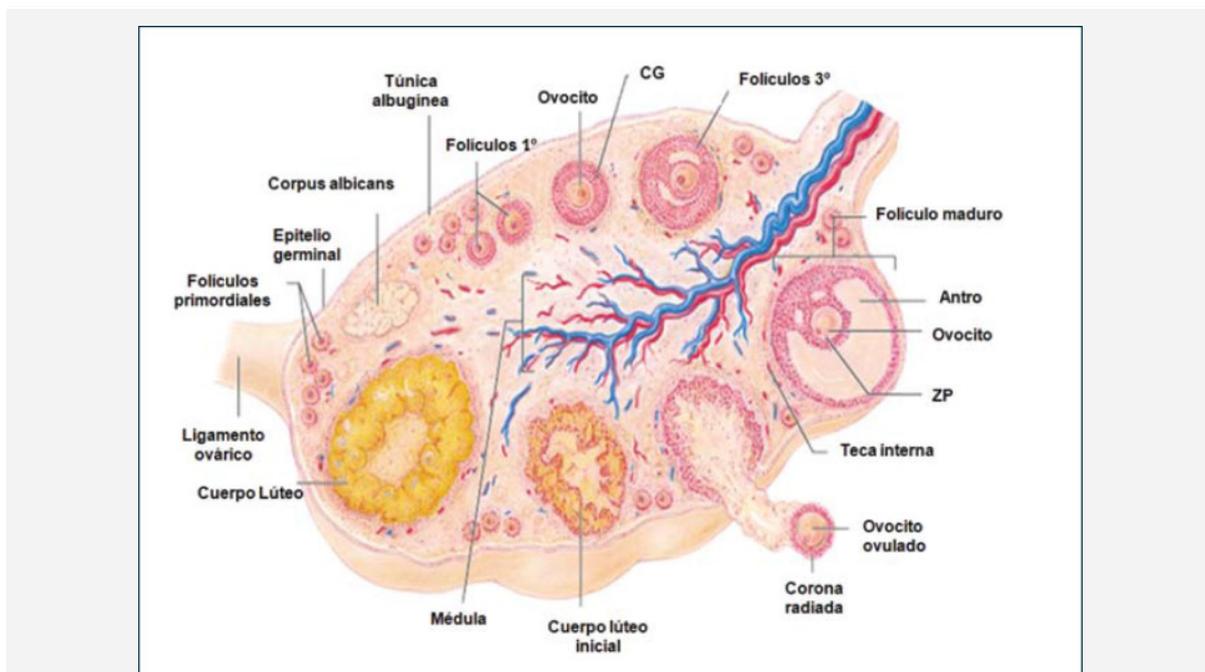
Durante la gametogénesis ocurre un tipo especial de división celular con una única duplicación del ADN seguida por dos divisiones cromosómicas y citoplasmáticas consecutivas, conocidas como meiosis I y meiosis II (Boitoni, *et al.*, 2016). A través de este proceso, el material genético se reduce de diploide ( $2n$ ) a haploide ( $n$ ) en las células destinadas a la reproducción sexual.

Además del carácter reduccional de la meiosis, durante el proceso se introduce variabilidad genética ya que tienen lugar la recombinación, sinapsis y la segregación de cromosomas homólogos. Estos procesos son clave para asegurar la transmisión de una dotación genética única y particular a la descendencia, y todos ellos se desarrollan bajo un control estricto que evita la aparición de alteraciones que puedan repercutir en el desarrollo del futuro embrión.

#### 1.1.1. Ovogénesis

Es el proceso por el cual se desarrollan y diferencian las células germinales femeninas (ovogonias, que se encuentran en los ovarios) y se transforman en óvulos maduros capaces de ser fecundados. En mamíferos, la producción de estas células se da a partir de las células germinales primordiales. En humanos, a partir de la octava semana de gestación las ovogonias comienzan a dividirse por mitosis y se genera toda la dotación de óvulos de la futura mujer. Con la maduración de las ovogonias, su número se reduce sensiblemente y no se vuelven a formar, dando así, una cantidad fija de células con potencial para transformarse en óvulos maduros. Es así como aproximadamente sólo 400 ovocitos primarios consiguen

madurar en el transcurso de la vida reproductiva de una mujer normal. Las ovogonias que sobreviven dan lugar a los ovocitos primarios, los cuales un puñado de ellos reanuda la meiosis en cada ciclo estral. La profase I se reanuda por efecto de la hormona luteinizante (Manandhar *et al.*, 2005) y luego los ovocitos entran en una fase de detención (dictioteno) por la acción del factor de inhibición de la meiosis. Cuando se alcanza la madurez sexual se reanuda la meiosis. Una de las células descendientes prácticamente no contiene citoplasma y dará origen al cuerpo polar, mientras que la otra descendiente, tiene la mayor parte de los constituyentes celulares y conforma el ovocito (Gilbert 2006). Entre 24 a 48 horas antes de la ovulación se da un pico de la hormona luteinizante que da paso a la meiosis II. En el ahora ovocito secundario se da una nueva repartición desigual del citoplasma formando un segundo cuerpo polar, y la que recibe la mayor parte de los componentes citoplasmáticos formará el óvulo femenino maduro (Figura 1). El resultado es la formación de un núcleo haploide dentro del ovocito y dos cuerpos polares (Extraído de Morelli *et al.* 2005 revisado por Handel y Eppig 1998).



**Figura 1: Corte de ovario**

Esquema de un ovario de mamífero con desarrollo progresivo del folículo. (Vantman *et al.*, 2010)

### *Fases de la ovogénesis*

Durante la fase embrionaria las oogonias se están dividiendo por mitosis. Son células diploides, que en los humanos cuentan con 23 pares de cromosomas homólogos. Para el tercer mes del desarrollo embrionario las oogonias se convierten en ovocitos primarios y comienzan la primera división meiótica; aún son células diploides, con cromosomas duplicados y repartidos en dos series completas de cromosomas homólogos maternos y paternos. Los ovocitos permanecerán en profase hasta que el individuo alcance la madurez sexual. Al llegar la madurez sexual, se reinicia la primera división meiótica, se separan los cromosomas homólogos y el ovocito primario se transforma en ovocito secundario, haploide, con sólo una serie de 23 cromosomas duplicados (Morelli *et al.*, 2005).

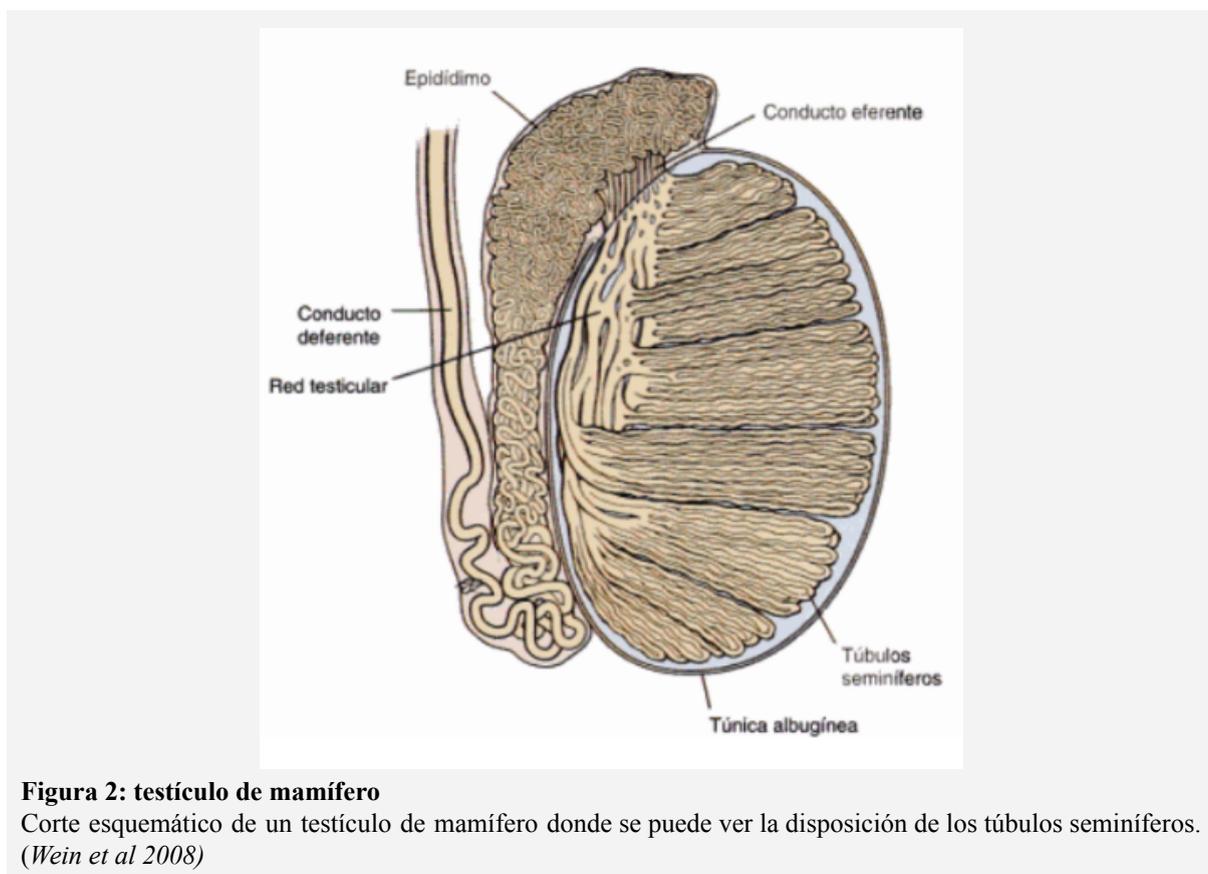
Diferente de lo que ocurre con la espermatogénesis, en donde el espermatocito primario se transforma en dos espermatocitos secundarios, en la ovogénesis el ovocito primario sólo da lugar a un ovocito secundario haploide, y a un cuerpo polar que contiene la otra serie haploide de cromosomas. Durante la segunda división meiótica, el ovocito secundario recorre las trompas de Falopio. Al finalizar se ha formado un oótide y un cuerpo polar que luego será desintegrado, y el oótide se transforma en óvulo (Sadler, 2002).

### **1.1.2. Espermatogénesis**

En individuos del sexo masculino, la gametogénesis recibe el nombre de espermatogénesis. Es el complejo proceso en el cual las células germinales primitivas, espermatogonias, se transforman en espermatozoides capaces de fecundar al óvulo. Se divide en tres fases: proliferativa, meiótica y de diferenciación. Se inicia mediante la proliferación por divisiones mitóticas de las espermatogonias, luego los espermatocitos se dividen por meiosis, y finalmente se producen espermatozoides móviles, esto último mediado por una serie de procesos de maduración posmeióticos agrupados bajo el nombre de espermiogénesis. La espermatogénesis se lleva a cabo en el interior de los túbulos seminíferos (Figura 2), estructuras altamente organizadas que contienen gran diversidad de células en diferentes fases de maduración.

Los túbulos seminíferos están rodeados por una membrana basal, sobre la que se apoya el epitelio seminífero que contiene las células germinales, y en contacto con todas

ellas, las células de Sertoli. Estas son células somáticas que sirven de sustrato y aportan nutrientes, segregan hormonas para el correcto funcionamiento de la espermatogénesis, y forman la barrera hemato-testicular (Wein *et al.*, 2008). En el exterior de los túbulos seminíferos se encuentran las células de Leydig que producen testosterona, y desde la pubertad aumentan su secreción hormonal para favorecer la maduración de los espermatozoides.



**Figura 2: testículo de mamífero**

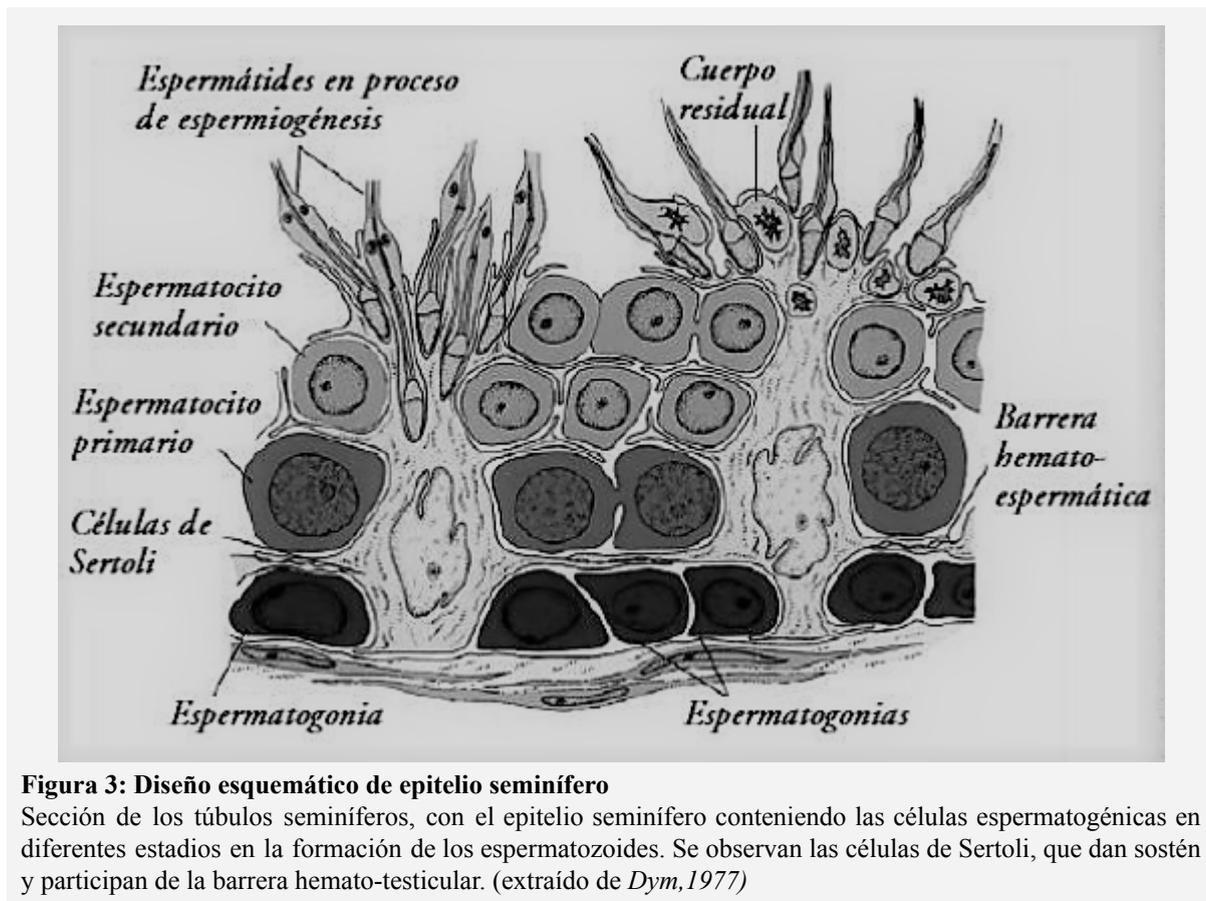
Corte esquemático de un testículo de mamífero donde se puede ver la disposición de los túbulos seminíferos. (Wein *et al* 2008)

### *Fases de la espermatogénesis*

Las espermatogonias, ubicadas sobre la membrana basal de los túbulos seminíferos, se dividen de forma continua. En los mamíferos, durante el periodo embrionario y en la infancia, estas células se van dividiendo por mitosis para dar lugar al crecimiento del testículo. A diferencia del ovario, en el testículo se están produciendo continuamente espermatogonias.

En determinado momento algunas de esas espermatogonias dejan de dividirse, aumentan de tamaño y se transforman en espermatocitos primarios diploides, con las dos series completas de cromosomas homólogos duplicados (contenido de ADN 4C). A partir de este momento comienza la meiosis, y el espermatocito primario se transforma en dos espermatocitos secundarios, haploides y de contenido de ADN 2C, mediante la primera división meiótica. Una vez formados los espermatocitos secundarios, durante la segunda división de la meiosis, se transforman en 4 espermátidas redondas, también haploides pero de contenido de ADN C, que se diferenciarán en espermatozoides durante la espermiogénesis (Boitani, *et al.*, 2016). Las espermátidas se irán convirtiendo, de espermátidas redondas, a espermátidas elongadas. Éstas tienen núcleos alargados y flagelos dirigidos al centro del túbulo seminífero. Este proceso de diferenciación implica la formación del acrosoma por la fusión de vesículas del aparato de Golgi, y el centrosoma se desplaza a la cara opuesta del núcleo, donde se está formando el acrosoma. A partir de uno de los centriolos se forma el axonema del flagelo. Las mitocondrias también comienzan a migrar y se colocarán alrededor de la porción proximal del axonema. El núcleo se reduce de tamaño, se va alargando, y la cromatina adquiere un alto grado de compactación. Finalmente, el exceso de citoplasma será eliminado en los cuerpos residuales, y así culmina la formación de un espermatozoide maduro (Figura 3).

Dentro de los túbulos seminíferos, las células forman estratos visibles histológicamente: las espermatogonias están situadas cerca de la lámina basal, en la parte más externa del túbulo; a continuación, encontramos espermatocitos primarios, secundarios, espermátidas y finalmente, ya próximos al lumen central, los espermatozoides. Una vez formados, los espermatozoides se desplazarán hacia el epidídimo (Figura 2) donde serán almacenados.



**Figura 3: Diseño esquemático de epitelio seminífero**

Sección de los túbulos seminíferos, con el epitelio seminífero conteniendo las células espermatogénicas en diferentes estadios en la formación de los espermatozoides. Se observan las células de Sertoli, que dan sostén y participan de la barrera hemato-testicular. (extraído de *Dym, 1977*)

## 1.2. Reproducción sexual y Meiosis.

En el transcurso de la evolución surgió un mecanismo que permite a los organismos el intercambio de información genética y así aumentar su variabilidad, permitiendo de esta manera hacer frente a los diferentes factores ambientales a los que se puedan encontrar expuestos. Este mecanismo es el sexo, que no es necesario para la reproducción en todos los organismos, pero trajo como consecuencia la recombinación de los genomas de los individuos.

Esta forma de reproducción en la que la recombinación génica tiene lugar se conoce como reproducción sexual, y forma parte de ella la alternancia de generaciones. De esta manera, individuos de una especie van a producir una generación celular haploide que, al fusionarse con las células provenientes de otros individuos diploides diferentes, restablecen la diploidía en un individuo nuevo con una mezcla génica de ambos progenitores, la cual podría

aportar alguna ventaja adaptativa en un medio variable. Los organismos superiores se encuentran la mayor parte de su ciclo vital en estado diploide, y el mecanismo por el cual se generan las células haploides, necesarias para la reproducción sexual y el mantenimiento de la diploidía, es la meiosis (Page y Hawley, 2004).

La meiosis es una forma de división celular relacionada a la gametogénesis de los eucariotas, y es imprescindible para la reducción del número de cromosomas de diploide a haploide en el núcleo de los gametos. En los organismos pluricelulares, este fenómeno se lleva a cabo únicamente en la línea celular germinal. El proceso meiótico se caracteriza por una única duplicación del contenido celular seguida por dos divisiones nucleares y citoplasmáticas, para lograr reducir a la mitad la información genética (Figura 4). La progresión adecuada de la meiosis es un requisito previo para el desarrollo de espermatozoides y óvulos sanos. La necesidad de crear roturas de doble cadena de ADN (DSBs, del inglés *Double Strand Breaks*) como los eventos necesarios para el apareamiento de cromosomas homólogos y la formación de entrecruzamientos (COs, del término inglés *Crossing Overs*) pueden considerarse adaptaciones biológicas para la reproducción sexual que evolucionaron a partir de mecanismos de detección y reparación de daños del ADN en células somáticas (Marcon, E. & Moens, P. B, 2005). Estas características explican, en parte, el alto grado de conservación de la meiosis en diferentes organismos (Keeney, *et al.*, 2008).

En términos generales, el proceso se inicia tras una replicación del ADN (célula 4C, 2n), generando cuatro células haploides (1C, 1n) mediante dos procesos de división: meiosis I, caracterizada por la separación de los pares de cromosomas homólogos, y meiosis II, caracterizada por la separación de las cromátidas hermanas. La fase más característica de la meiosis I es la profase, durante la cual los cromosomas homólogos se unen a través del complejo sinaptonémico (CS), del que detallaremos su estructura y función más adelante, y llevan a cabo la recombinación meiótica. Los cambios estructurales que se van dando a lo largo de las etapas del proceso son causados por modificaciones de las histonas, complejos remodeladores de la cromatina, cohesinas y condensinas, que modifican la cromatina e influyen en el ensamblaje y desensamblaje de complejos multiproteicos que afectan a la dinámica de los cromosomas (Morelli *et al.*, 2005).

### **1.2.1. Fases de la meiosis**

Antes que la profase I dé comienzo, se replica el ADN en la fase S del último ciclo celular premeiótico. Cuando la replicación ha terminado, podemos encontrar 46 cromosomas formados por dos cromátidas hermanas que están unidas por cohesinas, dentro de las espermatogonias humanas. Algunas de estas cohesinas, son específicas de la meiosis y participan de la sinapsis y recombinación (Prieto, *et al.*, 2001).

### **1.2.2. Meiosis I**

**Profase I:** Dada su extensión, la misma ha sido dividida en diferentes estadios para su estudio.

*Leptoteno:* En este estadio la cromatina de los cromosomas se condensa y forma filamentos finos donde las dos cromátidas no son distinguibles. Los extremos se encuentran unidos a la envoltura nuclear. En esta fase también inicia el alineamiento entre cromosomas homólogos, basado en la búsqueda de homologías, y la formación de los elementos axiales a partir de cohesinas y proteínas específicas que van a conformar el CS (Gerton, *et al.*, 2005; Figura 4).

*Zigoteno:* Continúa la condensación de la cromatina. Los homólogos siguen alineándose y se establece la unión de los elementos axiales mediante la aparición de un elemento central. Los cromosomas homólogos de cada par se asocian en las regiones teloméricas y en puntos intermedios. Es a partir de estas zonas de interacción que se inicia la formación de los elementos laterales del CS (antes elementos axiales) y comienza la sinapsis cromosómica de manera progresiva, hasta dejar a los cromosomas homólogos apareados en toda su longitud por acción del elemento central del complejo (Figura 4). En esta configuración, a los cromosomas se les denomina bivalentes o tétradas (Schmekel, *et al.*, 1996).

*Paquiteno:* Los cromosomas homólogos han completado ya la sinapsis y están completamente apareados con condensación máxima; el CS está totalmente ensamblado de un extremo cromosómico al otro. En algunos puntos del elemento central del CS, se

distinguen los nódulos de recombinación (regiones recombinantes de los dos cromosomas). Durante esta etapa, es cuando finaliza el proceso de reparación de los DSBs.

*Diploteno:* Durante el diploteno los CSs se desensamblan y los homólogos comienzan a separarse, al desaparecer las cohesinas que se encontraban uniendo a los homólogos (Buonomo *et al.*, 2000). Cuando el CS se ha desensamblado, los cromosomas se repelen, pero continúan unidos por los quiasmas, que conforman las regiones donde se dio realmente el entrecruzamiento (sitio de ruptura y reunión recíproca entre cromátidas no hermanas) (Figs. 4 y 5A).

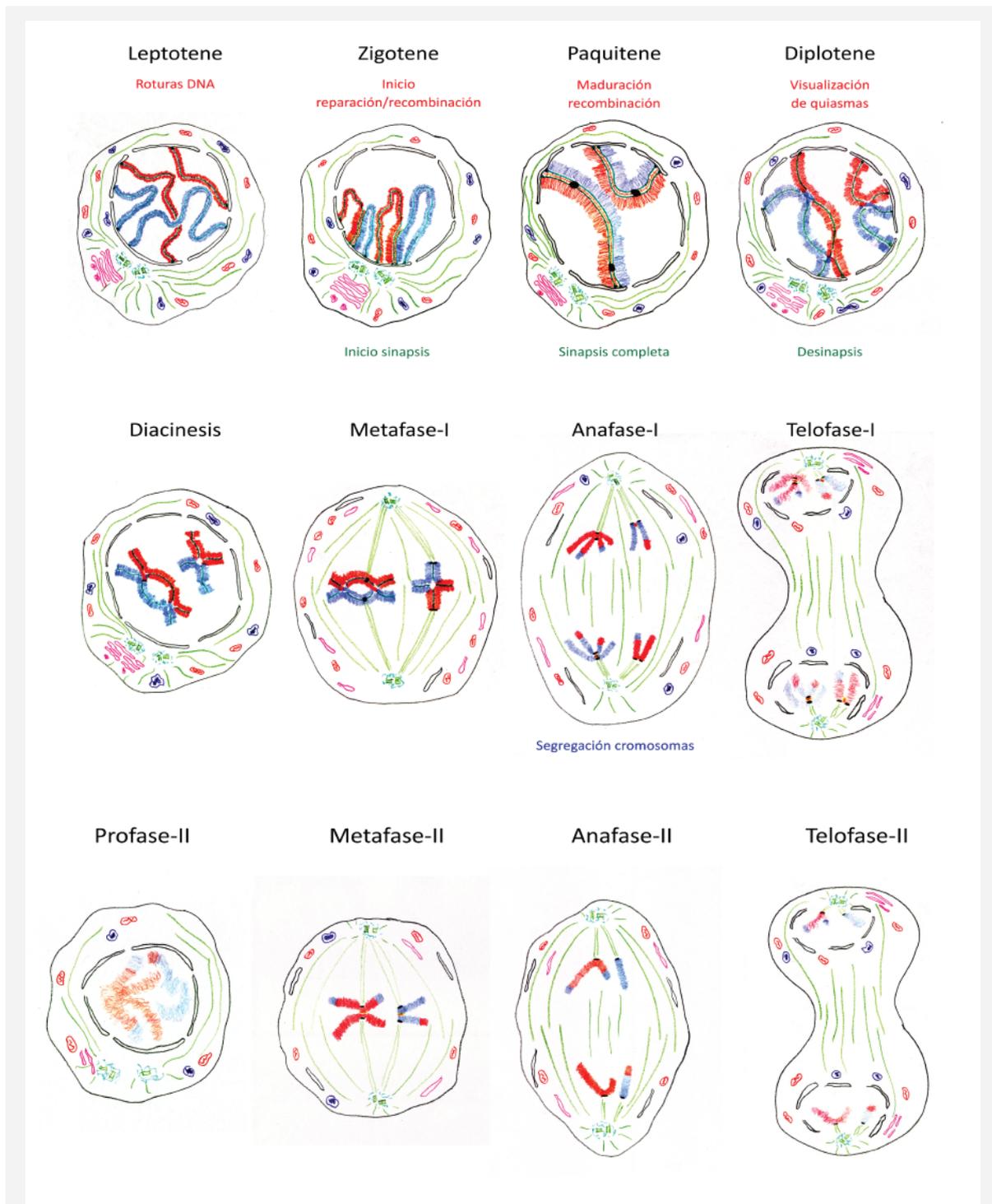
*Diacinesis:* Al final del diploteno las cuatro cromátidas de los dos cromosomas unidos por sus centrómeros y los quiasmas quedan en evidencia, se liberan de las paredes del núcleo y migran a la placa ecuatorial, marcando de esta forma la entrada a la metafase de la primera división meiótica.

En metafase I, los cromosomas bivalentes se sitúan sobre la placa ecuatorial, y los centrómeros de cada par de homólogos se orientan hacia polos opuestos. Debido a que la supresión de la separación de las cromátidas hermanas durante la primera división meiótica es uno de los factores clave de la meiosis, las cromátidas hermanas quedan orientadas hacia el mismo polo. La membrana nuclear desaparece y se forma el huso.

En la anafase I los cromosomas homólogos se segregan, dando lugar en la telofase I y citocinesis a dos células hijas denominadas meiocitos secundarios o meiocitos II: células haploides con un solo cromosoma de cada par, y cada uno de éstos, con dos cromátidas que para entonces ya no son idénticas (Salcedo, 1995).

### ***1.2.3. Meiosis II***

La misma se asemeja a una división mitótica. Durante la misma tendrá lugar la separación de las cromátidas hermanas, dando como resultado células haploides con una única cromátida de cada par y contenido de ADN C. En el caso masculino, estas células son las espermátidas redondas, y en condiciones normales, cada espermatocito primario dará origen a través de las meiosis I y II, a un total de cuatro espermátidas redondas.



**Figura 4: Fases de la meiosis**

El proceso meiótico se caracteriza por dos divisiones nucleares y dos divisiones citoplasmáticas, para lograr reducir a la mitad la información genética. (Fernández, 2019).

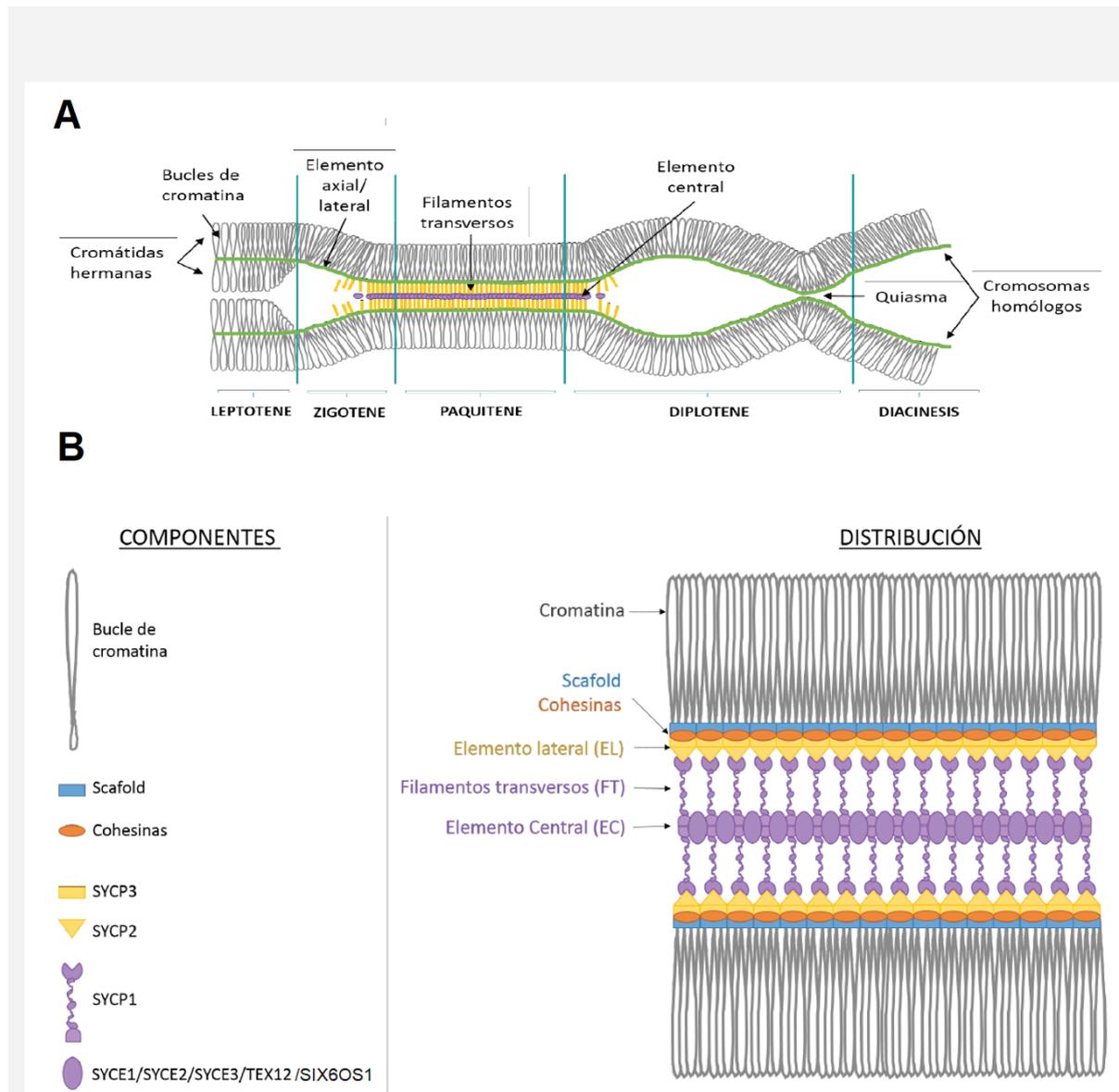
### 1.3. Complejo sinaptonémico

El CS es una estructura específica de la meiosis, de naturaleza proteica y en forma de cremallera, y es un componente clave que constituye el marco estructural para la recombinación (Handel y Schimenti, 2010; Hann, *et al.*, 2011). Su formación se inicia durante el leptoteno de la profase I, con la aparición de los elementos axiales.

Antes de la sinapsis, los elementos axiales, precursores del elemento lateral (EL) del CS (Figura 5), se forman entre las cromátidas hermanas (Offenberg, *et al.*, 1998; Yang, *et al.*, 2006; Winkel, *et al.*, 2009). Su función principal es promover la condensación de los cromosomas, participar en el apareamiento y la sinapsis entre homólogos, intervenir en la reparación de DSBs, controlar la distribución de los puntos de recombinación y contribuir al correcto ensamblaje del elemento central (Liebe, *et al.*, 2004). Durante el zigoteno, los elementos axiales se alinean según homología e inician la sinapsis, y así se define la estructura del CS. Los elementos axiales pasan a ser EL, que se mantienen unidos por la región central formada por los filamentos transversales (FT) y el elemento central (EC) (Sage, *et al.*, 1997). Las cohesinas juegan un papel esencial en el ensamblaje de los elementos axiales, desde levaduras (Klein, *et al.*, 1999), hasta mamíferos (Fraune *et al.*, 2012).

El CS está compuesto por dos EL, un elemento central y filamentos transversales entre los EL y el EC. Juntos, el EC y los FT forman la región central (RC) del CS. En los mamíferos, se han identificado y caracterizado 8 proteínas componentes del CS (Figura 5B). SYCP3 y SYCP2 inicialmente forman los elementos axiales, y posteriormente integran el EL. En humanos, SYCP3 es una proteína de 236 aminoácidos (aa) con un 66% de similaridad con SYCP3 de ratón (Lammers, *et al.*, 1994; Alsheimer, *et al.*, 2010). Esta proteína presenta un dominio corto en espiral (*coiled-coil*) en su extremo C-terminal (Offenberg, *et al.*, 1998) que interactúa con SYCP2 (Yang, *et al.*, 2006) y SYCP1 (Winkel, *et al.*, 2009), facilitando el ensamblaje del EC y la sinapsis entre homólogos alineados (de Vries, *et al.*, 2005). Entre otras posibles funciones, los dominios *coiled-coil* son motivos estructurales que median la formación de oligómeros (Cohen *et al.*, 1994). Estudios más recientes muestran que SYCP3 podría formar heterotetrámeros con SYCP2 u homotetrámeros, y que se dispone formando fibras poliméricas que interactúan extensamente con el ADN (Syrjänen *et al.*, 2014). Por su

parte, SYCP2 es una proteína de mayor tamaño que también presenta dominio *coiled-coil*, y capacidad predicha de unión al ADN (Yang, *et al.*, 2006).



### Figura 5: Complejo Sinaptonémico.

El CS se ensambla durante la profase meiótica I y es fundamental para la progresión normal de la meiosis: otorga el soporte estructural para alineamiento/apareamiento de cromosomas homólogos, actúa como scaffold para la recombinación meiótica, y asegura la correcta segregación cromosómica. **A.** Evolución del CS a lo largo de la profase meiótica. **B.** Componentes del CS en mamíferos. (Adaptado de *Fernandez, 2019*).

