

Estudi dels telòmers de les cèl·lules germinals de mamífer

Caracterització de l'RNA telomèric TERRA i de la telomerasa

Rita Reig Viader



**ESTUDI DELS TELÒMERS DE LES CÈL·LULES
GERMINALS DE MAMÍFER**

**CARACTERITZACIÓ DE L'RNA TELOMÈRIC TERRA I DE LA
TELOMERASA**

Memòria presentada per

Rita Reig Viader

Per optar al títol de

Doctor en Biologia Cel·lular

Tesi doctoral dirigida per

Dra. Montserrat Garcia Caldés

Dra. Aurora Ruiz-Herrera Moreno

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Universitat Autònoma de Barcelona

Directora

Directora

Montserrat Garcia Caldés

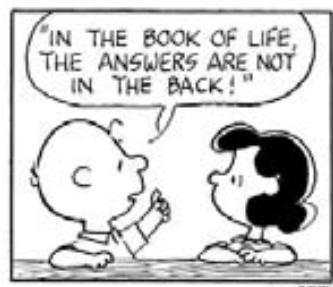
Aurora Ruiz-Herrera Moreno

Bellaterra, 2014

Als meus pares

A l'Eduard

A l'Albert



Charles M. Schulz

*Tu preguntes, què és la vida? Això és el mateix que preguntar: què és una pastanaga?
Una pastanaga és una pastanaga i, a part d'això, no se sap res més.*

Carta d'Antón P. Chéjov a la seva dona Olga Knípper

Aquesta tesi doctoral s'ha realitzat amb el finançament de:

- Universitat Autònoma de Barcelona, Beca per a Personal Investigador en formació de Departaments 456-05-2/09
- *Consorzio Interuniversitario Biotecnologie* (Italia), *Contributo per lo Svolgimento di Attività di Formazione presso Laboratori Nazionali o Stranieri*
- Generalitat de Catalunya, 2009SGR-1107

ÍNDEX

RESUM/SUMMARY	i
ACRÒNIMS I ABREVIATURES	iv
1. INTRODUCCIÓ.....	1
1.1. La gametogènesi	3
1.2. La meiosi.....	8
1.2.1.Etapes de la meiosi.....	8
1.2.2.Regulació de la meiosi	12
1.3. Els telòmers.....	14
1.3.1.Estructura dels telòmers	14
1.3.2.Manteniment de l'estructura telomèrica.....	18
1.3.2.1. El complex shelterina.....	20
1.3.2.2. La telomerasa.....	21
1.3.2.3. TERRA	23
1.3.3.Els telòmers en la línia germinal	27
2. OBJECTIUS.....	31
3. MATERIALS I MÈTODES.....	35
3.1. Material biològic.....	37
3.1.1.Ovaris fetals humans	37
3.1.2.Biòpsies testiculars humanes	37
3.1.3.Ovaris fetals de ratolí	38
3.1.4.Testicles de ratolí	38
3.1.5.Cèl·lules HeLa	39
3.2. Eines bioinformàtiques	39
3.3. Tècniques de biologia molecular	40
3.3.1.Amplificació de seqüències de DNA per <i>polymerase chain reaction</i>	41
3.3.2.Purificació de DNA.....	43
3.3.3.Desfosforilació	44
3.3.4.Lligació	45
3.3.5.Digestió enzimàtica.....	48
3.3.6.Transformació d e cè l·lules co mpetents d ' <i>E.coli</i> , selecció de colònies transformades i cultiu bacterià	49
3.3.7.Extracció de DNA.....	50
3.3.7.1. <i>Miniprep</i> pel mètode clàssic	51
3.3.7.2. <i>Midiprep</i> pel mètode comercial (Qiagen).....	52

3.4. Tècniques de biologia cel·lular.....	54
3.4.1. Cultiu i transfecció de cèl·lules HeLa.....	54
3.4.1.1. Subcultiu de cèl·lules HeLa.....	54
3.4.1.2. Transfecció de cèl·lules HeLa amb vectors plasmídics	55
3.4.2. Preparacions cel·lulars per microscòpia.....	56
3.4.2.1. Extensions per RNA- <i>Fluorescent in situ hybridization</i> (RNA-FISH) i immunofluorescència (IF).....	57
3.4.2.2. Extensions per anàlisi de la recombinació	58
3.4.3. Marcatge fluorescent per microscòpia i separació cel·lular.....	59
3.4.3.1. <i>Fluorescent activated cell sorting</i> (FACS)	59
3.4.3.2. Immunofluorescència.....	62
3.4.3.3. RNA- <i>Fluorescent in situ hybridization</i>	66
3.4.3.4. <i>Quantitative-Fluorescent in situ hybridization</i>	67
4. RESULTATS.....	69
4.1. Identificació del promotor de TERRA en ratolí.....	71
4.2. TERRA i la telomerasa a les cèl·lules germinals de mamífer	99
4.2.1. TERRA i telomerasa als oòcits fertils humans	101
4.2.2. TERRA i telomerasa són components dels telòmers durant la gametogènesi dels mamífers	113
4.3. L'homeòstasi telomèrica es veu compromesa als espermatòcits de pacients amb b infertilitat idiopàtica.....	133
5. DISCUSSIÓ.....	151
5.1. El promotor de TERRA en el ratolí	153
5.2. El paper de TERRA als telòmers de les cèl·lules germinals de mamífer	155
5.3. La relació de la telomerasa amb els telòmers de les cèl·lules germinals de mamífer.	161
5.4. L'homeòstasi telomèrica i la infertilitat humana	165
6. CONCLUSIONS.....	173
7. BIBLIOGRAFIA	177

RESUM

Els telòmers són estructures ribonucleoproteïques formades per repeticions en tandem TTAGGG, un complex proteic específic (shelterina), i RNA telomèric no codificant (TERRA), que es localitzen als extrems dels cromosomes eucariotes per prevenir la inestabilitat genòmica i les fusions entre cromosomes. En elles cèl·lules germinals, el manteniment de l'estructura telomèrica és crucial per a la correcta progressió de la gametogènesi, ja que els telòmers participen en l'aparellament entre cromosomes homòlegs durant la profase I de la meiosi, i promouen la sinapsi i la recombinació entre ells. De fet, la disruptió de l'homeòstasi telomèrica provoca l'apoptosi de les cèl·lules germinals i/o la generació d'aneuploidies, i està al tinent relacionada amb la senescència reproductiva. No obstant, no se'ns sap dels mecanismes encarregats de preservar l'estructura i longitud telomèrica a llarg de la gametogènesi dels mamífers. Per aquest motiu, tenint en compte que TERRA és un component integral de l'estructura telomèrica, i que la telomerasa és el complex enzimàtic que allarga els telòmers, en aquest treball es va aplantear l'estudi de la implicació d'aquestes dues molècules en la preservació de l'homeòstasi dels telòmers en les cèl·lules germinals de mamífer. Amb aquest objectiu, es van analitzar cèl·lules germinals humanes i de ratolí a llarg de la gametogènesi mitjançant tècniques citogenètiques i moleculars. Els nostres resultats mostraren que tant TERRA com el component proteic de la telomerasa (TERT) es localitzaven als telòmers de les cèl·lules germinals. La distribució nuclear de TERRA estaria subjecta a un lliniar dependent dels nivells cel·lulars de TERRA i del gènere de la cèl·lula (oòcit o espermatòcit), mentre que la transcripció de TERRA dependria de l'estadi de la gametogènesi i de l'estat del mateix telòmer. D'altra banda, TERT es trobava majoritàriament als telòmers de les cèl·lules germinals, sobretot en ratolí, tot i que no s'observà l'elongació dels telòmers al llarg de la gametogènesi. Alhora, la (baixa) co-localització entre TERRA i TERT als meiòcits humans i de ratolí es produïa majoritàriament fora del complex telomèric. De la mateixa manera, es va analitzar la distribució de TERRA i TERT en espermatòcits de pacients diagnosticats amb infertilitat idiopàtica d'origen no obstructiu, els quals mostraren un menor nombre d'esdeveniments de recombinació en comparació amb els espermatòcits control. S'observà una reducció en els nivells de TERRA conjuntament amb una disruptió de la distribució telomèrica de TERRA i TERT en les cèl·lules dels individus infèrtils: mentre TERRA tendia a localitzar-se als telòmers, TERT tendia a dissociar-se'n. No obstant, ni el nombre de repeticions telomèriques ni l'associació de TERRA i TERT es veien afectades. Per tant, en base als nostres resultats, proposem que TERRA i TERT s'associarien amb els telòmers de les cèl·lules germinals humanes i de ratolí per tal de participar en el manteniment de l'estabilitat de l'estructura telomèrica durant els complexos esdeveniments cromosòmics que tenen llocs durant la meiosi i la gametogènesi. Alhora, donat

que l'homeòstasi d'aquestes dues molècules es veu alterada a les cèl·lules germinals de pacients infèrtils, el seu ànalisi en meiòcits, conjuntament amb d'altres paràmetres, podria ser útil per a la determinació de l'origen de la infertilitat humana.

SUMMARY

Telomeres are ribonucleoprotein complexes, composed by TTAGGG tandem repeats, a telomere-specific protein complex (shelterin) and telomeric noncoding RNA (TERRA) that cap the ends of eukaryote chromosomes preventing them from genomic instability and fusions. In mammalian germ cells, the maintenance of the telomeric structure is crucial for the proper progression of gametogenesis since telomeres are involved in homologous chromosomes pairing during the meiotic prophase I, also promoting their synapsis and recombination. In fact, disruption of telomere homeostasis leads to germ cells apoptosis and/or aneuploidy, and has been strongly related to reproductive aging. However, little is known on the mechanisms preserving telomere structure and length during mammalian gametogenesis so far. Thus, taking into account that TERRA is an integral component of the telomeric structure, and that telomerase is the enzymatic complex that elongates telomeres, the main objective of this work was to investigate whether these two molecules are implicated in the preservation of telomere homeostasis of mammalian germ cells. To this aim, mouse and human germ cells were analyzed by cytogenetic and molecular techniques throughout gametogenesis. Our results showed that both TERRA and the protein component of telomerase (TERT) localized at telomeres of germ cells. The distribution of TERRA in the nucleus would be subjected to a threshold that would depend on TERRA cellular levels and the cell gender (i.e. oocyte or spermatocyte), whereas TERRA transcription would be regulated according to the gametogenic stage and the telomere status *per se*. On the other hand, TERT highly localized at germ cells telomeres, especially in mouse, although no telomere elongation was observed in these cells throughout gametogenesis. Moreover, (scarce) TERRA and TERT co-localization occurred out of the telomeric complex in mouse and human meiocytes. In the same way, TERRA and TERT distribution was analyzed in human spermatocytes from patients diagnosed with idiopathic non-obstructive infertility, which showed fewer recombination events compared to spermatocytes of a control donor. A reduction in TERRA levels together with a disruption of the telomeric distribution of TERRA and TERT was observed in cells of infertile individuals. While TERRA was prone to localize at telomeres, TERT tended to dissociate from them. Nevertheless, neither the number of telomeric repeats nor TERRA-TERT association was affected in spermatocytes of infertile patients. Therefore, in the

light of our results, we propose that TERRA and TERT would associate with telomeres of mouse and human germ cells to participate in the maintenance of the stability of telomere structure during the complex chromosome events taking place throughout meiosis and gametogenesis. Moreover, since the homeostasis of these two molecules is disrupted in germ cells from infertile patients, they could be useful to determine of the origin of human infertility by their analysis in meiocytes together with other parameters.

ACRÒNIMS I ABREVIATURES

Donat que la majoria dels acrònims utilitzats per a la denominació de molècules i processos biològics procedeixen del seu nom original en anglès, en molts casos o bé no tenen traducció al català o bé són difícils de traduir. Per mantenir la coherència i la cohesió del text i facilitar-ne la comprensió, en el present treball s'utilitzarà majoritàriament la nomenclatura en llengua anglesa de determinats components i processos cel·lulars, així com els seus respectius acrònims.