Los FT están compuestos de moléculas de SYCP1, que cierran la brecha entre un EL y el EC (Meuwissen *et al.*, 1992). Estos componentes se han estudiado en distintas especies:

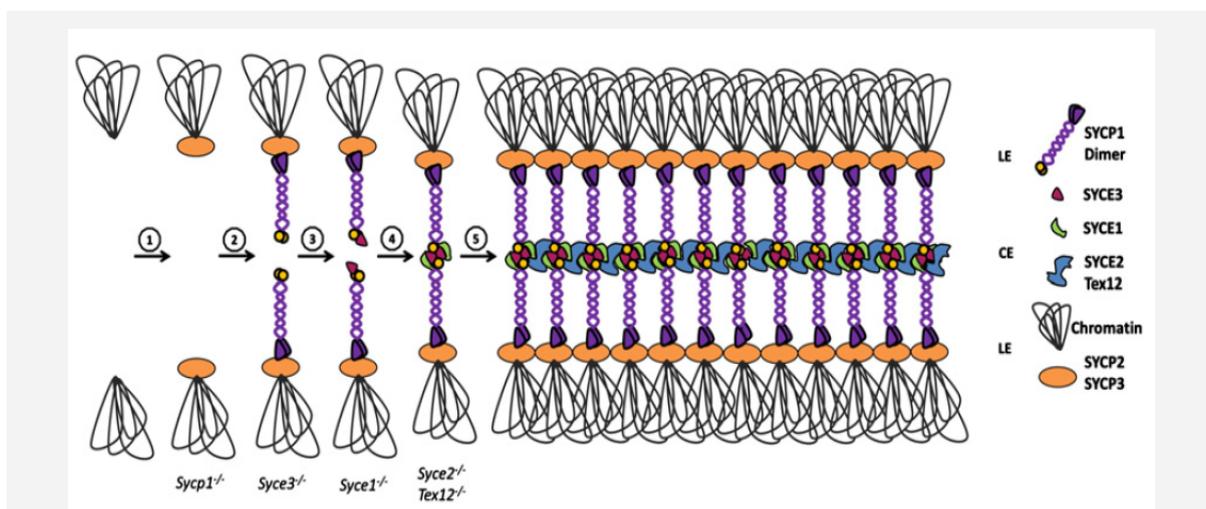
---

Zip1p en *S. cerevisiae* (Sym, *et al.*, 1993), SYCP1 en mamíferos (Meuwissen, *et al.*, 1992), SYP-1 en *C. elegans* (MacQueen, *et al.*, 2002). A pesar de las diferencias a nivel de secuencia, todas estas proteínas comparten características estructurales como el dominio *coiled-coil* en el centro de la molécula, flanqueado por dominios globulares (Schmekel, K. *et al.*, 1996). Dentro del complejo, los FT forman dímeros paralelos mediante la unión de los dominios *coiled-coil*; los dominios C-terminales están situados junto a los EL e interactuarían con el ADN (Dunce *et al.*, 2018); los dominios N-terminales de dímeros opuestos interactúan de forma antiparalela en el centro del CS (Schmekel, K. *et al.*, 1996; Figura 5B). Estudios más refinados han mostrado que SYCP1 en mamíferos forma homotetrámeros que se bifurcan en dos *coiled-coils* diméricos C-terminales (Dunce *et al.*, 2018). El autoensamblado de SYCP1, con los extremos N-terminales ensamblados cooperativamente en el centro, y los extremos C-terminales interactuando contra los EL, genera un entramado supramolecular que, a modo de cierre, media la sinapsis cromosómica.

Estudios de microscopía de luz de super-resolución y crio-microscopía electrónica de alta resolución han mostrado que los FT y el EC forman una red tridimensional vagamente definida, probablemente establecida por la asociación de los *coiled-coils* N-terminales de SYCP1, la que sería estabilizada por las proteínas del EC (Dunce *et al.*, 2018; Spindler *et al.*, 2019; Zwettler *et al.*, 2020).

En el EC, se han identificado 5 proteínas: SYCE1, SYCE2 (Costa *et al.*, 2005), SYCE3 (Schramm *et al.*, 2011), TEX12 (Hamer *et al.*, 2006), y SIX6OS1 (Gómez *et al.*, 2016), y para todas ellas se han predicho motivos *coiled-coil*. La localización e interacción de los componentes sugiere que SYCP1, SYCE1 y SYCE3 actúan de forma conjunta y son esenciales para el inicio de la sinapsis, mientras que SYCE2 y TEX12 forman un complejo separado que promueve la propagación de sinapsis, pero no son esenciales para su inicio (Bolcun-Filas *et al.*, 2007; Hamer *et al.*, 2008). SYCE1 humana posee 351 aa, y se dispone como homodímeros antiparalelos. Constaría de un núcleo central constituido por los aa 25-179 en la mitad N-terminal; ese núcleo central confiere la estabilidad estructural, y media la dimerización de la proteína (Dunne y Davis, 2019). SYCE1 se cargaría a través de una interacción de su hélice C-terminal con la hélice N-terminal de SYCE3 (Lu *et al.*, 2014). SYCE1 también interactúa con la región N-terminal de SYCP1, aparentemente

estabilizándola (Costa *et al.*, 2005). Finalmente, SYCE2 y TEX12 serían reclutados (Hamer *et al.*, 2008), probablemente en forma de un complejo hetero-octamérico (Davies, *et al.*, 2012), que a su vez se entrelazan para formar largas fibras que definen la estructura de la línea media del CS (Dunce *et al.*, 2021). El complejo SYCE2-TEX12 interactúa con el CS a través de SYCE2, que uniría SYCE1 así como la región N-terminal de SYCP1 (Costa *et al.*, 2005; Bolcun-Filas *et al.*, 2007; Schramm *et al.*, 2011). La Figura 6 muestra el orden de ensamblaje de los componentes del CS, de acuerdo con el modelo aceptado, derivado de los análisis de ratones *knockout* con ausencia de las distintas proteínas.



**Figura 6: Ensamblaje de los componentes del CS.**

En orden cronológico de aparición. No se muestra la proteína de EC SIX6OS1 ya que fue identificada después de la publicación (Fraune *et al.*, 2012)

SIX6OS1 ha sido la última proteína de la región central descubierta, y participaría en la progresión de la recombinación (Gómez *et al.*, 2016). Tiene un tamaño de 70 kDa con una región conservada de alto contenido helicoidal en su extremo N-terminal, que incluye un corto tramo de la estructura *coiled-coil* en espiral hacia el extremo C-terminal, por donde interactúa con el EC del CS. Se detectó en etapa de zigoteno hasta paquiteno en co-localización con SYCP1, con la que se superpone parcialmente en los ejes sinapsados del CS (Gómez, *et al.*, 2016). Un trabajo reciente determinó que SIX6OS1 presenta interacciones multivalentes con SYCE1 (Sánchez-Sáez *et al.*, 2020).

En paquiteno, el CS está completamente ensamblado y se realiza el entrecruzamiento (Bolcun-Filas y Schimenti, 2012; Fraune *et al.*, 2012). Durante la fase de diploteno inicia el desensamble del CS, y los componentes de la RC se separan de los cromosomas, permaneciendo sólo en los telómeros y quiasmas. Sin embargo, a pesar de la identificación de varios componentes nuevos de CS en los últimos años, sólo estamos comenzando a comprender cómo éstos interactúan precisamente para formarlo (Davies, *et al.*, 2012).

#### 1.4. Infertilidad

La infertilidad es una enfermedad multifactorial que afecta aproximadamente a un 15% de las parejas en edad reproductiva (Evers, 2002; Devroey, *et al.*, 2009). La infertilidad se define como la incapacidad de conseguir o completar un embarazo tras un período de un año de relaciones sexuales regulares y sin protección. Se estima que la infertilidad en la pareja por causas atribuibles al hombre son aproximadamente la mitad de todos los casos, en tanto la otra mitad se debería a factores femeninos (García-Cruz, *et al.*, 2009).

Si bien existen algunos trastornos de fertilidad que están asociados con defectos genéticos bien definidos, una cuarta parte de los casos clínicos en ambos sexos son de causa desconocida, en parte debido al escaso conocimiento que se tiene sobre los mecanismos básicos que regulan la fertilidad. Por tanto, no es extraño que el diagnóstico de infertilidad con etiología desconocida sea el más común en la clínica. (Llano, *et al.*, 2014)

Uno de los problemas sociales que enfrentan los países desarrollados hoy, es la disminución de la tasa de natalidad, aunque en general no se reconoce claramente que el número de parejas infértiles está aumentando en estos países. Factores sociales y ambientales podrían provocar parte del aumento en el número de pacientes con infertilidad. Muchos investigadores han afirmado que el progreso social en países avanzados y el empeoramiento del entorno natural probablemente contribuyen a la disminución de la fertilidad.

Numerosos estudios han comparado pacientes con infertilidad masculina con sujetos sanos, y los factores de riesgo propuestos incluyen la temperatura del aire, tiempo de conducción de automóviles por día, contaminación del aire, diferencias regionales en la densidad de población residencial, estrés y alcoholismo además de otras patologías puntuales (de Gennaro. *et al.*, 2003), trabajo a altas temperaturas, ruido asociado con ciertas

ocupaciones laborales, y la exposición a la radiación, ondas electromagnéticas y una variedad de sustancias químicas (Kenkel, *et al.*, 2001). Por el contrario, muchos informes indican la ausencia de una correlación entre los factores ambientales y la infertilidad masculina. Por lo tanto, no existe una opinión bien definida sobre el papel de los factores ambientales sobre la infertilidad masculina. La causa subyacente de estas anomalías en la producción de espermatozoides puede ser adquirida, congénita o ambas. Actualmente, se estima que en aproximadamente el 40% de los hombres, el diagnóstico queda por dilucidar (Krausz, 2011). Particularmente en Uruguay, un estudio reciente indica una disminución en la calidad del semen en hombres presuntamente sanos (Rosa-Villagrán *et al.*, 2021).

La azoospermia, que es la ausencia total o parcial de espermatozoides en la eyaculación, representa el 10-15% de los casos de infertilidad en el hombre y generalmente afecta al 1% de la población masculina (Maor-Sagie, *et al.*, 2015). La azoospermia se clasifica como obstructiva (OA, del inglés, “*obstructive azoospermia*”) o no obstructiva (NOA, “*non obstructive azoospermia*”). La OA surge del bloqueo en el sistema de conductos como consecuencia de una infección grave, lesión iatrogénica, o anomalías congénitas. La NOA representa el 60% de los casos de azoospermia, y es provocada por patología testicular intrínseca (insuficiencia testicular primaria) o insuficiencia testicular secundaria (endocrinopatía u otra afección que suprime la producción de espermatozoides). Las tres causas de origen genético más importantes de azoospermia son: mutación en el gen CFTR (asociado con ausencia congénita bilateral del conducto deferente y OA), anomalías cromosómicas (como el síndrome de Klinefelter) y microdeleciones en el cromosoma Y, que causan NOA (Vogt, *et al.*, 1996). Sin embargo, la evidencia sugiere que muchos otros pacientes con azoospermia tienen una predisposición genética a la enfermedad, aunque la causa no se ha dilucidado en la gran mayoría de los casos (Matzuka, *et al.*, 2002).

En la mujer, la principal causa de infertilidad es provocada por la insuficiencia ovárica primaria (POI) causada por la disfunción o agotamiento del folículo ovárico. Tiene un fenotipo variado, que va desde la pubertad tardía en adolescentes, hasta la amenorrea primaria en mujeres adultas con pérdida de la menstruación antes de los 40 años de edad.

Se han encontrado genes asociados con POI en autosomas, el cromosoma X y el ADN mitocondrial. Hasta el momento solo existe el reporte de infertilidad femenina asociada a genes del CS *SYCE1* (de Vries *et al.*, 2014) y *SYCP3* (Nishiyama *et al.*, 2010).

En general, como hemos mencionado, aproximadamente el 25% de los casos de infertilidad tanto en hombres como en mujeres, siguen sin explicarse y no se les puede encontrar un origen causal (NICE, 2013); estos casos son clasificados como "infertilidad idiopática". Por ejemplo, el 50-80% de las mujeres con insuficiencia ovárica prematura (POF) son clasificadas como idiopáticas, lo que sugiere un origen genético para la enfermedad (Laissue, 2015).

Por otra parte, se ha sugerido que las causas de infertilidad pueden ser poligénicas (Bilgin y Kovanci, 2015; Laissue, 2015), o surgir como una combinación de factores genéticos y ambientales (Massart *et al.*, 2012). Además, la evidencia creciente implica cambios epigenéticos tales como las diferencias de expresión en microARNs.

Los errores durante la meiosis parecen estar involucrados en al menos parte de los casos de infertilidad idiopática. Los defectos en la meiosis pueden resultar en errores de segregación cromosómica que llevan a la muerte celular o aneuploidía en los gametos, que es la principal causa de pérdida del embarazo (Handel y Schimenti, 2010). Dado que durante la profase meiótica I tienen lugar dos eventos principales, el apareamiento cromosómico homólogo y la recombinación, los cuales tienen un papel crucial para la segregación cromosómica posterior, se espera que alteraciones en genes importantes para estos procesos tengan profundas consecuencias para la fertilidad.

#### ***1.4.1. Infertilidad por falla meiótica y las dificultades para su estudio***

Una dificultad presente al momento de realizar estudios en esta área es la ausencia de sistemas de cultivo de células meióticas de mamíferos. Es por esta causa que el CS y sus componentes proteicos específicos, así como la dinámica de su ensamblaje, se han estudiado principalmente en modelos murinos *knock-out*. Estos estudios que utilizan ratones han vinculado recientemente muchos genes a la gametogénesis, cuyos mecanismos se están

aclarando, aunque estos hallazgos en animales aún no se han demostrado aplicables a la mayoría de los casos humanos. Ello se debe a que la identificación de los genes afectados en humanos requiere un análisis del historial genético, ya que el fenotipo de ratón *knockout* no siempre se reproduce fielmente en humanos. De hecho, hasta el momento se han identificado varios genes que participan en el apareamiento y la recombinación de cromosomas homólogos, y cuya mutación se relaciona con fallas en la capacidad reproductiva, pero sólo para muy pocos de ellos se ha demostrado su influencia en la fertilidad humana (Hann, *et al.*, 2011; Quartuccio y Schindler, 2015; Yang, *et al.*, 2015).

Durante la espermatogénesis, grandes ondas de células germinales meióticas se reponen rápida y continuamente en los testículos, siendo semi sincrónicas al inicio de la pubertad, y asincrónicas durante la edad adulta. Pero a diferencia de los machos, los estudios en relación a la meiosis femenina representan un desafío mayor. La ovogénesis en las hembras de mamífero se inicia únicamente durante el desarrollo fetal (Morelli, *et al.*, 2005), y la producción de oogonias o células germinales primitivas termina antes del nacimiento.

En la mujer, como hemos mencionado más arriba, a partir del tercer mes de desarrollo intrauterino no se vuelven a formar más oogonias, contando así con un número fijo de éstas que potencialmente pueden transformarse en óvulos maduros. Los ovocitos permanecerán en profase, paralizados en esta etapa hasta que el organismo femenino alcance la madurez sexual. De esta forma, al momento del nacimiento, la niña contará con un número fijo de ovocitos primarios en sus ovarios.

En consecuencia, aunque la ovogénesis es propensa a errores, y los eventos de segregación errónea de cromosomas durante la primera división meiótica representan la fuente más común de enfermedad genética en la progenie (Hassold, *et al.*, 2007), en la práctica es muy difícil estudiar estos eventos durante la meiosis femenina, ya que ello implica la necesidad de trabajar con ovarios fetales.

#### **1.4.2. Defectos meióticos en genes codificantes para componentes del CS, y sus consecuencias en la fertilidad**

En los años 80 algunos estudios relacionaron defectos sinápticos con posibles causas de infertilidad (Vidal *et al.*, 1982). Entre las anomalías descritas se encontraron *gaps* (discontinuidades) a lo largo del CS, asinapsis (EL no unidos por EC) y CS irregulares. Trabajos posteriores realizados en humanos y ratones, confirmaron que errores en la sinapsis se relacionaban con apoptosis de espermatocitos en fase de paquiteno, con la consecuente afectación en la fertilidad (Burgoyne *et al.*, 2009).

Como hemos mencionado, la recombinación meiótica es fundamental para la correcta segregación de los cromosomas homólogos en la meiosis I, y para generar variabilidad. Se observó que, en modelos animales, una reducción de la tasa de recombinación (Roeder, 1997) o la localización incorrecta de estos puntos (Ross, *et al.*, 1996) se asocian a un aumento de la no disyunción de los cromosomas homólogos en la anafase I, y gametos con aneuploidías. Ambos tipos de defectos también han sido asociados con aneuploidías en humanos: reducción de la recombinación (Lynn, *et al.*, 2004) y variación en la localización de estos puntos. Casos extremos en la reducción de la recombinación se han asociado también con azoospermia (Lamb *et al.*, 1996).

En el año 2000, Yuan *et al.*, generaron un ratón *knock-out* para el gen *Sycp3*. Los ratones macho y hembra *knockout* para *Sycp3* se desarrollaban con normalidad, pero se vio que los machos mutantes en homocigosis eran estériles, con testículos más pequeños que los normales. La histología mostró detención meiótica en el zigoteno, con una ausencia completa de espermatidas redondas, espermatidas elongadas y espermatozoides. Contrariamente, hembras *knock-out* en *Sycp3* o *Sycp2* muestran efectos leves sobre la sinapsis, y los ovocitos transitan parcialmente la meiosis. Sin embargo, el tamaño de las camadas se reduce debido a una mayor frecuencia de ovocitos aneuploides (Yang, *et al.*, 2006).

Estudios realizados en ratones muestran que la ausencia de SYCP3 o SYCP2 provoca defectos sinápticos y apoptosis de los espermatocitos. Los meiocitos que carecen de SYCP3 no forman elementos axiales, y SYCP2 no puede dirigirse a los cromosomas meióticos (Liebe, *et al.*, 2004). Además, los cromosomas en los espermatocitos *Sycp3*<sup>-/-</sup> son

significativamente más largos en comparación con los de los meiocitos de tipo salvaje, evidenciando que SYCP3 es imprescindible para una compactación cromosómica (Kolas, *et al.*, 2004). De estas observaciones se desprende que SYCP3 y los núcleos de cohesina deben actuar en conjunto para asegurar la formación de un eje cromosómico normal (Revenkova, *et al.*, 2004).

Miyamoto *et al.*, reportaron en 2003 una mutación para el gen *SYCP3* como la probable causa de azoospermia en dos hombres infértiles. La mutación descrita generaba un codón *stop* prematuro, resultando en una proteína más corta. La espermatogénesis en estos pacientes se interrumpió en la meiosis temprana, mostrando una alteración grave de las células de los túbulos seminíferos (Miyamoto *et al.*, 2003). Durante los últimos años, se han reportado varios casos de infertilidad humana en los que se detectaron mutaciones en el gen *SYCP3*, si bien la vinculación de dichas mutaciones con la infertilidad fue inferida pero no demostrada (Geisinger y Benavente, 2016).

Contrariamente a lo observado para mutantes en componentes del EL, la eliminación de los componentes de la RC afecta a ambos sexos por igual. Los ratones *knockout* son infértiles por causa de fallas sinápticas y muerte celular masiva de los meiocitos (Schramm *et al.*, 2011), estudios en ratones *SYCE1*<sup>-/-</sup> mostraron que ambos sexos eran infértiles. Las hembras tenían ovarios diminutos y desprovistos de folículos; mientras que los machos tenían testículos que eran un 20-30% más pequeños que en ratones WT (Bolcun-Filas *et al.*, 2009). Estas diferencias en los fenotipos de ratones *knockout* conducen a la suposición de que la RC tendría un papel estructural más importante que los EL, que podría estar relacionado con el proceso de recombinación homóloga.

Se ha visto que en ratones *knockout* para *Sycp1*, los elementos axiales se forman y alinean normalmente en leptoteno/zigoteno, pero los homólogos fallan al llegar a la sinapsis. Estudios previos demuestran que SYCP1 es fundamental para la coordinación y formación de entrecruzamientos y se observó que en espermatocitos *Sycp1*<sup>(-/-)</sup> no formaron cuerpos XY (de Vries *et al.*, 2005). La identificación de las proteínas pertenecientes al EC deja en evidencia la importancia de SYCP1, ya que en su ausencia las proteínas del EC no se cargan al CS

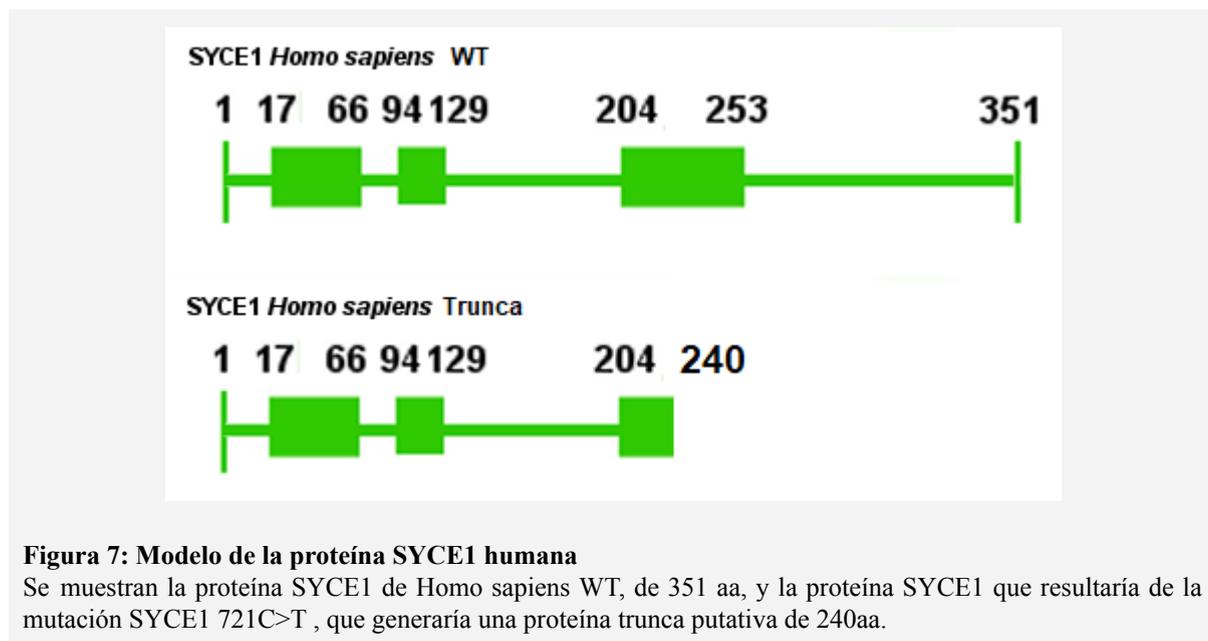
(Schramm, *et al.*, 2011), apoyando la idea de que SYCP1 actúa como marco para el ensamblaje de la RC (Ollinger, *et al.*, 2005; Hamer, *et al.*, 2008).

Con respecto a la presencia de mutaciones en genes de la RC del CS en pacientes humanos infértiles, hasta el momento en que se desarrolló esta tesis únicamente se habían detectado mutaciones humanas en el gen *SYCE1* (ver a continuación). Más recientemente, en 2021, un trabajo reportó mutaciones en pacientes infértiles de ambos sexos, en el gen *SIX60SI* humano (Fan *et al.*, 2021; ver Discusión).

### 1.5. Mutaciones puntuales reportadas para el gen *SYCE1* humano

Los primeros dos casos reportados de mutaciones en la RC del CS vinculados a infertilidad humana fueron ambos en el gen *SYCE1*, y en ambos los padres eran heterocigotas para la mutación mientras que los pacientes presentaban la mutación en homocigosis, indicando herencia recesiva.

En 2014, De Vries *et al.*, reportaron una mutación para el gen *SYCE1* en la posición 721C>T. El trabajo se basó en el estudio de una familia en la que hermanas infértiles homocigotas para esta mutación, nacidas de padres consanguíneos heterocigotos, presentaban amenorrea primaria, sugiriendo una causa genética con un modo recesivo de herencia. La mutación conduce a una sustitución de una citosina por una timina provocando la aparición de un codón *stop* prematuro (mutación *non-sense*) que resultaría en una proteína predicha de 240 aa, es decir, más corta que la proteína normal, de 351 residuos (Figura 7).



**Figura 7: Modelo de la proteína SYCE1 humana**

Se muestran la proteína SYCE1 de Homo sapiens WT, de 351 aa, y la proteína SYCE1 que resultaría de la mutación SYCE1 721C>T, que generaría una proteína trunca putativa de 240aa.

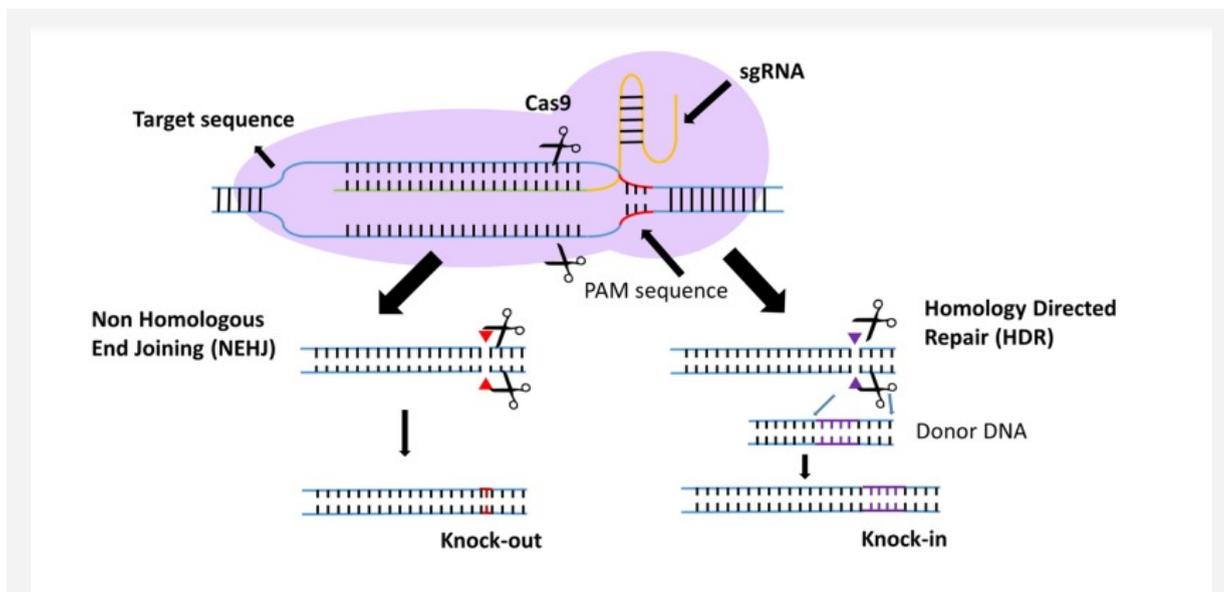
En 2015 Maor-Sagie *et al.*, estudiaron otra mutación para el gen *SYCE1*. La mutación, reportada en la posición c.197-2 A> G, interrumpiría el sitio aceptor de *splicing* del intrón 3 (la proteína completa consta de 13 exones), conduciendo a una proteína trunca de 86 residuos. Este trabajo estudió a una familia judío-iraní en la que dos hermanos varones, hijos de padres consanguíneos, padecían azoospermia no obstructiva (NOA). El análisis reveló que ambos hermanos contenían la mutación, y el examen histológico de sus testículos mostró arresto en la maduración de células germinales, que no avanzaban más allá de la profase meiótica (meiocitos). La herencia recesiva y las observaciones histológicas son consistentes con lo observado en el ratón *knockout* de *Syce1*, sugiriendo la vinculación de la mutación humana en *SYCE1* con el fenotipo NOA.

Más recientemente, se reportó la tercera mutación de SYCE1 vinculada a casos de infertilidad en humanos. La variante homocigota c.375-2A>G que se asoció a casos de NOA en una familia iraní (Pashaei *et al.*, 2020).

La presente tesis está centrada en la caracterización en el ratón de una mutación equivalente a la primera reportada para *SYCE1* en 2014 por DeVries y colaboradores.

### 1.6. Uso de CRISPR/Cas para la edición de genomas.

CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) y los genes asociados a CRISPR (*Cas*) forman parte del sistema de respuesta inmune adaptativa de algunos organismos procariontes al intervenir en la eliminación de material exógeno invasor. Actualmente, CRISPR es la herramienta más utilizada para la edición génica, permitiendo la obtención de diversos modelos animales (Menchaca *et al.*, 2017). Este sistema cuenta con tres componentes: la endonucleasa Cas9 capaz de generar DSB, un CRISPR RNA (crRNA) complementario al sitio objetivo y un *trans-activating* RNA (tracrRNA) necesario para la unión del crRNA a la nucleasa. El sistema se puede simplificar con la hibridación de ambos ARNs, generando un sgRNA (ARN guía) (Figura 8).



**Figura 8: Sistema CRISPR/Cas9.**

Cas9 (lila) reconoce el ADN diana gracias a la secuencia PAM (rojo) localizada próxima al sitio de corte. El sgARN interactúa con Cas9 y la guía hasta la secuencia específica por complementariedad, donde se efectuará un corte de doble hebra en el ADN diana. Una ruptura de doble hebra (DSB) en la secuencia objetivo se puede reparar mediante vías de unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación dirigida por homología (HDR). Extraído de Hryhorowicz *et al.*, 2017.

La nucleasa Cas9 es guiada hacia determinado sitio del genoma complementario al ARN guía e induce DSB en el ADN, algunos nucleótidos antes de una secuencia denominada

---

PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), característica de cada Cas9 según su origen. Por ejemplo, para la Cas9 más común proveniente de *Streptococcus pyogenes* el PAM es NGG (donde N es cualquier desoxinucleótido) (Mojica *et al.*, 2009). Una vez introducidos los cortes en el ADN, la maquinaria de reparación celular se encarga de añadir las modificaciones genéticas vía unión de extremos no homólogos (NHEJ) o la reparación dirigida por homología (HDR) (Figura 8B).

NHEJ es una vía rápida y predominante en las células, pero poco fiel y propensa al error, que termina por introducir pequeñas inserciones y deleciones (*indels*) en la región de corte. Estas *indels* desorganizan la secuencia diana y generan mutaciones con cambios en el marco de lectura que provocan la pérdida de función del gen (*knock-out*) (Ghezraoui *et al.*, 2014). La HDR es más precisa, pero de baja eficiencia. Requiere de un molde de DNA que, por recombinación homóloga, acabará incorporándose al genoma. El molde puede diseñarse para introducir una secuencia deseada en cualquier región del genoma (Shao *et al.*, 2017). En este contexto, un abordaje posible para que siga la vía de reparación HDR y generar modelos animales *knock-in* (por ejemplo, introducción de mutaciones específicas), es proveer al sistema de un molde o ssODN (*Single Stranded Oligonucleotides*), además del/los ARNs guías y la nucleasa Cas9 (Qin *et al.*, 2015; Sternberg y Doudna, 2015).

### 1.7. Justificación

A pesar de la gran importancia de los eventos que rodean a la meiosis, y los componentes que conforman el CS, en particular la proteína SYCE1, no existen estudios exhaustivos en humanos que arrojen luz sobre las bases moleculares de los eventuales errores que se presenten durante la meiosis y el proceso de ensamblaje del CS en casos de mutaciones reportadas, supuestamente vinculadas a infertilidad.

El estudio detallado para caracterizar la etiología y mecanismos de este tipo de infertilidad en humanos representa un desafío por varios motivos. En el hombre, el material histológico disponible proveniente de biopsias resulta insuficiente para brindar información concluyente. En mujeres se suma otra complejidad, ya que como hemos mencionado, el ensamblaje del CS y sinapsis ocurren durante el período embrionario y, por tanto, la

enfermedad sólo puede ser evidenciada y diagnosticada posteriormente al momento en que se dio la falla. Además, el estudio de personas en esta etapa tiene obvios impedimentos éticos.

La presente tesis formó parte de un proyecto de investigación del grupo, en el cual se empleó el sistema de edición genómica CRISPR/Cas (Jinek, *et al.*, 2012), para generar un modelo murino conteniendo una mutación (Min, *et al.*, 2015) equivalente a la primera reportada en humanos para el gen *SYCE1*. El objetivo principal de dicho abordaje era contribuir al conocimiento de las causas y mecanismos de este tipo de infertilidad, además de aportar al entendimiento de los procesos normales asociados al CS. Adicionalmente, fue planteado que los propios ratones mutantes generados durante el proyecto como modelos de la enfermedad podrían luego ser empleados en el desarrollo de eventuales terapias para corregir este tipo de mutaciones mediante la edición genómica.

Existen antecedentes de la generación de ratones mutantes empleando sistemas de edición genómica, para el estudio de mutaciones humanas causantes de patologías (e.g. Arimura, *et al.*, 2005). Sin embargo, no existen estudios previos de este tipo para analizar mutaciones en genes para proteínas del CS en humanos. Por este motivo, este trabajo podría aportar una prueba de principio que valide la estrategia experimental aplicada para futuros estudios de otras mutaciones en genes de proteínas del CS vinculadas a infertilidad.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. Hipótesis

**1:** Las mutaciones observadas en el gen *SYCE1* de humanos infértiles, cuando se encuentran en homocigosis, son las causantes de la condición infértil. Mutaciones equivalentes en el ratón conducen a un fenotipo similar, permitirían su estudio exhaustivo.

**2:** Los mecanismos de la enfermedad afectan el normal funcionamiento del producto del gen *SYCE1*, ya sea a través de la degradación de su transcrito o la presencia de una proteína trunca con menor o nula funcionalidad, o una combinación de ambas.

### 2.2. Objetivos

#### **2.2.1. Objetivo general**

Aportar al conocimiento molecular de las causas de un tipo de infertilidad idiopática humana.

#### **2.2.2. Objetivos específicos**

1. Caracterizar un modelo murino “humanizado”, generado por el grupo de investigación, conteniendo una mutación equivalente a la reportada por deVries y colaboradores en 2014 para el gen *SYCE1*, en pacientes con infertilidad idiopática.
2. Demostrar la etiología de este tipo de infertilidad, empleando la línea de ratones mutantes generados.
3. Determinar si los mecanismos de la patología se vinculan a desajustes en el ensamblado del CS, sinapsis y/o recombinación.
4. Determinar si los mecanismos de la enfermedad involucran la producción de proteína aberrante.
5. Realizar aportes al conocimiento de la dinámica del CS y sus diferencias en situaciones de salud/ enfermedad.

### 3. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN Y MÉTODOS

#### 3.1. Animales y aprobación ética

En este trabajo se utilizaron ratones (*Mus musculus*) de la cepa C57BL/6. Dichos ratones han sido producidos en colaboración con la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) del Instituto Pasteur de Montevideo (IPMont), categorizado como un bioterio libre de patógenos específicos (SPF, *Specific Pathogen Free*) y se mantuvieron en dicha Unidad. Los ratones fueron trasladados regularmente al Depto. de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE, Montevideo, Uruguay) para la realización de los experimentos indicados en este proyecto, según el cronograma y la disponibilidad de los mismos.

Los animales se mantuvieron alojados en jaulas ventiladas individualmente (Tecniplast, Milán, Italia), en un ambiente controlado con temperatura  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , una humedad relativa del 40-60%, en un ciclo de luz/oscuridad de 14/10 h. Los alimentos se esterilizaron en autoclave (Labdiet 5K67, PMI Nutrition, IN, EE. UU.), y el agua se administró a demanda.

Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité institucional de ética animal del IPMont - Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA), número de protocolo 007-18, de conformidad con la Ley Nacional de Experimentación Animal 18.611 (Uruguay) y las directrices internacionales para el cuidado de animales (Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, NRC, 1996). Todos los procedimientos experimentales con animales que se realizaron en el IIBCE también fueron de conformidad con la Ley Nacional 18.611, y siguiendo las recomendaciones de la Comisión Nacional de Experimentación Animal de Uruguay (CNEA, protocolo experimental aprobado 009/11/2016).

### 3.2. Obtención de ratones *Knock-in*

Al momento de inicio de la presente tesis, el grupo de investigación acababa de aplicar mutagénesis mediante CRISPR/Cas con el objetivo de obtener una línea de ratones humanizados, con una mutación puntual equivalente a *SYCE1* c.721C>T identificada en el gen *SYCE1* humano. En esta tesis para hacer referencia a la mutación en estudio hemos considerado la variante de transcripción #4 de *SYCE1* humana (NM\_001143764) que codifica la isoforma SYCE1 más larga, por lo cual la mutación se ubica en la posición 721 de la secuencia codificante. La misma mutación había sido descrita como *SYCE1* c.613C> T por de Vries *et al.* (2014), dado que los autores consideraron la variante #1 (NM\_130784.2), que usa un codón de inicio *downstream*. En el ratón, dicha C corresponde a la posición 727 (*Syce1* c.727C> T; ver Resultados).

#### 3.2.1. Diseño de moléculas para mutagénesis y manipulación animal

Las secuencias codificantes de los genes *SYCE1* humano y *Syce1* de ratón, fueron comparadas mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) herramienta informática capaz de comparar secuencias con una gran base de datos. El diseño y la selección de las moléculas que se utilizaron en la mutagénesis dirigida se llevó a cabo teniendo en cuenta los ranking *on-target* y *off-target*, y la distancia del ARN guía (*sgRNA*) al sitio objetivo de la mutagénesis<sup>1</sup>. La síntesis del *sgRNA* seleccionado se encomendó a la empresa Synthego (Menlo Park, California, EE. UU), como CRISPR*evolution* *sgRNA EZ kit* (3 nmoles). El donante de oligonucleótidos monocatenario [ssODN (*single strand oligonucleotides donor template*)] empleado como molde para la reparación dirigida por homología (HDR) se diseñó utilizando herramientas en línea para la búsqueda de mutaciones silenciosas<sup>2</sup> y el análisis de enzimas de restricción<sup>3</sup>, y encargado a IDT como *PAGE Ultramer DNA Oligo*, 4 nmoles (Coralville, Iowa, EE. UU.). El motivo adyacente al protoespaciador (PAM) se interrumpió en el molde donador ssODN conteniendo la mutación puntual a

---

<sup>1</sup> <http://www.broadinstitute.org/rnai/public/analysis-tools/sgrna-design>

<sup>2</sup> <http://watcut.uwaterloo.ca/template.php>

<sup>3</sup> <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>

reemplazar en el genoma, de modo de así evitar la acción de la nucleasa después de una eventual corrección.

La técnica utilizada para introducir la mutación generada fue la microinyección citoplasmática. Para ello se emplearon hembras receptoras pseudopreñadas de la cepa B6D2F1 de 0,5 dpc, que al momento del procedimiento fueron sedadas con una mezcla de ketamina (100 mg / kg, Pharmaservice, Ripoll Vet, Montevideo, Uruguay), xilazina (10 mg / kg, Seton 2%; Calier, Montevideo, Uruguay) y ácido tolfenámico, que se administró por vía subcutánea (1 mg / kg, Tolfedina, Vetoquinol, Madrid, España) para proporcionar efectos analgésicos y anti-inflamatorios (Schlapp *et al.*, 2015).

Las microinyecciones se realizaron sobre cigotos de la cepa C57BL/6J a los que se administró una mezcla de 20 ng/ $\mu$ L sgRNA, 30 ng/ $\mu$ L Cas9 mRNA y 20 ng/ $\mu$ L ssDNA oligo. Los cigotos que sobrevivieron al procedimiento fueron transferidos al oviducto de las hembras mencionadas anteriormente. Se implantaron aproximadamente 25 cigotos en cada hembra, siguiendo los procedimientos quirúrgicos establecidos en la instalación animal (Crispo, *et al.*, 2013). El diagnóstico de embarazo se determinó mediante inspección visual por un cuidador de animales experimentado dos semanas después de la transferencia de embriones, y el tamaño de la camada se registró el día 21 después del nacimiento.

### 3.3 Genotipado de ratones: amplificación por PCR estándar, purificación de bandas y secuenciación

Para realizar el estudio del genotipo de los ratones se utilizó la punta de cola (de un tamaño aproximado de 0,5 cm) de cada individuo, a los 20 días del nacimiento. Para el genotipado de embriones, las hembras preñadas y sus embriones se disecaron según se indica más abajo, los embriones se sexaron, se separaron los ovarios de los embriones hembra (Fig. 8) y se extrajo un fragmento de tejido caudal de cada embrión para el genotipado.

El ADN genómico se extrajo mediante el kit de purificación de ADN genómico *GeneJET Genomic DNA Purification Kit K0721* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.). Para ello, se procedió a la lisis mecánica del tejido con un bisturí. Luego de la resuspensión en solución de digestión y adición de proteinasa K según lo

indicado en el protocolo, se agitó la mezcla para homogeneizar, se incubó a continuación a 56°C entre 6 horas y toda la noche, y se prosiguió de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La cuantificación de ADN extraído se realizó en un espectrofotómetro Nanodrop® 1000 (Thermo Scientific).

La región genómica de interés se amplificó por PCR a tiempo final, y los fragmentos amplificados fueron posteriormente enviados a secuenciar, de modo de identificar aquellos individuos que hubieran adquirido la sustitución nucleotídica deseada, y que a la vez no hubieran sufrido otras alteraciones (ej. *indels*).

Los reactivos (Tabla 1) y el programa (Tabla 2) usados en la amplificación del ADN genómico se detallan a continuación. La reacción se realizó en un termociclador Bioer Technology TC-24/H(b) (Bioer, Hangzhou, China.)

Los cebadores empleados fueron:

- *Syce1-727-FOR*: 5 'TCAAGGAAGGTGAGGTCAGG 3';
- *Syce1-727-REV*: 5 'ATGAAGAGACATACCGGCAG 3'.

**Tabla 1:** Mix PCR

REACTIVOS	VOLUMEN (1X)
H2O	10,7µl
Buffer PCR (10X)	2µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2µl
10 mM dNTPs	1µl
10 mM Primer F	1µl
10 mM Primer R	1µl
Taq	0,3µl
ADN genómico	2µl

Tabla 2: Programa termociclador

CICLOS X (33)	TEMP°C / TIEMPO
Desnaturalización inicial	95°C/ 5 minutos
Desnaturalización	95°C/ 30 segundos
<i>Annealing</i>	57°C/ 30 segundos
Elongación	72°C/ 30 segundos
Elongación final	72°C/ 5 minutos
Producto de 469 pb	

La correcta amplificación de los productos de PCR fue analizada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % en *buffer* TAE 1X conteniendo bromuro de etidio, según los procedimientos habituales. Las bandas fueron visualizadas en un transiluminador de luz UV y recortadas y recuperadas de la agarosa mediante el *GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro kit #K0831* (ThermoFisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ADN se recuperó en 12 µl de buffer de elución, y se almacenó a -20 °C.

Posteriormente, la secuenciación bidireccional de las muestras amplificadas se realizó en una empresa especializada (Macrogen, Seúl, Corea del Sur). Los cromatogramas resultantes se analizaron manualmente para encontrar el sitio de la mutación.

Es importante señalar que debido a que los ratones homocigotos mutantes resultaron infértiles (ver Resultados), la única fuente de obtención de homocigotos fue a través del cruzamiento de ratones heterocigotos de ambos sexos. Por lo tanto, el procedimiento de genotipado se llevó a cabo continuamente a lo largo del proyecto, dada la necesidad de conocer el genotipo de cada una de las crías.

### 3.4. Ensayos de fertilidad

Como una forma de validar nuestra hipótesis inicial se realizaron ensayos de fertilidad entre ratones mutantes para SYCE1. Para ello, se cruzaron ratones adultos jóvenes de 2 meses de edad, mutantes homocigotos y heterocigotos, machos y hembras, que fueron cruzados con ratones *wild-type* (WT). Se usaron ratones WT de la misma camada como grupos de control. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada género en parejas o harenes reproductores (dos hembras y un macho). Las parejas o harenes armados se mantuvieron juntos por un período de 3 meses y al cabo de este tiempo, los individuos que no tuvieron descendencia se consideraron infértiles.

### 3.5. Análisis Histológico

#### 3.5.1 Inclusión en resina epóxica.

Los testículos y ovarios enteros se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2,5% en *buffer* fosfato 0,1M pH 6,9 y permanecieron durante 12 horas a 4 °C. Para el caso de testículos WT o heterocigotas, para los pasos siguientes el tejido fue cortado en trozos. Para ovario o testículos mutantes homocigotas, se continuó trabajando con el órgano entero debido a su menor tamaño. Se realizaron 5 lavados de 10 minutos en *buffer* fosfato. Luego se fijó en tetróxido de osmio al 1% y se realizaron 3 lavados sucesivos de 10 minutos con *buffer* fosfato. Las muestras se deshidrataron en etanol al 25% por 15 minutos, y luego en soluciones de etanol al 50, 75 y 100% por 30 minutos. Luego de la deshidratación, se realizó inclusión en resina (Durcupan, ACM, Fluka, Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri EE.UU.). Dicha inclusión consistió en 2 inmersiones de la muestra en acetona absoluta por 30 minutos y 4 infiltraciones de concentración progresiva (Durcupan/ acetona) en proporciones 1/3, 1/1, 3/1 por 30 minutos y resina pura por 1 hora (Glauert y Lewis, 1998). A continuación, se rellenaron con resina pura los moldes conteniendo las muestras, y se formaron los bloques que se dejaron secar en la estufa a 65 °C por 3 días.

### **3.5.2 Cortes semifinos**

Utilizando un ultramicrotomo Power Tome XL (Boeckeler Instruments, Tucson, Arizona, EE. UU.), se realizaron cortes de 250 nm de espesor a partir de los bloques descritos en el ítem anterior. Los cortes realizados se fijaron sobre portaobjetos, se tiñeron con solución de azul de toluidina al 1% y tetraborato de sodio al 1%, y se examinaron en microscopio óptico de campo claro. Se hizo un registro fotográfico de las muestras utilizando un microscopio Olympus FV300 equipado con una cámara DP70 y el software DPController v.1.1.1.65.

## **3.6 Análisis por citometría de flujo (CMF)**

### **3.6.1. Suspensión de células testiculares**

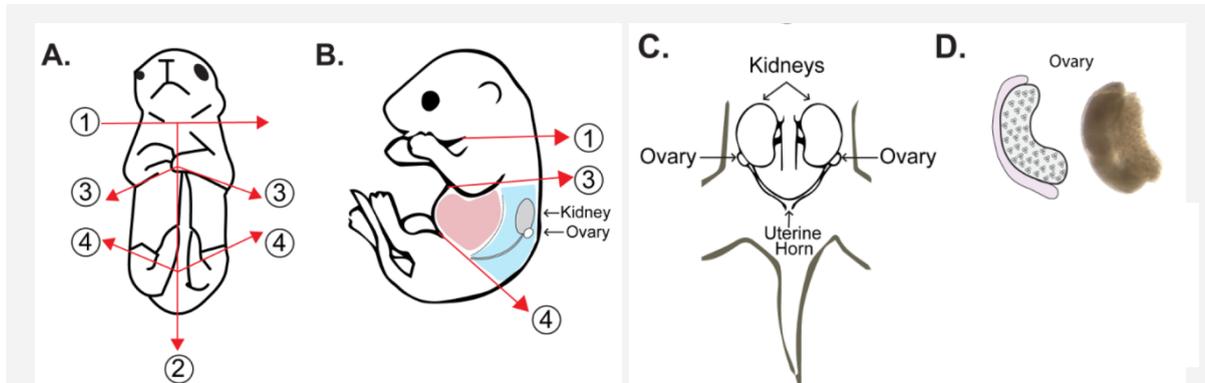
Para obtener las suspensiones de células testiculares seguimos el protocolo descrito por Rodríguez-Casuriaga, *et al.*, 2013. Se disecaron los testículos y se colocaron en una placa de Petri de vidrio de 96 mm sobre hielo, conteniendo 10 ml de DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%. Se retiró la túnica albugínea y se cortaron los testículos en trozos de 2-3 mm de lado. A continuación, el tejido fue procesado en un equipo disgregador mecánico (*Medimachine*, Becton Dickinson). Dentro de unidades disgregadoras descartables (Medicons, BD) se colocaron 4 o 5 trozos de tejido en 1 ml de DMEM, con el disgregador encendido se procesaron durante 50 segundos. La suspensión celular resultante se colectó con una jeringa de 3-5 ml y se filtró a través de una malla de 50  $\mu\text{m}$  humedecida previamente con 0,5 ml de DMEM suplementado. Luego se realizó un segundo filtrado con malla de 50  $\mu\text{m}$  y se mantuvo en hielo. En cámara de Neubauer se contó y ajustó la concentración celular a  $1-2 \times 10^6$  células/ml con DMEM suplementado y se agregó NDA (ácido 2-naftol-6,8-disulfónico, sal dipotásica) hasta una concentración final del 0,2% para evitar la aglutinación celular. Finalmente, se tiñó con *Vybrant Dye Cycle Green* 10  $\mu\text{M}$  y se mantuvo en agitación suave a 80 rpm a 35°C por una hora, protegido de la luz hasta su medición.

### 3.6.2. Análisis citométricos

Todos los análisis se realizaron en el Servicio de Citometría de flujo y Clasificación Celular (SECIF) del IIBCE. El material obtenido fue teñido con *Vybrant DyeCycle Green* (VDG, *Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, California, EE. UU.) a concentración 10  $\mu\text{M}$  por 1 hora a 35 °C en oscuridad con agitación suave (80 rpm). El análisis de CMF se realizó en un citómetro de flujo y clasificador celular MoFlo Astrios EQ (Beckman Coulter, Brea, California, EE. UU.), usando láser de 488 nm, boquilla de 100  $\mu\text{m}$  (25 psi) y el software Summit (Beckman Coulter). La calibración y el control de calidad del equipo se realizaron utilizando partículas fluorescentes *Ultra Rainbow* de 3,0  $\mu\text{m}$  (Spherotech, Lake Forest, Illinois, EE. UU.). La fluorescencia emitida por el VDG se detectó con un filtro de banda 513/26. Se registraron los siguientes parámetros: dispersión frontal (FSC-Height con máscara P1), dispersión lateral (SSC-Height ), 513/26 área de pulso (intensidad de fluorescencia VDG), y 513/26 ancho de pulso. Los dobletes se excluyeron usando gráficos de puntos de 513/26 área de pulso vs 513/26 ancho de pulso . Los datos de CMF se analizaron con el software Kaluza (Beckman Coulter).

### 3.7. Disección de ovarios fetales

Para obtener embriones de 18,5 días poscoito (dpc), nos basamos en el protocolo elaborado por Hwang, *et al.*, 2018. Las hembras gestantes fueron sacrificadas por dislocación cervical en conformidad con las recomendaciones de la CEUA. Se realizó una incisión en V en la cavidad pélvico abdominal, se diseccionó el cuerno uterino materno, se removieron los embriones de la placenta y fueron transferidos a placas de Petri con solución salina con tampón fosfato a 37°C. Los embriones se sacrificaron por decapitación (Fig. 9A) con tijeras 3,5" y se colocaron en PBS (ver composición en Tabla 3) a 37°C. Cada embrión se diseccionó en placa de Petri con 3 ml de PBS a 37°C cortando la línea media ventral, a la mitad posterior y debajo de las extremidades anteriores. Se abrió el abdomen, se removieron las vísceras y se pasaron los ovarios (Fig. 9) a otra placa con PBS a 37 °C. Los ovarios disecados se utilizaron para ensayos de inmunocitoquímica, o para RT-qPCR.



**Figura 9: Cortes de disección para extracción de ovario embrionario**

1-En el primer corte se decapitó al embrión, 2- Se cortó la línea media ventral, 3- luego la mitad anterior, debajo de las extremidades delanteras, 4- finalmente se removieron las extremidades posteriores y la cola. A: vista frontal de los cortes, B: vista lateral de los cortes. C: Esquema de la vista frontal de la pared abdominal del embrión y la ubicación de los ovarios, luego de la remoción del hígado y los intestinos. D: Representación esquemática de la morfología del ovario. *Hwang, et al., (2018)*.

**Tabla 3:** Soluciones para el acondicionamiento de ovarios embrionarios.

Solución fijadora Paraformaldehído	Buffer hipotónico	PBS
PFA 1%	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 17mM	NaCl 140mM
Tritón X100 0,2 %	sacarosa 50mM	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 1,9 mM
pH 9,2	EDTA 5 mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 8,9 mM
	DTT 0,5 mM	pH 7,4
	Tris HCl 30 mM	
	inhibidor de proteasa	
	pH 8,2	

### 3.8. Inmunofluorescencia

Los ensayos de inmunolocalización se realizaron en células de diseminación gonadal obtenidas mediante la técnica de secado (Peters, *et al.*, 1997), con modificaciones menores.

### ***3.8.1. Esparcidos de células de testículo***

Suspensiones celulares de testículo obtenidas como se describió más arriba (pero sin teñir) se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, y se suspendieron en PBS a concentración aprox. de  $10^7$  células/ml. La suspensión celular fue tratada con *buffer* hipotónico (Tabla 3) en proporción 1:1 e incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. El tratamiento hipotónico fue detenido agregando 1 volumen de sacarosa 100mM. Los portaobjetos utilizados se sumergieron previamente en paraformaldehído (PFA) (Tabla 3) y se inclinaron para que se forme una gota sobre una de las esquinas. Sobre esa misma esquina se depositó una alícuota de las células en suspensión (40µl), con movimientos suaves de inclinación se dejó dispersar el material y luego se llevó a cámara húmeda cerrada por 2 horas. Posteriormente, se secó a temperatura ambiente por 30 minutos con cámara entreabierta. Finalmente, se enjuagaron y se dejaron secar a temperatura ambiente, protegidos del polvo. Una vez listos, se usaron inmediatamente o se almacenaron en freezer – 80°C protegidos por papel aluminio hasta el momento de su empleo.

### ***3.8.2. Esparcidos de células de ovarios embrionarios***

Se colocó cada par de ovarios en 0,5 ml de *buffer* hipotónico (Tabla 3) y se incubaron por 30 minutos. Luego se pipeteo 50 µl de sacarosa 100 mM sobre portaobjetos limpios y se transfirió un par de ovarios a cada uno. Usando un par de agujas se disgregaron los ovarios para liberar las células en la solución de sacarosa. Se adicionaron 40 µl de PFA 1% para fijar de forma uniforme sobre la superficie del portaobjetos, y se transfirieron a cámara húmeda para incubación durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego de este tiempo se abrió la cámara para que el portaobjetos se secase lentamente. Finalmente, cuando se completó el secado, los portaobjetos se envolvieron en papel aluminio y se almacenaron a -80 ° C hasta su uso.

### ***3.8.3. Anticuerpos***

Dado que no existía un anticuerpo comercial anti-SYCE1 dirigido contra la región N-terminal, se encargó su desarrollo a la empresa *GenScript* (Piscataway, Nueva Jersey,

EE.UU.). El anticuerpo primario contra la región N-terminal de SYCE1 de ratón producido detecta la forma nativa de la proteína y su forma mutante putativa. Para esto, los péptidos ATRPQPLGMEPEGSC y CPEGARGQYGSTQKI de la parte N-terminal de la proteína se conjugaron con KLH y se usaron como inmunógenos en conejos Nueva Zelanda. El anticuerpo purificado por afinidad se empleó tanto para microscopía de fluorescencia (1:200) como en ensayos de Western blot (0,3 µg / ml).

También se usaron anticuerpos primarios contra otros componentes de CS, donados gentilmente por el Dr. Ricardo Benavente de la Universidad de Würzburg, Alemania. Los mismos habían sido generados por la empresa SeqLab mediante inmunización de animales con los péptidos respectivos y purificadas por afinidad: anti-SYCP3, hecho en cobayo contra el extremo Nt de SYCP3 (aa 27-38) de rata (dilución 1:200); anti-SYCP1, hecho en conejo contra el extremo Nt (aa 1-124) de SYCP1 de ratón (dilución 1:200); anti-SYCE3, hecho en conejo contra proteína SYCE3 entera (88aa) de ratón (dilución 1: 200); anti-TEX12, hecho en cobayo contra proteína entera de ratón (dilución 1:200). Se empleó un anticuerpo comercial contra la variante de histona anti-γH2AX en Millipore (conejo anti-ratón; 1:500, 05-636; Millipore, Alemania). El anticuerpo primario anti-β-tubulina, empleado en los Western blots para revelar la β-tubulina como control de carga, se adquirió de Abcam (ab6046, 1: 8000, Abcam, Cambridge, Reino Unido), y se reveló utilizando un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (1:30 000, Pierce, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.)

Los anticuerpos secundarios adecuados acoplados a los fluorocromos AlexaFluor se adquirieron de Invitrogen Life Technologies: AlexaFluor488, cabra anti-conejo (A11034, 1: 1,000); AlexaFluor633, cabra anti-cobayo (A21105, 1: 1,000), y AlexaFluor546, cabra anti-cobayo (A11074, 1: 1,000).

#### ***3.8.4. Microscopía de fluorescencia***

Utilizando los mismos portaobjetos preparados para los esparcidos de células, se incubaron los anticuerpos indicados para la microscopía de inmunofluorescencia.

A cada portaobjeto con esparcidos de células realizado previamente, se los dejó alcanzar temperatura ambiente, se les realizaron 3 lavados sucesivos de 5 minutos con PBS.

Se cubrieron los portaobjetos con 500  $\mu$ l de solución de bloqueo (leche en polvo 5%, suero fetal bovino 5%,  $\text{NaN}_3$  0,01%, PMSF 1mM, agregar en el momento, pH 7,4) que fue previamente centrifugada durante 30 minutos a 16.000 x g a 4°C antes de su uso y se incubó 30 minutos en cámara húmeda cerrada.

Todas las incubaciones con anticuerpos primarios se realizaron durante la noche a 4 °C en presencia de inhibidores de proteasas (P2714, Sigma-Aldrich). Por cada portaobjetos, se cargaron 100  $\mu$ l de dilución adecuada para cada anticuerpo primario en solución de bloqueo. Seguidamente se transfirieron a una cámara húmeda y se dejaron en incubación. Transcurrido este tiempo se hicieron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se volvieron a bloquear cada portaobjetos con 500 $\mu$ l de solución de bloqueo por 30 minutos en cámara húmeda. Las incubaciones secundarias de anticuerpos se realizaron a temperatura ambiente durante 1 hora protegidas de la luz. Luego se repitieron 3 lavados de 5 minutos con PBS, y se realizó un enjuague sumergiendo el portaobjetos en agua destilada. Finalmente, se montó con *ProLong Diamond Antifade* (Thermofisher), se cubrió con un cubreobjeto y se selló con esmalte.

### 3.9. Microscopía y análisis de imágenes

Todas las adquisiciones de microscopía de inmunofluorescencia se realizaron empleando un microscopio confocal Zeiss LSM 800 (Carl Zeiss Microscopy, Alemania) equipado con un módulo de procesamiento Airyscan (módulo de super-resolución), un objetivo de aceite Apochromat Plan 63X / 1.4 NA, cámara digital en color AxioCam 506 y software ZEN Blue 2.3 (Carl Zeiss Microscopía, Alemania). El procesamiento de imágenes de Airyscan se realizó a través del paso de deconvolución automática del software. Todos los análisis de imágenes se realizaron mediante el software FIJI ImageJ.

### 3.10. Western blots

Los lisados de proteínas testiculares se cargaron en geles de poliacrilamida en una concentración correspondiente a  $7,5 \times 10^5$  células en tampón de muestra de Laemmli por carril. La electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida se realizó en geles al 12%. Los geles de

proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante transferencia líquida (Matsudaira, 1987), y los Western blots se realizaron según los procedimientos habituales, empleando ya sea el anticuerpo anti-SYCE1 descrito anteriormente (Descripción en página 45 ), o un anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina (ab6046, 1: 8,000; Abcam Antibodies, Cambridge, Reino Unido) como control de carga.

Las membranas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en TBST (Tris-HCl 0,05 mol/L/, Tween 20 al 0,1%) con anticuerpos primarios: (anti-SYCE1-Nt y anti- $\beta$ -tubulina), y durante 1 hora en solución de bloqueo con anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Pierce, 1: 30,000). Los anticuerpos unidos se detectaron usando el sustrato *Super Signal West Pico* (Pierce, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Todos los ensayos se realizaron más de una vez, y utilizando réplicas biológicas.

### 3.11. Ensayos de RT-qPCR

El ARN total de las suspensiones de células testiculares se extrajo con *PureLink RNA Mini Kit* (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La cuantificación de ARN se realizó mediante un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (*ThermoScientific*).

La retrotranscripción y qPCR se realizaron utilizando el kit *Power SYBR Green Cells-to-Ct* (Ambion), a partir de 50 ng de ARN, siguiendo las instrucciones del kit, en un sistema de detección de PCR en tiempo real táctil CFX96 1 (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.). Para la etapa qPCR, se usaron 2  $\mu$ L de ADNc en 20  $\mu$ L de volumen final.

Para RT-qPCR en ovarios embrionarios, el mismo kit se empleó directamente después de una reacción de lisis sin extracción previa de ARN (debido a la escasez de tejido), y también se utilizaron 2  $\mu$ L de ADNc en 20  $\mu$ L de volumen final.

Se hicieron 3 réplicas biológicas, y elegimos *Ppp1cc* (*proteína fosfatasa 1, subunidad catalítica, gamma isozima*) como gen normalizador, ya que se ha demostrado previamente que es un buen gen normalizador para el ARN testicular (da Cruz *et al.*, 2016). La eficiencia

de amplificación de todos los cebadores (Tabla 4) fue > 93%. Se utilizaron el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , y el ARN de ratón WT como condición de calibrador (Livak y Schmittgen, 2001).

**Tabla 4:** Cebadores usados en qPCR

Cebadores	Transcripto	Secuencia 5' - 3'
Syce1-FOR	<i>Syce1</i>	GGGTTCTTCCAGCCTCATTG
Syce1-REV	<i>Syce1</i>	CCCATGCTTTTCCAGTTCTTC
Ppp1cc-FOR	<i>Ppp1cc</i>	CATATCTTGAGTGGTGCTTCA
Ppp1cc-REV	<i>Ppp1cc</i>	GACAGCATCATCCAACGGCT
Sycp2-FOR	<i>Sycp2</i>	TCACTTCCGGCTGACCCATC
Sycp2-REV	<i>Sycp2</i>	GAAGACAAACACCCGCAGAC

### 3.12. Análisis estadístico

Se compararon los datos cuantitativos de cromosomas sinapsados de mutantes homocigotos y heterocigotos con los WT de la misma camada, utilizando una prueba de chi-cuadrado. Con respecto a los datos obtenidos por RT-qPCR y los datos de intensidad de fluorescencia, se calculó la significación estadística y el valor p en el bioconductor R<sup>4</sup>.

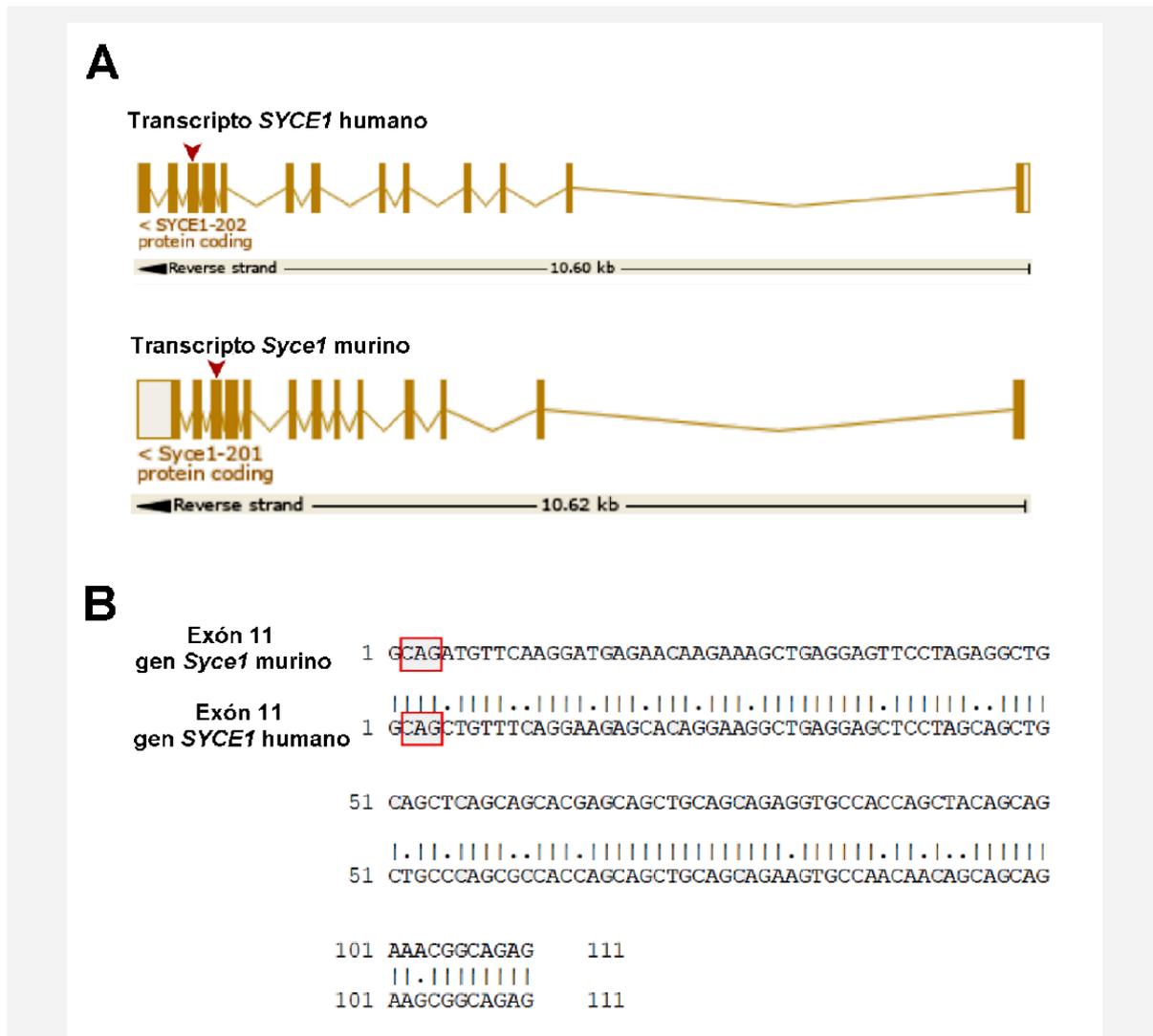
<sup>4</sup> <http://cran.r-project.org/>

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Generación de un modelo murino con mutación equivalente a la encontrada en humanos.

Como se mencionó anteriormente, al momento de inicio de esta tesis, el grupo de investigación acababa de aplicar mutagénesis mediante CRISPR/Cas para obtener la línea de ratones humanizados deseada. Para ello, inicialmente fueron comparadas las secuencias codificantes de *SYCE1* humano y *Syce1* de ratón, que constituyen las regiones de interés para seleccionar el objetivo de la edición. El alineamiento de los productos génicos reveló que existe 65% y 78% de coincidencias (idénticas y conservadas, respectivamente) (Figura 10A). Cuando la comparación se limitó al exón 11 del gen (al inicio del cual se detectó la mutación en humanos), el porcentaje de identidad fue aún mayor (81%), por lo cual resultó relativamente sencillo decidir el blanco para la edición en ratón (Figura 10B). Utilizando el sistema de edición génica CRISPR/Cas9 se generó una línea de ratones mutantes que imitan la mutación *SYCE1* c.721C>T encontrada en humanos. En humanos, *SYCE1* en estado WT es una proteína que tiene 351 aminoácidos. *SYCE1* c.721C>T es una mutación sin sentido (*non-sense*) que conduciría a una proteína truncada de 240 residuos. En el ratón, la mutación equivalente afectaría al residuo 727, conduciendo a una proteína truncada de 242 aminoácidos, en comparación con la versión WT, de 329 residuos. Por lo tanto, a la mutación diseñada en el ratón la denominamos *Syce1* c.727C>T. El diseño de las moléculas a utilizar en la mutagénesis dirigida (sgRNA y ssODN; Figura 11) se optimizó para favorecer la vía de reparación dirigida por homologías (HDR) (Yang, *et al.*, 2015). De todos modos, es importante señalar que, dado que la incorporación del cambio de interés requiere la acción de ambas moléculas, en este tipo de experimentos es esperable que la proporción de individuos con la modificación deseada (*knock-in*) sea menor en comparación con los que sólo hayan adquirido modificaciones génicas como consecuencia de la acción de Cas9 dirigida por el sgRNA pero sin considerar el molde en la posterior reparación, y por lo tanto reparen por la vía no homóloga (NHEJ), produciendo otros mutantes diferentes al buscado e incluso *knockouts* (Shao *et al.*, 2017). Más aún, es también posible la aparición de individuos con la modificación deseada, pero que además presenten otros cambios adicionales (ej. *indels*) en

las inmediaciones de la sustitución, por lo cual la cuidadosa elección del mutante fundador de la línea modelo es vital.