A – Adenina	dNTP – <i>Desoxinucleotid Phosphate</i>
ADB – <i>Antibody Dilution Buffer</i>	dpc – Dies Post-Concepció
ALT – Alternative Lengthening of Telomeres	DSB – <i>Double-Strand Breaks</i>
ATM – <i>Ataxia Talangectasia Mutated</i>	<i>E. coli</i> – <i>Escherichia coli</i>
BLAT – <i>BLAST-Like Alignment Tool</i>	EDTA – <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
BLAST – <i>Basic Local Alignment Tool</i>	EMBOSS – <i>European Molecular Biology Open Software Suite</i>
BSA – <i>Bovine Serum Albumin</i>	ER – Enzims de Restricció
C – Citosina	F – <i>Primer Forward</i>
CENP – <i>Centromeric Proteins</i>	FACS – <i>Fluorescent Activated Cell Sorting</i>
CMV – <i>Cytomegalovirus</i>	FAM – <i>Fluorescein Amidite</i>
CO – <i>Crossover</i>	FITC – <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
CpG – Dinucleotid Citosina-fosfat-Guanina	γ H2AX – H2AX fosforil·lada
CREST - <i>Complication of Raynaud's phenomenon, Esophageal dysfunction, Sclerodactyly and Telangiectasia</i>	G – Guanina
CSK – <i>Cytoskeletal</i>	GBSS – <i>Gey Balanced Salt Solution</i>
CTCF – <i>CCCTC-binding factor</i>	GFP – <i>Green Fluorescent Protein</i>
Cy3 – Cianina 3	H1t – <i>Histone cluster 1</i>
Cy5 – Cianina 5	H2AX – <i>X variant of 2A histone family</i>
Da – Daltons	H3K9 – Histona H3 lisina 9
DAPI – <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>	H4K20 – Histona H4 lisina 20
DMC1 – <i>Disrupted Meiotic cDNA 1</i>	HBSS – <i>Hank Balanced Salt Solution</i>
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium	HeLa – Cèl·lules epitelials humanes procedents d'un carcinoma cervical de Henrietta Lacks
DMSO – Dimetilsulfòxid	HP1 – <i>Heterochromatin Protein 1</i>
DNA – <i>Desoxyribonucleic Acid</i>	IF – Immunofluorescència
DNMT – <i>DNA Methyltransferase</i>	Kb – Kilobases
	KO – <i>Knock Out</i>

LB – <i>Lysogeny Broth</i>	rpm – Revolucions Per Minut
MLH1 – <i>MutL Homolog 1</i>	<i>S. cerevisiae</i> – <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
MLH3 – <i>MutL Homolog 3</i>	<i>S. pombe</i> – <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
MRE11 – <i>Meiotic recombination 11</i>	SAP – <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
MSH4 – <i>MutS Homolog 4</i>	SDS – <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
MSH5 – <i>MutS Homolog 5</i>	SMC1 β – <i>Structural Maintenance of Chromosomes 1β</i>
NBS1 – <i>Nibrin</i>	SOB – <i>Superoptimal Broth</i>
NCBI – National Center for Biotechnology Information	spc – <i>Setmanes post-concepció</i>
NHEJ – <i>Non-Homologous End Joining</i>	STAG3 – <i>Stroma Antigen 3</i>
NMD – <i>Nonsense-Mediated RNA Decay</i>	SUV – <i>Suppressor of Variegation methyltransferase</i>
NNPP – <i>Neural Network Promoter Prediction</i>	SYCP1 – <i>Synaptonemal Complex Protein 1</i>
nt – Nucleòtids	SYCP2 – <i>Synaptonemal Complex Protein 2</i>
ON – <i>Overnight</i>	SYCP3 – <i>Synaptonemal Complex Protein 3</i>
pb – Parells de bases	T – Timina
PBS – <i>Phosphate Buffered Saline</i>	TAE – <i>Tris-acetate-EDTA buffer</i>
PBST – PBS amb Tween-20	TCAB1 – <i>Telomere Cajal Body protein 1</i>
PCR – <i>Polymerase Chain Reaction</i>	TERRA – <i>Telomeric Repeat-containing RNA</i>
PGC – <i>Primordial Germ Cell</i>	TERT – <i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>
PNA – <i>Peptid Nucleic Acid</i>	TIN2 – <i>TRF1-Interacting Nuclear factor 2</i>
POT1 – <i>Protein Of Telomeres 1</i>	TPE – <i>Telomere Position Effect</i>
psi – <i>Pound-force per square inch</i>	TPP1 – <i>TIN2- and POT1-interacting nuclear Protein 1</i>
PTBG – PBS, Tween-20, BSA, gelatin	TR – <i>Telomerase RNA</i>
Q-FISH – <i>Quantitative-fluorescence In Situ Hybridization</i>	TRAP – <i>Telomeric Repeat Amplification Protocol</i>
R – <i>Primer Reverse</i>	TRF – <i>Telomere Restriction Fragment</i>
RAD50 – <i>Radiation Sensitive 50</i>	TRF1 – <i>Telomeric Repeat-binding Factor 1</i>
RAD51 – <i>Radiation Sensitive 51</i>	TRF2 – <i>Telomeric Repeat-binding Factor 2</i>
RAP1 – <i>Repressor and Activator Protein 1</i>	TSS – <i>Transcription Start Site</i>
REC8 – <i>Meiotic Recombination protein 8</i>	TA – Temperatura Ambient
RNA – <i>Ribonucleic Acid</i>	TE – Tris-EDTA
RNasa A – Ribonucleasa A	u – Unitats d’activitat enzimàtica
RNA-FISH – <i>RNA-fluorescence In S itu Hybridization</i>	U – Uracil
RNAPII – <i>RNA Polymerase II</i>	
RPA – <i>Replication Protein A</i>	

UCSC – University of California, Santa

Cruz

V – Volum

WT – *Wild Type*

1. INTRODUCCIÓ

La gametogènesi és el procés de formació, desenvolupament i maduració dels cèl·lules germinals fins a convertir-se en gàmetes aptes per a la fecundació (Fig. 1.1). Alhora, és la principal font de variabilitat genètica per a les espècies amb reproducció sexual, la qual és imprescindible per a la seva supervivència i adaptació a l'entorn. En aquest sentit, sobretot pel que fa a l'espècie humana, una de les qüestions que genera més interrogants sobre el funcionament d'aquests processos biològics és l'elevada freqüència d'errors que es produeixen de forma "natural" al llarg del desenvolupament dels gàmetes i per tant, la important incidència d'infertilitat. Aquest fet ha dut a estudiar els mecanismes involucrats tant en la gametogènesi com en la meiosi en sí mateixa des de molts i diferents punts de vista com poden ser els canvis en la dinàmica dels cromosomes, les proteïnes implicades en les vies de senyalització, o els canvis genètics i epigenètics que s'hi produeixen.

El present treball està focalitzat en l'estudi de la gametogènesi i la meiosi dels mamífers des de la vessant dels telòmers, donant que són unes estructures cromosòmiques que, tot i ser imprescindibles per a l'estabilitat del genoma i per tant per a la viabilitat cel·lular, el seu paper dins els processos de formació dels gàmetes encara no està ben definit. Per aquest motiu, s'ha utilitzat com a models d'estudi l'espècie humana i el ratolí ja que tot i que comparteixen els trets fonamentals tant per la gametogènesi com a l'estructura dels telòmers, presenten determinades diferències específiques d'espècie que ens poden ser útils per comprendre millor els mecanismes implicats en la regulació dels telòmers i les seves funcions al llarg de la gametogènesi.

1.1. La gametogènesi

La gametogènesi als mamífers, s'inicia amb la formació de les cèl·lules germinals primordials (PGCs) durant el desenvolupament embrionari, i inclou diverses etapes de proliferació mitòtica, seguides d'una fase de replicació del DNA prèvia a dues divisions meiotiques, i una etapa de diferenciació (Fig. 1.1). No obstant, els processos que tenen lloc un cop les PGCs es diferencien en espermatogonios o oogonios presenten un marcado morfisme sexual pel que fa al *tempo*, sincronia, producció i morfologia dels gàmetes, períodes de bloqueig i en conseqüència, regulació del procés en general (revisat per Hassold i Hunt, 2001; Morelli i Cohen, 2005; García i Ponsa, 2003).

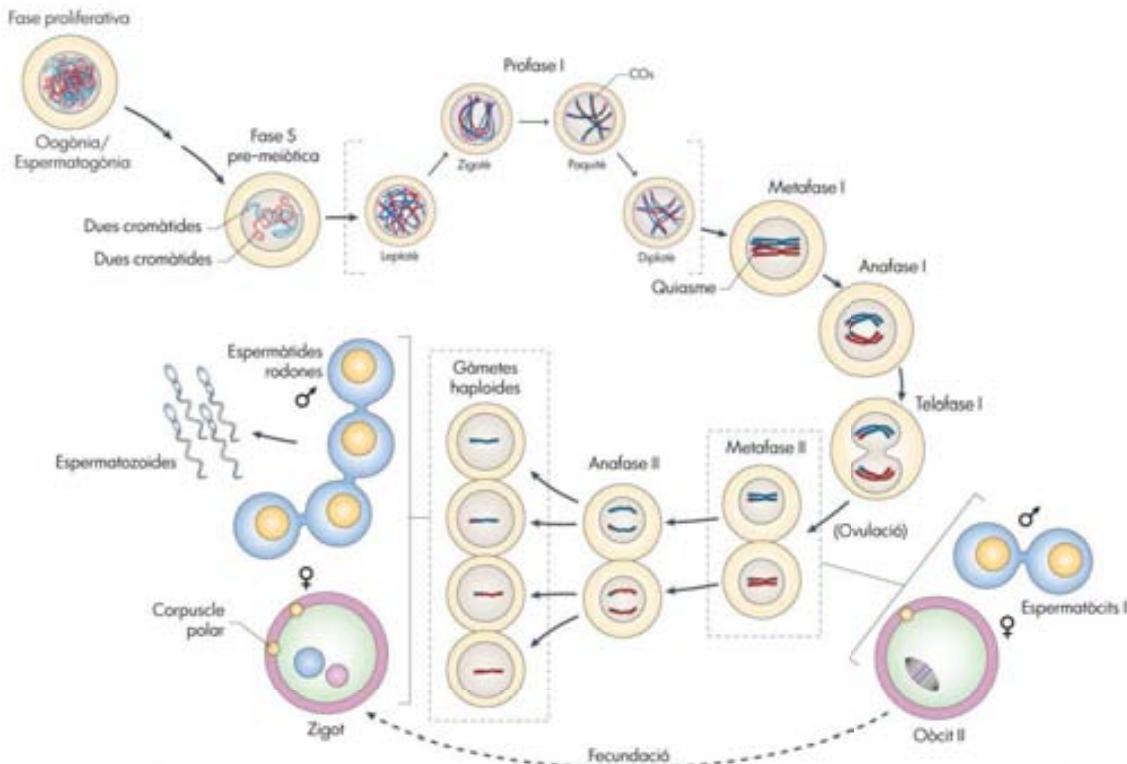


Figura 1.1. La gametogènesi en els mamífers. Les cèl·lules beix representen els processos comuns a la oogènesi i l'espermatogènesi. Les cèl·lules en blau i en rosa representen les diferents morfologies que prenen, respectivament, les cèl·lules germinals masculines i femenines en diferents punts del procés. Adaptat i modificat de Handel i Schimenti (2010).

A l'embrió d'ambdós sexes, les PGCs es detecten per primera volta al sac de l'allantoide a voltant dels 7,5 dies post-concepció (dpc) en ratolí i a les 4 setmanes post-concepció (spc) en humà (Fig. 1.2) (Fujimoto, *et al.*, 1977; Ginsburg, *et al.*, 1990; Anderson, *et al.*, 2000). Prèviament a l'inici de la migració cap a les crestes gonadals, la població de PGCs pateix una primera però breu fase de proliferació mitòtica, seguida d'un estat transitori de quiescència en G₂ que coincideix amb una remodelació extensa de la cromatina (Tam i Snow, 1981; Seki, *et al.*, 2007; Surani, 2001). Als 9,5 dpc (5 spc), les PGCs inicien la migració cap a les crestes gonadals alhora que reprenen el cicle mitòtic, i cap als 11,5 dpc (5-6 spc) la major part d'elles s'acumulen a la gònada (Clark i Eddy, 1975; Fujimoto, *et al.*, 1977; Motta, *et al.*, 1997; Molyneaux, *et al.*, 2001; Mamsen, *et al.*, 2012). A partir d'aleshores, se'ls anomena gonòcits, ja que experimenten múltiples canvis morfològics i biològics, com ara la pèrdua de la capacitat migratòria i la disminució de la seva potencialitat (Labosky, *et al.*, 1994; Tada, *et al.*, 1998; Molyneaux, *et al.*, 2004). Quan les PGCs/gonòcits finalitzen totes les etapes de proliferació, el nombre total de cèl·lules germinals ha incrementat radicalment, sobretot en el cas de les gònades femenines (Clark i Eddy, 1975; Tam i Snow, 1981; Bendsen, *et al.*, 2003; Bendsen, *et al.*, 2006; Mamsen, *et al.*, 2011).

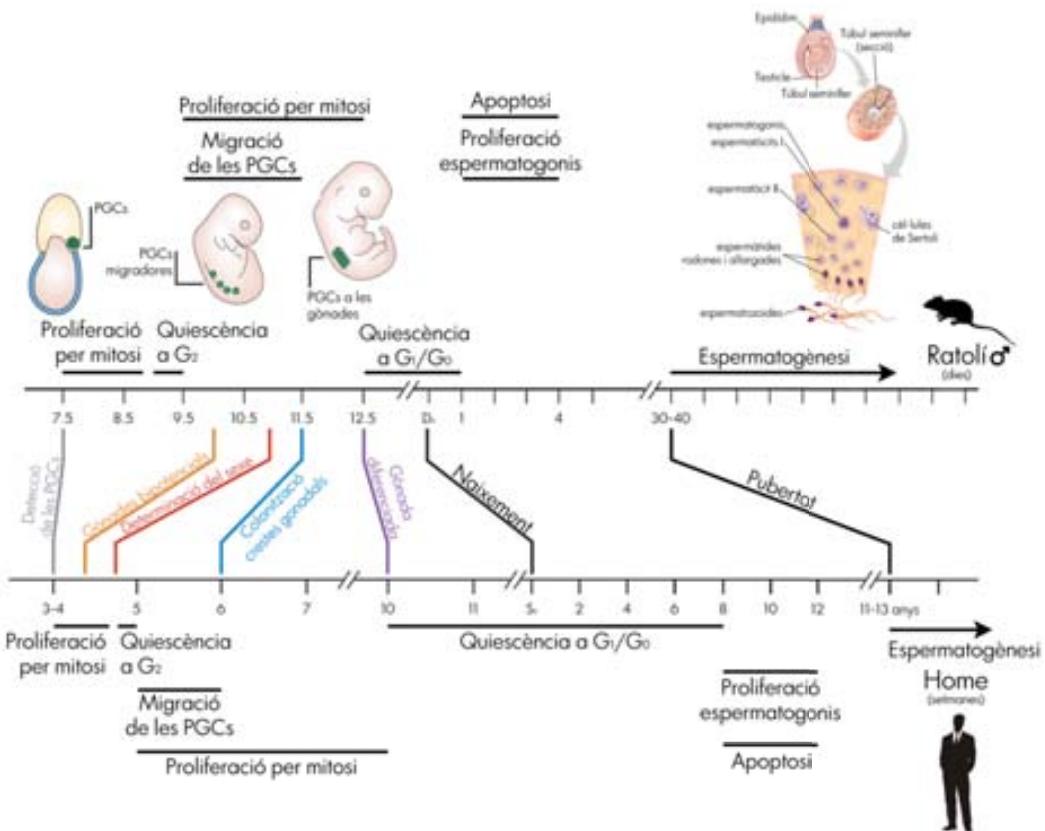


Figura 1.2. Formació i desenvolupament dels testicles i les cèl·lules germinals masculines: comparació entre el ratolí i l'espècie humana. L'eix superior indica (en dies) el moment i/o la durada de diferents esdeveniments que tenen lloc al llarg del desenvolupament dels testicles i els espermatozoides en el ratolí. L'eix inferior presenta la mateixa informació per a l'espècie humana (en setmanes). Les dades per a la construcció d'aquesta cronologia han estat extretes de fonts citades al text. Figures adaptades de McMurray (2010) i de Campbell i Reece (1999).

La diferenciació dels gonòcits en oogonis o espermatogonis depèn sobretot de senyals externs, i no coincideix entre els dos sexes ni pel que fa a la via de diferenciació ni al moment del desenvolupament en què es produeix (Figs. 1.2 i 1.3) (Ford, *et al.*, 1975; Palmer i Burgoine, 1991). Concretament, a la gònada XX els gonòcits estan destinats a dur a terme l'oogènesi (oogonis) als 12,5 dpc (9-10 spc) i inicien la meiosi a partir del 13,5 dpc (10 spc) (McLaren i Southee, 1997; Motta, *et al.*, 1997; Baker, *et al.*, 1980; Kurilo, 1981; Garcia, *et al.*, 1987). A la gònada XY en canvi, els gonòcits estan ja destinats a dur a terme l'espermatogènesi cap als 11,5 dpc (~8-9 spc) (McLaren i Southee, 1997; Chuma i Nakatsuji, 2001; Adams i McLaren, 2002; Bendsen, *et al.*, 2003). En aquest punt (anomenats també pro-espermatogonis), deixen de proliferar, mantenint-se quiescents en la fase G_1/G_0 del cicle cel·lular a partir dels ~12,5 dpc (~10 spc) fins que no s'activa la maduració i proliferació dels espermatogonis (Hilscher, *et al.*, 1974; Bendsen, *et al.*, 2003; McLaren, 2003).

En el mascle de mamífer doncs, la proliferació dels pro-espermatogonis s'atura a l'etapa embrionària. En el cas del ratolí, no es reprèn fins després del naixement quan, entre el primer i el quart dia post-part, es produeix una primera proliferació dels pro-espermatogonis, que migren

cap als túbuls seminífers i on maduren a espermatogonis (McLean, *et al.*, 2003). En el masclle humà en canvi, aquests esdeveniments es produeixen íntegrament durant el període fetal (a les 8-12 s'pc) (Culty, 2009). D'aquesta manera, els espermatogonis romanen quiescents fins que l'individu no madura sexualment, moment en què s'activa el procés d'espermatogènesi a l'esticle i es produeix una primera onada de cèl·lules germinals que completen tot el procés (Bellvé, *et al.*, 1977; Goetz, *et al.*, 1984). En aquest punt és també quan es produeix una onada important d'apoptosi. De fet, durant el desenvolupament del testicle i les cèl·lules germinals masculines es produeixen múltiples onades d'apoptosi (Print i Loveland, 2000; Helal, *et al.*, 2002), però la més important és la que té lloc quan s'inicia l'espermatogènesi, probablement per oportunitzar la proporción entre cèl·lules germinals i cèl·lules de Sertoli (Rodríguez, *et al.*, 1997; Jahnukainen, *et al.*, 2004). A partir d'aquest punt, la proliferació dels espermatogonis i la generació d'espermatozoides es manté activa durant tota la vida adulta de l'individu (Fig. 1.2).

En ratolí, cada cicle d'espermatogènesi té una durada de 8-9 dies, mentre que en humà dura al voltant de 64 dies (Oakberg, 1956; Heller i Clermont, 1963). L'espermatogènesi (Figs. 1.1 i 1.2) s'inicia amb la proliferació contínua dels espermatogonis per mitosi. Alguns però, abandonen la proliferació mitòtica per diferenciar-se en espermatòcits I i iniciar la meiosi (vegeu apartat 1.2). La primera divisió meiotica dona lloc als espermatòcits II i la segona a les espermàtides rodones, connectades per ponts citoplasmàtics. Finalment, les espermàtides rodones duen a terme un important procés de diferenciació anomenat espermiogènesi, al llarg del qual pateixen importants canvis morfològics, bioquímics i metabòlics – com la pèrdua del citoplasma, el creixement del flagel o la formació de l'acrosoma –, acompanyats d'una severa compactació del DNA. D'aquesta manera, passen primer per una etapa intermèdia de diferenciació (espermàtides allargades) per finalment convertir-se en espermatozoides madurs capaços de fecundar.

En el cas de la femella de mamífer en canvi, la proliferació dels oogonis es produeix exclusivament a l'ovari fetal. De tots els oogonis que es generen, a quells que no inicien la meiosi degeneren produint una onada d'apoptosi que té lloc durant la formació dels cists, i és la principal causa de la marcada reducció del pool inicial de cèl·lules germinals en l'ovari fetal (Baker, 1963; Pepling i Spradling, 2001; Fulton, *et al.*, 2005). En la femella els cists corresponen a l'agrupació d'oogonis que, durant la seva fase proliferativa, han dut a terme divisions mitòtiques amb citocinesis incomplertes i es mantenen units per ponts citoplasmàtics (Gondos, 1973; Pepling i Spradling, 1998; Fulton, *et al.*, 2005). Només part de les cèl·lules que formen cada cist sobreviu per formar óocits madurs, mentre que la majoria d'elles faran la funció de cèl·lules mainadera (*o feeders*), proporcionant diferents tipus de molècules a l'òcit necessàries per a la seva maduració. No obstant, la majoria dels oogonis (entre un 50-80% en humans i un 80% en ratolí) abandonen la proliferació mitòtica per iniciar la primera

profase meiòtica (oòcits I) cap als 13,5 dpc (10 spc) (Fig. 1.3) (Baker, 1963; Baker, *et al.*, 1980; Kurilo, 1981; Garcia, *et al.*, 1987; McClellan i Gosden, 2003; Baltus, *et al.*, 2006). En ambdues espècies, els oogonis que inicien la meiosi (oòcits I), progressen per les diferents subetapes de la primera profase meiòtica (vegeu apartat 1.2) fins a estar aturats en l'etapa de dictiotè – estadi especialitzat de diplotè – fins que la femella assoleix la maduresa sexual.