**Figura 10: Comparación de secuencias.**

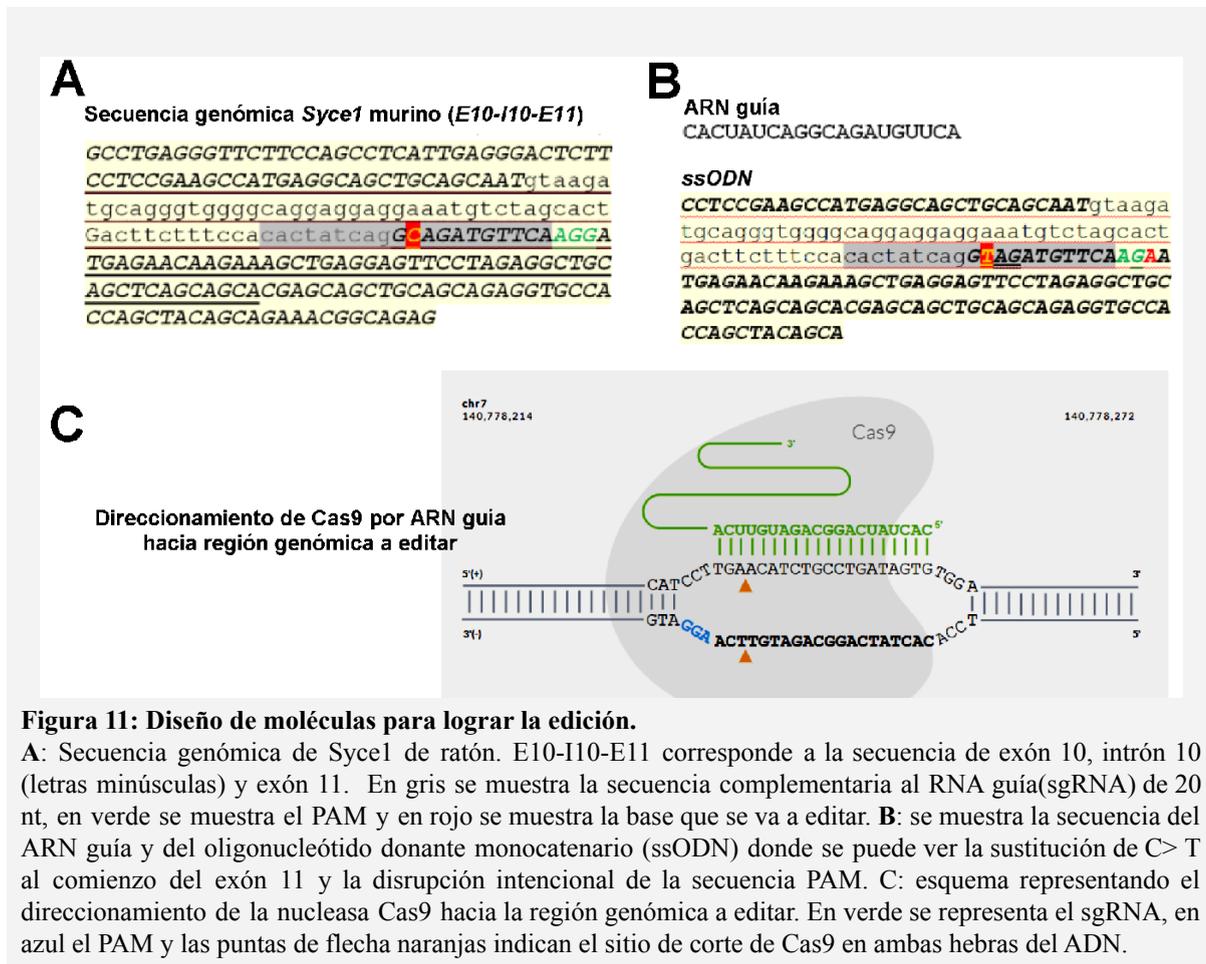
**A:** Representación gráfica de los transcritos *SYCE1/Syce1* de humanos y ratones. Los recuadros representan los 13 exones separados por secuencias intrónicas (líneas); las puntas de flecha indican el exón 11 donde se encontró la mutación en humanos y al cual se dirigió la mutagénesis en el genoma del ratón. **B:** Se presenta el alineamiento de las secuencias genómicas de ratón y humano para el exón 11, que muestra una alta similitud de secuencia. Los recuadros rojos indican el codón afectado por la mutación c.721C> T en humanos que generaría un codón de terminación TAG prematuro.

---

La idea subyacente del empleo de este sistema es la relativa facilidad con la que se puede programar al sgARN para guiar a la nucleasa Cas9 a una ubicación específica del genoma diana e hibridar con el ADN blanco y cortarlo. Para esto, un prerrequisito es la presencia de un motivo adyacente de protoespaciador o PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) ubicado próximo a la secuencia de ADN blanco de la Cas9. En el caso de la Cas9 de *Streptococcus pyogenes* se trata de una secuencia corta conservada de nucleótidos NGG ubicados en la región 3' de la hebra de ADN blanco, a pocos nucleótidos de la secuencia diana (Jinek *et al.*, 2012). El PAM no se une al sgARN y permite que la Cas9 provoque la ruptura de la doble hebra en el ADN blanco, este corte activa la vía de reparación, generalmente la vía NHEJ. Para nuestro objetivo, se favoreció la reparación por homología que permite introducir mutaciones puntuales en regiones específicas del genoma. Para activar la vía HDR, se debe incorporar un molde de ADN que contenga secuencias de homología o brazos de 50-80 nucleótidos que flanqueen el lugar de clivaje (Burle-Caldas *et al.*, 2018). Es necesario que el molde, además de poseer el cambio que se quiere introducir, incluya la disrupción del PAM, de modo que aquellas regiones eventualmente reparadas por HDR no sigan siendo blanco de corte de la nucleasa Cas9. A su vez, la disrupción del PAM en nuestro diseño también incluía la aparición de un sitio de restricción nuevo en la región editada, de modo de facilitar los genotipados. Sin embargo, pudo comprobarse mediante secuenciación que el ratón fundador de la línea poseía la mutación puntual deseada pero no el sitio de restricción, por lo cual no fue posible genotipar empleando esta estrategia.

Como se describe en la metodología, los cigotos microinyectados con la Cas9, sgRNA y ssODN se transfirieron a hembras receptoras, para obtener la primera generación (F0). Al nacimiento, las crías se genotiparon en busca del cambio deseado. De los cigotos microinyectados que completaron su desarrollo y fueron genotipados, 59% presentaron *indels*, 35% no presentaron edición alguna, y 6% presentaron la edición buscada. Luego de identificados los ratones con la edición planificada, se eligió a un macho fundador para su apareamiento con hembras WT para obtener la generación F1. Posteriormente, los ratones que resultaron ser heterocigotas de la generación F1 se cruzaron entre sí para generar descendencia (F2). Como era de esperar en base a la 2ª ley de Mendel, de este cruzamiento se

obtuvieron ratones WT, heterocigotos y homocigotos para la mutación puntual deseada (se espera que aproximadamente un 25% de la F2 sean mutantes homocigotos).



**Figura 11: Diseño de moléculas para lograr la edición.**

A: Secuencia genómica de *Syce1* de ratón. E10-I10-E11 corresponde a la secuencia de exón 10, intrón 10 (letras minúsculas) y exón 11. En gris se muestra la secuencia complementaria al RNA guía (sgRNA) de 20 nt, en verde se muestra el PAM y en rojo se muestra la base que se va a editar. B: se muestra la secuencia del ARN guía y del oligonucleótido donante monocatenario (ssODN) donde se puede ver la sustitución de C>T al comienzo del exón 11 y la interrupción intencional de la secuencia PAM. C: esquema representando el direccionamiento de la nucleasa Cas9 hacia la región genómica a editar. En verde se representa el sgRNA, en azul el PAM y las puntas de flecha naranjas indican el sitio de corte de Cas9 en ambas hebras del ADN.

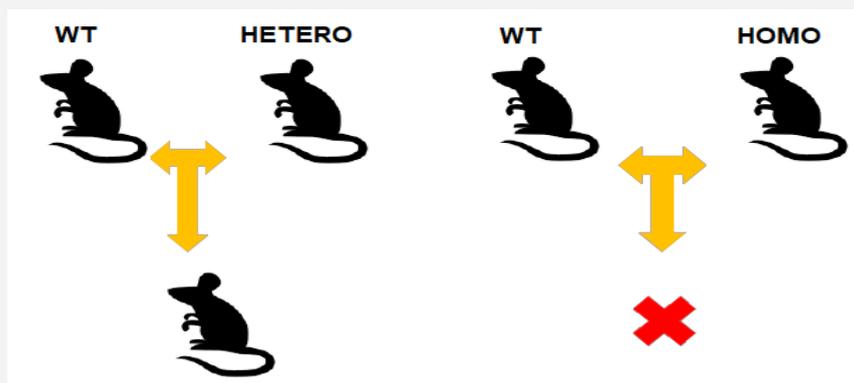
#### 4.2. La mutación homocigota *Syce1* c.727C>T causa infertilidad en ratones macho y hembra.

Se evaluó la fertilidad de los ratones macho y hembra obtenidos del cruzamiento de ratones F1, apareando ratones mutantes de ambos sexos con ratones WT del sexo opuesto. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada género. Se emplearon parejas reproductivas, o harenes, de 1 macho y 2 hembras cuando fue posible y se utilizaron ratones mutantes heterocigotos y ratones WT como grupos de control (tabla 5).

No se pudo observar diferencias entre la fertilidad de ratones WT y ratones heterocigotos, que lograron la gravidez con la misma facilidad y tuvieron camadas de 7 crías en promedio, con una proporción igual de crías macho y hembra. Luego del transcurso de 3 meses, sólo los ratones homocigotos para la mutación *Syce1* c.727C> T no consiguieron reproducirse (Figura 12). Este resultado se observó para ambos sexos.

**Tabla 5:** Ensayos de fertilidad realizados para mutantes homocigotas y mutantes heterocigotas.

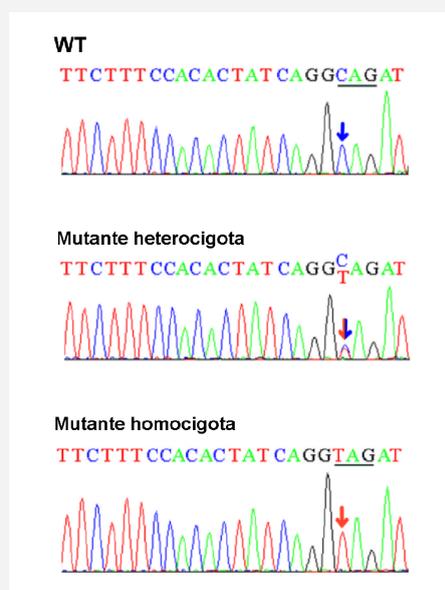
TEST DE FERTILIDAD			
GENERACIÓN	MACHO	HEMBRA	DESCENDENCIA
F0	MUT (fundador)	WT	SI
		WT	
F1	HETERO	HETERO	SI
		HETERO	
F2	WT	HOMO	NO
	WT	HOMO	NO
		HOMO	
	HOMO	WT	NO
		WT	
HOMO	WT	NO	
F3	HETERO	HETERO	SI
	HETERO	HETERO	SI
		HETERO	



**Figura 12: Evaluación de fertilidad**

Cruzamientos entre ratones WT y heterocigotas para la mutación *Syce1* c.727 C>T dieron descendencia, mientras que cruzamientos entre ratones WT y homocigotas, no. Este resultado se verificó para hembras y machos.

Los resultados obtenidos de los ensayos de fertilidad, con mutantes homocigotas incapaces de generar descendencia, hizo necesario el cruce de heterocigotas entre sí para el mantenimiento de la línea y la generación de los especímenes necesarios para los estudios planificados. A su vez, esto generó la necesidad de genotipar cada nueva camada a lo largo de todo el proyecto. Como se mencionó anteriormente, los genotipados se realizaron en base a secuenciación (Figura 13).

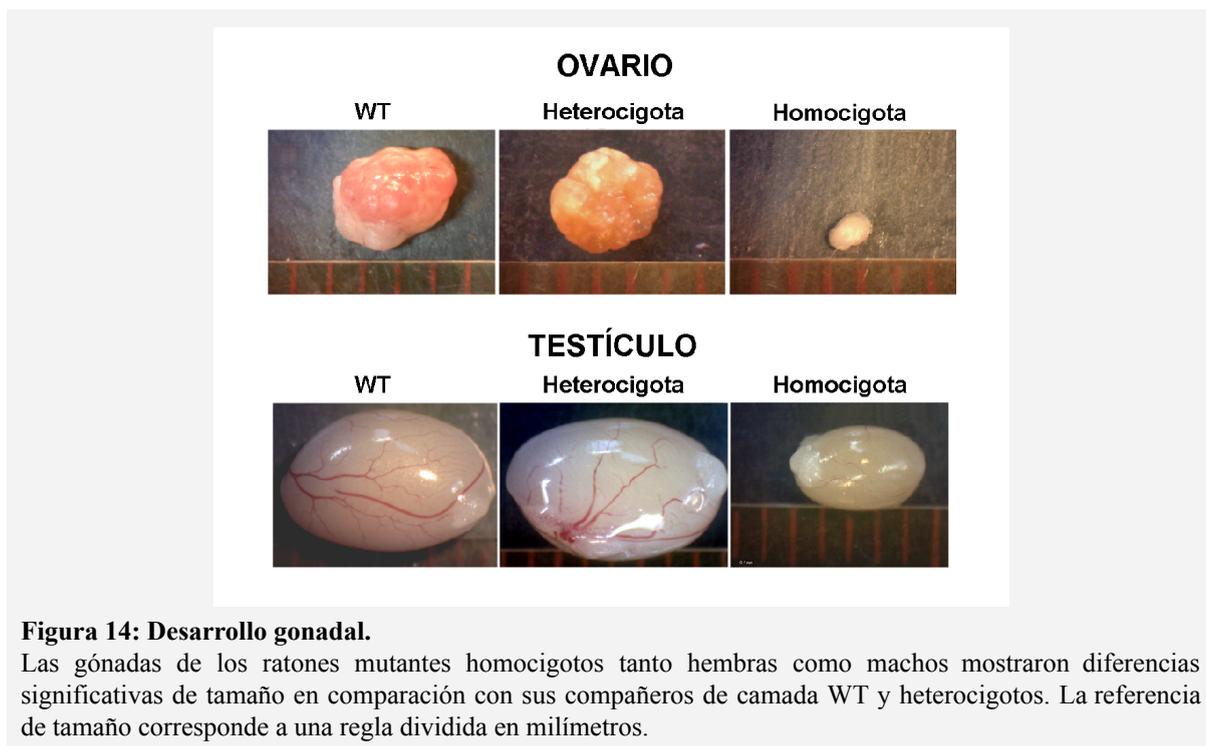


**Figura 13: Genotipado de especímenes en base al análisis de cromatogramas obtenidos de la secuenciación**

de los productos de PCR amplificados a partir de la región editada.

#### 4.3. La mutación homocigota *Syce1* c.727C>T afecta el desarrollo gonadal.

La evaluación de las gónadas de ratones adultos no mostró diferencias visibles en aspecto y tamaño para ratones macho y hembra, entre individuos WT y mutantes heterocigotos. Por el contrario, los ratones mutantes homocigotos macho y hembra adultos presentaron diferencias muy notables en el tamaño y aspecto gonadal, en comparación con sus compañeros de camada WT y heterocigotos (Figura 14). El análisis comparativo de varianza del peso testicular para las tres condiciones reafirma estas observaciones, revelando que el grupo de mutantes homocigotas presenta diferencias estadísticamente significativas en este aspecto ( $p < 0,00001$ ).

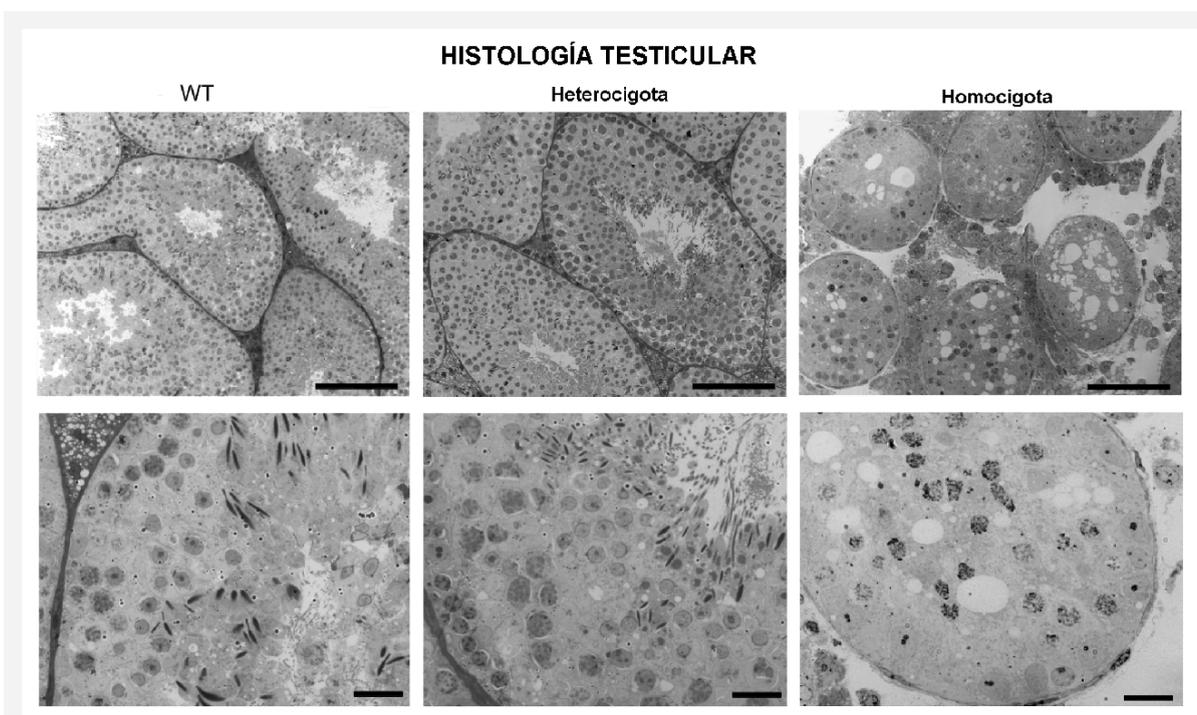


**Figura 14: Desarrollo gonadal.**

Las gónadas de los ratones mutantes homocigotos tanto hembras como machos mostraron diferencias significativas de tamaño en comparación con sus compañeros de camada WT y heterocigotos. La referencia de tamaño corresponde a una regla dividida en milímetros.

Con respecto a la histología gonadal de los ratones machos, se observó que los testículos de adultos WT y heterocigotos mostraron túbulos seminíferos normales con espermatogénesis completa. Por el contrario, los túbulos seminíferos de los mutantes

homocigotos presentaron aspecto inmaduro y menor diámetro que el de sus compañeros de camada WT y heterocigotos, además de un aspecto vacuolado, y un número mucho menor de células (Figura 15). El análisis microscópico del contenido gonadal de ratones mutantes homocigotos adultos reveló un proceso de espermatogénesis profundamente afectado y detenido en las etapas tempranas de profase I, y la ausencia total de etapas posmeióticas. Esto estaría evidenciando la detención o arresto de la meiosis en las primeras etapas de profase meiótica I.

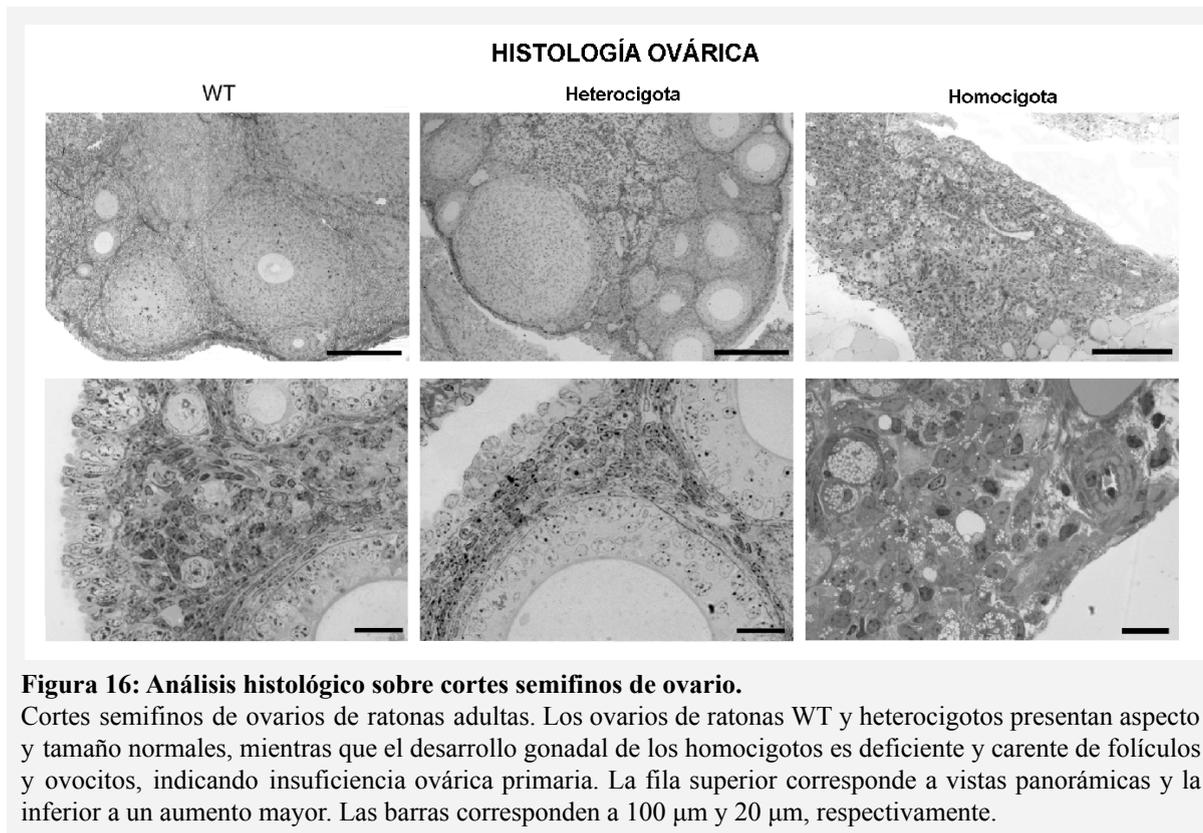


**Figura 15: Análisis histológico sobre cortes semifinos de testículo.**

Cortes transversales de túbulos seminíferos de ratones adultos. En WT y heterocigotos se pueden apreciar túbulos de aspecto normal con diversos estadios de maduración de células gametogénicas. En homocigotos, la histología de las gónadas se ve profundamente alterada, con ausencia de espermatidas y espermatozoides. La fila superior corresponde a vistas panorámicas de los túbulos y la inferior a un aumento mayor. Las barras corresponden a 100  $\mu\text{m}$  y 20  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

Para las hembras (Figura 16), el análisis morfológico de los ovarios fue realizado por dos investigadores con experiencia en la materia, sobre secciones ciegas (identificadas con código no explícito) de 3 muestras diferentes por cada condición. No se encontraron diferencias evidentes entre las muestras provenientes de ratones WT y heterocigotas que

permitieran distinguirlos. Por otra parte, las hembras homocigotas *Syce1 c.727C>T* presentaron ovarios minúsculos y sin folículos distinguibles, contrariamente a las hembras WT y heterocigotas que mostraron un crecimiento de los ovocitos y desarrollo folicular evidentes.



**Figura 16: Análisis histológico sobre cortes semifinos de ovario.**

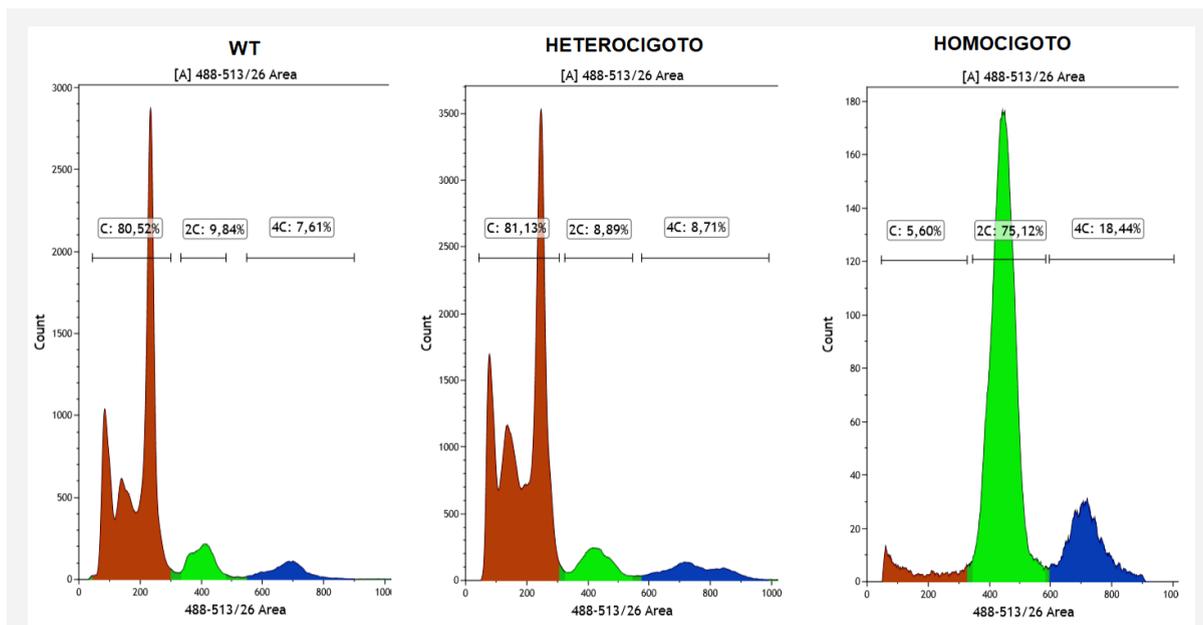
Cortes semifinos de ovarios de ratonas adultas. Los ovarios de ratonas WT y heterocigotas presentan aspecto y tamaño normales, mientras que el desarrollo gonadal de los homocigotas es deficiente y carente de folículos y ovocitos, indicando insuficiencia ovárica primaria. La fila superior corresponde a vistas panorámicas y la inferior a un aumento mayor. Las barras corresponden a 100 µm y 20 µm, respectivamente.

#### 4.4. Los testículos de mutantes homocigotos carecen de poblaciones celulares con contenido C de ADN.

El empleo del análisis citométrico de flujo sobre suspensiones celulares de testículo permite obtener datos cuantitativos de elevado valor estadístico sobre el contenido testicular (revisión por Rodríguez-Casuriaga y Geisinger, 2021). Como parte de la caracterización de los ratones mutantes machos, se utilizaron suspensiones celulares de testículo de ratones adultos para una comparación cuantitativa del contenido celular de ADN mediante citometría de flujo. En los testículos de mamíferos adultos, en condiciones normales, existen diversas poblaciones celulares con diferente contenido de ADN: células haploides y con contenido de ADN C representadas por espermátidas redondas, espermátidas en elongación y espermatozoides maduros; células 2C mayormente correspondientes a las espermatogonias en

fase G1 del ciclo celular, y células somáticas como las de Sertoli y de Leydig; y finalmente, células con contenido de ADN 4C que corresponden principalmente a espermatoцитos primarios y espermatogonias en fase G2 del ciclo celular (Malkov, *et al.*, 1998; revisado por Geisinger y Rodríguez-Casuriaga 2010; Rodríguez-Casuriaga y Geisinger, 2021).

Como se especificó en Materiales y Métodos, en estos ensayos se empleó el fluorocromo Vybrant DyeCycle Green, de unión específica y estequiométrica al ADN. El análisis no mostró diferencias significativas entre los histogramas resultantes de ratones WT y heterocigotos, pero confirmó que los ratones mutantes homocigotos carecen completamente de población celular con contenido C de ADN, correspondiente a las etapas posmeióticas (Figura 17).

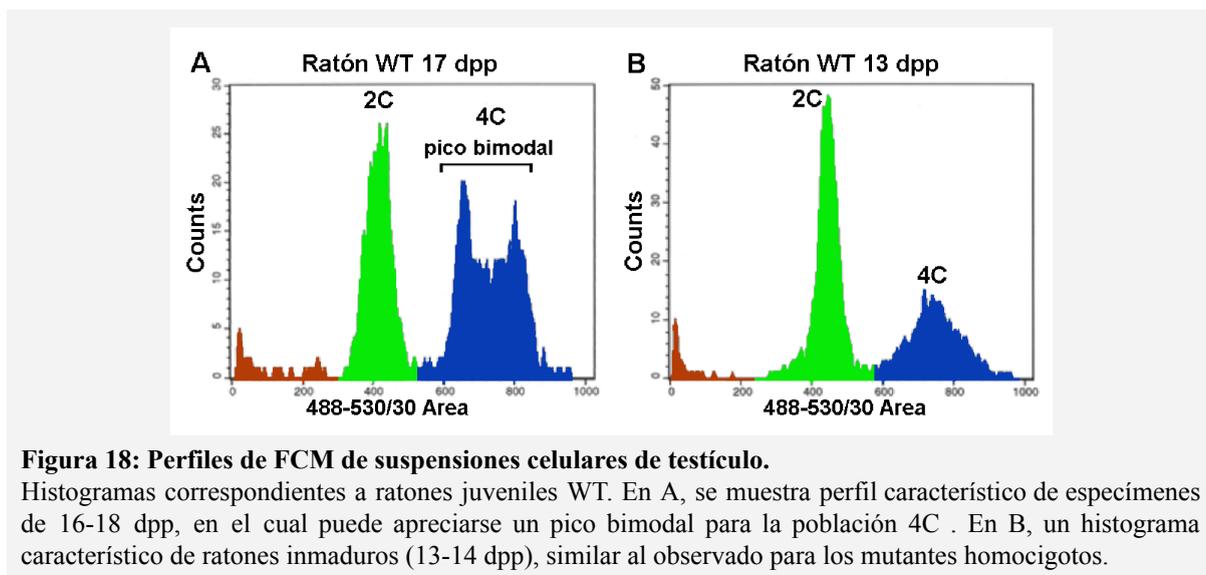


**Figura 17: Análisis mediante Citometría de flujo de células testiculares en suspensión.**

Los perfiles citométricos para WT y heterocigoto no presentan diferencias y muestran un contenido normal de poblaciones C, 2C y 4C de células, mientras que los ratones mutantes homocigotos para *Syce1* muestran ausencia de células posmeióticas, representadas en el gráfico por la población C.

Para la población 4C, este análisis citométrico también permitió visualizar algunas alteraciones interesantes. El VDG permite distinguir, dentro de la población 4C, la subpoblación de espermatoцитos tempranos cursando leptoteno y zigoteno (L/Z), y la

subpoblación de espermatoцитos tardíos, en paquiteno y diploteno (P/D) (Rodríguez-Casuriaga, *et al.*, 2014; Geisinger y Rodríguez-Casuriaga, 2017). Particularmente, en los histogramas de ratones jóvenes, en que dichas subpoblaciones son proporcionalmente más abundantes que en adultos, las mismas se identifican como un pico bimodal de contenido de ADN 4C (Rodríguez-Casuriaga, *et al.*, 2014; Figura 18A). El perfil de los mutantes homocigotos adultos presenta similitudes con los perfiles de ratones juveniles, con ausencia de estadios posmeióticos y, por ende, una mayor representación proporcional de espermatoцитos. Sin embargo, no se distingue el pico bimodal para la población 4C, y el perfil observado se parece a los esperados para ratones inmaduros de 13 a 14 días, en los que aún no se visualizan espermatoцитos en etapa de paquiteno (Figura 18B).



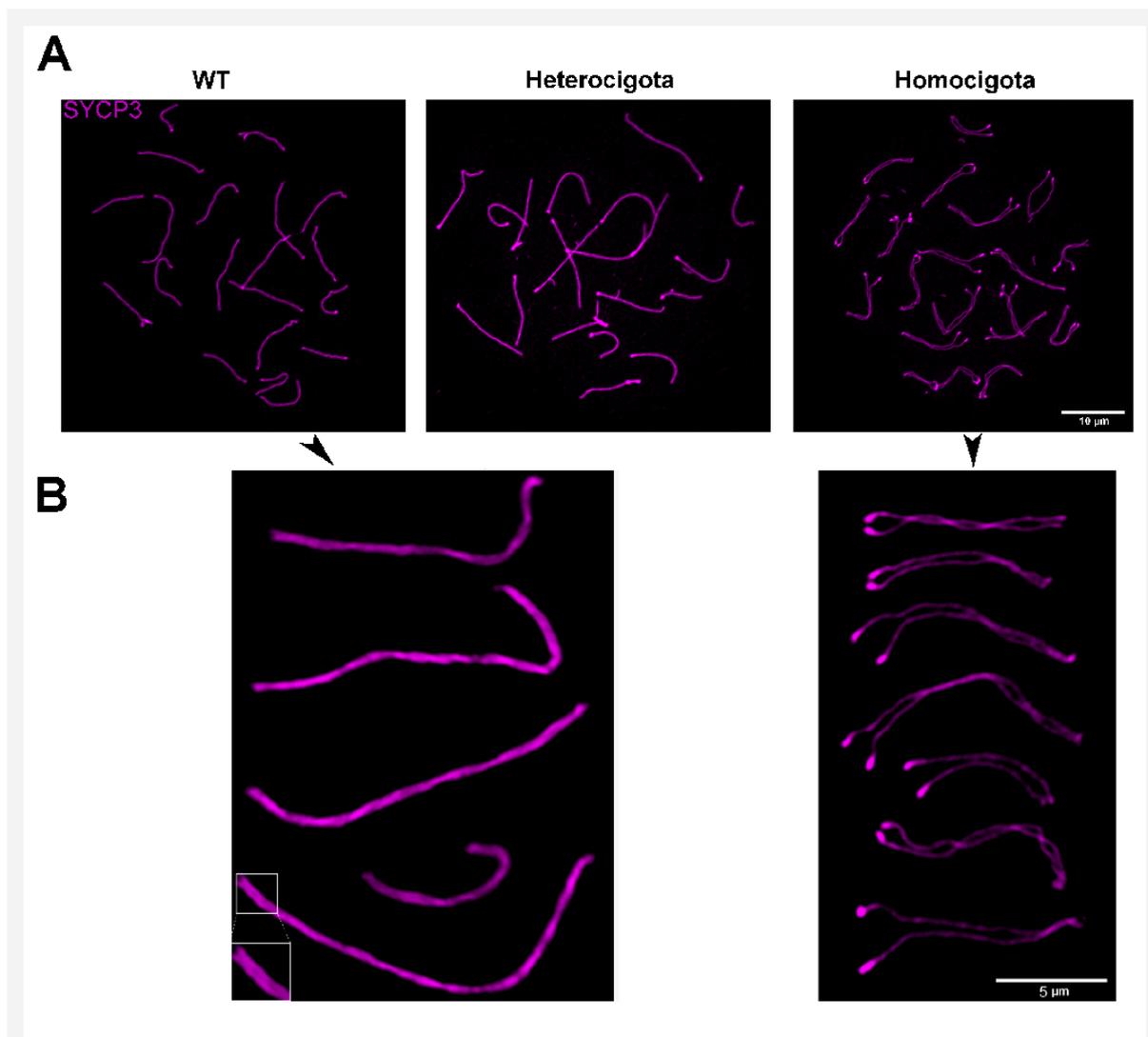
**Figura 18: Perfiles de FCM de suspensiones celulares de testículo.**

Histogramas correspondientes a ratones juveniles WT. En A, se muestra perfil característico de especímenes de 16-18 dpp, en el cual puede apreciarse un pico bimodal para la población 4C. En B, un histograma característico de ratones inmaduros (13-14 dpp), similar al observado para los mutantes homocigotos.

#### 4.5. Los estudios de inmunolocalización no detectaron SYCE1 cargada al CS de mutantes homocigotas.

Dados los efectos visibles que la mutación provoca en el desarrollo de las gónadas, nos preguntamos si estas observaciones tendrían consecuencias sobre la estructura del CS, su ensamblaje, y la sinapsis cromosómica homóloga. Para responder a esto, se efectuaron inmunolocalizaciones sobre esparcidos de células de testículos de ratones adultos y ovarios embrionarios, que luego se analizaron mediante microscopía de escaneo láser confocal.