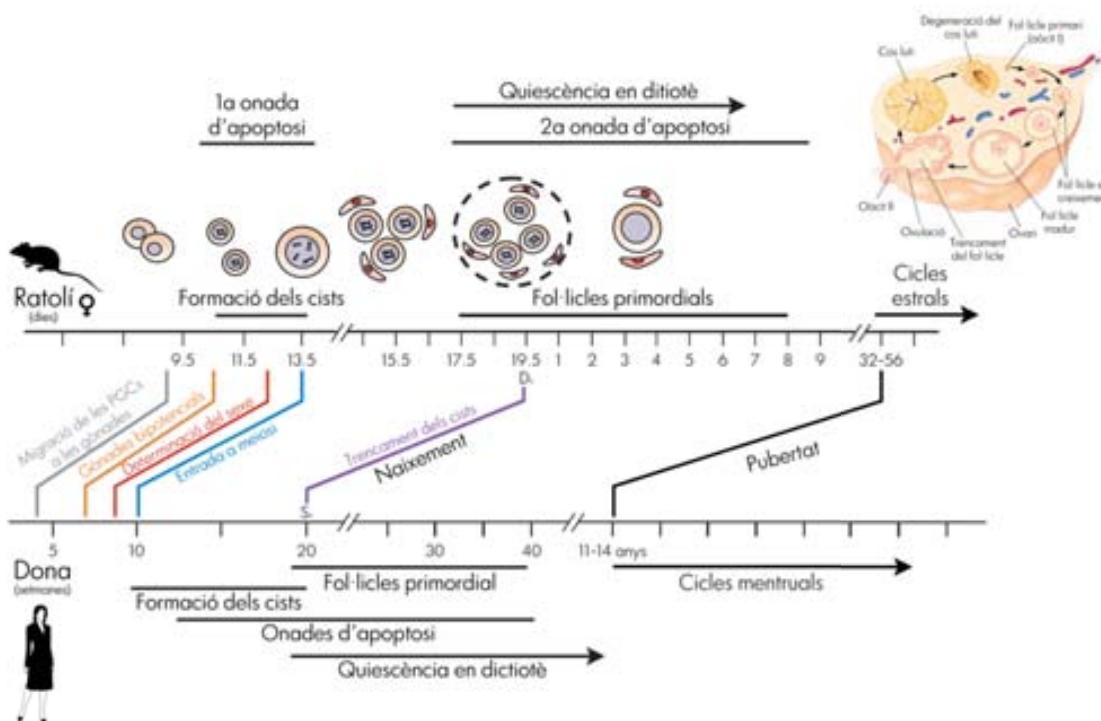


Figura 1.3. Formació i desenvolupament de l'ovari i els oòcits: comparació entre el ratolí i l'espècie humana. L'eix superior correspon a la cronologia (en dies) de la fol·liculogènesi i oogènesi en l'ovari de ratolí, mentre que l'eix inferior il·lustra els mateixos processos en l'ovari humà (en setmanes). Adaptat i modificat de Sarraj i Drummond (2012) i de Campbell i Reece (1999). Les dades han estat contrastades amb la bibliografia citada al text.

En la femella humana, els oòcits s'envolten de cèl·lules fol·liculars per formar els fol·licles primordials cap a les 22 spc, la qual cosa a l'ovari de ratolí succeeix després del naixement (Fig. 1.3) (Pepling i Spradling, 2001; Hartshorne, *et al.*, 2009). En ambdues espècies, però, el nombre màxim de fol·licles primordials – i en conseqüència, d'oòcits I – s'assoleix cap a la meitat del període gestacional (13,5 dpc, 20 spc). Això és degut a que, d'una banda, es produeix una segona onada d'apoptosi a l'ovari durant el trençament dels cists per a la formació dels fol·licles (Baker, 1963; Hilscher, *et al.*, 1974; Pepling i Spradling, 2001); i de l'altra, el nombre de fol·licles (i d'oòcits I) disminueix progressivament al llarg dels anys degut a la degeneració de bona part d'ells a mesura que avança l'edat de la femella, i posteriorment en les successives ovulacions que sigui sexualment madura (Baker, 1963; Pepling i Spradling, 2001; Hartshorne, *et al.*, 2009; Wallace i Kelsey, 2010). A més, la població d'oòcits I no es

regeneraria en l'ovari adult, ja que al voltant del naixement la població d'oogonis es perdria totalment (Byskov, *et al.*, 2011). No obstant, existeixen opinions divergents respecte aquesta qüestió. Alguns autors han trobat evidències de renovació del pool d'oòcits a l'ovari de ratolí (Baker, *et al.*, 1980; Reizel, *et al.*, 2012). Determinats estudis (Bukovsky, *et al.*, 2004; Bukovsky, *et al.*, 2005; Virant-Klun, *et al.*, 2008) fins i tot han identificat cèl·lules de l'ovari (tant de ratolí com humà) capaces de formar nous fol·licles i/o oòcits. De fet, en ratolí ha estat possible generar nous oòcits de sprés de tractaments de qui mioteràpia que ha vinent provocat l'esterilitat de l'individu (Zou, *et al.*, 2009). Altres autors però, afirmen que, almenys en humà, tot i que encara quedarien oogonis en el moment de naixement, aquesta població desapareixeria completament passat un temps, prèviament a que l'individu assoleixi la maduresa sexual (Liu, *et al.*, 2007a; Byskov, *et al.*, 2011).

Quan la femella arriba a la pubertat (Fig. 1.3), per cada cicle reproductiu (generalment) només un dels múltiples fol·licles reclutats madura completament en un procés de selecció, i la resta entra en atriòria. Només quan un fol·licle és del tot madur, l'oòcit reprèn la primera divisió meiòtica i és ovulat. Això es tradueix en que, en femella humana, la quiescència de l'oòcit en dictiotè pot perllongar-se fins a 50 anys. Un cop reactivat, l'oòcit finalitza la primera divisió meiòtica i inicia la segona, la qual es completarà només si és fecundat, resultant-ne el zigot (Fig. 1.1).

1.2. La meiosi

La meiosi és un tipus de divisió cel·lular especialitzada que permet la formació de gàmetes haploïdes i alhora mantenir la variabilitat genètica de l'espècie. Aquests objectius s'assoleixen mitjançant dues divisions meiòtiques consecutives precedides d'una sola ronda de replicació del DNA (fase S pre-meiòtica), conjuntament amb l'intercanvi de material genètic entre cromosomes homòlegs (recombinació) (Fig. 1.1).

1.2.1. Etapes de la meiosi

La primera divisió meiòtica inclou les fases típiques d'una divisió cel·lular, profase, metafase, anafase i telofase, amb la particularitat que durant la profase I es produeix l'intercanvi genètic entre cromosomes homòlegs mitjançant un complex mecanisme que implica la intervenció de múltiples proteïnes així com importants canvis en la morfologia i la localització dels cromosomes. Precisament, aquests canvis són els que permeten distingir dins la profase I quatre

etapes ben diferenciades (leptotè, zigotè, paquitè i diplotè) (Speed, 1982; Goetz, *et al.*, 1984; Handel i Schimenti, 2010):

- Just després de la fase S pre-meiotica, existeix una etapa i ntermèdia de **pre-leptotè** durant la qual els cromosomes s'uniuen a la condensació del DNA (Fig. 1.4), que progressarà fins arribar al seu màxim a la metafase I. Al mateix temps, els telòmers s'uneixen a l'embolcall nuclear i s'aparellen de manera transitòria entre telòmers homòlegs (Fig. 1.4; vegeu apartat 1.3.3) (Boateng, *et al.*, 2013).

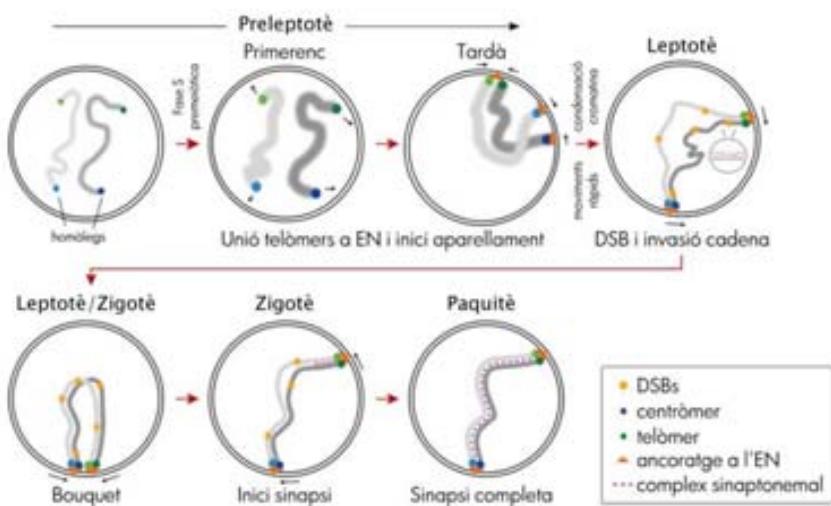
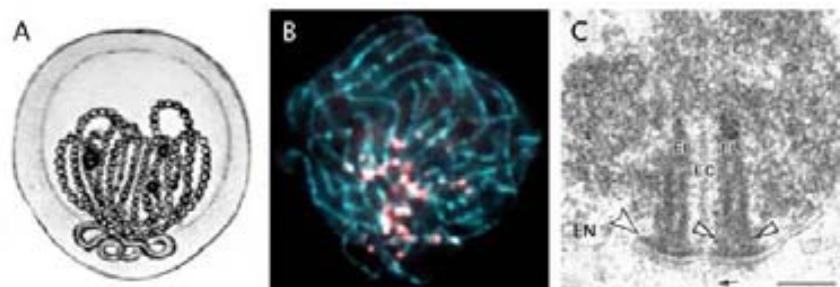


Figura 1.4. Dinàmica dels cromosomes homòlegs durant la profase meiotica. Representació esquemàtica dels moviments cromosòmics que tenen lloc durant la profase I. En gris es mostren dos homòlegs, en els quals s'hi han senyalat els telòmers, també homòlegs, en blau i en verd, que s'uneixen a l'embolcall nuclear (EN) mitjançant un conjunt de proteïnes marcat en taronja. Adaptat de Boateng, *et al.* (2013).

- L'aparellament dels homòlegs, és a dir, l'estabilització de l'alignament dels seqüències homòlogues (Jones, 2008), s'inicia durant l'etapa de **leptotè** en gran part promogut per l'agrupació dels telòmers formant l'estructura de *bouquet* (Fig. 1.4; Apunt 1) (Scherthan, *et al.*, 1996; Scherthan, 2007), tot i que també hi intervenen altres factors (Kneitz, *et al.*, 2000). Alhora, es comença a formar una “bastida” proteica al llarg de cadascun dels cromosomes (Apunt 2) mitjançant l’assemblatge dels anomenats elements laterals, formats per cohesines – com *meiotic recombination protein 8* (REC8) i *structural maintenance of chromosomes 1β* (SMC1β) (Bannister, *et al.*, 2004 ; Revenkova, *et al.*, 2004) – i per les *synaptonemal complex protein 2* i *3* (SYCP2 i SYCP3) (Yuan, *et al.*, 2000; Yuan, *et al.*, 2002 ; Yang, *et al.*, 2006; Winkel, *et al.*, 2009). A més, també al mateix temps, es generen els trencaments de doble cadena o *double-strand breaks* (DSBs) (Fig. 1.4, Apunt 2), els quals provoquen l’activació de la maquinària de recombinació homòloga (Apunt 2), i que són imprescindibles per a que es doni correctament la sinapsi entre cromosomes homòlegs (Romanienko i Camerini-Otero, 2000).

Apunt 1. El bouquet

La formació de l'estructura de *bouquet* (A i B) es produeix durant la transició de leptotè a zigotè i promou l'alignació i l'aparellament en tretz omosomes homòlegs (Scherthan, *et al.*, 1996; Roig, *et al.*, 2004) mitjançant l'agrupació d'els telòmers en una regió concreta dels perifèrius nuclears, adiacent a l'organitzador de microtúbulos (Liebe, *et al.*, 2004; Yoshida, *et al.*, 2013). Això és possible gràcies a l'ancoratge dels telòmers a la membrana nuclear interna mitjançant l'estructura anomenada placa d'unió (C) (Liebe, *et al.*, 2004). La placa d'unió consisteix en l'engruiximent de l'element axial a la zona telomèrica, la qual a més està formada per repeticions telomèriques (Voet, *et al.*, 2003), proteïnes telomèriques com els *telomeric repeat-binding factors* 1 i 2 (TRF1 i TRF2) (Scherthan, *et al.*, 2000; Liebe, *et al.*, 2004), i determinades cohesines com SMC1 β i la *stoma antigen 3* (STAG3) (Revenkova, *et al.*, 2004; Scherthan, 2007; Adelfalk, *et al.*, 2009). No obstant, encara existeixen moltes incògnites pel que fa als components que formen aquesta estructura. La dissolució del *bouquet* es produeix típicament durant el zigotè, tot i que la seva durada dins la profase I sembla ser específica d'espècie i de sexe (Scherthan, *et al.*, 1996; Pfeifer, *et al.*, 2001; Pfeifer, *et al.*, 2003; Roig, *et al.*, 2004).