Los primeros análisis de localización se dirigieron a la proteína SYCP3, componente del EL del CS, con el fin de determinar si existían diferencias entre ratones WT y mutantes, con respecto a la disposición espacial de los EL y la sinapsis cromosómica. Para este objetivo se seleccionaron machos adultos y embriones de ratones hembra de 17,5 a 18 días poscoito. A esta edad embrionaria, en el ovario murino en desarrollo normalmente se alcanza el estadio de paquiteno, con cromosomas homólogos completamente sinapsados. La observación microscópica no permitió detectar diferencias entre los meiocitos de ratones WT y heterocigotas, en relación con la localización de SYCP3 y la sinapsis entre homólogos (Figura 19). Sin embargo, en el caso de los ratones mutantes homocigotos se observó que los cromosomas se encontraban alineados y muy próximos entre sí, pero sin establecer sinapsis entre ellos, semejante a lo que ocurre en las primeras etapas de la profase meiótica, y hemos considerado esta disposición espacial como “asinapsis”. Esto se aprecia muy claramente en la Figura 19B derecha. Dado que la presente tesis se centró en el estudio de una mutación equivalente a la encontrada en mujeres infértiles, la mayoría de los resultados inmunocitoquímicos mostrados corresponden a cromosomas meióticos de los ratones hembra generados. Vale señalar que en relación a la presencia/ausencia, disposición espacial y cuantificación comparativa de los diversos componentes de CS analizados en estos ensayos, para los especímenes machos se obtuvieron los mismos resultados que en meiocitos femeninos.



**Figura 19: Inmunolocalización del componente de elemento lateral SYCP3 en cromosomas meióticos esparcidos.**

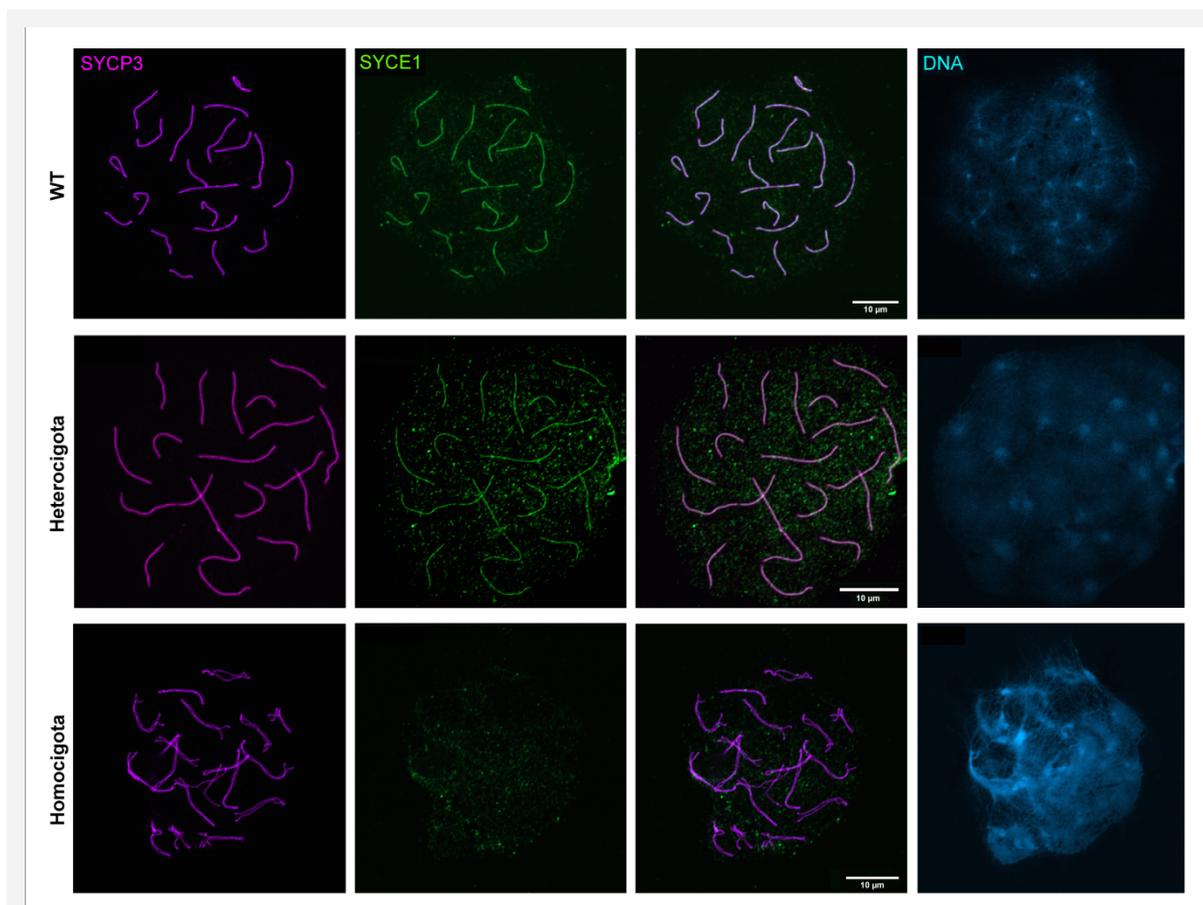
Los resultados mostrados corresponden a ovarios embrionarios de 18dpc. A, Comparación de resultados obtenidos sobre WT, mutantes heterocigotas y homocigotas. Nótese el alineamiento cromosómico y ausencia de sinapsis en el caso de los homocigotas. B, Detalle de apariencia de CS para las condiciones WT y mutante homocigota.

Se comparó estadísticamente la frecuencia de meiocitos con cromosomas sinapsados, en esparcidos celulares de ratones mutantes y WT de la misma camada, utilizando una prueba de chi-cuadrado ( $X^2$ ). Una vez más, al considerar mutantes heterocigotas y WT, se vio que ambos grupos presentaban cromosomas de aspecto normal en etapa de paquiteno y no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $X^2 [1, N = 84] = 0.26, p = 0.61$ ). Sin embargo, para la mutación en homocigosis en contraposición a la condición WT, se comprobaron

---

profundos efectos sobre la sinapsis cromosómica homóloga ( $X^2 [1, N = 84] = 134.6, p < 0.00001$ ), afectando a machos y hembras por igual.

En relación a la cuantificación de fluorescencia para SYCP3 en estas preparaciones, no se encontraron diferencias significativas entre WT y ratones mutantes (valor de  $P > 0.1$ ). Para la detección de la proteína SYCE1, se utilizó un anticuerpo diseñado específicamente contra péptidos de la región N-terminal de SYCE1, que fuera capaz de reconocer tanto la proteína WT como la trunca putativa (Ver “Materiales y Métodos”). Mediante esta inmunolocalización se pudo detectar SYCE1 claramente sobre los CS de ratones WT y mutantes heterocigotos, pero no se logró detectar la proteína trunca putativa sobre los CS en formación de los mutantes homocigotas (Figura 20). Este resultado se observó para ratones macho y hembra por igual, y de forma consistente para todas las réplicas biológicas y técnicas. Si bien, cuando usamos este anticuerpo, en homocigotas se detecta una marca fluorescente difusa, la misma también fue obtenida en los preparados de WT y heterocigotas, por lo cual sería atribuible a *background* propio del anticuerpo. Con respecto a la cuantificación de fluorescencia de SYCE1 sobre los CS, tampoco aquí se encontraron diferencias significativas entre ratones WT y mutantes heterocigotas (valor de  $P > 0.1$ ).



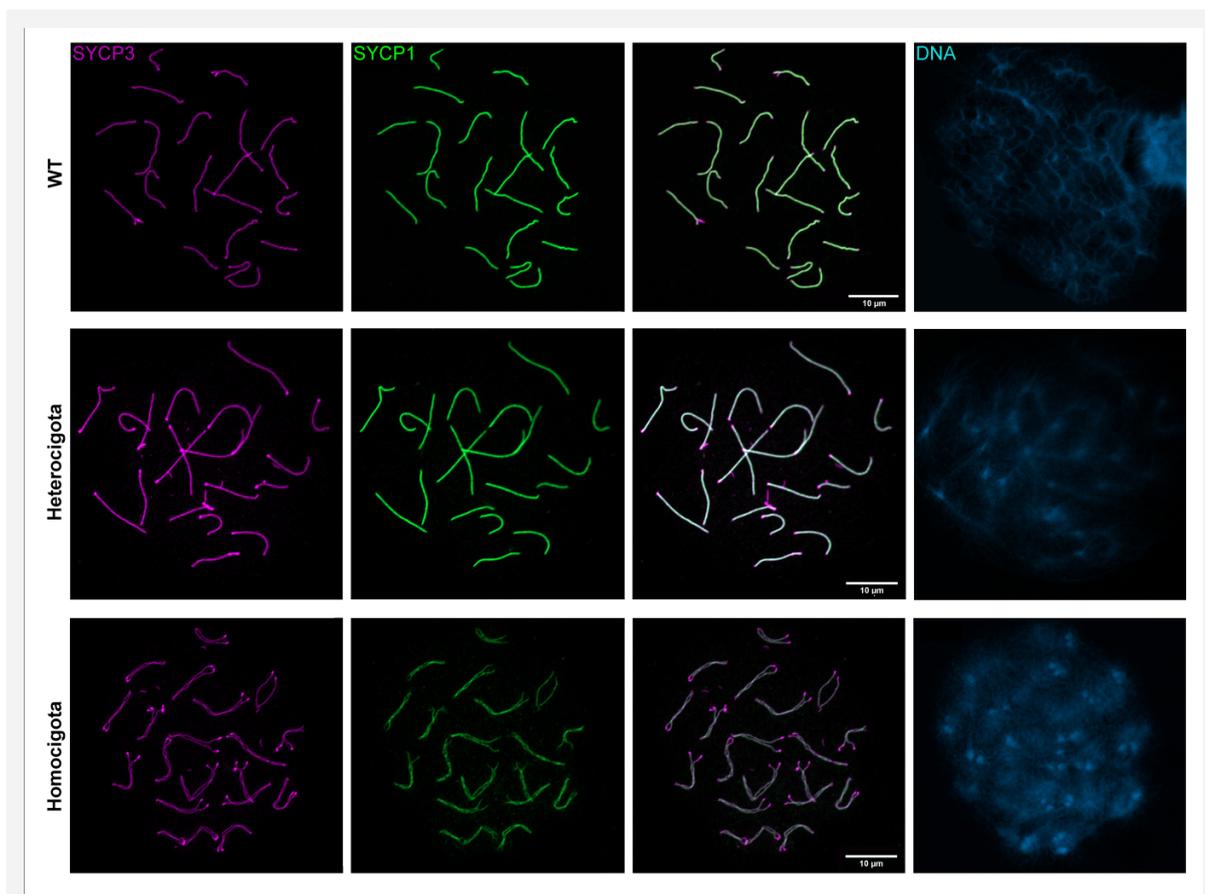
**Figura 20: Inmunolocalización de la proteína SYCE1 en embriones de ratón hembras de 18 dpc WT y mutantes.**

Se empleó un anticuerpo especialmente desarrollado contra la región amino-terminal (N-t) de SYCE1. SYCE1 se detectó claramente en los esparcidos de WT y mutantes heterocigotas (verde), pero no pudo detectarse sobre los CS en muestras de mutantes homocigotas. El inmunomarcado del componente del elemento lateral de CS SYCP3 se muestra en magenta. En el caso de los mutantes homocigotas son evidentes los elementos laterales estrechamente alineados y la ausencia de sinapsis. Los últimos dos paneles muestran la superposición de canales y la tinción de ADN con DAPI.

También se evaluó la presencia de otros componentes del CS pertenecientes a los FT (SYCP1) (Figura 21), y al EC, como SYCE3 y TEX12 (Figuras 22-23). Particularmente, se escogieron estos dos componentes del EC, ya que SYCE3 se carga al CS previamente a SYCE1, en tanto TEX12 se carga una vez que SYCE1 ya está cargada (ver Figura 6 de Introducción). Los resultados mostraron una vez más que no hubo diferencias entre ratones WT y heterocigotos para las proteínas evaluadas (Figura 20-24). Por otra parte, para los mutantes homocigotos se observó que los componentes proteicos SYCP1 y SYCE3, que se

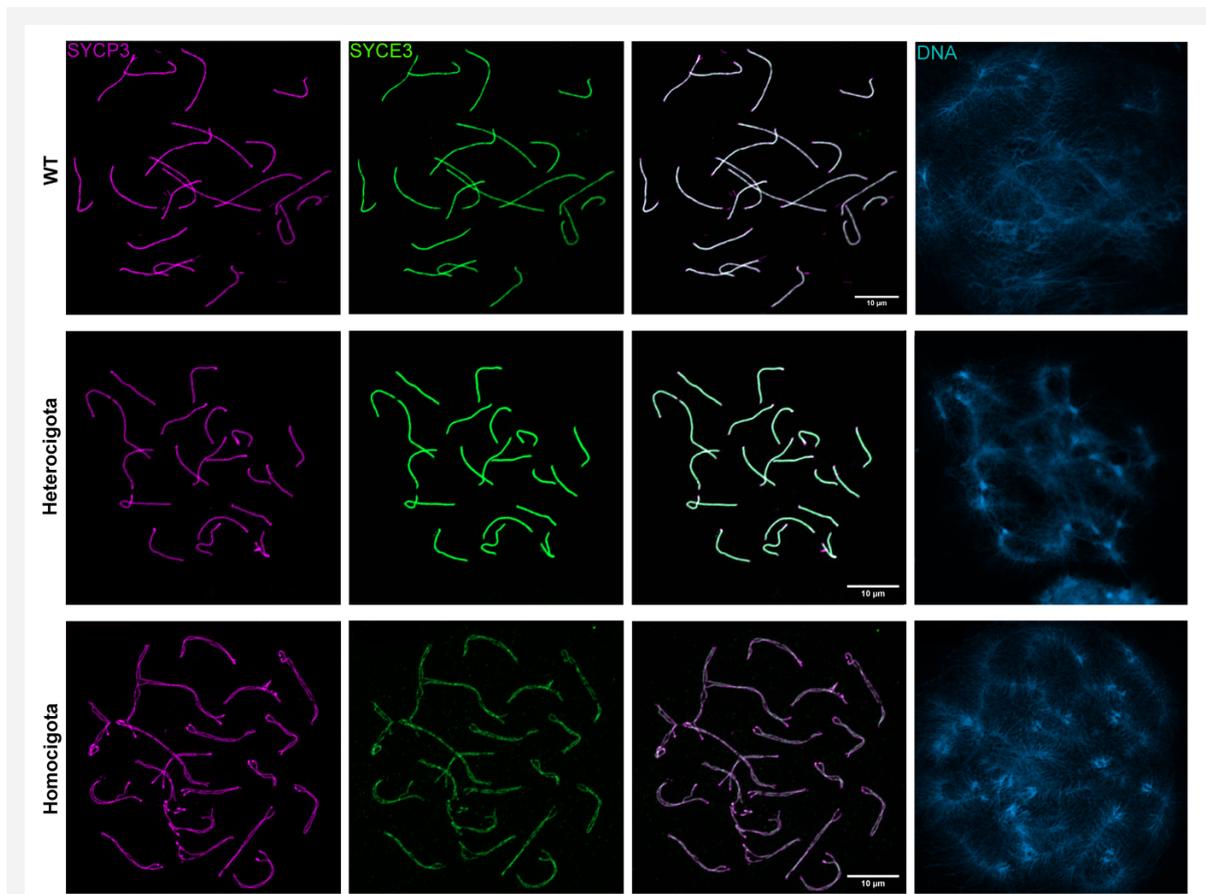
cargan al CS antes que SYCE1, fueron detectados en el CS (Figura 21 y 22), mientras que TEX12 no pudo ser detectada en la estructura del CS (Figura 23 y 24).

En relación al aspecto cuantitativo, no hubo diferencias en la intensidad de fluorescencia de SYCP1 y SYCE3 sobre los CS entre ratones WT y mutantes heterocigotos. Contrariamente, las intensidades de fluorescencia de SYCP1 y SYCE3 fueron significativamente más bajas para los mutantes homocigotos, en comparación con los compañeros de camada WT y heterocigotas (valor  $P < 0,0005$ ).



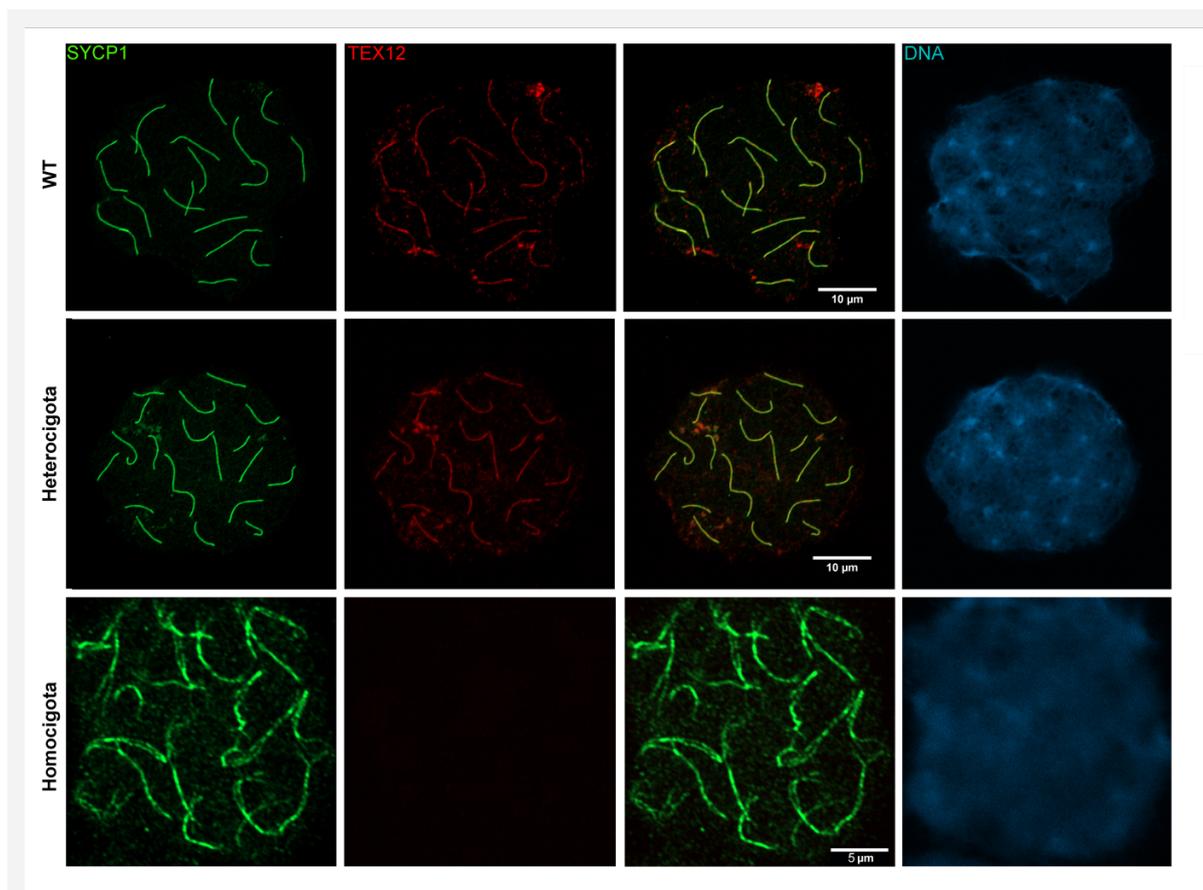
**Figura 21: Inmunolocalización de la proteína SYCP1 en embriones de ratón hembras de 18 dpc WT y mutantes.**

El inmunomarcado del componente del elemento lateral de CS SYCP3 se muestra en magenta. SYCP1 (mostrado en verde) se detectó claramente en los esparcidos para las tres condiciones analizadas. Sin embargo, para WT y mutantes heterocigotas, la mayoría de los núcleos mostraron una tinción típica del estadio de paquiteno (PS), mientras que no se encontró PS para los mutantes homocigotas. Los elementos laterales estrechamente alineados y sin sinapsis son nuevamente evidentes en los ovocitos de mutantes homocigotas. Los últimos dos paneles muestran la superposición de canales y la tinción de ADN con DAPI.



**Figura 22 - Inmunolocalización de la proteína SYCE3 en embriones de ratón hembra de 18 dpc WT y mutantes.**

El inmunomarcado del componente del elemento lateral SYCP3 se muestra en magenta. Se detectó SYCE3 (que se muestra en verde) en los esparcidos cromosómicos meióticos de todos los ovarios embrionarios. Para WT y mutantes heterocigotas se encontraron en alta frecuencia CS completamente ensamblados, pero no para mutantes homocigotas que mostraban, en el mejor de los casos, elementos laterales estrechamente yuxtapuestos. En los últimos dos paneles se muestra la superposición de canales y la tinción de ADN con DAPI.

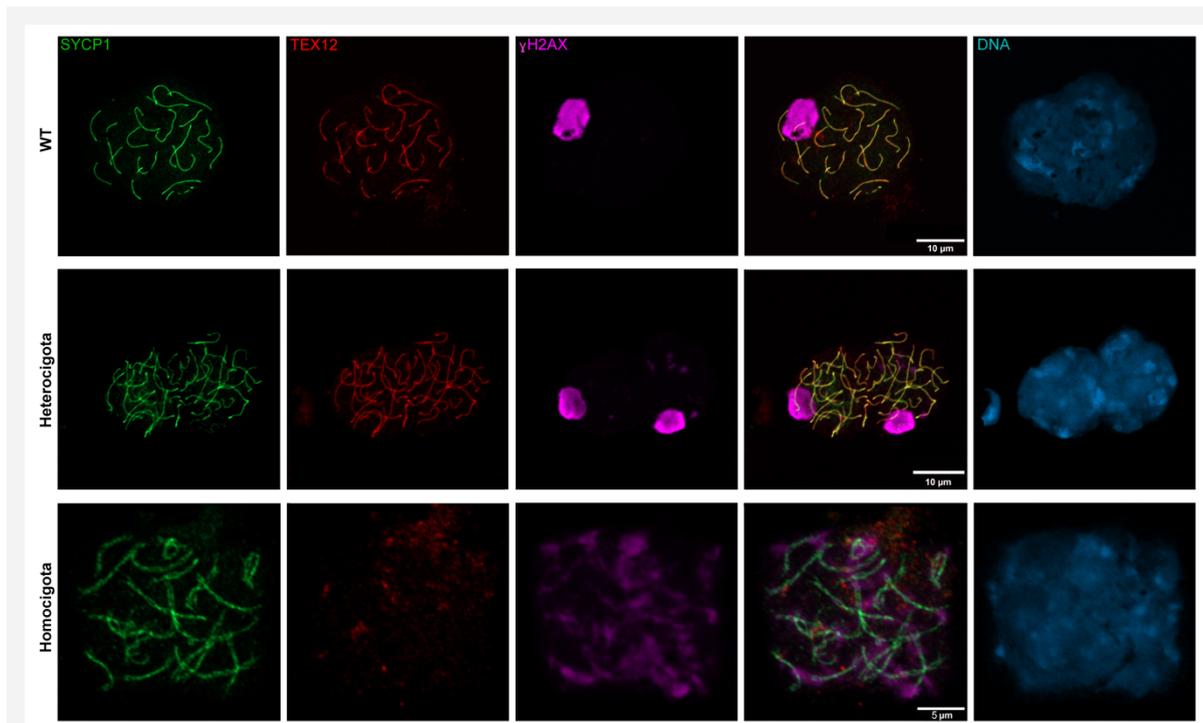


**Figura 23: Inmunolocalización de la proteína TEX12 en embriones de ratón hembras de 18 dpc WT y mutantes.**

La inmunomarcación del componente de filamento transversal de CS SYCP1 se muestra en verde. TEX12 (mostrado en rojo) se detectó claramente en esparcidos de ovarios embrionarios de WT y mutantes heterocigotas, mostrando la mayoría de los núcleos una tinción típica de PS. Por el contrario, no se detectó TEX12 para esparcidos ováricos de mutantes homocigotas, en las que los cromosomas no sinapsados y estrechamente alineados fueron nuevamente evidentes. También se muestra la tinción de ADN con DAPI y canales fusionados.

Finalmente, se utilizó el inmunomarcado de la histona  $\gamma$ H2AX sobre esparcidos de testículo con el fin de visualizar esta histona modificada, marcadora de cortes doble hebra del ADN, asociada a la cromatina en espermatocitos. Esta variante de histona proporciona una tinción dispersa característica sobre los cromosomas durante las etapas tempranas de la meiosis masculina y luego, en etapa de paquiteno queda restringida al cuerpo de los cromosomas XY donde contribuyen a la condensación y silenciamiento de la cromatina, que para este momento es transcripcionalmente inactiva (Fernández-Capetillo *et al.*, 2003). En estos ensayos, se inmunomarcaron adicionalmente en paralelo las proteínas SYCP1 y TEX12. Una vez más, no se encontró diferencia entre ratones WT y mutantes heterocigotos (Figura

23 y 24). Para el caso de los mutantes homocigotos, como se esperaba, se observó un patrón de tinción de  $\gamma$ H2AX difuso, característico de etapas meióticas más tempranas (Figura 24), y sin tinción restringida a los cromosomas sexuales, evidenciando una detención del proceso anterior a la etapa de paquiteno.



**Figura 24: Inmunolocalización de TEX12, SYCP1 y  $\gamma$ H2AX en ratones machos adultos WT y mutantes.** El inmunomarcado del componente de filamento transversal SYCP1 se muestra en verde, TEX12 en rojo y  $\gamma$ H2AX en magenta. Al igual que en los ovarios embrionarios, TEX12 se detectó claramente en esparcidos de células testiculares de mutantes heterocigotas y WT, y la mayoría de los núcleos mostraban una tinción típica de PS. No se detectó TEX12 en preparaciones de mutantes homocigotas, presentando de nuevo cromosomas estrechamente alineados, sin sinapsar. La tinción de  $\gamma$ H2AX en WT y mutantes heterocigotas se restringió con mayor frecuencia al cuerpo XY, indicativo de PS. Por el contrario, sólo se obtuvo la tinción difusa de  $\gamma$ H2AX típica de las etapas meióticas tempranas en núcleos diseminados de ratones homocigotas. En cada caso, también se muestran los canales superpuestos y la tinción de ADN con DAPI.

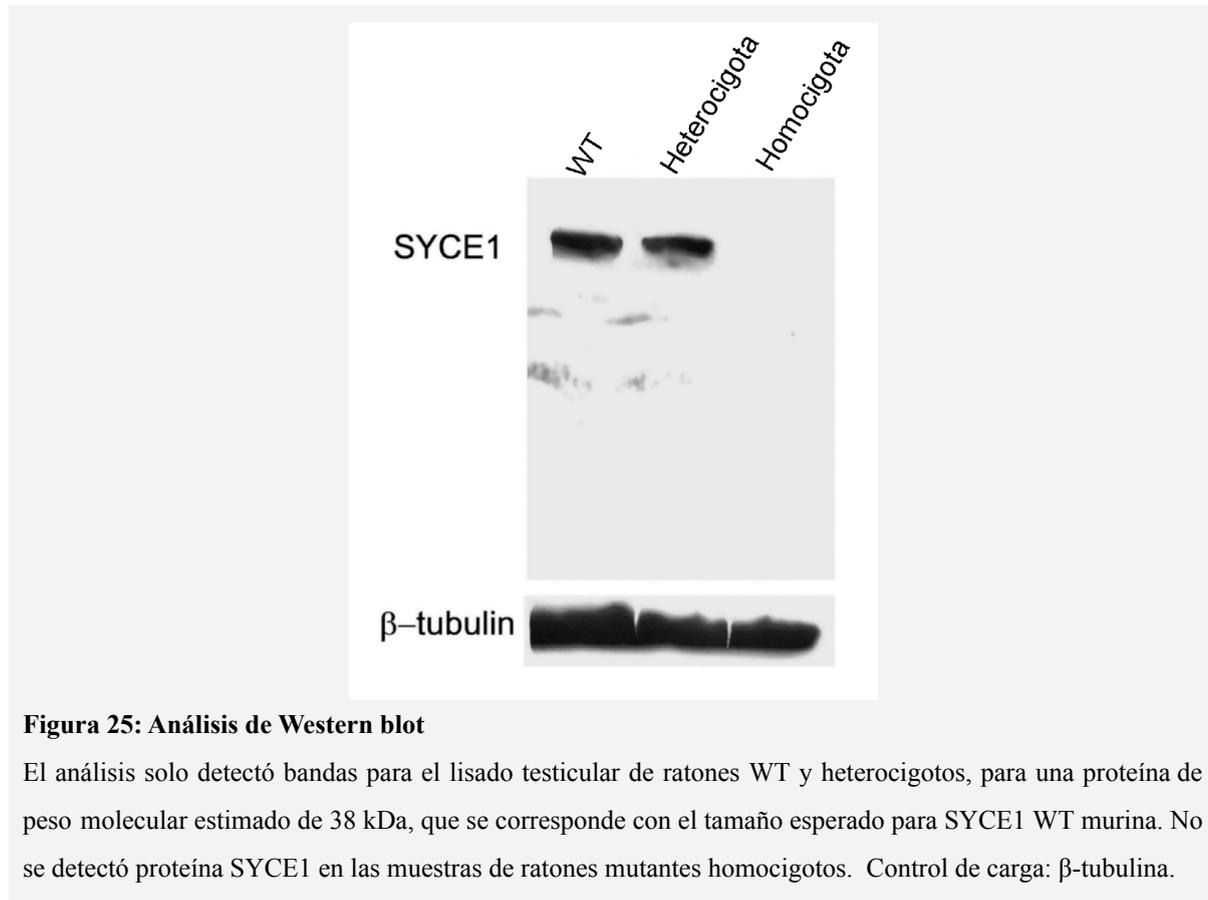
#### 4.6. La proteína putativa SYCE1 truncada no se detecta en los testículos de ratones mutantes.

Los resultados de la inmunolocalización mostraron que la proteína SYCE1 no se encontraba cargada en los CS en ratones mutantes homocigotos. Aun así, cabe la posibilidad de que la proteína trunca putativa se encuentre en los meiocitos sin estar cargada al CS, y que no la estuviésemos detectando (por ejemplo, por encontrarse en menor concentración, y/o dispersa en el núcleo o incluso en el citoplasma, etc.). Con el objetivo de evaluar esta

hipótesis y esclarecer los mecanismos que llevan al fenotipo infértil, se analizó la presencia de la proteína SYCE1 trunca en ratones mutantes homocigotos mediante ensayos de Western blot sobre lisados proteicos de tejido testicular.

Los resultados muestran una banda con una masa molecular de 38 kDa tanto para ratones WT como mutantes heterocigotos, de acuerdo con el peso molecular predicho para la versión WT de 329 residuos, de la proteína SYCE1 de ratón (Figura 25). No se detectó proteína SYCE1 trunca para mutantes heterocigotos, cuyo tamaño teórico esperado sería de 28 kDa. De igual modo, no se detectó proteína SYCE1 en la muestra de mutantes homocigotos (Figura 25). Aunque se sobrecargaron los geles de proteínas para minimizar los efectos de los límites de sensibilidad de detección, en ninguno de los ensayos se observó una banda de 28 kDa.

Este ensayo se realizó únicamente para muestras de testículo. No sería posible este estudio en hembras, ya que la cantidad de tejido ovárico embrionario obtenido no sería suficiente para permitir su estudio (<0,0001 g para embriones WT y mutantes).

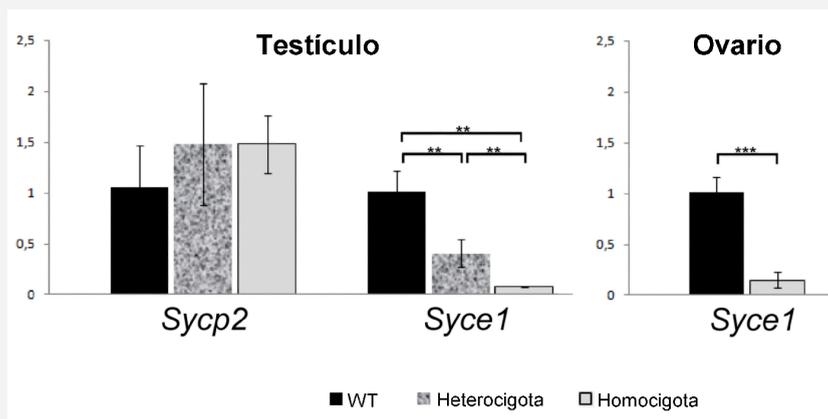


#### 4.7. El nivel de ARNm de *Syce1* disminuye significativamente en los mutantes homocigotos.

Los resultados obtenidos de los ensayos de Western blot llevaron a analizar los niveles de transcritos de *Syce1*. Con ese fin, se efectuaron estudios de RT-qPCR de testículos mutantes homocigotos, en comparación con WT y heterocigotas. Dado que la sensibilidad de los estudios de RT-qPCR hacen que se requiera mucho menor cantidad de material de partida, en este caso el análisis también se pudo realizar a partir de ovario.

Los resultados de la cuantificación del ARNm de *Syce1* mostraron diferencias significativas entre ratones WT y mutantes homocigotos, que resultaron presentar niveles mínimos de ARNm, tanto para ovarios embrionarios ( $p < 0,0001$ ) como para testículos adultos ( $p < 0,005$ ). Por otra parte, la diferencia de transcritos *Syce1* entre los testículos de ratones WT y heterocigotas fue menos pronunciada que en relación a los mutantes homocigotos, pero aún significativa, con niveles de transcripción intermedios ( $p < 0,01$ ) (Figura 26).

Se utilizó el gen *Sycp2*, codificante para un componente del EL del CS, como control positivo. La cuantificación del transcritos de *Sycp2* no mostró diferencias significativas entre las tres condiciones.



**Figura 26: Cuantificación de ARNm por RT-qPCR.**

Se representan los resultados obtenidos para testículos adultos y ovarios embrionarios de ratones WT y mutantes ( $n=3$  para cada categoría). Se usó el gen *Sycp2* como control positivo. Se detectaron niveles notablemente disminuidos del transcritos de *Syce1* para los mutantes homocigotas. En el caso de testículo, también pudo evaluarse el nivel de transcritos *Syce1* en los mutantes heterocigotas, y se evidenciaron niveles intermedios en relación a los individuos WT y mutantes homocigotas.

---

## 5. DISCUSIÓN

En este trabajo se abordó el estudio de un tipo de infertilidad categorizada como idiopática. En particular, se estudió una mutación sin sentido en *SYCE1* (*SYCE1* c.721C>T), gen codificante para un componente del EC del CS, y su posible relación con el fenotipo infértil de pacientes homocigotos para esta mutación, reportados por de Vries y colaboradores en 2014.

En relación a la nomenclatura, para hacer referencia a la mutación en estudio hemos considerado la variante de transcripción #4 de *SYCE1* humana (NM\_001143764) que codifica la isoforma *SYCE1* más larga, por lo cual la mutación se ubica en la posición 721 de la secuencia codificante. El transcripto empleado como referencia por de Vries *et al.*, (2014) fue la variante 1 (NM\_130784.2), que usa un codón de inicio *downstream*, de ahí que ellos se refieran a la misma mutación como *SYCE1* c.613C>T.

Además de estudiar su vinculación con el fenotipo infértil, abordamos el estudio del mecanismo de acción por detrás de esta mutación y sus consecuencias. Para responder a estas interrogantes, se generó una línea de ratones humanizados conteniendo una mutación equivalente a la reportada en humanos, mediante el sistema de mutagénesis dirigida de CRISPR/Cas9. En este sentido, el alto grado de identidad entre las secuencias genómicas *SYCE1* humana y *Syce1* de ratón facilitaron la búsqueda de una mutación murina equivalente a *SYCE1* c.721C>T (*Syce1* c.727C>T). La generación de este modelo animal nos ha permitido estudiar la etiología y la patogénesis de estos casos de infertilidad.