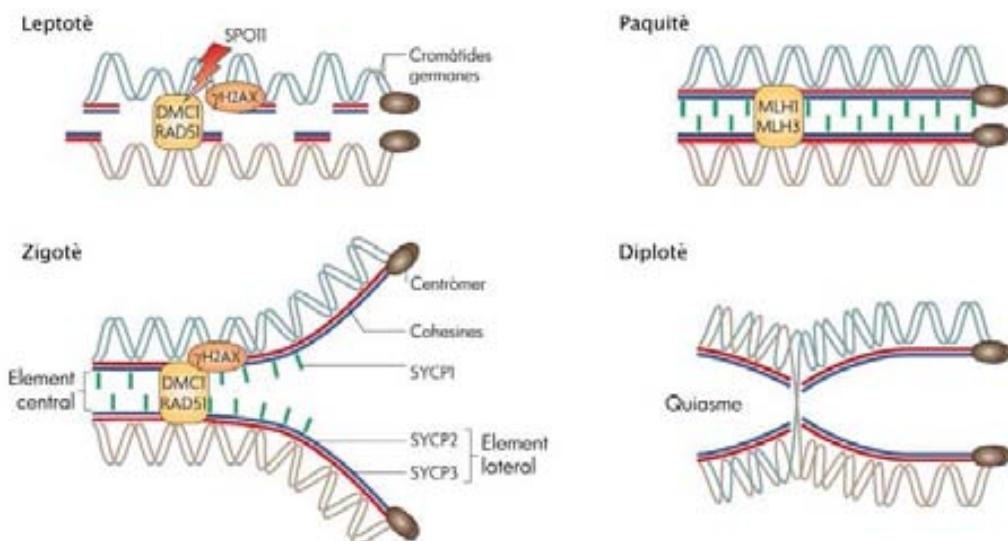


(A) Una de les primeres representacions d'un nucli en *bouquet* d'una cèl·lula germinal de cargol (*Helix pomatia*) (Platner, 1885). (B) Oòcit humà en zigotè on es mostra SYCP3 en blau i TRF2 en vermell (Reig-Viader, *et al.*, 2013). (C) Placa d'unió obtinguda per Liebe *et al.* (2004) mitjançant l'anàlisi per microscòpia electrònica d'un espermatòcit de ratolí on s'observen els elements laterals (EL) i central (EC) del complex sinaptonemal, i l'embolcall nuclear (EN).

- La sortida de l'etapa de *bouquet* a **zigotè** (Apunt 1), requereix la participació de diferents proteïnes implicades en la senyalització i reparació dels DSBs durant el procés de recombinació (Rogakou, *et al.*, 1998; Pandita, *et al.*, 1999). Al llarg d'aquesta etapa, s'inicia la sinapsi entre homòlegs (Oud, *et al.*, 1979; Speed, 1982) mitjançant la unió dels elements laterals del complex per filaments transversals que formen l'element central, el qual està constituït principalment per la proteïna SYCP1 (Fig. 1.4, Apunt 2) (Schmekel, *et al.*, 1996; De Vries, *et al.*, 2005). La sinapsi s'inicia a partir d'almenys uns dels extrems dels cromosomes (Fig. 1.4) (Barlow i Hultén, 1996), els quals es mantenen aparellats des de l'inici de la profase fins la reparació dels DSBs de les seqüències no telomèriques mitjançant recombinació homòloga (Apunt 2) (Boateng, *et al.*, 2013), procés que també s'inicia durant aquesta etapa.

Apunt 2. La recombinació homòloga

La recombinació entre homòlegs es produeix com a conseqüència de la reparació dels DSBs que genera l'endonucleasa Spo11 (Keeney, *et al.*, 1997). ATM fosforila H2AX (γ H2AX) (Rogakou, *et al.*, 2000), i la *replication protein A* (RPA) s'uneix als extrems 3' exposats dels DSBs (He, *et al.*, 1995). RPA és subseqüentment desplaçada per les recombinases *radiation sensitive 51* (RAD51) i/o *disrupted meiotic cDNA 1* (DMC1) (Pittman, *et al.*, 1998; Yoshida, *et al.*, 1998), les quals faciliten la cerca de la seqüència complementària de l'altre homòleg mitjançant la invasió de la cadena lliure dins la doble cadena de l'altre cromosoma per formar un *D-loop* (Hunter i Kleckner, 2001). Si l'altre extrem del DSB original s'uneix també a l'homòleg, es forma un doble creuament en tres cadenes de DNA, anomenat *Holliday junction* doble, que es resol donant lloc a un CO o un non-CO (Schwacha i Kleckner, 1995; Wu i Hickson, 2003). La formació dels COs és promoguda tant per les proteïnes *MutS homologs 4 i 5* (MSH4 i MSH5) com les *MutL homologs 1 i 3* (MLH1 i MLH3) (Baker, *et al.*, 1996; Kneitz, *et al.*, 2000; Lipkin, *et al.*, 2002; Santucci-Darmanin, *et al.*, 2000; Snowden, *et al.*, 2004).



En la majoria dels organismes, els COs tendeixen a formar-se en llocs específics dels genoma que es coneixen com a punts calents (*hotspots*) de recombinació (Mézard, 2006; Buard i de Massy, 2007; Pryce i McFarlane, 2009). En general, els *hotspots* solen ser regions d'1-2 kb que se produeixen preferentment fora de les regions que es transcriuen del genoma (Myers, *et al.*, 2005; Myers, *et al.*, 2008; Paigen i Petkov, 2010). No obstant, els mecanismes que controlen la posició dels DSBs en cara no es coneixen del tot. S'ha relacionat, per exemple, amb zones de cromatina oberta (Berchowitz, *et al.*, 2009), determinats tipus de seqüències (Myers, *et al.*, 2008), o modificacions d'histones i marques epigenètiques (Buard, *et al.*, 2009; Sigurdsson, *et al.*, 2009). Figura adaptada de Handel, *et al.* (2010).

- La recombinació, juntament amb la síntesi, finalitza a l'etapa de **paquите** (Fig. 1.4, Apunt 2). Precisament, es té a questa etapa quan els complexos si naptonemals estan completament formats, unint les quatre cromàtides dels cromosomes d'un lloc als anomenats bivalents (Oud, *et al.*, 1979; Speed, 1982). Els DSBs que es resolen com a *crossovers* (COs) connecten els dos cromosomes homòlegs mitjançant els quiassmes (Apunt 2) (Tease i Jones, 1978). Els quiassmes són les connexions físiques que mantenen els cromosomes homòlegs units fins que s'eliminen parcialment les cohesines al final de la profase I per tal d'assegurar-ne la correcta segregació a metafase I i II (Hawley, 1988; Lamb, *et al.*, 1997; Bonomo, *et al.*, 2000; Kitajima, *et al.*, 2003;

Fledel-Alon, *et al.*, 2009 ; Garcia-Cruz, *et al.*, 2010a). En el cas de les cromosomes sexuals del mascle però, la sinapsi és parcial, ja que només són homòlogues les regions anomenades pseudo-autosòmiques. Això fa que tant la sinapsi com la recombinació entre els cromosomes sexuals del mascle tingui lloc posteriorment a les dels autosomes (Kauppi, *et al.*, 2012).

- Per últim, durant el **diplotè**, els cromosomes homòlegs comencen a separar-se alhora que es desestabilitza el complex sinaptonemal i s'inicia la desinapsi (Apunt 2), de manera que cada parella de cromosomes homòlegs quedarà unida només pels quiassmes fins a l'anafase I (Oud, *et al.*, 1979; Speed, 1982).

A l'etapa de metafase I desapareix l'embolcall nuclear, i els bivalents s'uneixen als filaments del fus meiòtic situant-se al pla equatorial de la cèl·lula per formar la placa metafàsica. En aquesta fase, els cromosomes estan completament condensats i encara són visibles els quiassmes, els quals es desfan amb la separació dels homòlegs durant l'anafase I. Un cop es divideix el citoplasma a telofase I, es produeixen dues cèl·lules amb dotació cromosòmica haploide i genèticament diferents entre ells gràcies a l'processus de recombinació (Fig. 1.1). La segregació meiòtica és semblant a la divisió cel·lular per mitosi (Fig. 1.1) (Garcia-Cruz, *et al.*, 2010a). S'inicia amb la profase II (tan breu en femella que en algunes espècies es considera inexistent), durant la qual es forma un nou fus i es trenca l'embolcall nuclear. A metafase II, els cromosomes es condensen i s'alineen formant la placa metafàsica per tal que es separin les cromàtides germanes durant l'anafase II, i es formen dues noves cèl·lules amb la divisió del citoplasma i la formació dels nous embolcalls nuclears durant la telofase II.

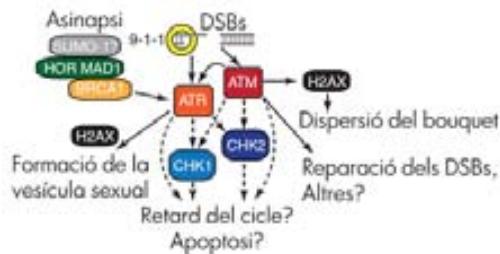
1.1.1. Regulació de la meiosi

Tot i l'important dimorfisme sexual que s'observa en el procés general de la gametogènesi (Figs. 1.2 i 1.3), els processos de recombinació i sinapsi *per se* semblen estar força conservats entre sexes deixant de banda petites diferències en l'estructura del complex sinaptonemal o en el nombre i la distribució dels COs al llarg del complex (revisat per Hassold, *et al.*, 2000; Garcia-Cruz, *et al.*, 2009 ; Fraune, *et al.*, 2012). No obstant, existeixen diferències entre sexes especialment importants quan es tracta dels mecanismes cel·lulars de regulació i control d'aquests processos, també anomenats *checkpoints* (vegeu apartat 1.3). Durant la meiosi, i concretament durant la profase I, dos mecanismes *checkpoint* regulen la progressió dels diferents esdeveniments cromosòmics que tenen lloc en aquesta etapa: el *checkpoint* de recombinació i el *checkpoint* de sinapsi (Apunt 3). El *checkpoint* de recombinació, s'activa quan no es produeix correctament la reparació dels DSBs; mentre que el *checkpoint* de sinapsi es

produceix com a resultat de defectes en la formació o en l'assemblatge del complex sinaptonemal (revisat per Morelli i Cohen, 2005; MacQueen i Hochwagen, 2011). L'activació d'ambdós *checkpoints* provoca retard en la progressió de la meiosi, la qual cosa proporciona temps extra per completar adequadament la reparació dels DSBs i/o la sinapsi entre homòlegs prèviament a que es produueixin les divisions meiòtiques i, a l'hora, dóna l'oportunitat d'eliminar mitjançant apoptosis aquelles cèl·lules meiòtiques que no siguin capaces de resoldre els errors i/o obstacles que hagin sorgit. Existeix a més un tercer mecanisme *checkpoint* a metafase I que retarda l'inici de l'anafase en el cas que els cromosomes no hagin assolit unions bipolarars estables amb els microtúbuls del fus meiòtic alineant-se al pla equatorial de la cèl·lula. Es tracta del *checkpoint* d'organització del fus o *spindle assembly checkpoint*, el qual també s'activa durant la mitosi de les cèl·lules somàtiques (Subramanian i Kapoor, 2013).