En relación con la generación del modelo murino humanizado, el empleo de la tecnología de edición genómica CRISPR/Cas9 resultó una vez más muy eficiente. Nuestro grupo de investigación ya poseía experiencia en su empleo para la generación de ratones *knockout* (*KO*) o pérdida de función, trabajo llevado también a cabo en conjunto con los especialistas del UATE del IPMont. En esa ocasión, se generó una línea *KO* para el gen *Spats1* (Capoano *et al.*, 2021). La generación de esta línea *KO* se había intentado producir anteriormente mediante células embrionarias stem (ESC) en instalaciones del propio UATE.

---

La técnica con ESC requirió numerosas sesiones de microinyección (aprox. 20), se produjeron 3 quimeras, pero ninguna de ellas mostró transmisión de la modificación genética a la línea germinal, resultando en una eficiencia global menor a 1%. En contraste, cuando se empleó CRISPR/Cas9 se produjeron 30 crías KO en un total de 4 sesiones, con una eficiencia global de 6,9% (TT 2016). En el presente trabajo, el desafío era aún mayor, ya que no se buscaba la sola pérdida de una función génica, sino la introducción precisa de cierta modificación puntual en el genoma del ratón de modo de generar un *knock-in* (KI). Para ello se requiere que el DSB introducido por Cas9 sea reparado por la vía *homology-directed repair* (HDR), para lo cual se debe agregar un donante de ADN que presente homología con secuencias flanqueantes al sitio blanco, de manera que el DBS sea reparado usando esta secuencia de ADN como molde. Como se mencionó anteriormente, la reparación por la vía NHEJ es más común que la de HDR y surgen en paralelo ediciones no precisas como consecuencia de *indels*. Como era de esperar, se observó un porcentaje mayoritario de correcciones por la vía de NHEJ: de los cigotos microinyectados que completaron su desarrollo y fueron genotipados, 35% no presentaron edición alguna, 59% presentaron *indels* (reparación vía NHEJ), y 6% presentaron la edición buscada (reparación vía HDR). De este modo, se logró introducir la edición genómica deseada y proceder a caracterizar la línea modelo generada.

La mutación acá estudiada fue reportada inicialmente para dos mujeres, hermanas homocigotas para la mutación (de Vries *et al.*, 2014). Los varones que participaron del estudio resultaron ser heterocigotos y no reportaron signos o síntomas patológicos. En esa oportunidad, en la familia de las pacientes no se encontraron varones homocigotos, motivo por el cual el fenotipo infértil para ellos se desconocía. Estos hechos justifican que, hasta ese momento, la mutación encontrada se relacionara únicamente con formas de infertilidad femenina. Gracias a nuestro trabajo, podemos asegurar que en el modelo murino la mutación *Syce1* c.727C> T es suficiente para causar infertilidad en ratones macho y hembra por igual. De esta manera, se podría predecir que la mutación *SYCE1* c.721C>T, de encontrarse en homocigosis seguramente también cause infertilidad en los hombres. Observamos también que los ratones heterocigotos para la mutación no presentan diferencias distinguibles con sus

---

compañeros WT en ninguno de los dos sexos. Por lo tanto, podemos decir para este caso, que la infertilidad tendría origen genético y un modo de herencia recesivo.

El hecho de que no exista dimorfismo sexual para la mutación de *Syce1*, apoya reportes anteriores sobre estudios de pérdida de función de genes codificantes de componentes del EC del CS, cuyos modelos animales resultaron infértiles en ambos sexos (Schramm, *et al.*, 2011; de Vries, *et al.*, 2005; Hamer, *et al.*, 2008; Bolcun-Filas, *et al.*, 2007; Bolcun-Filas, *et al.* 2009; Gómez, *et al.*, 2016). Contrariamente a esto, los mutantes para *Sycp2* y *Sycp3*, componentes del EL, mostraron dimorfismo sexual (Yuan, *et al.*, 2002; Yang, *et al.*, 2006). Los machos y hembras heterocigotos consiguen desarrollarse con normalidad, pero los machos homocigotos resultan ser infértiles, con un fenotipo muy similar al descrito para los mutantes caracterizados en este trabajo; en tanto en las hembras, las mismas mutaciones pueden dar lugar a un espectro de fenotipos más amplio, que van desde la reducción de la fertilidad con mayor número de ovocitos aneuploides, pérdida de embriones y menor descendencia (Yuan, *et al.*, 2002). Vale recordar que, en las hembras de mamíferos, y en particular en las mujeres, las células germinales pasan por la meiosis I de forma semi-sincrónica en el desarrollo embrionario hasta completar la profase I. Luego los ovocitos entran en detención y permanecen inactivos hasta la madurez sexual, cuando se recluta un número muy limitado de ovocitos en cada ciclo para proseguir la meiosis. En los hombres por otro lado, este es un evento enteramente posnatal (Morelli *et al.*, 2005; revisado por Handel y Eppig, 1998). Las células germinales masculinas entran en meiosis en la pubertad y la gametogénesis continúa en ondas durante toda la vida, reclutando en cada evento de espermatogénesis, nuevas y numerosas poblaciones de células. Esta disparidad numérica entre sexos se ve reflejada, por ejemplo, en una vida reproductiva más extensa en machos en relación a las hembras. Se ha propuesto que los puntos de control que regulan los eventos de la meiosis de mamíferos son más estrictos en los machos que en las hembras y que esta flexibilidad femenina responde al hecho del limitado potencial reproductivo representado por un número reducido de ovocitos. En este escenario, la fertilidad se volvería una prioridad, aún cuando el número de ovocitos aneuploides resultantes aumente (Hunt *et al.*, 2003).

La comparación del material histológico de las gónadas de los ratones mutantes heterocigotos y ratones WT no arrojó diferencias en tamaño ni contenido celular. Esto se

---

condice con nuestros resultados de los ensayos de fertilidad, y con el fenotipo fértil observado en humanos heterocigotos por de Vries y colaboradores. En cambio, las imágenes de microscopía de las gónadas de mutantes, con una detención de la meiosis en etapas tempranas, y los resultados de los análisis de citometría de flujo, que confirman un proceso espermatogénico deficiente en los ratones homocigotos machos, reflejan el fenotipo infértil de ambos sexos. De hecho, las hembras homocigotas con ovarios desprovistos de folículos se aproximan mucho a la descripción clínica de las dos mujeres con POI reportadas como homocigotas para la mutación (de Vries, *et al.*, 2014).

El análisis de localización proteica empleando anticuerpos anti-SYCE1, en combinación con otros anticuerpos contra diferentes componentes de CS y el empleo de un microscopio confocal con resolución optimizada (ZeissLSM800 con módulo de súper-resolución Airyscan), permitieron visualizar la progresión de la meiosis y evaluar el ensamblaje del CS. En mutantes homocigotas SYCE1 no pudo ser detectada sobre los CS, y la sola presencia en homocigosis de la mutación *Syce1* c.727C>T tiene consecuencias severas en la sinapsis. Como se vio en modelos mutantes para otras proteínas del CS, esto podría generar cortes de doble hebra (DSBs) que no logran ser reparados, pudiendo causar fallas en la sinapsis homóloga (Hamer, *et al.*, 2008; Schramm, *et al.*, 2011). Esto explicaría la falta de ovocitos observada en hembras y la carencia de espermátidas y espermatozoides en machos, ya que al acumular DSBs podrían desencadenar la vía de control de daños del ADN, y serían eliminados (Rinaldi, *et al.*, 2017).

Por otra parte, se conoce que en ratones *KO*, la ausencia de algunas de las proteínas de la RC del CS como SYCP1, o SYCE3, resultan en animales infértiles ya que la estructura del EC no se forma (Schramm, *et al.*, 2011). Además, se sugiere que SYCE3 interactúa con SYCP1 (a través de la región N-terminal de esta última) y con SYCE1 promoviendo el ensamblaje de los FT con el EC. Luego, el reclutamiento de SYCE2 y TEX12 al complejo formado por SYCP1, SYCE3 y SYCE1 (ver Figura 6) permitirían la extensión del CS (Hernández-Hernández, *et al.*, 2016). En nuestros resultados, para ratones homocigotos se ve SYCE3 cargada al CS, pero no se detecta la señal de SYCE1 ni de otros componentes del CS de carga posterior a SYCE1, como es el caso de TEX12.

---

La proteína más recientemente identificada de la RC del CS fue SIX60S1. Esta proteína, encontrada en un ensayo de híbrido de levadura, formaría un dominio junto con SYCP1, SYCE1 y SYCE3. La presencia de SIX60S1 sería esencial para la progresión de la recombinación, ya que ésta se vio detenida en meiocitos *Six60S1*<sup>-/-</sup> (Gómez, *et al.*, 2016). En un trabajo publicado recientemente, posterior al nuestro (Sánchez-Sáez *et al.*, 2020), mediante estudios de dicroísmo circular y cromatografía de exclusión de tamaño se concluyó que el correcto ensamblaje del CS depende de las interacciones que se dan entre el extremo N terminal de SIX60S1 que se une al núcleo dimérico de SYCE1 y un enlace formado por una secuencia descendente de SIX60S1 que interactúa con SYCE1 formando un complejo esencial para la progresión de la meiosis. Se sugiere un rol estabilizador que favorece el reclutamiento y ensamblaje de SYCE2 y TEX12.

La mutación en *SYCE1* aquí estudiada conduce a la aparición de un codón *stop* prematuro (mutación *non-sense*). Estas mutaciones representan el 20% de las mutaciones puntuales asociadas con alguna enfermedad (Miller *et al.*, 2014). En este contexto, se plantean dos posibilidades sobre estos casos de infertilidad. Podría suceder que la supuesta proteína trunca SYCE1, estuviera presente y no fuera cargada al CS ya que se vería impedida su interacción con SYCE3 y SIX60S1, impidiéndole el ensamblaje normal del CS. La otra posibilidad es que SYCE1 trunca, o su ARNm, fueran eliminados y por ende no se encontrasen presentes dentro de los núcleos celulares.

Para responder a esta interrogante, se realizaron ensayos de Western blot, cuyo resultado no logró detectar la supuesta proteína trunca en los ratones mutantes homocigotos ni en los mutantes heterocigotos, aún cuando los geles proteicos se sobrecargaron para minimizar los efectos de los límites de sensibilidad de detección. Este resultado sugiere que el fenotipo infértil observado en ratones mutantes homocigotos se debe a la ausencia de SYCE1 (tanto la forma normal como la trunca), o a niveles tan bajos de la misma que resultaran indetectables. La ausencia de una proteína SYCE1 trunca interferente podría explicar el fenotipo mutante heterocigoto, que no presenta diferencias morfológicas o funcionales con sus compañeros de camada WT. Esto es diferente de lo que ocurre con la mutación de SYCP3 reportada por Miyamoto *et al.*, en 2003, en la que se informó un efecto

---

negativo dominante en pacientes heterocigotos, dado por la interferencia de la proteína SYCP3 trunca con la polimerización de la proteína WT (Bolor, *et al.*, 2009).

Una posible explicación para la ausencia de niveles detectables de la proteína mutante es que el transcrito con el codón de terminación prematuro sea degradado por la vía de *nonsense-mediated decay* (NMD), sistema de control de calidad del ARNm que reconoce y degrada los transcritos aberrantes que contienen codones de terminación prematuros (PTC; Chang *et al.*, 2007). De esta forma, el mecanismo de NMD protege a las células, de los posibles efectos deletéreos que podría suponer un ARNm aberrante (Nicholson *et al.*, 2010). Se ha propuesto que NMD podría tener un papel importante en la prevención de estos defectos, y finalmente en las enfermedades humanas de origen genético. El estudio de la secuencia del ARNm mutante *Syce1* c.721C>T nos indicó que el mismo podría ser un fuerte candidato para NMD. Para evaluar esta posibilidad, se cuantificaron los niveles de transcrito *Syce1* en ratones mutantes y se comparó con compañeros de camada WT. Los resultados mostraron niveles de transcripción mínimos para mutantes homocigotos, y niveles intermedios para los mutantes heterocigotos, apuntando a la degradación de los transcritos *Syce1* aberrantes por la vía de NMD. Por lo tanto, la presencia homocigota de la mutación *Syce1* c.727C>T conduciría a un fenotipo similar al informado para ratones KO para este gen, donde la ausencia de proteína SYCE1 provoca infertilidad (Bolcun-Filas, *et al.*, 2009). De todos modos, existen evidencias crecientes de que la eficiencia del NMD puede variar en función del tipo de mutación y la célula en la que actúa (revisado por Miller y Pearce 2014). Estas particularidades podrían tener efectos variables en la manifestación de una enfermedad. Por lo tanto, aún si el ARNm de *Syce1* mutante estuviera siendo eliminado por la vía de NMD, es posible que el efecto no sea total, y permita la síntesis de proteína trunca en cantidades mínimas, no detectables en los ensayos de Western blot.

Un estudio reciente, realizado en 2021 identificó tres mutaciones homocigotas en el gen C14ORF39 de humano, ortólogo de SIX60S1 murino, relacionada a casos de NOA y POI. Los autores se basaron en nuestros resultados reportados para SYCE1 para evaluar la posible existencia de proteína trunca putativa en mutantes SIX60S1. Sus resultados fueron diferentes a los nuestros, ya que los autores detectaron proteína trunca del tamaño predicho (Fan *et al.*, 2021). Comprobaron también que pese a conservar los dos sitios de unión a

SYCE1, la interacción entre ellas se vio alterada, resultando en individuos con defectos sinápticos y detención meiótica.

El hecho de que la proteína mutante esté presente tiene una connotación importante. En el escenario en el que una proteína trunca interferente circule y compita por los sitios de interacción con una eventual proteína normal exógena introducida, podría dificultar el desarrollo de un procedimiento terapéutico de este tipo en individuos mutantes homocigotas.

Los resultados de este trabajo representaron una prueba de principio, ya que no existían estudios previos sobre el uso de la tecnología CRISPR/Cas para provocar cambios específicos a una proteína del EC de CS, y generar una línea de modelo de ratón humanizado para el estudio de casos de infertilidad idiopática. Este modelo también podría ser utilizado para darle continuidad a esta línea de investigación, por ejemplo, mediante el desarrollo de una posible terapia que permita revertir la condición infértil en pacientes afectados. Un abordaje posible es la terapia génica, intentando la corrección del defecto mediante edición genómica.

---

## 6. CONCLUSIONES

Se caracterizó una línea de ratones humanizados (*Syce1-727*) generada por el grupo, la cual ha servido de modelo para el estudio de un tipo de infertilidad humana idiopática. Para la generación de este modelo de infertilidad se empleó la tecnología de edición genómica de última generación CRISPR/Cas9. La edición resultó exitosa y la línea generada constituye un material muy preciado para la comprensión de estos casos de infertilidad en humanos, permitiendo corroborar su causa y estudiar los mecanismos involucrados. La estrategia empleada en este proyecto constituyó una prueba de principio en relación al estudio de mutaciones que afectan componentes de CS.

La mutación *Syce1* c.727 C>T introducida en el genoma de ratones es causante de infertilidad cuando se encuentra en homocigosis, afectando a hembras y machos por igual. Dado que se trata de ratones humanizados conteniendo una mutación equivalente a la encontrada en humanos (*SYCE1* c.721C>T), se confirma que esta mutación en homocigosis es causa de infertilidad en humanos, y afectaría a hombres y mujeres por igual. De esta manera, se confirma la etiología de la enfermedad para ambos sexos.

Existen importantes diferencias de tamaño y contenido celular en las gónadas de los mutantes homocigotos. El proceso de espermatogénesis se detiene en meiosis temprana en estos ratones. En hembras homocigotas no se observan ovocitos ni folículos ováricos en desarrollo, mientras que los machos presentan testículos desprovistos de células posmeióticas. En conclusión, la presencia bialélica de la mutación puntual en estudio provoca azoospermia no obstructiva en ratones macho e insuficiencia ovárica primaria en hembras, y lo mismo ocurriría en humanos.

En relación a la patogenia o mecanismos de la enfermedad, los análisis realizados permiten afirmar que la mutación estudiada provoca, en los gametos en formación, alteraciones en el ensamblaje del CS y en la sinapsis de cromosomas homólogos. No se detectó la proteína putativa SYCE1 trunca cargada al CS ni aquellos componentes de carga posterior a SYCE1 como TEX12. Asimismo, los resultados obtenidos a partir de RT-qPCRs

indican que en los mutantes ocurre la degradación a nivel de transcripto *Syce1*, lo cual provoca a su vez ausencia de niveles detectables de la proteína SYCE1 (resultado observado en Western blots). En este sentido, podemos afirmar que las consecuencias fenotípicas observadas no serían causadas por alteraciones en las interacciones de SYCE1 trunca con otros componentes del CS, sino por la casi total ausencia de tal proteína trunca.

Se generaron nuevas herramientas moleculares: se diseñaron y adquirieron herramientas para el estudio de los mecanismos de la enfermedad (por ejemplo, síntesis de anticuerpos capaces de reconocer la eventual proteína trunca, los cuales no se hallaban disponibles a nivel comercial). Estas herramientas fueron empleadas en diversos ensayos (inmunolocalizaciones, Western blots), de gran importancia en la caracterización de la nueva línea modelo.

Finalmente, se preservó la línea estudiada para otros fines de investigación. Una vez completada la caracterización de la línea *Syce1-727*, se procedió a su preservación mediante congelamiento de semen de machos heterocigotas para la mutación (UATE, IPMont). Esto constituye un material muy preciado y nos permitirá emplear la misma línea en proyectos futuros, con diferentes fines. A modo de ejemplo, podrá emplearse para desarrollar procedimientos de terapia génica que apunten a revertir la mutación y sus consecuencias en las células germinales masculinas. Sentar las bases en el modelo murino generado, será de evidente valor biomédico. Además, los avances que se obtengan en relación con el *delivery* dirigido a gónada masculina exceden a esta mutación en particular, ya que serán potencialmente útiles también para intentar revertir otras mutaciones reportadas que afecten la formación de gametos normales. Más aún, esta línea de ratones mutantes podrá eventualmente ser utilizada en el marco de otros proyectos de investigación para contestar otras preguntas biológicas vinculadas a la salud reproductiva.

---

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- **Arimura T, Helbling-Leclerc A, Massart C, Varnous S, Niel F, Lacène E, et al.** Mouse model carrying H222P-Lmna mutation develops muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy similar to human striated muscle laminopathies. *Hum Mol Genet.* 2005; 14: 155-69.
- **Alsheimer M, Baier A, Schramm S, Schutz W, Benavente R.** Synaptonemal Complex Protein SYCP3 Exists in Two Isoforms Showing Different Conservation in Mammalian Evolution. *Cytogenet. Genome Res.* 2010; 128: 162–168.
- **Bilgin EM, Kovanci E.** Genetics of premature ovarian failure. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2015; 27: 167-74.
- **Boitoni C, Di Persico S, Esposito V.** Spermatogonial cells: mouse, monkey, end man comparison. *Seminars in Cell Dev Biol.* 2016; 59: 79-88
- **Bolcun-Filas E, Costa Y, Speed R, Taggart M, Benavente R, De Rooij DG, et al.** SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. *J Cell Biol.* 2007; 176: 741-747.
- **Bolcun-Filas E, Hall E, Speed R, Taggart M, Grey C, de Massy B, et al.** Mutation of the mouse *Syce1* gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair. *PLoS Genet.* 2009; 5: e1000393.
- **Bolcun-Filas E, Schimenti JC.** Genetics of meiosis and recombination in mice. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012; 298: 179-227.
- **Bolor H, Mori T, Nishiyama S, Ito Y, Hosoba E, Inagaki H, et al.** Mutations of the SYCP3 gene in woman with recurrent pregnancy loss. *Am J Hum Genet.* 2009; 84:14-20.
- **Buonomo B, Clyne R, Fuchs J, Loidl J, Uhlmann K, Nasmyth K.** Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell.* 2000;103: (3):387-98.
- **Burgoyne PS, Mahadevaiah SK, Turner, JMA.** The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat. Rev. Genet.* 2009; 10, 207–216.
- **Burle-Caldas G, Soares-Simões M, Lemos-Pechnicki L, DaRocha W, Teixeira S.** Assessment of two CRISPR-Cas9 genome editing protocols for rapid generation of *Trypanosoma cruzi* gene knockout mutants. *Int J Parasitol.* 2018; 48: 591-596.
- **Capoano A, Ortiz-Laquintana A, Rodríguez-Casuriaga R, Schlapp G, Meikle N, Mulet P, Crispo M, Benavente R, Geisinger A.** SPATS1(spermatogenesis-associated, serine-rich 1) is not essential for spermatogenesis and fertility in mouse. *Plos One.* 2021; doi.org/10.1371/journal.pone.0251028

- 
- **Chang Y, Imam J, Wilkinson M.** The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 2007; 76: 51-74.
  - **Cohen C, Parry DA.** Alpha-helical coiled coils: more facts and better predictions. *Science.* 1994; 263 : 488 - 489.
  - **Costa Y, Speed R, Ollinger R, Alsheimer M, Semple CA, Gautier P, et al.** Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *J Cell Sci.* 2005; 118: 2755-62.
  - **Crispo M, Schlapp G, Cardenas-Rodriguez M, Gonzalez-Maciel D, Rumbo M.** Optimization of transgenesis conditions for the generation of CXCL2-luciferase reporter mice line. *Electron J Biotechnol.* 2013; 16:14.
  - **Davies OR, Maman JD, Pellegrini L.** Structural analysis of the human SYCE2-TEX12 complex provides molecular insights into synaptonemal complex assembly. *Open Biol.* 2012; 2: 120099.
  - **da Cruz, I., Rodríguez-Casuriaga, R., Santiñaque, FF et al.** Análisis del transcriptoma de poblaciones de células espermatogénicas de ratón altamente purificadas: las firmas de expresión génica cambian de procesos relacionados con la meiótica a la posmeiótica en la etapa de paquiteno. *BMC Genomics.* 2016; 17: 294. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2618-1>
  - **de Gennaro L, Balistreri S, Lenzi A, Lombardo F, Ferrara M, Gandini L.** “Psychosocial factors discriminate oligozoospermic from normozoospermic men,” *Fertility and Sterility.* 2003; 79: 3. 1571–1576.
  - **de Vries FA, de Boer E, van den Bosch M, Baarends WM, Ooms M, Yuan L, et al.** Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev.* 2005; 19: 1376-89.
  - **de Vries L, Behar DM, Smirin-Yosef P, Lagovsky I, Tzur S, Basel-Vanagaite L.** Exome sequencing reveals SYCE1 mutation associated with autosomal recessive primary ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99: E2129-32.
  - **Devroey P, Fauser BC, Diedrich K;** Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group 2008 Approaches to improve the diagnosis and management of infertility. *Hum Reprod Update.* 2009; 15: 391–408.
  - **Dunce JM, Dunne OM, Ratcliff M.** Structural basis of meiotic chromosome synapsis through SYCP1 self-assembly. *Nat Struct Mol Biol.* 2018; 25, 557–569.
  - **Dunce JM, Salmon LJ, Davies OR.** Structural basis of meiotic chromosome synaptic elongation through hierarchical fibrous assembly of SYCE2-TEX12. *Nature Structural & Molecular Biology.* 2021;28, 681–693.
  - **Dunne O, Davies O.** Molecular structure of human synaptonemal complex protein SYCE1. *Chromosoma.* 2019;128(3):223-236

- 
- **Dym M.** The male reproductive system. En: Histology (L. Weiss y R.O. Greep, eds.) 4ta Ed., pp 979-1038. New York: McGraw-Hill (1977).
  - **Evers JL.** Female subfertility. *Lancet.* 2002; 360: 151–9.
  - **Fan S, Jiao Y, Khan R, Jiang X, Rafay A, Ali A, Zhou J, Naeem M, Murtaza G, Li Y, Yang G, et al.** Homozygous mutations in C14orf39/SIX6OS1 cause non-obstructive azoospermia and premature ovarian insufficiency in humans. *J. Human Genetics.* 2021; 108: 324–336.
  - **Fernandez A.** Organización y comportamiento meiótico de los cromosomas sexuales de mamíferos en un contexto evolutivo. Universidad Autónoma de Madrid,, Facultad de Ciencias. Dto de Biología. Tesis Doctoral (2019).
  - **Fernandez-Capetillo O, Mahadevaiah S, Celeste A, Romanienko P, Camerini-Otero D, Bonner W, Manova K, Burgoyne P, Nussenzweig A.** H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell.* 2003; 4: 497-508
  - **Fraune J, Schramm S, Alsheimer M, Benavente R.** The mammalian synaptonemal complex: Protein components assembly and role in meiotic recombination. *Exp Cell Res.* 2012; 318: 1340–1346.
  - **Garcia-Cruz R, Roig I, Robles P, Scherthan H, Caldés, M. G.** ATR, BRCA1 and gammaH2AX localize to unsynapsed chromosomes at the pachytene stage in human oocytes. *Reprod. Biomed. Online.* 2009; 18: 37–44.
  - **Geisinger A, Benavente R.** Mutations in Genes Coding for Synaptonemal Complex Proteins and Their Impact on Human Fertility. *Cytogenet Genome Res* 2016; 150: 77–85.
  - **Geisinger A, Rodríguez-Casuriaga R.** Flow cytometry for gene expression studies in Mammalian spermatogenesis. *Cyto Gen Res.* 2010;128(1-3):46-56.
  - **Geisinger A, Rodríguez-Casuriaga R.** Flow cytometry for the isolation and characterization of rodent meiocytes. *Methods Mol Biol.* 2017; 1471: 217–230.
  - **Gerton, JL, Hawley RS.** Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nat. Rev. Genet.* 2005; 6: 477–487.
  - **Gilbert, SF.** Biología del Desarrollo. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana 7° edición. 2006.
  - **Ghezraoui H, Piganeau M, Renouf B, Renaud J, Sallmyr A, Ruis B, Oh S, Tomkinson E, Hendrickson, Giovannangeli C, Jasin M, Brunet E.** Chromosomal translocations in human cells are generated by canonical nonhomologous end-joining. *Mol Cell.* 2014; 18: 55(6):829-842.

- 
- **Glauert AM, Lewis PR.** Biological specimen preparation for transmission electron microscopy. In: Glauert AM (ed). *Practical Methods in Electron Microscopy*, Vol. 17. London: Portland Press, 1998.
  - **Gómez-H L, Felipe-Medina N, Sánchez-Martín M, Davies OR, Ramos I, García-Tuñón I, de Rooij DG, Dereli I, Tóth A, Barbero JL, Benavente R, Llano E, Pendas AM.** C14ORF39/SIX6OS1 is a constituent of the synaptonemal complex and is essential for mouse fertility. *Nat Commun.* 2016; 7:13298. doi: 10.1038/ncomms13298.
  - **Hamer, G., Gell, K., Kouznetsova, A., Novak, I., Benavente, R. y Hoog, C.** Caracterización de una nueva proteína específica de la meiosis dentro del elemento central del complejo sinaptonémico. *J. Cell Sci.* 2006;119, 4025-4032.
  - **Hamer G, Wang H, Bolcun-Filas E, Cooke HJ, Benavente R, Höög C.** Progression of meiotic recombination requires structural maturation of the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci.* 2008; 121: 2445-51.
  - **Handel MA, Schimenti JC.** Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet.* 2010; 11:124-36.
  - **Hann, MC, Lau PE, Tempest HG.** Meiotic recombination and male infertility: from basic science to clinical reality? *Asian J Androl.* 2011; 13:212-8.
  - **Hassold T, Hall H, Hunt P.** The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet.* 2007; 16: 2, 203-208.
  - **Hernández-Hernández A, Masich S, Fukuda T, Kouznetsova A, Sandin S, Daneholt B, Hoog C.** The central element of the synaptonemal complex in mice is organized as a bilayered junction structure. *J Cell Sci.* 2016; 129: 2239–2249.
  - **Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovič M, Ressel S, Charpentier E.** The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell.* 2018; 172: 1239-1259.
  - **Hryhorowicz M, Lipiński D, Zeyland J, Słomski R.** CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2017; 65 (3): 233-240.
  - **Hunt PA, Koehler KE, Susiarjo M, Hodges CA, Ilagan A, Voigt RC, Thomas S, Thomas BF & Hassold TJ.** Bisphenol a exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Current Biology.* 2003;13 546–553.
  - **Hwang GH, Hopkins JL, Jordan, PW.** Chromatin Spread Preparations for the Analysis of Mouse Oocyte Progression from Prophase to Metaphase II. *J. Vis. Exp.* (132), e56736, doi:10.3791/56736 (2018).
  - **Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E.** A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012; 337 (6096): 816-21.

- 
- **Keeney S.** Spo11 and the Formation of DNA Double-Strand Breaks in Meiosis. *Genome Dyn Stab.* 2008; 2: 81-123.
  - **Kenkel S, Rolf C, Nieschlag E.** “Occupational risks for male fertility: an analysis of patients attending a tertiary referral centre,” *International Journal of Andrology.* 2001; 24: no. 6, 318–326.
  - **Klein F, et al.** A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell.* 1999; 98: 91–103.
  - **Kolas NK, Yuan L, Hoog C, Heng HH, Marcon E, Moens PB.** Male mouse meiotic chromosome cores deficient in structural proteins SYCP3 and SYCP2 align by homology but fail to synapse and have possible impaired specificity of chromatin loop attachment, *Cytogenet. Genome Res.* 2004; 105: 182–188.
  - **Krausz C.** Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011; 25: 271–85.
  - **Laissue P.** Aetiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure: From genetic linkage analysis to next generation sequencing. *Mol Cell Endocrinol.* 2015; 411: 243-57.
  - **Lamb NE, et al.** Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nat Genet.* 1996; 14: 400–405.
  - **Lammers JH, Offenbergh HH, van Aalderen M, Vink AC, Dietrich AJ, Heyting C,** The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol. Cell. Biol.* 1994; 14: 1137–1146.
  - **Liebe B, Alsheimer M, Hoog C, Benavente R, Scherthan H.** Telomere attachment, meiotic chromosome condensation, pairing, and bouquet stage duration are modified in spermatocytes lacking axial elements. *Mol. Biol. Cell.* 2004; 15 : 827–837.
  - **Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2  $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001; 25: 402–408.
  - **Llano E, Gomez-H L, García-Tuñón I, Sánchez-Martín M, Caburet S, Barbero JL, et al.** STAG3 is a strong candidate gene for male infertility. *Hum Mol Genet.* 2014; 23: 3421-31.
  - **Lu J, Gu Y, Feng J, Zhou W, Yang X, Shen Y.** Structural insight into the central element assembly of the synaptonemal complex. *Sci Rep.* 2014; 4:7059.
  - **Lynn A, Ashley T, Hassold T.** Variation in Human Meiotic Recombination. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2004; 5: 317–349.

- 
- **MacQueen AJ, Colaiacovo MP, McDonald K, Villeneuve AM.** Synapsis-dependent and -independent mechanisms stabilize homolog pairing during meiotic prophase in *C. elegans*. *Genes Dev.* 2002; 16: 2428–2442.
  - **Malkov M, Fisher Y, Don J.** Developmental Schedule of the Postnatal Rat Testis Determined by Flow Cytometry. *Biol Rep.* 1998; 59: 1,1 84–92.
  - **Manandhar G, Schatten H, Sutovsky P.** Centrosome Reduction During Gametogenesis and Its Significance. *Bio of Rep.* 2005; 72: 2-13.
  - **Maor-Sagie E, Cinnamon Y, Yaacov B, Shaag A, Goldsmidt H, Zenvirt S, et al.** Deleterious mutation in SYCE1 is associated with non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet.* 2015; 32: 887-91.
  - **Marcon E, Moens PB.** The evolution of meiosis: recruitment and modification of somatic DNA-repair proteins. *Bioessays.* 2005; 27: 795–808.
  - **Massart A, Lissens W, Tournaye H, Stiffs K.** Genetic causes of spermatogenic failure. *Asian J Androl.* 2012;14: 40-8.
  - **Matsudaira, P.** Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem.* 1987; 262 (21):10035-8.
  - **Matzuk MM, Lamb DJ.** “Genetic dissection of mammalian fertility pathways,” *Nature Medicine.* 2002; 8: 41– 49.
  - **Menchaca A, Schlapp G, Meikle M, Crispo M.** Transgenesis and Gene Edition in Mammals. *Reference Module in Life Sciences, Elsevier.* 2017.
  - **Meuwissen RL, Offenbergh HH, Dietrich AJ, Riesewijk A, van Iersel C, Heyting A.** coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes, *EMBO J.* 1992; 11: 5091–5100.
  - **Miller JN, Pearce DA.** Nonsense-Mediated Decay in Genetic Disease: Friend or Foe? *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2014 ; 762: 52–64.
  - **Min B, Qi L, Yanjiao S, Yuanhua H, Dali L, Yanlin M.** Generation of site-specific mutant mice using the CRISPR/Cas9 system. *Yi Chuan.* 2015; 37(10): 1029-35.
  - **Miyamoto T, Hasuike S, Yogev L, Maduro MR, Ishikawa M, Westphal H, et al.** Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *Lancet.* 2003; 362:1714-49.
  - **Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, et al.** Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* 2009; 155:733–740.
  - **Morelli MA, Cohen PE.** Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction.* 2005; 130: (6), 761-781.

- 
- **Nicholson P, Yepiskoposyan H, Metze S, Zamudio Orozco R, Kleinschmidt N, Mühlemann O.** Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. *Cell. Mol. Life Sci.* 2010; 67: 677-700.
  - **Nishiyama S, Kishi T, Kato T, Suzuki M, Bolor H, Nishizawa H, Iwata N, Udagawa Y, Kurahashi H.** A rare synaptonemal complex protein 3 gene variant in unexplained female infertility. *Mol Hum Repr.* 2011; Vol.17, No.4 pp. 266–271.
  - **NICE (National Collaborating Centre for Women's and Children's Health).** Fertility: Assessment and Treatment for People with Fertility Problems. London: Royal College of Obstetricians & Gynaecologists (UK); 2013.
  - **National Research Council (NRC).** Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th edn. Washington, DC: National Academies Press, 1996.
  - **Offenberg HH, Schalk JA, Meuwissen RL, Van Aalderen M, Kester HA, Dietrich AJ, Heyting C.** SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26: 2572–2579.
  - **Ollinger R, Alsheimer M, Benavente R.** Mammalian protein SCP1 forms synaptonemal complex-like structures in the absence of meiotic chromosomes. *Mol. Biol. Cell.* 2005; 16: 212–217.
  - **Page SL, Hawley RS.** The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004; 20: 525–58.
  - **Pashaei M, Rahimi Bidgoli MM, Zare-Abdollahi D, Najmabadi H, Haji-Seyed-Javadi R, Fatehi F, Alavi A.** The second mutation of SYCE1 gene associated with autosomal recessive nonobstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2020;37:451–458.
  - **Peters AH, Plug AW, van Vugt MJ, de Boer P.** A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome Res.* 1997; 5 :66–68.
  - **Prieto I, et al.** Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat. Cell Biol.* 2001; 3: 761–766.
  - **Qin W, Dion SL, Kutny PM, Zhang Y, Cheng AW, Jillette NL, Malhotra A, Geurts AM, Chen YG, Wang H.** Efficient CRISPR/cas9-mediated genome editing in mice by zygote electroporation of nuclease. *Genetics.* 2015; 200 (2) :423–430.
  - **Quartuccio SM, Schindler K.** Functions of Aurora kinase C in meiosis and cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2015; 3:50.
  - **Rosa-Villagrán, L., Barrera, N., Montes, J. et al.** Disminución de la calidad del semen en los últimos 30 años en Uruguay. *Clínica básica. Androl.* 2021; 31, 8.