Apunt 3. Mecanismes *checkpoint* durant la profase I de la meiosi

La progressió dels esdeveniments que tenen lloc durant la profase I de la meiosi estan regulats per dos mecanismes *checkpoint*. En primer lloc, el *checkpoint* de paquitè respon a DSBs no processats, els quals són detectats primer per ATM (Barlow, *et al.*, 1998), que s'uneix als extrems de DNA a partir del complex format per les proteïnes MRE11/RAD50/NBS1 (MRN) (Uziel, *et al.*, 2003), i després per ATR, que és reclutada per RPA (Zou i Elledge, 2003). Un cop activades, ATM i ATR fosforil·len diferents substrats que activen la resposta al dany al DNA (Zhao i Piwnica-Worms, 2001; Melchionna, *et al.*, 2000; revisat per Niida i Nakanishi, 2006). La resposta de reparació dels DSBs dirigida per ATM/ATR no només és un denominador comú entre els organismes eucariotes (revisat per MacQueen i Hochwagen, 2011), sinó que també ho és per a la mitosi i la meiosi, tot i que mentre en la meiosi els DSBs són preferentment reparats a partir del DNA dels homòlegs, en la mitosi la cèl·lula tendeix a utilitzar els DNA de les cromàtides germanes (Schwacha i Kleckner, 1997).



En segon lloc, el *checkpoint* de sinapsi respon a defectes en la sinapsi entre homòlegs mitjançant l'activació preferent d'ATR (Keegan, *et al.*, 1996; Moens, *et al.*, 1999). Aquest mecanisme però, sembla ser menys astringent en els espermatòcits, ja que varia en funció del grau d'asinapsi. En el cas d'asinapsi molt extensa, es produeix un defecte sever i el bloqueig a paquitè mitjà (Mahadevaiah, *et al.*, 2008), mentre que si el grau d'asinapsi autosòmica és relativament baix, com succeeix en les translocacions Robertsonianes, la meiosi pot progressar almenys fins a trobar-se amb el *spindle assembly checkpoint* (Manterola, *et al.*, 2009; Naumova, *et al.*, 2013). Figura adaptada de MacQueen i Hochwagen (2011).

Precisament, el fet que en humans les taxes estimades d'aneuploidia als oòcits (20-70%) siguin molt superiors a les dels espermatozoides (1-4%) (Nagaoka, *et al.*, 2012), sembla estar associat, en gran part, a que els *checkpoints* són molt més astringents en mascles que en femelles (vegeu apartat 1.3.3). Estudis en ratolins mutants (revisat per Morelli i Cohen, 2005) han demostrat que l'abolició de proteïnes implicades en els processos cromosòmics de la primera profase meiòtica

produeixen efectes diferentes en la funció del gènere. En el mascle, la seva abolició implica interrupció de l'espermatogènesi i apoptosis de les cèl·lules germinals. En la femella en canvi, els oòcits progressen en la gametogènesi i maduren, tot i que la vida i/o capacitat reproductiva de la femella es pot veure reduïda. Per exemple, mentre l'alteració dels processos de sinapsi i recombinació com a conseqüència de l'abolició de proteïnes com SYCP3, MLH1 o H2AX en ratolins mascle provoca esterilitat, en les femelles es produueixen oòcits a neuploides, mortalitat embrionària o reducció en la mida de la camada (Edelmann, *et al.*, 1996; Woods, *et al.*, 1999; Yuan, *et al.*, 2000; Celeste, *et al.*, 2002; Yuan, *et al.*, 2002). Pel que fa al *spindle assembly checkpoint*, la capacitat de respondre a les cèl·lules meiòtiques a alteracions en el comportament dels cromosomes durant la metafase I sembla ser també específica de sexe. En ratolins mascle, la resposta és robusta, i la presència d'un sol cromosoma univalent provoca l'aturada en metafase I i l'eliminació de l'espermatòcit I (Kot i Handel, 1990; Sutcliffe, *et al.*, 1991). En la femella en canvi, la presència d'un o diversos univalents a metafase I és compatible amb l'inici de l'anafase i, a més, no produeix retard en la progresió del cicle cel·lular (LeMaire-Adkins, *et al.*, 1997; Garcia-Cruz, *et al.*, 2010b).

1.3. Els telòmers

Tal com hem vist, els telòmers són regions dels cromosomes que participen activament en el procés de la meiosi, particularment durant els esdeveniments d'aparellament i sinapsi entre cromosomes homòlegs a la profase I (Fig. 1.4). En conseqüència, l'alteració de l'equilibri i l'estabilitat del sistema telomèric, és a dir, de l'homeòstasi telomèrica és altament perjudicial per a la generació de gammates euploides viables. Així doncs, entendre la regulació de l'estructura i la funció dels telòmers és clau per conèixer i identificar possibles factors que podrien estar involucrats en la generació de fenotips infèrtils.

1.3.1. Estructura dels telòmers

Els telòmers són complexos ribonucleoproteics que es troben als extrems dels cromosomes eucariotes, i que contribueixen a mantenir l'estabilitat genòmica de les cèl·lules (Li, *et al.*, 1998). Els telòmers estan formats per repeticions en tandem de la seqüència TTAGGG a la qual s'hi uneixen un conjunt de proteïnes que formen el complex shelterina (Moyzis, *et al.*, 1988; Kipling i Cooke, 1990; De Lange, 2005), així com molècules d'un RNA no codificant anomenat *telomeric repeat-containing RNA* (TERRA) (Fig. 1.5) (Azzalin, *et al.*, 2007; Schöftner i Blasco, 2008).

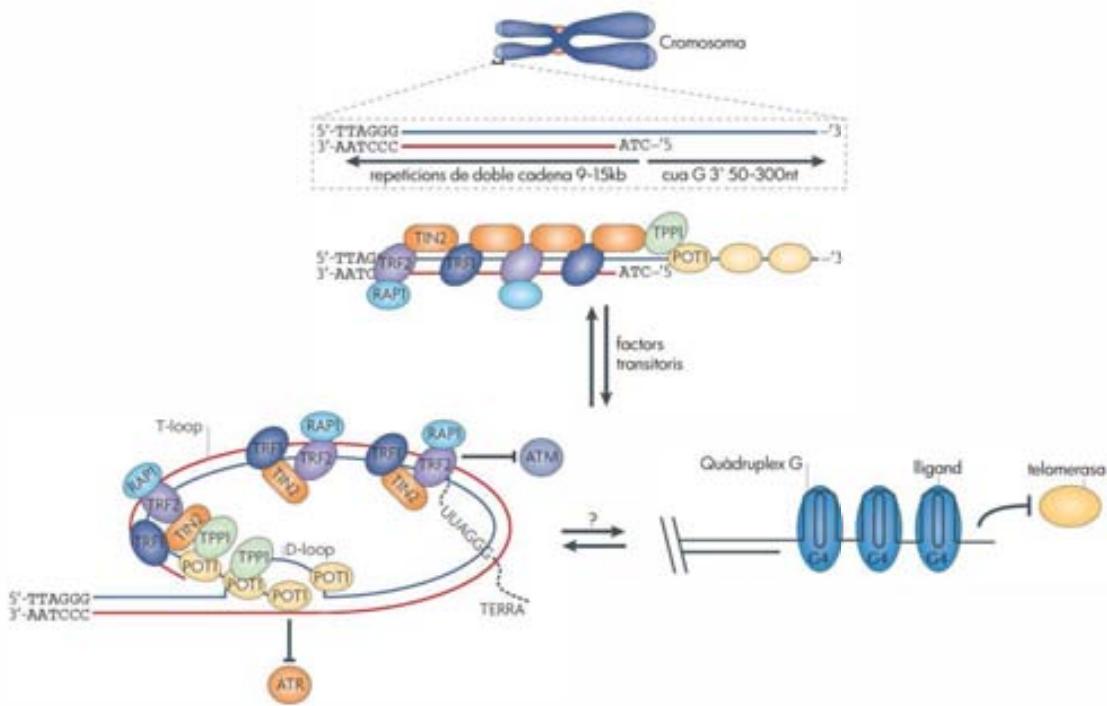


Figura 1.5. Estructura dels telòmers dels mamífers. Els telòmers consisteixen en múltiples repeticions TTAGGG, amb una cadena motlle rica en G i una cadena retardada rica en C. Els elements del complex shelterina (TRF1 i 2, RAP1, T IN2, T PP1 i POT1) interaccionen amb molts altres factors (vegeu apartat 1.3.2.1) que es localitzen transitòriament als telòmers, sovint de forma dependent del cicle cel·lular. Aquests factors inhibeixen les vies de senyalització de la formació de DSBs dependents de la proteïna ATM i ATR, i contribueixen a la generació d'una estructura protectora als extrems dels cromosomes, el T-loop. Un plegament de les repeticions telomèriques alternatiu al T-loop és l'estructura de quàdruplex G, a la qual s'hi unirien lligands específics per aquesta estructura, encara per determinar. Figura adaptada d'O'Sullivan i Karlseeder (2010) i de Bochman *et al.* (2012).

Els telòmers són estructures extremadament inàmiques ja que, per tal d'acomplir totes les seves funcions, la seva estructura ha de ser capaç de passar ràpidament d'un estat "tancat" a un estat "obert", i viceversa al llarg del cicle i d'interferència cel·lulars (Blackburn, 2001). La conformació tancada impedeix l'accés delsenzims de reparació del DNA als extrems dels cromosomes, mentre que l'oberta es dóna per exemple durant la fase S per tal de permetre l'accés controlat dels factors de replicació del DNA (Hug i Lingner, 2006). No obstant, la naturalesa de l'estructura telomèrica en les conformacions oberta i tancada encara no es comprèn del tot. Una de les solucions proposades per a la protecció del DNA telomèric és el seu repliegament formant un laç anomenat T-loop (Fig. 1.5) (Griffith, *et al.*, 1999). El T-loop és una estructura que s'ha identificat mitjançant microscòpia electrònica, en la qual la cua G de cadena simple es repliga enviant la regió telomèrica *upstream* de doble cadena, i generant alhora un segon loop (D-loop) degut al desplaçament d'una cadena del telòmer respecte l'altra. Els T-loops són molt variables en mida i s'han detectat en diversos eucariotes tot i que no està clar que es formin a tots els telòmers d'una mateixa cèl·lula (Griffith, *et al.*, 1999; De Lange, 2004). De fet, s'ha proposat una estructura alternativa per a protegir els extrems dels cromosomes, el quadruplex G (Fig. 1.5) (Sen i Gilbert, 1988). El quadruplex G es formaria a partir del

plegament de quatre cadenes de DNA de cadena simple (G4; Fig. 1.5), que contenen entre tres i quatre guanines consecutives, formant tetrades de Gs. A més, s'ha visto que quàdruplex G intramoleculars an tiparal·leles poden inhibir la telomerasa entre que estructures intermoleculars paral·leles de quàdruplex G permeten l'estensió de les repeticions telomèriques per part d'aquest enzim (Zahler, *et al.*, 1991; Oganesian, *et al.*, 2007). No obstant, fins al moment aquesta estructura només s'ha pogut observar *in vivo* en ciliats (Paeschke, *et al.*, 2005), mentre que en mamífers només s'ha demostrat indirectament mitjançant molècules estabilitzadores de quàdruplex G o anticossos específics (Brown, *et al.*, 1998; Gowan, *et al.*, 2001; Duan, *et al.*, 2001; Biffi, *et al.*, 2013).