- 
- **Revenkova E, Eijpe M, Heyting C, Hodges CA, Hunt PA, Liebe B, Scherthan H, Jessberger R.** Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat. Cell Biol.* 2004; 6: 555–562.
  - **Rinaldi VD, Bolcun-Filas E, Kogo H, Kurahashi H, Schimenti JC.** The DNA damage checkpoint eliminates mouse oocytes with chromosome synapsis failure. *Mol Cell.* 2017; 67: 1026–1036.
  - **Rodríguez-Casuriaga R, Geisinger A.** Contributions of Flow Cytometry to the Molecular Study of Spermatogenesis in Mammals. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22(3).
  - **Rodríguez-Casuriaga R, Folle GA, Santinaque F, López-Carro B, Geisinger A.** Simple and efficient technique for the preparation of testicular cell suspensions. *J Vis Exp.* 2013; 78: e50102.
  - **Rodríguez-Casuriaga R, Geisinger A, López-Carro B, Porro V, Wettstein R, Folle GA.** Ultra-fast and optimized method for the preparation of rodent testicular cells for flow cytometric analysis. *Biol Proced Online.* 2009; 11:184–195.
  - **Rodríguez-Casuriaga R, Santinaque F, Folle GA, López-Carro B, Geisinger A.** Rapid preparation of rodent testicular cell suspensions and spermatogenic stages purification by flow cytometry using a novel blue-laser-excitable vital dye. *MethodsX.* 2014; 1: 239–243.
  - **Roeder, GS.** Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev.* 1997; 11: 2600–2621.
  - **Ross, LO, Maxfield R, Dawson D.** Exchanges are not equally able to enhance meiotic chromosome segregation in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 4979–4983.
  - **Sadler, TW.** Embriología Médica: con orientación clínica / Langman. Madrid: Panamericana (8ª Ed.).Cap. 1: Gametogénesis: conversión de las células germinales en gametos masculinos y femeninos. 2002; pp. 3-29.
  - **Sage J, et al.** The Sycp1 loci of the mouse genome: successive retropositions of a meiotic gene during the recent evolution of the genus. *Genomics.* 1997; 44: 118–126.
  - **Salcedo P.** Meiosis. *Rev Fac Med UNAM Vol. 38. N° 3.* (1995).
  - **Sánchez-Sáez F, Gómez-H L, Dunne O, Gallego-Páramo C, Medina F, Sánchez-Martín M, Llano E, Pendas A, Davies O.** Meiotic chromosome synapsis depends on multivalent SYCE1-SIX6OS1 interactions that are disrupted in cases of human infertility. *Sci. Adv.* 2020; 6 : eabb1660 2.
  - **Schlapp G, Goyeneche L, Fernández G, Menchaca A, Crispo M.** Administration of the nonsteroidal anti-inflammatory drug tolfenamic acid at embryo transfer improves maintenance of pregnancy and embryo survival in recipient mice. *J Assisted Reprod Genet.* 2015; 32: 271–275.

- 
- **Schmekel K, Meuwissen RL, Dietrich AJ, Vink AC, van Marle J, van Veen H, Heyting C.** Organization of SCP1 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat, *Exp. Cell Res.* 1996; 226: 20–30.
  - **Schramm S, Fraune J, Naumann R, Hernandez-Hernandez A, Höög C, Cooke HJ, et al.** A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination, and fertility. *PLoS Genet.* 2011; 7: e1002088.
  - **Shao S, Ren C, Liu Z, Bai Y, Chen Z, Wei Z, Wang X, Zhang Z, Xu X.** Enhancing CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair in mammalian cells by expressing *Saccharomyces cerevisiae* Rad52. *J Biochemistry and Cell Bio.* 2017; 92: 43-52.
  - **Spindler MC, Filbeck S, Stigloher C, Benavente R.** Quantitative basis of meiotic chromosome synapsis analyzed by electron tomography. *Sci. Rep.* 2019; 9:16102
  - **Sternberg SH, Doudna JA.** Expanding the Biologist’s Toolkit with CRISPR-Cas9. *Mol Cell* 2015; 58: 568–574.
  - **Sym M, Engebrecht JA, Roeder GS.** ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis. *Cell.* 1993; 72: 365–378.
  - **Syrjänen J, Pellegrini L, Davies O.** A molecular model for the role of SYCP3 in meiotic chromosome organisation. *eLife* 2014; 3: e02963 DOI: 10.7554 / eLife.02963.
  - **TT 2016 Program and Abstracts of the 13th Transgenic Technology Meeting .** Transgenic Research 2016; 25: 195–270.
  - **Vantman D, Vega M.** Fisiología reproductiva y cambios evolutivos con la edad de la mujer, *Revista Médica Clínica Las Condes.* 2010; 21: 348-362.
  - **Vidal F, et al.** Meiotic and synaptonemal complex studies in 45 subfertile males. *Hum Genet.* 1982; 60: 301–304.
  - **Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, et al.** Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different suregions in Yq11. *Hum Mol Genet.* 1996; 5: 933.
  - **Wein A, Partin W, Louis M, Kavoussi R, Andrew M, Novick C.** Campbell- Walsh Urologia. 9° ed, tomo 1. 2008, p 582- 591.
  - **Winkel K, Alsheimer M, Ollinger R, Benavente R.** Protein SYCP2 provides a link between transverse filaments and lateral elements of mammalian synaptonemal complexes, *Chromosoma.* 2009; 118: 259–267.
  - **Yang F, de La Fuente R, Leu NA, Baumann C, McLaughlin KJ, Wang PJ.** Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis, *J. Cell Biol.* 2006; 173: 497–507.
  - **Yang F, Silber S, Leu NA, Oates RD, Marszalek JD, Skaletsky H, et al.** TEX11 is mutated in infertile men with azoospermia and regulates genome-wide recombination rates in mouse. *EMBO Mol Med.* 2015; 7: 1198-210.

- **Yuan L, Liu JG, Hoja MR, Wilbertz J, Nordqvist K, Hoog C.** Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science*. 2002; 296: 1115-1118.
- **Yuan L, Liu JG, Zhao J, Brundell E, Daneholt B, Hoog, C.** The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol. Cell*. 2000; 5: 73-83.
- **Zwettler FU, Spindler MC, Reinhard S, Klein T, Kurz A, Benavente R, Sauer M.** Tracking down the molecular architecture of the synaptonemal complex by expansion microscopy. *Nat. Commun.* 2020; 11:322

## **8. ANEXOS**

A partir de este proyecto se publicó en mayo de 2020 un paper titulado “*Familial primary ovarian insufficiency associated with an SYCE1 point mutation: defective meiosis elucidated in humanized mice*” en la revista “*Molecular Human Reproduction*”, que se adjunta a continuación:

# Familial primary ovarian insufficiency associated with an *SYCE1* point mutation: defective meiosis elucidated in humanized mice

Diego Hernández-López<sup>1</sup>, Adriana Geisinger<sup>1,2</sup>,  
María Fernanda Trovero<sup>3</sup>, Federico F. Santinaque<sup>4</sup>, Mónica Brauer<sup>5</sup>,  
Gustavo A. Folle<sup>3,4</sup>, Ricardo Benavente <sup>6,\*</sup>, and  
Rosana Rodríguez-Casuriaga <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), 11600 Montevideo, Uruguay <sup>2</sup>Biochemistry-Molecular Biology, Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UdelaR), 11400 Montevideo, Uruguay <sup>3</sup>Department of Genetics, IIBCE, 11600 Montevideo, Uruguay <sup>4</sup>Flow Cytometry and Cell Sorting Core, IIBCE, 11600 Montevideo, Uruguay <sup>5</sup>Laboratory of Cell Biology, Department of Experimental Neuropharmacology, IIBCE, 11600 Montevideo, Uruguay <sup>6</sup>Department of Cell and Developmental Biology, Biocenter, University of Würzburg, D-97074 Würzburg, Germany

\*Correspondence address. Department of Molecular Biology, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), 11.600 Montevideo, Uruguay. E-mail: rrodriguez@iibce.edu.uy;  [orcid.org/0000-0002-7656-0288](https://orcid.org/0000-0002-7656-0288); Department of Cell and Developmental Biology, Biocenter, University of Würzburg, D-97074 Würzburg, Germany. E-mail: benavente@biozentrum.uni-wuerzburg.de;  [orcid.org/0000-0001-6361-0672](https://orcid.org/0000-0001-6361-0672)

Submitted on February 12, 2020; resubmitted on April 24, 2020; editorial decision on May 6, 2020

**ABSTRACT:** More than 50% of cases of primary ovarian insufficiency (POI) and nonobstructive azoospermia in humans are classified as idiopathic infertility. Meiotic defects may relate to at least some of these cases. Mutations in genes coding for synaptonemal complex (SC) components have been identified in humans, and hypothesized to be causative for the observed infertile phenotype. Mutation *SYCE1* c.721C>T (former c.613C>T)—a familial mutation reported in two sisters with primary amenorrhea—was the first such mutation found in an SC central element component-coding gene. Most fundamental mammalian oogenesis events occur during the embryonic phase, and eventual defects are identified many years later, thus leaving few possibilities to study the condition's etiology and pathogenesis. Aiming to validate an approach to circumvent this difficulty, we have used the CRISPR/Cas9 technology to generate a mouse model with an *SYCE1* c.721C>T equivalent genome alteration. We hereby present the characterization of the homozygous mutant mice phenotype, compared to their wild type and heterozygous littermates. Our results strongly support a causative role of this mutation for the POI phenotype in human patients, and the mechanisms involved would relate to defects in homologous chromosome synapsis. No *SYCE1* protein was detected in homozygous mutants and *Syce1* transcript level was highly diminished, suggesting transcript degradation as the basis of the infertility mechanism. This is the first report on the generation of a humanized mouse model line for the study of an infertility-related human mutation in an SC component-coding gene, thus representing a proof of principle.

**Key words:** gametogenesis / idiopathic infertility / primary ovarian insufficiency / meiosis / synaptonemal complex / *SYCE1* / CRISPR/Cas9 / humanized mice

## Introduction

Primary ovarian insufficiency (POI) is a clinical syndrome characterized by loss of ovarian activity before the age of 40 years. It is a heterogeneous condition with a broad phenotypic spectrum, sharing the common feature of ovarian follicle dysfunction or follicle depletion. It can have serious noxious effects upon women's psychological and physical

health. POI incidence increases with age, affecting one in every 10 000 women at the age of 20 years, and 1 in 100 at the age of 40 years (Goswami and Conway, 2005). Most cases (50–90%) have unknown causes and, therefore, are classified as idiopathic (Chapman *et al.*, 2015). An important number of idiopathic POI cases have been related to the genetic background of the diagnosed females (Coulam *et al.*, 1983), with 10–15% of them having an affected first-degree

relative (Van Kasteren and Schoemaker, 1999). Among the already reported causes of POI are alterations in chromosome number and structure (e.g. Turner's syndrome, 45,X) as well as genomic changes in 46,XX nonsyndromic patients (Fonseca et al., 2015; Laissue, 2015; Huhtaniemi et al., 2018). During the last two decades, an increasing number of POI-associated genes have been identified both on the X chromosome (e.g. Riva et al., 1996; Di Pasquale et al., 2006; Ennis et al., 2006; Laissue et al., 2006) and in autosomes (e.g. Doherty et al., 2002; Laissue et al., 2006; Watkins et al., 2006; Qin et al., 2007; Zhao et al., 2008), as well as in mitochondrial DNA (Pagnamenta et al., 2006), thus confirming the heterogeneous nature of the genetic causal component.

Given the requirement of meiotic divisions for normal gamete formation, it is expected that mutations in meiosis-related genes would account for at least part of the idiopathic infertility cases. Specifically, since synaptonemal complexes (SCs) are essential structures for recombination and proper chromosome segregation (and thus for gametogenesis progression), alterations in SC-coding genes are obvious candidates to be causative for infertility (revised by Geisinger and Benavente, 2016), and particularly of POI. The SC is a meiosis-specific proteinaceous, ladder-like structure that physically binds together homologous chromosomes and facilitates the resolution of recombination intermediates (Zickler and Kleckner, 2015). SCs are composed of two lateral elements (LEs), a central element (CE) and transverse filaments (TFs) linking both LEs with the CE. The CE together with the TFs constitutes the SC central region (CR). So far, eight different SC protein components have been identified, including LE proteins SYCP3 (Lammers et al., 1994; Alsheimer et al., 2010) and SYCP2 (Offenberg et al., 1998; Yang et al., 2006; Winkel et al., 2009), TF constituent SYCP1 (Meuwissen et al., 1992; De Vries et al., 2005; Schücker et al., 2015) and CE components SYCE1, SYCE2, SYCE3, TEX12 and SIX6OS (Costa et al., 2005; Hamer et al., 2006; Schramm et al., 2011; Gómez-H et al., 2016).

The involvement of SC components in POI would be supported by loss-of-function studies for different SC genes employing knockout (KO) mice, which have been reported to disrupt SC structure, and lead to infertility (reviewed by Yuan et al., 2002; De Vries et al., 2005; Yang et al., 2006; Bolcun-Filas et al., 2007; Hamer et al., 2008; Bolcun-Filas et al., 2009; Schramm et al., 2011; Fraune et al. 2012; Gómez-H et al., 2016). Some human mutations in SC-coding genes have been identified and linked to infertility as well (reviewed by Geisinger and Benavente, 2016). Concerning LE components, various mutations for SYCP3 have been reported, and the first SYCP2 mutations have recently been identified (Schilit et al., 2020).

Regarding CE components of the SC, in recent years mutations potentially associated with clinical conditions have started to be reported. In particular, deletions in human 10q26.3 encompassing the *SYCE1* gene were found in patients with POI (McGuire et al., 2011; Zhen et al., 2013; Bestetti et al., 2019). Very recently, a consanguineous familial study led to the identification of a homozygous gross deletion affecting ~4000 bp of *SYCE1* that was associated to POI (Zhe et al., 2020). Besides, thus far three reports identifying mutations in *SYCE1* in infertile patients have been made, all of them from consanguineous families (de Vries et al., 2014; Maor-Sagie et al., 2015; Pashaei et al., 2020). In the first of these reports, a homozygous point mutation was identified in a 13-member-family in which two sisters born to consanguineous parents suffered primary amenorrhea (de Vries et al., 2014). This mutation—initially identified as *SYCE1* c.613C>T—corresponds

to *SYCE1* c.721C>T (GRCh38.p13 human genome release), and would lead to *SYCE1* protein truncation. By sequencing studies, the authors determined that of the 11 descendants (five males and six females), only the two affected siblings were homozygous for the *SYCE1* c.721C>T point mutation, suggesting a genetic cause with a recessive mode of inheritance (de Vries et al., 2014). Although the idea of a possible relation of *SYCE1* mutation with pathogenesis would be supported by the phenotype of *Syce1* KO mice, which are infertile (Bolcun-Filas et al., 2009), an unequivocal evaluation linking *SYCE1* mutations to the observed medical conditions is lacking.

As most fundamental mammalian oogenesis events (including SC formation and recombination) occur during the embryonic phase, eventual defects in this process are only identified after many years of delay, leaving few possibilities to intervene, and even to study the condition's etiology and pathogenesis. A valid alternative to circumvent this difficulty is the employment of suitable animal models, which has the highest physiological relevance after human studies. So far, some mouse models have been generated for the study of putative infertility-linked alleles in genes involved in meiotic double-strand break (DSB) repair and recombination pathways (Tran and Schimenti, 2018, 2019; Tran et al., 2019). However, thus far no transgenic humanized mice mimicking mutations found in humans for any SC component-coding gene have been reported.

In order to evaluate a causative role of mutation *SYCE1* c.721C>T in the observed infertile phenotype, and to study its pathogenesis, we have generated a humanized mouse model line containing an equivalent point mutation by using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) mutagenesis system. Here, we present the phenotypic characterization of the humanized mutant mice, helping to shed light on the etiology and mechanisms of these infertility cases. We also discuss the potential usefulness of these humanized mouse models as substrates for future development of gene therapy approaches.

## Materials and methods

### Ethical approval

All animal procedures to generate the mutant line were performed at the SPF animal facility of the Transgenic and Experimental Animal Unit of Institut Pasteur de Montevideo. Experimental protocols were accordingly approved by the institutional Animal Ethics Committee (protocol number 007-18), in accordance with National Law of animal experimentation 18,611 (Uruguay) and international animal care guidelines (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) (National Research Council (NRC), 1996).

All subsequent experimental animal procedures were performed at Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE, Montevideo, Uruguay), also in accordance with National Law 18,611, and following the recommendations of the Uruguayan National Commission of Animal Experimentation (CNEA, approved experimental protocol 009/11/2016).

### Design of molecules for mutagenesis

CRISPR/Cas mutagenesis was employed aiming to obtain a humanized mouse cell line with an equivalent point mutation to the human *SYCE1*

gene c.721C>T (former SYCE1 c.613C>T, de Vries et al., 2014), which in mouse corresponds to *Syce1* c.727C>T. Design and selection of molecules to be used in the directed mutagenesis were carried out taking into account on-target ranking, off-target ranking and distance of single-guide RNA (sgRNA) to target site of mutagenesis (<http://www.broadinstitute.org/rnai/public/analysis-tools/sgna-design>). The selected sgRNA was acquired as CRISPR*Evolution Synthetic sgRNA kit* (Synthego, USA). The single-stranded oligonucleotide donor employed as template for homology-directed repair (HDR) was designed making use of online tools for silent mutation scanning (<http://watcut.uwaterloo.ca/template.php>) and restriction enzyme analysis ([nc2.neb.com/NEBcutter2/](http://nc2.neb.com/NEBcutter2/)), and ordered from IDT as 4 nmole Ultramer DNA Oligo (IDT, USA). Protospacer adjacent motif was disrupted in the single-stranded donor oligonucleotide (ssODN) in order to avoid repeated nuclease action after eventual correction.

### Mice manipulation for genome editing

Mice were housed in individually ventilated cages (Tecniplast, Milan, Italy), in a controlled environment at 20°C ± 1°C with a relative humidity of 40–60%, in a 14/10 h light-dark cycle. Autoclaved food (Labdiet 5K67, PMI Nutrition, USA) and water were administered *ad libitum*.

Cytoplasmic microinjection was performed in C57BL/6J zygotes using a mix of 20 ng/μl sgRNA, 30 ng/μl Cas9 mRNA and 20 ng/μl ssDNA oligo. The same day, surviving zygotes were transferred to oviducts of B6D2F1 0.5 day postcoitum pseudopregnant females (25 embryos/female in average), following surgery procedures established in the animal facility (Crispo et al., 2013). Previously, recipient females were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg, Pharmaservice, Ripoll Vet, Uruguay) and xylazine (10 mg/kg, Seton 2%; Calier, Uruguay). Tolfenamic acid was administered s.c. (1 mg/kg, Tolfedine, Vetoquinol, Spain) in order to provide analgesic and anti-inflammatory effects (Schlapp et al., 2015). Pregnancy diagnosis was determined by visual inspection by an experienced animal caretaker 2 weeks after embryo transfer, and litter size was recorded when the litters were 21 days old.

### Genotyping of transgenic mice

Offspring genotyping was performed *via* tail-tips. DNA was extracted by means of *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA). The genomic region of interest (i.e. where the mutation was directed) was specifically amplified by standard PCR. The primers employed were:

*Syce1*-727-FOR: 5'-TCAAGGAAGGTGAGGTCAGG-3';

*Syce1*-727-REV: 5'-ATGAAGAGACATACCGGCAG-3'.

PCR products were run by electrophoresis, recovered by the *GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA), and sequenced.

### Fertility tests

Fertility was assessed both for females and males by mating 2-month-old mutant mice homozygous for the change with adult wild type (WT) mice of opposite gender. Heterozygous mutants and WT mice were used as control groups. Assays were performed in triplicate for each gender in breeding pairs or trios (two females and one male).

After a period of at least 3 months without offspring, the analyzed mice were considered infertile.

### Histology

Whole adult testes and ovaries were primary fixed in 2.5% glutaraldehyde, postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated and resin-embedded (Durcupan ACM, Fluka, Sigma-Aldrich, USA) according to conventional procedures (Glauert and Lewis, 1998). Thereafter, 250 nm sections were cut using a *Power Tome XL* ultra-microtome (Boeckeler Instruments, USA), stained with toluidine blue, and examined by bright field microscopy. Photographs were taken by means of an *Olympus FV300* microscope equipped with a *DP70* camera, and *DPController v.1.1.1.65* software (Olympus, Tokyo, Japan).

### Analysis by flow cytometry

Testicular cell suspensions were prepared using a mechanical method previously described by our group (Rodríguez-Casuriaga et al., 2009, 2013). The resulting cell suspensions were stained with Vybrant DyeCycle Green (VDG, Invitrogen Life Technologies, USA) at a final concentration of 10 μM for 1 h at 35°C in the dark with gentle agitation (80 rpm), as reported earlier (Rodríguez-Casuriaga et al., 2014).

Flow cytometry (FCM) analyses were performed by means of a flow cytometer and cell sorter *MoFlo Astrios EQ* (Beckman Coulter, USA), using a 488 nm laser, a 100 μm nozzle (25 psi) and Summit software (Beckman Coulter, IN, USA). Flow cytometer calibration and quality control were carried out using *3.0 μm Ultra Rainbow Fluorescent Particles* (Spherotech, USA). Fluorescence emitted from VDG was detected with a 513/26 bandpass filter. The following parameters were analyzed: forward scatter (FSC-Height with PI Mask), side scatter (SSC-Height), 513/26-Area (VDG fluorescence intensity) and 513/26-Width. Doublets were excluded using dot plots of 513/26 pulse-area versus 513/26 pulse-width. FCM data were analyzed with Kaluza software (Beckman Coulter, IN, USA).

### Antibodies

A primary antibody against SYCE1 amino-terminal region (i.e. capable of detection of WT SYCE1 and its putative truncated form) was developed at GenScript (GenScript USA Inc.). In order to achieve this, peptides ATRPQPLGMEPEGSC and CPEGARGQYGSTQKI from the amino-terminal part of the protein were conjugated to KLH, and employed as immunogens in New Zealand rabbits. The affinity-purified antibody was employed both for fluorescence microscopy (1:200) and in western blots (0.3 μg/ml).

Guinea pig anti-SYCP3 (1:200), guinea pig anti-TEX12 (1:200), rabbit anti-SYCP1 (1:200) and rabbit anti-SYCE3 (1:200) primary antibodies were used as affinity-purified immunoglobulins and described in detail elsewhere (Schücker et al., 2015). Mouse anti-γH2AX (histone) was purchased at Millipore (1:500, 05-636; Millipore, Germany).

The primary antibody anti-β-tubulin—employed in western blots as loading control—was acquired from Abcam (ab6046, 1:8000, Abcam Antibodies, USA), and revealed using an anti-rabbit secondary antibody coupled to horse-radish peroxidase (1:30 000, Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA).

Suitable secondary antibodies coupled to AlexaFluor dyes were acquired from Invitrogen Life Technologies, USA: AlexaFluor488 goat anti-

rabbit (A11034, 1:1000), AlexaFluor633 goat anti-guinea pig (A21105, 1:1000) and AlexaFluor546 goat anti-guinea pig (A11074, 1:1000).

## Immunocytochemistry

Immunolocalization assays were performed on gonadal spread cells obtained through the dry-down technique (Peters et al., 1997) with minor modifications. Briefly, for oocyte spreading, fetal ovaries (E18 embryos) were dissected, incubated in hypotonic buffer (30 mM Tris-HCl pH 8.2, 17 mM sodium citrate, 5 mM EDTA, 50 mM sucrose, 5 mM dithiothreitol) for 30 min, mechanically disaggregated on clean slides containing 100 mM sucrose, fixed in 1%-paraformaldehyde/0.15%-TritonX100 and allowed to dry slowly (overnight in closed humidity chamber, then open). Once completely dry, slides were wrapped in aluminum foil, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. For spermatocyte spreading, the same procedure was applied on mechanically disaggregated adult mice testes.

Slides were afterwards used for incubations with the indicated antibodies for immunofluorescence microscopy. All incubations with primary antibodies were performed overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  in the presence of protease inhibitors (P2714, Sigma-Aldrich, USA). Secondary antibody incubations were done at room temperature for 1 h protected from light.

## Microscopy and imaging

All immunofluorescence microscopy acquisitions were performed employing a Zeiss LSM 800 confocal microscope (Carl Zeiss Microscopy, Germany) equipped with an Airyscan processing module, a 63X/1.4 N.A. Plan Achromat oil objective, AxioCam 506 color digital camera and ZEN Blue 2.3 software (Carl Zeiss Microscopy, Germany). Airyscan image processing was done through the software's automatic deconvolution step. All image analyses were performed by means of Fiji ImageJ software (Schindelin et al., 2012).

## Statistical analyses

Quantitative data from spread nuclei with synapsed chromosomes (zygotene and pachytene stage) from homozygous and heterozygous mutants with WT littermate controls were statistically compared using a chi-square test. Regarding quantitative RT-PCR (qRT-PCR) and fluorescence intensity data, statistical significance and *P*-value were calculated in R bioconductor (<http://cran.r-project.org/>).

## Western blots

Testicular protein lysates corresponding to  $7.5 \times 10^5$  cells in Laemmli sample buffer were loaded per lane. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis was carried out on 12% polyacrylamide gels. Protein gels were transferred to nitrocellulose membranes as instructed (Matsudaira, 1987), and western blots were performed as previously described (Goldman et al., 2015). Membranes were incubated for 2 h at room temperature in Tris-buffered saline/0.1%-Tween20 with primary antibodies: (anti-SYCE1-Nt and anti- $\beta$ -tubulin), and for 1 h in blocking solution with anti-rabbit secondary antibody. Bound antibodies were detected by using the Super Signal West Pico substrate (Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA). All assays were performed more than once, and using biological replicates.

## qRT-PCR assays

Total RNA from testicular cell suspensions was extracted with PureLink RNA Mini Kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific, USA), following manufacturer's recommendations. RNA quantification was done by Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). Retro-transcription and qPCR were performed using Power SYBR Green Cells-to-Ct kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific, USA), starting from 50 ng of RNA, following kit instructions, in a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System 1 (BioRad, USA). For qPCR step, 2  $\mu\text{l}$  cDNA in 20  $\mu\text{l}$  final volume reaction mix was used.

For qRT-PCR on embryonic ovaries, the same kit was directly employed after a lysis reaction with no previous RNA extraction (due to the scarcity of the tissue).

The primers used are listed in Supplementary Table S1. We made three biological replicas, and chose *Ppp1cc* (protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isozyme) as normalizing gene, as it has been previously shown to be a good normalizing gene for testicular RNA (da Cruz et al., 2016). Amplification efficiency of all primers was  $>93\%$ . The  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method and WT mouse RNA as calibrator condition were used (Livak and Schmittgen, 2001).

## Results

### Generation of model mouse line

Our first aim was to generate a model mouse line mimicking the SYCE1 c.721C>T point mutation observed in humans. To achieve this, we chose to use CRISPR/Cas9 technology, and proceeded as described in Materials and methods section. Comparison of SYCE1 coding regions from human and mouse genome revealed high identity, thus facilitating the choice of the editing target (Fig. 1A). SYCE1 c.721C>T is a nonsense mutation that would lead to a truncated human SYCE1 protein of 240 residues, while its WT counterpart has 351 amino acids. In mouse, an equivalent mutation would lead to a truncated protein of 242 amino acids, as compared to the WT 329-residue version.

Design of molecules to be used in the directed mutagenesis (sgRNA and ssODN) was optimized to favor the HDR pathway (Fig. 1B) (Yang et al., 2013). Specimens resulting from microinjected zygotes (F0) were genotyped in search of the desired change, and then mated with WT mice to obtain the F1 generation. Afterwards, heterozygous specimens from F1 were intermated to generate F2 offspring: as expected, the latter included WT specimens as well as others heterozygous and homozygous for the desired point mutation, which in mouse corresponds to *Syce1* c.727C>T (Fig. 1C).

### *Syce1* c.727C>T homozygous mutation causes infertility both in female and male mice

Fertility was assessed both for females and males by mating mutant mice with WT specimens of opposite gender. Data from three experimental groups were compared in these studies: WT, heterozygous and homozygous mice. No differences were observed between WT and heterozygous mice, which easily became pregnant, and had on average seven pups with an equal ratio of male and female offspring.



After a period of 3 months, only mice homozygous for the *Syce1* c.727C>T mutation failed to have offspring. This result was consistently reproduced in triplicates for each gender.

### *Syce1* c.727C>T homozygous mutation affects gonadal development

When gonadal size and aspect were assessed, no evident differences were found between adult WT and heterozygous mutant mice, neither for females nor for males (Supplementary Fig. S1A). However, adult homozygous mutants showed striking differences in gonadal size and aspect as compared to their WT littermates, and this proved to be true both for female and male adult mice (Fig. 1D).

Concerning microscopic analysis of ovaries, growing oocytes and follicle development was evident in adult WT and heterozygous female animals (Fig. 1E and Supplementary Fig. S1B). Morphological comparison between WT and heterozygous ovaries was performed by two experienced researchers on blind (unidentified) sections from three different specimens per condition (five sections from each specimen), and they were unable to distinguish one condition from the other. On the contrary, homozygous *Syce1* c.727C>T females presented minute ovaries with deeply altered histology, and lack of recognizable follicles or oocytes (Fig. 1E and Supplementary Fig. S2).

Regarding testicular development, while both WT and heterozygous adult males showed normal seminiferous tubules with complete spermatogenesis (Fig. 1E and Supplementary Fig. S1C), the microscopic analysis of gonadal content from adult homozygous male mutant mice revealed a severely affected spermatogenesis process, with complete absence of postmeiotic stages (Fig. 1E). The seminiferous tubules of these mutants were also depleted from mid and advanced prophase I stages (i.e. pachytene and diplotene), indicating an arrest in early meiotic prophase I stages. Moreover, the seminiferous tubules were much smaller than those of the WT and heterozygous mutants, and exhibited an immature aspect (Fig. 1E).

In order to have stronger quantitative comparative analyses, testicular cell suspensions from adult mice were analyzed by FCM, mainly based on DNA content (C, 2C and 4C populations). Figure 1F shows representative FCM results. While no significant differences were found between WT and heterozygous mutants, this study confirmed for the homozygous mutant males the complete absence of postmeiotic stages (i.e. spermatids with DNA content = C). Regarding the 4C population (mainly composed of primary spermatocytes), the FCM analyses hereby presented were obtained using the DNA-specific fluorochrome VDG that—as we had previously reported—allows the discrimination of two populations of spermatocytes: the early spermatocyte population (leptotene and zygotene stages, L/Z), and the mid/late spermatocyte one (pachytene and diplotene stages, P/D) (Rodríguez-Casuriaga et al., 2014). Although L/Z and P/D spermatocyte populations are usually visualized in the histograms of immature mice as a 4C bimodal peak (Supplementary Fig. S3A), the latter could not be observed in the FCM profiles from homozygous mutants (Fig. 1F) that resembled those expected for 13–14 days postpartum (dpp) WT juvenile mice, still lacking pachytene spermatocytes (Supplementary Fig. S3B) (Geisinger and Rodríguez-Casuriaga, 2017).

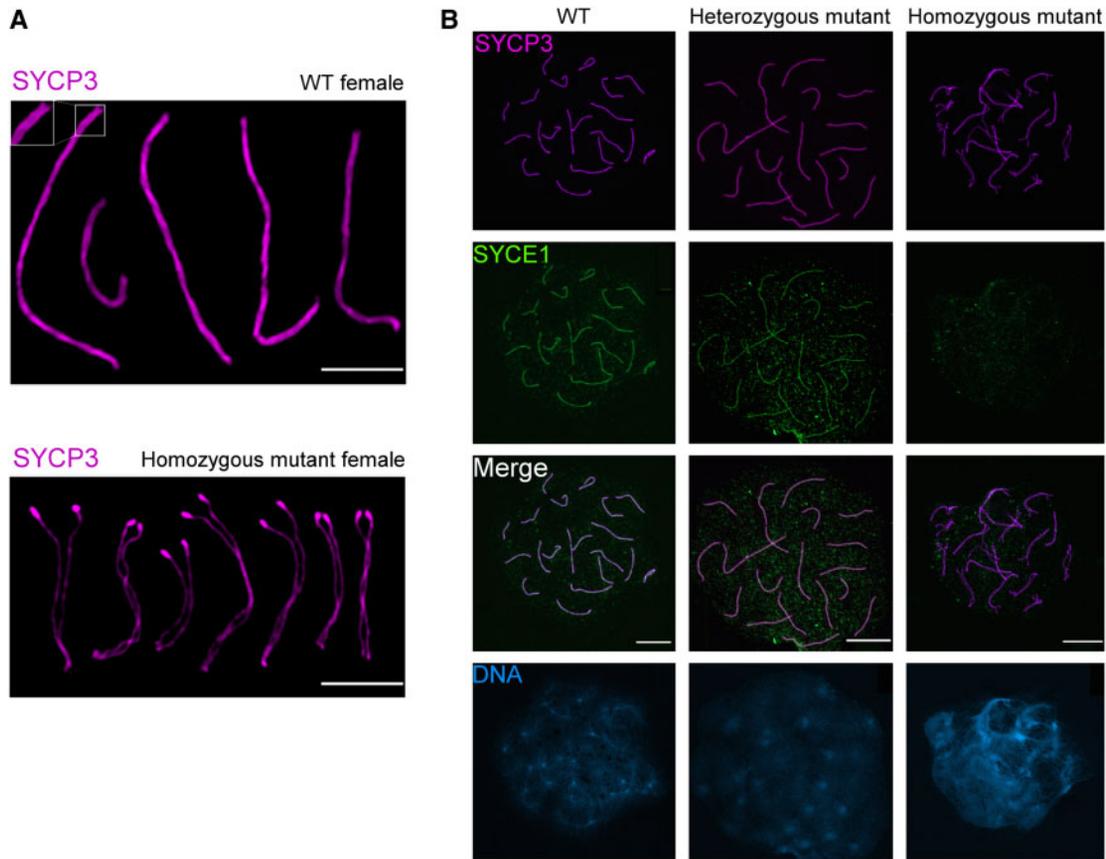
### Evaluation of chromosome synapsis and SC assembly

The dramatic effect of the point mutation on gonadal development prompted us to study its consequences on SC structure and homologous chromosome synapsis. Immunocytochemical localizations were performed on spread cells from both embryonic ovaries and adult testes, and analyzed by confocal laser scanning microscopy.

A first set of studies was centered on SYCP3, in order to evaluate the differences between WT and mutants concerning SC LE spatial arrangement and chromosome synapsis. As the pachytene stage (completely synapsed homologs) is reached by Day 13–14 postpartum in male mice and by Day 17.5–18 postcoitum in female mice embryos, the ages of the specimens to be analyzed were chosen accordingly. Frequency data of spread meiotic nuclei with synapsed chromosomes from *Syce1* c.727C>T mutants and WT littermate controls were statistically compared using a chi-square test ( $\chi^2$ ). Once again, no evident differences were found between heterozygous mutants and WT littermates ( $\chi^2$  [1,  $N=84$ ] = 0.26,  $P=0.61$ ), with both presenting normal-looking spread chromosomes that had reached the pachytene stage (Fig. 2A). However, homozygous mutants consistently showed, at most, closely juxtaposed chromosomes that resembled earlier meiotic prophase stages, and we have considered this homolog arrangement asynapsis (Fig. 2A). These findings proved to be true for both genders (herein shown for females), and indicate that the homozygous presence of the point mutation severely affects homologous chromosome synapsis ( $\chi^2$  [1,  $N=84$ ] = 134.6,  $P<0.00001$ ), and would most probably account for the observed gametogenesis failure. SYCP3 fluorescence quantification on these preparations rendered no significant differences between WT and mutant mice ( $P>0.1$ ).