La longitud de les repeticions telomèriques, tot i ser una característica altament controlada per mecanismes cel·lulars, és molt heterogènia entre espècies – des de 9-15 kb en cèl·lules humanes a 20-100 kb en ratolí –, individus o fins i tot entre telòmers d'una mateixa cèl·lula (De Lange, *et al.*, 1990; Starling, *et al.*, 1990; Lansdorp, *et al.*, 1996; Zijlmans, *et al.*, 1997; Canela, *et al.*, 2007). L'organització de la cromatina telomèrica i subtelomèrica és similar a la del DNA cromosòmic ja que també està empaquetat en nucleosomes i presenta marques epigenètiques com la modificació d'histones i la metilació del DNA (Fig. 1.6) (revisat per Blasco, 2007 i Galati, *et al.*, 2013). Definitivament, els nucleosomes dels telòmers presenten una organització equivalent a la de la resta de DNA, amb la particularitat de ser menys estables i més mòbils com degut a les característiques físic-químiques intrínseques del DNA telomèric (Makarov, *et al.*, 1993; Tommerup, *et al.*, 1994; Pisano, *et al.*, 2007; Ichikawa, *et al.*, 2014). No obstant, donat que els telòmers i els subtelòmers dels mamífers són regions de DNA altament repetitives, presenten una estructura heterocromàtica, de la mateixa manera que els passa als centròmers i regions pericentromèriques (Peters, *et al.*, 2001; Schotta, *et al.*, 2004). Precisament és aquesta estructura heterocromàtica la que confereix als telòmers la capacitat de silenciar l'expressió dels pocs gens que es troben als subtelòmers, un fenomen conegut com a *telomere position effect* (TPE) (Ottaviani, *et al.*, 2008). En les cèl·lules dels mamífers el TPE està influït per la longitud dels telòmers i la metilació dels DNA subtelomèric, alhora que requereix la hipoacetilació de les histones (Baur, *et al.*, 2001; Koering, *et al.*, 2002; Pedram, *et al.*, 2006). Tot i que els mecanismes que controlen el TPE als mamífers encara no s'han escrit, els seus telòmers i subtelòmers es caracteritzen precisament per una baja acetilació de los histones H3 i H4 (Benetti, *et al.*, 2007a) i una elevada metilació de las regions subtelomèriques (Brock, *et al.*, 1999; Okano, *et al.*, 1999) (Fig. 1.6).

La metilació del DNA subtelomèric als mamífers, a part de contribuir al TPE (Pedram, *et al.*, 2006), és important per el control de la modificació de la cromatina ja que regula l'accessibilitat de factors d'unió a DNA (Peters, *et al.*, 2003; Vakoc, *et al.*, 2005; Gonzalo, *et al.*, 2006) i, a més, les protegiria d'un excés de recombinació homòloga (Maloisel i Rossignol, 1998;

Domínguez-Bendala i McWhir, 2004; Gonzalo, *et al.*, 2006). No obstant, als mamífers només els subtelòmers (i no els telòmers) poden ser mètllats ja que les repeticions TTAGGG no contenen seqüències CpG (Steinert, *et al.*, 2004; Gonzalo, *et al.*, 2006). Els dinucleòtids CpG corresponen al substrat de les *DNA methyltransferases* (DNMT), enzims queafegeixen grups metil a les citosines d'aquests dinucleòtids (per a més informació vegeu Ooi, *et al.*, 2009). A les cèl·lules dels mamífers, existeixen tres DNMTs principals: la DNMT1, una DNMT de manteniment que durant la replicació del DNA copia la metilació de la cadena materna a la cadena sintetitzada; i les DNMT3a i DNMT3b, les quals metilen el DNA *de novo* (Fig. 1.6) (Li, *et al.*, 1992; Okano, *et al.*, 1999). Aquestes tres DNMTs són les encarregades de la metilació del genoma en general, incloses les regions pericentromèriques i subtelomèriques (Chen, *et al.*, 2004; Gonzalo, *et al.*, 2006). No obstant, els mecanismes que controlen l'estat de les marques epigenètiques dels telòmers dels mamífers encara estan per determinar.

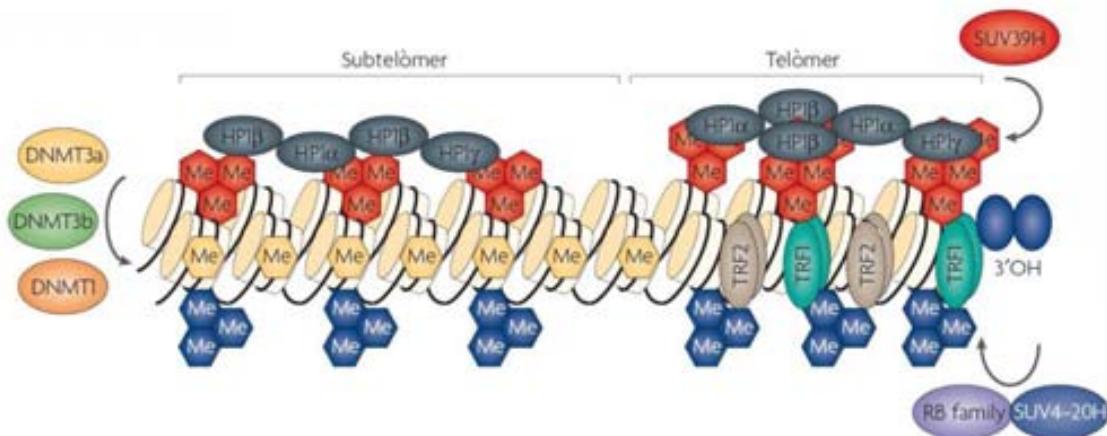


Figura 1.6. Modificacions epigenètiques dels telòmers i subtelòmers eucariotes. Els subtelòmers presenten metilació (Me) de les illes CpG, mentre que tant les seqüències subtelomèriques com les telomèriques estan enriquides en trimetilació de les histones i en les diferents isoformes de la proteïna HP1 (α, β, γ). A l'esquema es mostren també les metiltransferases encarregades de la metilació d'histones (SUV) i de la metilació del DNA (DNMT). Figura adaptada de Blasco (2007).

Una altra marca epigenètica típica de regions heterocromàtiques que es pot trobar tant a les regions telomèriques com subtelomèriques és la trimetilació de, respectivament, les histones 3 i 4 a les lisines 9 i 20 (H3K9 i H4K20) (Fig. 1.6) (Kourmouli, *et al.*, 2004; Gonzalo, *et al.*, 2006; Benetti, *et al.*, 2007b). Aquestes modificacions d'histones són dutes a la acció de metiltransferases anomenades *suppressor of variegation (SUV) methyltransferases*. Alhora, els telòmers i subtelòmers dels mamífers estan enriquits en la *heterochromatin protein 1* (HP1) (Koering, *et al.*, 2002; García-Cao, *et al.*, 2004), la qual és reclutada per la seva afinitat per els residus H3K9 trimetilats i és important per a la compactació de la cromatina en ambdues regions (Fig. 1.6) (Bannister, *et al.*, 2001; Lachner, *et al.*, 2001).

L'estat epigenètic dels telòmers humans, però, no presenta totes les característiques aquí descrites (Tommerup, *et al.*, 1994). Els estudis que existeixen al respecte semblen estar d'acord en que la presència de les marques en histones i l'establiment de l'estat heterocromàtic dels telòmers humans és important per a l'estabilitat cromosòmica. No obstant, no hi ha consens pel que fa a quines són les marques epigenètiques tant a les regions telomèriques com a les subtelomèriques (O'Sullivan, *et al.*, 2010; Ernst, *et al.*, 2011). D'altra banda, la proximitat de gens als telòmers no sempre resulta en hipermetilació del DNA telomèric ni en la silenciament de la seva expressió (Bayne, *et al.*, 1994; Ofir, *et al.*, 1999). A més, el DNA telomèric no presenta una replicació tardana, contràriament a les regions pericentromèriques i telomèriques d'altres espècies de mamífers (Ofir, *et al.*, 1999; Wright, *et al.*, 1999). Es creu doncs, que els telòmers humans es caracteritzarien per una mescla de marques heterocromàtiques i eucromàtiques, que donaria lloc a un patró epigenètic específic amb funcions i implicacions encara per determinar (Blasco, 2007; Galati, *et al.*, 2013).

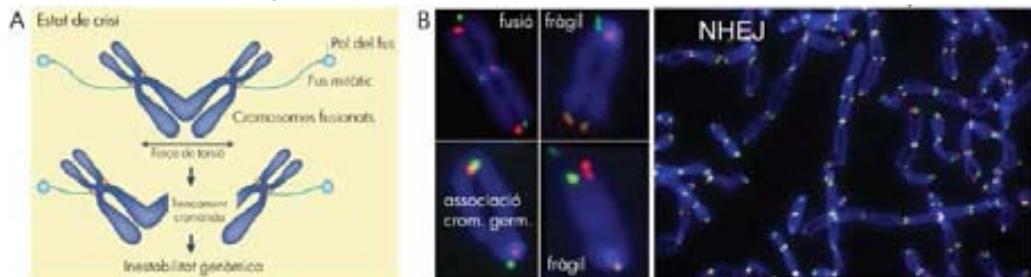
1.3.2. Manteniment de l'estructura telomèrica

La pèrdua de la protecció dels extrems cromosòmics provocada per l'acumulació de dany en l'estructura del telòmer conjuntament amb l'escurçament progressiu del DNA telomèric fa que, en condicions normals, la cèl·lula entri en l'anomenada “senescència replicativa” o bé mori per apoptosis (Apunt 4) (Karlseder, *et al.*, 2002; Von Zglinicki, *et al.*, 2005; O'Sullivan i Karlseder, 2010). El manteniment de la integritat dels cromosomes lineals i implica luitar contra els problemes biològics, els anomenats “problema de la protecció dels extrems” i “problema de la replicació dels extrems” (Palm i De Lange, 2008).

El “problema de la protecció dels extrems” (De Lange, 2009) consisteix en el fet que la cèl·lula ha de ser capaç de diferenciar el DNA telomèric de DSBs que necessiten ser reparats. Si aquesta distinció no es produeix, els cromosomes lineals estan exposats a patir unions entre extrems dels cromosomes o processos de recombinació que resultarien en fusions entre telòmers de cromosomes diferents (Sfeir i De Lange, 2012) (Apunt 4). La protecció del DNA telomèric ve donada principalment per dues estructures: el complex shelterina (vegeu apartat 1.3.2.1) i el T-loop que forma el DNA telomèric sobre si mateix mitjançant la cua G (vegeu apartat 1.3.1). A més però, hi intervenen altres factors, com les proteïnes ATM, ATR o el complex MRN els quals, paradoxalment, participarien activament en la protecció del DNA telomèric durant la seva replicació tot i formar part del mecanisme *checkpoint* de reparació del DNA (Apunt 3) (Verdun i Karlseder, 2006; Deng, *et al.*, 2009a).

Apunt 4. Escurçament telomèric, senescència i càncer

Els telòmers d'esprotegits són tractats per la cèl·lula com a DSBs no desitjats activant-se el mecanisme *checkpoint* de reparació del DNA (vegeu Apunt 3) (D'Adda di Fagagna, *et al.*, 2003; Takai, *et al.*, 2003), el qual condueix les cèl·lules negatives per la telomerasa a l'aturada del cicle o bé a l'apoptosi (Herbig, *et al.*, 2004). Aquest mecanisme doncs, limita la vida replicativa de les cèl·lules, i és per tant una via de supressió de tumors que evita que les cèl·lules adquireixin alteracions genòmiques i/o es tornin immortals (Davoli i de Lange, 2012).