As mentioned above, *Syce1* c.727C>T is a nonsense mutation that would lead to a truncated protein of 242 amino acids, as compared to the WT 329-residue version. In order to evaluate the eventual presence of the putative truncated SYCE1 protein in the SC of mutants, we investigated protein immunolocalization employing an antibody specially developed against peptides from SYCE1 amino-terminal (N-t) region (see Materials and Methods section). We clearly detected SYCE1 in spread meiotic nuclei from WT and heterozygous mutant mice, but not in those of homozygous mutants. This result was observed for both genders (herein shown for females; Fig. 2B), and was consistently obtained for all biological and technical replicates. Concerning SYCE1 fluorescence quantification, no significant differences were found between WT and heterozygous mutant mice ( $P>0.1$ ).

Afterwards, we evaluated the presence of other known protein components of the SC CR (i.e. TFs and CE). Some have been reported to be loaded earlier than SYCE1 onto the SC (i.e. TF SYCP1 and CE SYCE3), while others would be loaded later (e.g. CE TEX12) (Fraune et al., 2012). Representative results are shown in Fig. 3. Again, no differences were found between WT and heterozygous mutants for any of the analyzed components either in female (Fig. 3A–C) or male meiotic nuclei (e.g. Fig. 3D). Regarding homozygous mutants, protein components SYCP1 and SYCE3 were detected on spread meiotic nuclei containing SCs in the assembling process (Fig. 3A and B), while TEX12 was not detected at all in the assembling structure (Fig. 3C and D). Concerning quantification, again no significant differences were found between WT and heterozygous mutant mice. On the contrary, both



**Figure 2. Evaluation of chromosome synapsis and SYCE1 loading to synaptonemal complex in WT and mutant mice. (A)** Immunolabeling of LE component SYCP3 on spread meiotic chromosomes from WT (above) and homozygous mutant mice (below). Spread chromosomes from representative mice are shown stitched together. Fluorescence acquisition was performed by means of an Airyscan module that enabled the resolution of lateral elements (LEs), even in completely assembled synaptonemal complexes (SCs) (see inset above). Closely aligned but unsynapsed LEs are observed for homozygous mice (below). **(B)** Immunolocalization of SYCE1 protein in 18 dpc WT and mutant female mouse embryos. SYCE1 is shown in green, and SYCP3 in magenta. Merged channels and DNA staining with DAPI are also shown below. Bars correspond to 5 and 10  $\mu\text{m}$  (A and B, respectively).

SYCP1 and SYCE3 fluorescence intensities were significantly lower for homozygous mutants as compared to WT littermates ( $P < 0.0005$ ).

For spermatocytes,  $\gamma\text{H2AX}$  was also immunolabeled along with SC protein components. This histone variant renders a very typical staining on male meiotic chromosomes: dispersed chromosome staining in early stages, then restricted to the XY body in pachytene stage. No difference in this regard was detected between WT and heterozygous male mutants (Fig. 3D). However, as expected for a pre-pachytene meiotic arrest, no restricted staining for the sexual chromosome pair was found in homozygous male mutants, which presented a diffuse  $\gamma\text{H2AX}$  staining pattern, characteristic of earlier meiotic stages (Fig. 3D).

### The putative truncated SYCE1 protein is not detected in mutant mice testes

Although no SYCE1 protein was detected on assembling SCs of homozygous mutant mice, still, the putative SYCE1 truncated protein could actually be present in meiocytes, but not incorporated into the SC. In order to shed some light on the molecular mechanism leading to

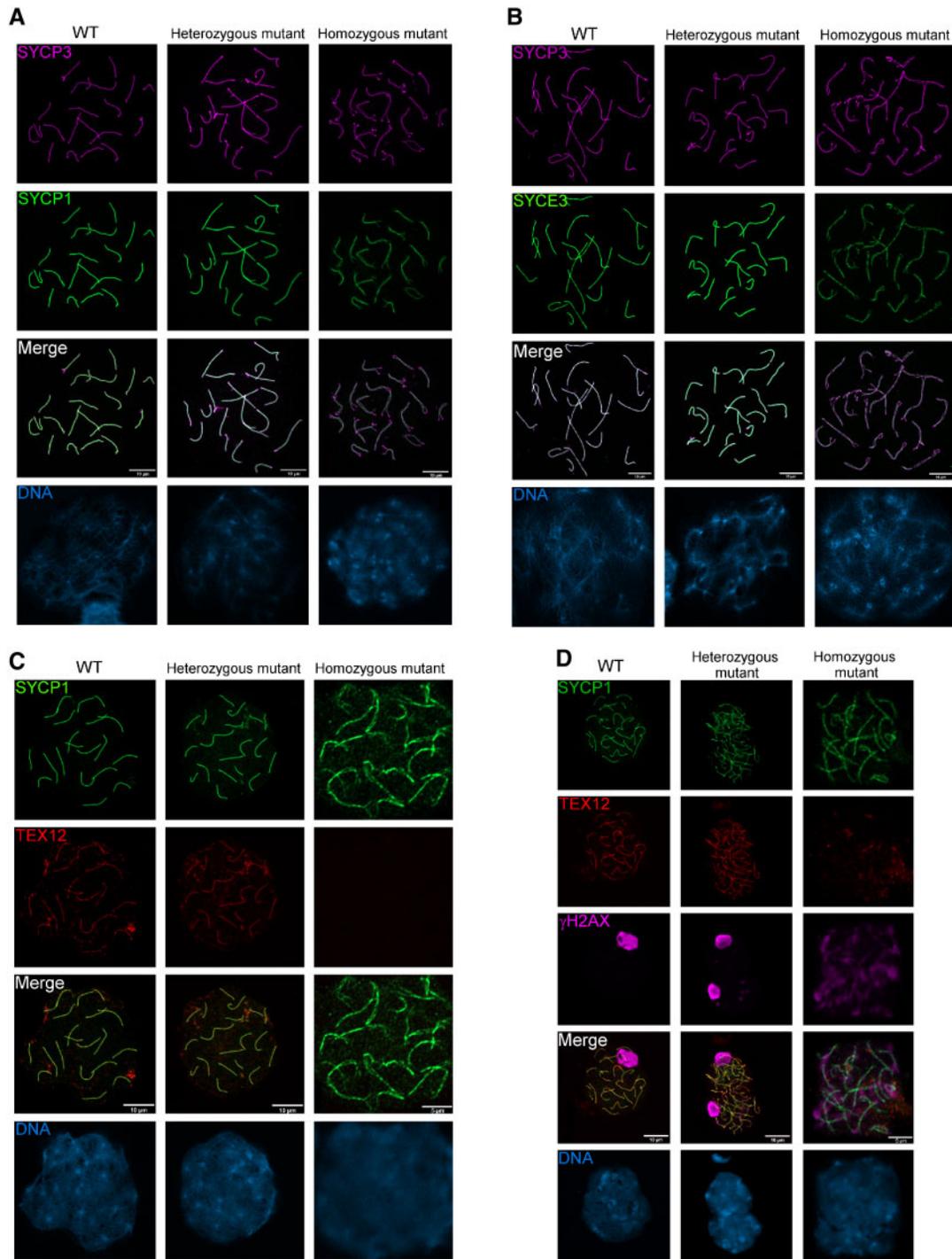
infertility, we assessed the presence of the putative truncated protein in mutant mice through western blot assays on testicular material. These protein studies cannot be performed in females due to material requirements unable to be fulfilled with embryonic ovaries ( $<0.0001$  g).

A band with an apparent molecular mass of 38 KDa was detected both for WT mice and heterozygous mutants, in accordance with the predicted molecular weight for the WT 329-residue version of murine SYCE1 protein (Fig. 4A). No truncated SYCE1 protein (theoretical expected size: 28 KDa) was detected for heterozygous mutants.

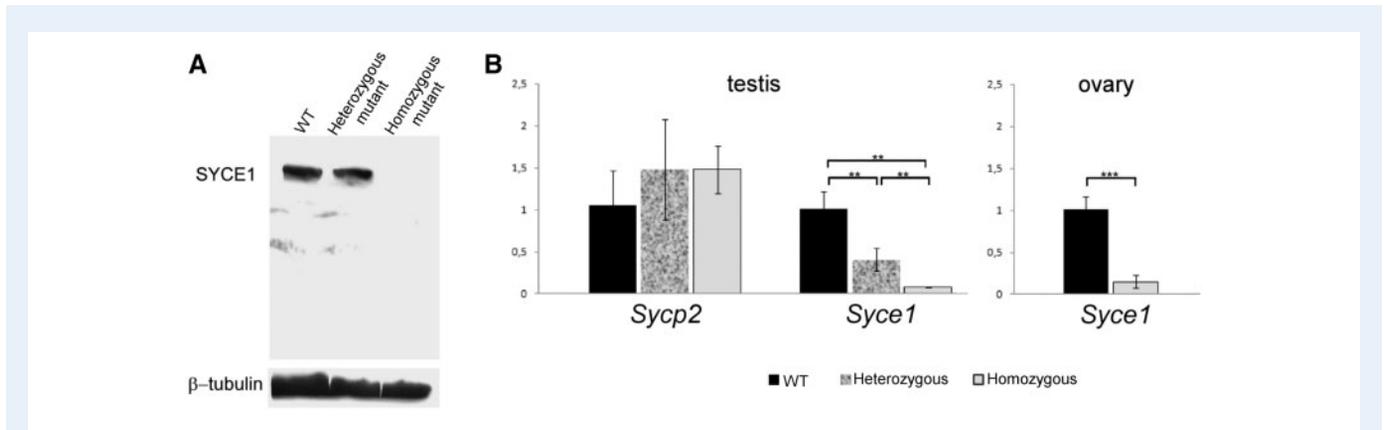
Concerning homozygous mutants, no protein reactive to anti-SYCE1 antibody was detected at all (Fig. 4A). Protein gels were deliberately overloaded to minimize the effects of detection sensitivity limits, but in all assays no band of 28 KDa was observed.

### Syce1 transcript is significantly decreased in humanized mice

The results from the western blot assays prompted us to analyze transcript levels. As shown in Fig. 4B, *Syce1* transcript quantification



**Figure 3. Immunolocalization of other CR SC components in WT and mutant mice.** (A) Immunolabeling of TF SYCP1 in female 18 dpc mouse embryos. SYCP3 is shown in magenta and SYCP1 in green. (B) Immunolocalization of central element (CE) SYCE3 in female 18 dpc mouse embryos. SYCE3 is shown in green and SYCP3 in magenta. (C) Immunolabeling of CE TEX12 in female 18 dpc mouse embryos. SYCP1 is shown in green and TEX12 in red. (D) Immunolocalization of TEX12, SYCP1 and  $\gamma$ H2AX in male adult WT and mutant mice. SYCP1 is shown in green, TEX12 in red and  $\gamma$ H2AX (histone) in magenta. Merged channels and DNA staining with DAPI are shown below in each case.



**Figure 4. Analysis of SYCE1 protein by western blot, and transcript quantitation by quantitative RT-PCR. (A)** Western blot analysis of SYCE1 protein and its putative truncated mutant variant in adult testes lysates from WT and mutant mice. The blotted bands were immunodetected with a specific rabbit antibody against mouse SYCE1 Nt-region.  $\beta$ -tubulin was employed as loading control. **(B)** Quantitative RT-PCR results obtained for adult testes and embryonic ovaries from WT and mutant mice ( $n = 3$  for each category). SD (error bars), and statistical level of significance calculated by one-way ANOVA (horizontal bars) are indicated in each case.  $**P < 0.005$ ;  $***P < 0.0001$ .

detected big differences between WT and homozygous mutants that exhibited minimum mRNA levels, both for embryonic ovaries ( $P < 0.0001$ ) and for adult testes ( $P < 0.005$ ).

Less pronounced but still significant differences were obtained between WT and heterozygous mutant males that showed intermediate transcript levels ( $P < 0.01$ ; Fig. 4B). On the contrary and as expected, quantification of the *Sycp2* transcript (coding for SC LE SYCP2) revealed no significant differences between the three conditions.

## Discussion

The present work relates to some POI cases that are presumably related to mutations in SC-coding genes, but still classified as idiopathic infertility. We have worked with the nonsense mutation SYCE1 c.721C>T, addressing the question of its responsibility for the infertility observed in female patients homozygous for this mutation. We have also intended to shed some light on the underlying mechanisms involved. To achieve this, we have applied directed mutagenesis in the mouse for genome editing, and successfully generated a humanized mouse line (i.e. the edited murine genome contains a mutation equivalent to the one found in humans). In this regard, the high percentage of identity between human and mouse SYCE1 protein-coding genes allowed us to easily find an SYCE1 c.721C>T murine equivalent mutation (*Syce1* c.727C>T). Generation of this animal model has enabled us to study the etiology and pathogenesis of POI.

Concerning etiology, it could be established that the homozygous presence of the *Syce1* c.727C>T mutation causes infertility in both female and male mice. This strongly suggests that the sole presence of the equivalent human mutation (SYCE1 c.721C>T) in both alleles should be enough to produce the infertile phenotype observed in women (de Vries et al., 2014). On the other hand, mice heterozygous for the mutation were as fertile as WT mice. Thus, infertility in these cases would have a genetic origin and a recessive mode of inheritance. It is worth noting that for humans, de Vries and collaborators (i.e. the

authors that reported the mutation) found no clinical symptoms for heterozygous individuals of both genders examined in their study. However, the phenotype for homozygous males for the mutated SYCE1 gene could not be known at that time because all the males examined in that study were found to be heterozygous for the mutation (de Vries et al., 2014). Thus, although the identification of this nonsense mutation was initially connected to cases of female infertility, we can now anticipate that the homozygous presence of this mutation would most probably cause infertility in men as well.

The fertility results reported here, demonstrate an absence of sexual dimorphism for this CE-related mutation. This would be in accordance with previous observations for mice with loss of function of CR component-coding genes, which are equally infertile in both genders (De Vries et al., 2005; Bolcun-Filas et al., 2007; Hamer et al., 2008; Bolcun-Filas et al., 2009; Schramm et al., 2011; Gómez-H et al., 2016), as opposed to LE-component mutants, which showed sexual dimorphism (Yuan et al., 2002; Yang et al., 2006).

Regarding gonadal development, the fact that we found no differences between heterozygous mutants and unaffected WT mice of both genders, is in accordance with the fertile phenotype observed in heterozygous humans, and also with our fertility tests results. On the other hand, the striking differences found in homozygous mutant gonads would explain their infertile phenotype. In particular, female mutant mice with an absence of recognizable oocytes and follicles (indicative of POI) resemble the clinical description of the human sisters who were homozygous for the mutation (de Vries et al., 2014), ratifying the validity of the experimental model.

In males, the seminiferous epithelium of homozygous mutants showed not only absence of postmeiotic cells, but also of midmeiotic prophase stages, thus indicating an early meiotic arrest. We also analyzed testicular cell suspensions by FCM as this methodology represents a widely accepted means to analyze testicular cellular content, with very high quantitative analytical power and statistical weight. These analyses corroborated a severely affected spermatogenic process in homozygous mutants, with testes completely depleted from

postmeiotic haploid cells with C DNA content (i.e. round and elongating spermatids, and spermatozoa). Moreover, concerning the 4C population (mainly composed of primary spermatocytes), FCM profiles obtained for homozygous mutants resembled those of ~13 dpp mice that have not reached the pachytene stage yet (Geisinger and Rodríguez-Casuriaga, 2017). This result is in agreement with the early meiotic arrest observed by microscopic examination.

Analysis of spread chromosomes immunolabeled against SC protein components, coupled to the use of an Airyscan super-resolution module, enabled assessment of chromosome synapsis, revealing that the homozygous presence of *Syce1* c.727C>T severely affects homologous synapsis. This provides a probable explanation for the lack of oocytes, as oocytes extensively defective in homolog synapsis would accumulate spontaneous DSBs and trigger the DNA damage checkpoint, leading to their elimination (Rinaldi et al., 2017).

Previous studies based on co-immunoprecipitation and yeast two-hybrid assays have identified SYCE1 interactions with SYCE3 and SIX6OS1 (Schramm et al., 2011; Lu et al., 2014; Gómez-H et al., 2016). Besides, SYCE1 recruitment to the SC has been proposed to be mediated by SYCE3 (Hernández-Hernández et al., 2016). While an SYCE3 immunolocalization signal was observed on SCs, neither SYCE protein nor SYCE1-downstream-loading SC components (e.g. TEX12) could be detected on meiotic chromosome axes of homozygous mutant mice. As the mutation under study is nonsense, two alternative hypotheses concerning the pathogenesis of these infertility cases arose: the putative SYCE1 truncated protein, which would lack 87 residues from the carboxyl terminus (Ct), would not be recruited and loaded to the SC as its interaction with SYCE3 would be impeded, thus affecting normal SC assembly after SYCE3 loading step; or SYCE1 loading disturbance could be due to absence of the putative truncated protein.

In order to shed some light on this matter, SYCE1 protein was assessed by western blot assays. The obtained results show the absence of detectable levels of the putative truncated protein both for the homozygous and for the heterozygous mutant mice, even in overloaded protein gels. This strongly suggests that the impeded synapsis phenotype observed in homozygous mutant mice would result from the absence (or at least presence of undetectable levels) of truncated SYCE1, thus supporting our second hypothesis above. Of note, the absence of an interfering shorter version of SYCE1 could explain the unaffected phenotype of heterozygous mutants. This would be quite different from the case of some *SYCP3* mutations where a dominant-negative effect has been reported in heterozygous patients, in which the truncated *SYCP3* interfered with polymerization of the normal protein (Miyamoto et al., 2003; Bolor et al., 2009). The lack of a possibly interfering truncated protein also has important implications concerning the development of eventual therapeutic procedures in homozygous mutant individuals, as it would guarantee the occurrence of no relevant interference with an eventually introduced exogenous normal protein, thus facilitating the intervention.

A possible mechanism involved in the lack of detectable mutant protein for this nonsense mutation could be nonsense-mediated mRNA decay (NMD). This regulatory pathway functions to degrade aberrant transcripts containing premature termination codons (PTCs). Since mutations that generate PTCs cause approximately one-third of all known human genetic diseases (Miller and Pearce, 2014), NMD has been proposed to have a potentially important role in human disease. The *SYCE1* c.721C>T mutation could be one of these cases. In order

to have a primary evaluation of this possibility, we have performed *Syce1* transcript quantitation in humanized mice compared to WT littermates. The results were consistent and pointed to transcript degradation of aberrant transcripts, with very low levels of transcript in homozygous mutant gonads of both genders. In addition, heterozygous mutant males showed intermediate *Syce1* levels, in accordance with NMD pathway involvement. Thus, the homozygous presence of *Syce1* c.727C>T mutation would lead—through a different mechanism—to a similar phenotype to that reported for *Syce1* KO mice, in which complete absence of SYCE1 protein causes infertility (Bolcun-Filas et al., 2009).

The findings reported here represent a proof of principle, since there are no previous reports on the employment of CRISPR/Cas technology to direct a specific change to an SC component, and generate a humanized mouse model line for its exhaustive study. Furthermore, the generated mouse model line can be further employed in other studies, including those aiming to develop eventual therapeutic procedures.

## Supplementary data

Supplementary data are available at *Molecular Human Reproduction* online.

## Acknowledgments

The authors wish to thank the staff of Transgenic and Experimental Animal Unit core facility from Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay, for technical support in the generation of the GM model.

## Authors' roles

D.H.L.: Mice genotyping, preparations for optical microscopy, spermatocyte spreading, protein immunolocalization experiments, western blot experiments, qRT-PCR from ovaries, statistical analysis, interpretation of results and manuscript correction. A.G.: Western blot experiments, data analysis, interpretation of results, critical discussion, manuscript correction and participation in the preparation of the revised version. M.F.T.: qRT-PCR experiments from testes and ovaries, data analysis, interpretation of results, critical discussion and manuscript correction. F.F.S.: Flow cytometric analysis, data analysis, interpretation of results, critical discussion and manuscript correction. M.B.: Embryonic ovaries dissection and spreading and manuscript correction. G.A.F.: Flow cytometric experimental design, data analysis, interpretation of results, critical discussion and manuscript correction. R.B.: Study conception, interpretation of results, critical discussion and manuscript correction. R.R.C.: Study conception and design, genome editing molecular design, study supervision, interpretation of results, critical discussion and manuscript preparation.

## Funding

Funding for this research was provided by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Uruguay; <https://www.anii.org.uy/>),

grant number FCE-3-2016-1-126285 awarded to R.R.C., and fellowship POS\_NAC\_2018\_1\_151425 to D.H.L. Complementary financial support through program aliquots to R.R.C. and D.H.L. was provided by Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA, Biología), Universidad de la República (UdelaR). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

## Conflict of interest

All authors have no conflict of interest to declare.

## References

- Alsheimer M, Baier A, Schramm S, Schutz W, Benavente R. Synaptonemal complex protein SYCP3 exists in two isoforms showing different conservation in mammalian evolution. *Cytogenet Genome Res* 2010;**128**:162–168.
- Bestetti I, Castronovo C, Sironi A, Caslini C, Sala C, Rossetti R, Crippa M, Ferrari I, Pistocchi A, Toniolo D et al. High-resolution array-CGH analysis on 46,XX patients affected by early onset primary ovarian insufficiency discloses new genes involved in ovarian function. *Hum Reprod* 2019;**34**:1–10.
- Bolcun-Filas E, Costa Y, Speed R, Taggart M, Benavente R, De Rooij DG, Cooke HJ. SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. *J Cell Biol* 2007;**176**:741–747.
- Bolcun-Filas E, Speed R, Taggart M, Grey C, de Massy B, Benavente R, Cooke HJ. Mutation of the mouse *Syce1* gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair. *PLoS Genet* 2009;**5**:e1000393.
- Bolor H, Mori T, Nishiyama S, Ito Y, Hosoba E, Inagaki H, Kogo H, Ohye T, Tsutsumi M, Takema K. Mutations of the *SYCP3* gene in women with recurrent pregnancy loss. *Am J Hum Genet* 2009;**84**:14–20.
- Chapman C, Cree L, Shelling AN. The genetics of premature ovarian failure: current perspectives. *Int J Womens Health* 2015;**7**:799–810.
- Costa Y, Speed R, Ollinger R, Alsheimer M, Semple CA, Gautier P, Maratou K, Novak I, Hoog C, Benavente R et al. Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein I (SYCP1) are at the centre of meiosis. *J Cell Sci* 2005;**118**:2755–2762.
- Coulam CB, Stringfellow S, Hoefnagel D. Evidence for a genetic factor in the etiology of premature ovarian failure. *Fertil Steril* 1983;**40**:693–695.
- Crispo M, Schlapp G, Cárdenas-Rodríguez M, González-Maciél D, Rumbo M. Optimization of transgenesis conditions for the generation of CXCL2-luciferase reporter mice line. *Electron J Biotechnol* 2013;**16**:14.
- da Cruz I, Rodríguez-Casuriaga R, Santiñaque FF, Farías J, Curti G, Capoano CA, Folle GA, Benavente R, Sotelo-Silveira JR, Geisinger A. Transcriptome analysis of highly purified mouse spermatogenic cell populations: gene expression signatures switch from meiotic-to postmeiotic-related processes at pachytene stage. *BMC Genomics* 2016;**17**:294–312.
- De Vries L, Behar DM, Smirin-Yosef, P, Lagovsky, I, Tzur, S, Basel-Vanagaite, L. Exome sequencing reveals *SYCE1* mutation associated with autosomal recessive primary ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;**99**:2129–2132.
- De Vries FA, de Boer E, van den Bosch M, Baarends WM, Ooms M, Yuan L, Liu JG, van Zeeland AA, Heyting C, Pastink A. Mouse *Sycp1* functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev* 2005;**19**:1376–1389.
- Di Pasquale E, Rossetti R, Marozzi A, Bodega B, Borgato S, Cavallo L, Einaudi S, Radetti G, Russo G, Sacco M et al. Identification of new variants of human *BMP15* gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;**91**:1976–1979.
- Doherty E, Pakarinen P, Tiitinen A, Kiilavuori A, Huhtaniemi I, Forrest S, Aittomäki K. A novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;**87**:1151–1155.
- Ennis S, Ward D, Murray A. Nonlinear association between CGG repeat number and age of menopause in *FMR1* premutation carriers. *Eur J Hum Genet* 2006;**14**:253–255.
- Fraune J, Schramm S, Alsheimer M, Benavente R. The mammalian synaptonemal complex: protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Exp Cell Res* 2012;**318**:1340–1346.
- Fonseca J, Patino LC, Suárez Y, Rodríguez J, Mateus H, Jiménez K, Ortega-Recalde O, Díaz-Yamal I, Laissue P. Next generation sequencing in women affected by nonsyndromic premature ovarian failure displays new potential causative genes and mutations. *Fertil Steril* 2015;**104**:154–162.e2.
- Geisinger A, Benavente R. Mutations in genes coding for synaptonemal complex proteins and their impact on human fertility. *Cytogenet Genome Res* 2016;**150**:77–85.
- Geisinger A, Rodríguez-Casuriaga R. Flow cytometry for the isolation and characterization of rodent meiocytes. *Methods Mol Biol* 2017;**1471**:217–230.
- Glauert AM, Lewis PR. Biological specimen preparation for transmission electron microscopy. In: Glauert AM (ed). *Practical Methods in Electron Microscopy*, Vol. 17. London: Portland Press, 1998.
- Goldman A, Rodríguez-Casuriaga R, González-López E, Capoano CA, Santiñaque FF, Geisinger A. MTCH2 is differentially expressed in rat testis and mainly related to apoptosis of spermatocytes. *Cell Tissue Res* 2015;**361**:869–883.
- Gómez-H L, Felipe-Medina N, Sánchez-Martín M, Davies OR, Ramos I, García-Tuñón I, de Rooij DG, Dereli I, Tóth A, Barbero JL et al. C14ORF39/SIX6OS1 is a constituent of the synaptonemal complex and is essential for mouse fertility. *Nat Commun* 2016;**7**:13298.
- Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure. *Hum Reprod Update* 2005;**11**:391–410.
- Hamer G, Gell K, Kouznetsova A, Novak I, Benavente R, Hoog C. Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci* 2006;**119**:4025–4032.
- Hamer G, Wang H, Bolcun-Filas E, Cooke H. J, Benavente R, Hoog C. Progression of meiotic recombination requires structural maturation of the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci* 2008;**121**:2445–2451.
- Hernández-Hernández A, Masich S, Fukuda T, Kouznetsova A, Sandin S, Daneholt B, Höög C. The central element of the

- synaptonemal complex in mice is organized as a bilayered junction structure. *J Cell Sci* 2016;**129**:2239–2249.
- Huhtaniemi I, Hovatta O, La Marca A, Livera G, Monniaux D, Persani L, Heddar A, Jarzabek K, Laisk-Podar T, Salumets A et al. Advances in the molecular pathophysiology, genetics, and treatment of primary ovarian insufficiency. *Trends Endocrinol Metab* 2018;**29**:400–419.
- Laissue P. Aetiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure: from genetic linkage analysis to next generation sequencing. *Mol Cell Endocrinol* 2015;**411**:243–257.
- Laissue P, Christin-Maitre S, Touraine P, Kuttann F, Ritvos O, Aittomaki K, Bourcigaux N, Jacquesson L, Bouchard P, Frydman R et al. Mutations and sequence variants in *GDF9* and *BMP15* in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol* 2006;**154**:739–744.
- Lammers JH, Offenberg HH, Van Aalderen M, Vink AC, Dietrich AJ, Heyting C. The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol* 1994;**14**:1137–1146.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method. *Methods* 2001;**25**:402–408.
- Lu J, Gu Y, Feng J, Zhou W, Yang X, Shen Y. Structural insight into the central element assembly of the synaptonemal complex. *Sci Rep* 2014;**4**:7059.
- Maor-Sagie E, Cinnamon Y, Yaacov B, Shaag A, Goldsmid H, Zenvirt S, Laufer N, Richler C, Frumkin A. Deleterious mutation in *SYCE1* is associated with non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2015;**32**:887–891.
- Matsudaira P. Sequence from picomole quantities of proteins electro-blotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem* 1987;**262**:10035–10038.
- McGuire MM, Bowden W, Engel NJ, Ahn HW, Kovanci E, Rajkovic A. Genomic analysis using high-resolution single-nucleotide polymorphism arrays reveals novel microdeletions associated with premature ovarian failure. *Fertil Steril* 2011;**95**:1595–1600.
- Meuwissen RL, Offenberg HH, Dietrich AJ, Riesewijk A, Van Iersel M, Heyting C. A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J* 1992;**11**:5091–5100.
- Miller JN, Pearce DA. Nonsense-mediated decay in genetic disease: friend or foe? *Mutat Res Rev Mutat Res* 2014;**762**:52–64.
- Miyamoto T, Hasuike S, Yogeve L, Maduro MR, Ishikawa M, Westphal H, Lamb DJ. Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in *SYCP3*. *Lancet* 2003;**362**:1714–1749.
- National Research Council (NRC). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 7th edn. Washington, DC: National Academies Press, 1996.
- Offenberg HH, Schalk JA, Meuwissen RL, Van Aalderen M, Kester HA, Dietrich AJ, Heyting C. SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Res* 1998;**26**:2572–2579.
- Pagnamenta T, Taanman W, Wilson C, Anderson N, Marotta R, Duncan A, Bitner-Glindzic M, Taylor R, Laskowski A, Thorburn D. Dominant inheritance of premature ovarian failure associated with mutant mitochondrial DNA polymerase gamma. *Hum Reprod* 2006;**21**:2467–2473.
- Pashaei M, Rahimi Bidgoli MM, Zare-Abdollahi D, Najmabadi H, Haji-Seyed-Javadi R, Fatehi F, Alavi A. The second mutation of *SYCE1* gene associated with autosomal recessive nonobstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2020;**37**:451–458.
- Peters AH, Plug AW, van Vugt MJ, de Boer P. A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome Res* 1997;**5**:66–68.
- Qin Y, Choi Y, Zhao H, Simpson JL, Chen ZJ, Rajkovic A. *NOBOX* homeobox mutation causes premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* 2007;**81**:576–581.
- Rinaldi VD, Bolcun-Filas E, Kogo H, Kurahashi H, Schimenti JC. The DNA damage checkpoint eliminates mouse oocytes with chromosome synapsis failure. *Mol Cell* 2017;**67**:1026–1036.
- Riva P, Magnani I, Fuhrmann Conti AM, Gelli D, Sala C, Toniolo D, Larizza L. FISH characterization of the Xq21 breakpoint in a translocation carrier with premature ovarian failure. *Clin Genet* 1996;**50**:267–269.
- Rodríguez-Casuriaga R, Folle GA, Santiñaque F, López-Carro B, Geisinger A. Simple and efficient technique for the preparation of testicular cell suspensions. *J Vis Exp* 2013;**78**:e50102.
- Rodríguez-Casuriaga R, Geisinger A, López-Carro B, Porro V, Wettstein R, Folle GA. Ultra-fast and optimized method for the preparation of rodent testicular cells for flow cytometric analysis. *Biol Proced Online* 2009;**11**:184–195.
- Rodríguez-Casuriaga R, Santiñaque F, Folle GA, López-Carro B, Geisinger A. Rapid preparation of rodent testicular cell suspensions and spermatogenic stages purification by flow cytometry using a novel blue-laser-excitable vital dye. *MethodsX* 2014;**1**:239–243.
- Schillit SLP, Menon S, Friedrich C, Kammin T, Wilch E, Hanscom C, Jiang S, Kliesch S, Talkowski ME, Tüttelmann F et al. *SYCP2* translocation-mediated dysregulation and frameshift variants cause human male infertility. *Am J Hum Genet* 2020;**106**:41–57.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012;**9**:676–682.
- Schlapp G, Goyeneche L, Fernández G, Menchaca A, Crispo M. Administration of the nonsteroidal anti-inflammatory drug tolfenamic acid at embryo transfer improves maintenance of pregnancy and embryo survival in recipient mice. *J Assisted Reprod Genet* 2015;**32**:271–275.
- Schramm S, Fraune J, Naumann R, Hernández-Hernández A, Hoog C, Cooke HJ, Alsheimer M, Benavente R. A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination, and fertility. *PLoS Genet* 2011;**7**:e1002088.
- Schücker K, Holm T, Franke C, Sauer M, Benavente R. Elucidation of synaptonemal complex organization by super-resolution imaging with isotropic resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;**112**:2029–2033.
- Tran TN, Martínez J, Schimenti JC. A predicted deleterious allele of the essential meiosis gene *MND1*, present in ~3% of East Asians, does not disrupt reproduction in mice. *Mol Hum Reprod* 2019;**25**:668–673.

- Tran TN, Schimenti JC. A putative human infertility allele of the meiotic recombinase DMC1 does not affect fertility in mice. *Hum Mol Genet* 2018;**27**:3911–3918.
- Tran TN, Schimenti JC. A segregating human allele of *SPO11* modeled in mice disrupts timing and amounts of meiotic recombination, causing oligospermia and a decreased ovarian reserve. *Biol Reprod* 2019;**101**:347–359.
- Van Kasteren YM, Schoemaker J. Premature ovarian failure: a systematic review on therapeutic interventions to restore ovarian function and achieve pregnancy. *Hum Reprod Update* 1999;**5**:483–492.
- Watkins WJ, Umbers AJ, Woad KJ, Harris SE, Winship IM, Gersak K, Shelling AN. Mutational screening of *FOXO3A* and *FOXO1A* in women with premature ovarian failure. *Fertil Steril* 2006;**86**:1518–1521.
- Winkel K, Alsheimer M, Ollinger R, Benavente R. Protein SYCP2 provides a link between transverse filaments and lateral elements of mammalian synaptonemal complexes. *Chromosoma* 2009;**118**:259–267.
- Yang F, De La Fuente R, Leu NA, Baumann C, McLaughlin KJ, Wang PJ. Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis. *J Cell Biol* 2006;**173**:497–507.
- Yang L, Guell M, Byrne S, Yang JL, De Los Angeles A, Mali P, Aach J, Kim-Kiselak C, Briggs AW, Rios X et al. Optimization of scarless human stem cell genome editing. *Nucleic Acids Res* 2013;**41**:9049–9061.
- Yuan L, Liu JG, Hoja MR, Wilbertz J, Nordqvist K, Hoog C. Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science* 2002;**296**:1115–1118.
- Zhao H, Chen ZJ, Qin Y, Shi Y, Wang S, Choi Y, Simpson JL, Rajkovic A. Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* 2008;**82**:1342–1348.
- Zhe J, Ye D, Chen X, Liu Y, Zhou X, Li Y, Zhang J, Chen S. Consanguineous Chinese familial study reveals that a gross deletion that includes the *SYCE1* gene region is associated with premature ovarian insufficiency. *Reprod Sci* 2020;**27**:461–467.
- Zhen XM, Sun YM, Qiao J, Li R, Wang LN, Liu P. Genome-wide copy number scan in Chinese patients with premature ovarian failure. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2013;**45**:841–847.
- Zickler D, Kleckner N. Recombination, pairing, and synapsis of homologs during meiosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;**7**:1–26.cshperspect.a016626.