Les cèl·lules que segueixen dividint-se més enllà del seu límit de replicació perdren la protecció telomèrica i entren en estat de "crisi" (A i B), caracteritzat per inestabilitat genòmica i mort cel·lular. En aquestes cèl·lules, la inestabilitat genòmica ve donada per cicles de trencament i fusió dels cromosomes (A), produint reorganitzacions cromosòmiques (B) com delecions terminals, duplicacions in vertides, amplificació del DNA, translocacions no recíproques o per duplicació, i cromosomes dicèntrics, totes les quals han estat associades al càncer (Bolzán i Bianchi, 2006; O'Sullivan i Karlseder, 2010). De vegades però, determinades cèl·lules aconsegueixen escapar de l'estat de crisi, les quals en general tenen l'activitat telomerasa sobre-regulada. En aquest punt, es posa de manifest el rol dual de la telomerasa en el procés d'immortalització cel·lular. D'una banda, la reactivació de l'enzim en cèl·lules amb telòmers críticament curts permet l'establiment de clons immortals i genòmicament instables, la qual cosa significa un pas important cap al càncer. I de l'altra, l'activació de la telomerasa en cèl·lules que no han arribat al punt de crisi evita la generació d'inestabilitat genòmica d'origen telomèric (Morales, *et al.*, 1999; Arandi i DePinho, 2000). La figura mostra (A) una representació gràfica dels cicles de fusió i trencament entre cromosomes no homòlegs (*non-homologous end joining*; NHEJ); i (B) exemples d'alteracions (telòmers fràgils) i reorganitzacions telomèriques entre cromosomes (fusió) i cromàtides germanes (crom. germ.).

Figura adaptada de O'Sullivan i Karlseder (2010) i Sfeir i De Lange (2012).

El "problema de la replicació dels extrems" (Palm i de Lange, 2008) ve donat per la mateixa replicació del DNA, la qual es produeix als telòmers de la mateixa manera que es dóna a la resta del cromosoma, és a dir, mitjançant la replicació estàndard semiconservativa a partir de DNA polimerases. Aquestes però, necessiten un encebador (normalment RNA) per iniciar la síntesi de DNA en direcció 5' → 3'. L'eliminació de l'RNA encebador terminal a l'extrem 5' de la cadena sintetitzada deixaria un espai que les DNA polimerases estàndard no poden omplir. En conseqüència, cada ronda de síntesi del DNA resulta en la pèrdua d'una seqüència terminal, i per tant, en l'escurçament progressiu de l'extrem del cromosoma (Allsopp, *et al.*, 1995). Un segon problema de replicació deriva de la importància de les cues G per a la integritat telomèrica (Wellinger, *et al.*, 1996; McElligott i Wellinger, 1997). Després de la replicació convencional del DNA, la DNA polimerasa de la cèl·lula genera un extrem terminal homogeni, és a dir, sense una G, la qual és necessària per a que se'n neixin determinades proteïnes del complex shelterina. Així doncs, les cues G són regenerades mitjançant la

degradació i re-síntesi de la cadena adenourinica, la qual cosa també provoca la pérdida de repeticiones teloméricas (Makarov, *et al.*, 1997; Jacob, *et al.*, 2003). Cal esmentar també, que la pérdida de repeticiones teloméricas es pot produir per altres motius a més del “problema de la replicació dels extrems”, com ara el dany oxidatiu del DNA o la manca d’activitat telomerasa (enzim encarregat del manteniment de la longitud telomèrica; vegeu apartat 1.3.2.2) (Bolzán i Bianchi, 2006).

1.3.2.1. El complex shelterina

El mecanisme de protecció dels telòmers contra el “problema de protecció dels extrems” més ben conegut i estudiat és la formació del complex shelterina sobre el DNA telomèric. El complex shelterina cobreix les repeticions telomèriques de doble i de simple cadena, i inclou sis proteïnes (Fig. 1.5). Els *telomeric repeat-binding factors 1 i 2* (TRF1 i TRF2), i la proteïna *protection of telomeres 1* (POT1) reconeixen directament les repeticions TTAGGG alhora que interaccionen amb la *TRF1-interacting nuclear factor 2* (TIN2), la *POT1- and TIN2-interacting nuclear protein 1* (TPP1), i la *repressor and activator protein 1* (RAP1) (O’Sullivan i Karlseder, 2010; Bolzán i Bianchi, 2006). El complex shelterina però, és una estructura dinàmica, ja que hi interaccionen altres factors i complexos cel·lulars que complementen les funcions dels elements que formen d’aquest complex (vegeu Palm i De Lange, 2008).

La principal funció del complex shelterina és evitar que la maquinària de reparació del DNA reconegui els extrems dels cromosomes com a DSBs (Sfeir i De Lange, 2012), preservant-ne així la seva integritat, i protegint-los de la degradació, recombinació i/o fusió. De fet, s’ha pogut demostrar que la presència de les proteïnes del complex shelterina poden impedir que la cèl·lula entri en estat de senescència replicativa tot assolir una longitud telomèrica crítica (Karlseder, *et al.*, 2002), mentre que la seva absence provoca un descontrol total de l’estabilitat genòmica cel·lular degut a les fusions que es produeixen entre extrems de diferents cromosomes (Sfeir i De Lange, 2012). Així doncs, la protecció proporcionada pel complex shelterina és especialment important ja que, en funció del context en què es trobi la cèl·lula, l’alteració de la integritat telomèrica pot desencadenar senescència cel·lular, apoptosis i/o inestabilitat genòmica (revisat per De Lange, 2009); i totes tres conseqüències estan estretament relacionades amb l’aparició de càncer i l’envelleixement (Apunt 4) (Blasco, 2005; O’Sullivan i Karlseder, 2010; Armanios, 2013; Eissenberg, 2013).

1.3.2.2. La telomerasa

Pel que fa al nombre de repeticions telomèriques, existeixen tres estratègies principals per contrarestar-ne l'escurçament degut al “problema de la replicació dels extrems”: la telomerasa (Greider i Blackburn, 1985), la recombinació homòloga – en aquest cas com a *alternative lengthening of telomeres* (ALT) (revisat per Cesare i Reddel, 2010), i la transposició – mecanisme àmpliament descrit en *Drosophila melanogaster*, però no en mamífers (revisat per Webb, *et al.*, 2013). Tanmateix, l’estratègia cel·lular més àmpliament utilitzada i conservada en els organismes eucariotes per mantenir la longitud telomèrica és mitjançant l’activitat de l’enzim telomerasa.

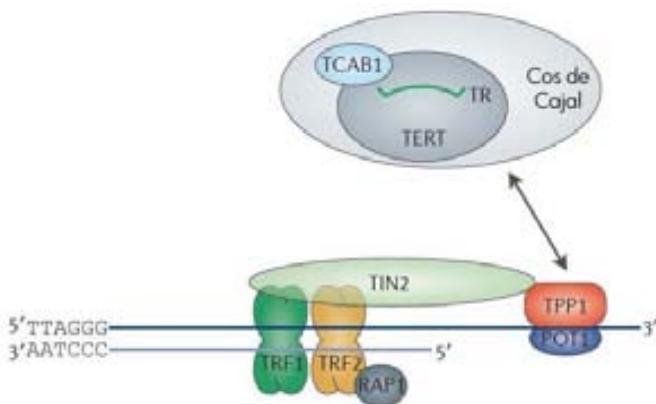


Figura 1.7. Reclutament de la telomerasa als telòmers. Model de reclutament de la telomerasa als telòmers dels vertebrats. Les proteïnes del complex shelterina TPP1 i TIN2 dirigeixen el reclutament de la telomerasa als telòmers, la qual cosa implica un desplaçament de l’enzim des dels cossos de Cajal, on s’hi acumula gràcies a la interacció amb la proteïna TCAB1 (vegeu text), cap als extrems dels cromosomes. Figura adaptada de Nandakumar i Cech (2013).

La telomerasa és una polimerasa especialitzada queafegeix repeticions TTAGGG a l’extrem 3’ dels telòmers (Tomlinson, *et al.*, 2006). És un complex enzimàtic format principalment per una subunitat proteica evolutivament molt conservada (*telomerase reverse transcriptase*; TERT), i per una subunitat RNA de longitud variable en funció de l’espècie (*telomerase RNA*; TR) (Nandakumar i Cech, 2013) (Fig. 1.7), a les que s’hi uneixen altres factors proteïcs indispensables per al seu funcionament (Webb, *et al.*, 2013). En general, l’activitat telomerasa és absent o indetectable en la majoria de tipus cel·lulars diferenciats, es troba en quantitats baixes però detectables a les poblacions de cèl·lules mare adultes, i és especialment present a les cèl·lules mare totipotents, a les cèl·lules tumorals, i a les cèl·lules germinals (Riethman, 2008; Keefe i Liu, 2009; Kim, *et al.*, 1994). No obstant cal destacar la peculiaritat del cas del ratolí, on s’ha detectat expressió de la subunitat TR i alhora activitat telomerasa tan en teixits de nounats (intestí, cervell, ronyó, pulmó i fetge) com en teixits adults (testicle, intestí, fetge, melsa i ronyó) (Blasco, *et al.*, 1995; Chadeneau, *et al.*, 1995; Prowse i Greider, 1995), la qual cosa s’associa a la particular longitud dels seus telòmers.

La subunitat TR proporciona l’RNA molde per a la síntesi del DNA telomèric però, a més, té altres funcions imprescindibles per al bon funcionament del complex enzimàtic com són limitar l’extensió de la transcripció inversa, contribuir a la processivitat de l’enzim, o unir-se a la

subunitat T ERT (Nandakumar i Cech, 2013). La subunitat T ERT és la que té l'activitat transcriptasa inversa. No obstant, recentment se li han atribuït noves funcions independents de l'elongació dels telòmers (revisat per Martínez i Blasco, 2011 i Chiodi i Mondello, 2012). D'una banda, s'ha vist que TERT podria unir-se a altres factors diferents de TR per activar vies reguladores de l'expressió gènica i participar en l'organització de la cromatina i en els mecanismes de resposta contra el dany al DNA (Sharma, *et al.*, 2003; Masutomi, *et al.*, 2005; Park, *et al.*, 2009). De l'altra, se sap que una petita part de TERT es troba als mitocondris, on participa en la resposta contra l'estrés cel·lular, l'apoptosi, i el manteniment de les condicions mitocondrials (Santos, *et al.*, 2006; Ahmed, *et al.*, 2008; Haendeler, *et al.*, 2009). A més a més, s'ha vist que TERT estaria involucrada en funcions relacionades amb la tumorigènesis independents del manteniment de la longitud dels telòmers (Majerská, *et al.*, 2011; Martínez i Blasco, 2011 ; Chiodi i Mondello, 2012). Per exemple, pot promoure el creixement i la proliferació cel·lulars, incrementar la resistència a quimiofàrmacs i estímuls pro-apoptòtics, i contribuir a l'estabilitat de l'estructura telomèrica, incrementant així la vida de la cèl·lula sense allargar-ne els telòmers.

Les interaccions de la telomerasa amb el DNA telomèric i el complex shelterina estan altament regulades i són essencials per a la protecció dels extrems cromosòmics (O'Sullivan i Karlseder, 2010). De fet, diverses proteïnes del complex shelterina, com TRF1, TPP1, POT1 i TIN2, participen activament en el reclutament de la telomerasa als telòmers, en la seva activació i contribueixen a la seva processivitat (Fig. 1.7) (Nandakumar i Cech, 2013; Webb, *et al.*, 2013). De fet, el complex enzimàtic de la telomerasa, que no es troba associat als telòmers, és reclutada per la *telomere Cajal body protein 1* (TCAB1), a partir de la seva unió amb la subunitat TR (Tycowski, *et al.*, 2009; Venteicher, *et al.*, 2009), per formar part dels cossos de Cajal, uns compartiments subnuclears molt conservats evolutivament i molt abundants en cèl·lules amb elevada activitat transcripcional (Fig. 1.7) (Cioce i Lamond, 2005). D'altra banda, TPP1 facilita l'associació de la telomerasa amb els extrems dels cromosomes (Xin, *et al.*, 2007; Abreu, *et al.*, 2010) i, juntament amb TIN2, és essencial per al seu reclutament als telòmers durant la fase S del cicle (Jády, *et al.*, 2006; Tomlinson, *et al.*, 2006). No obstant, l'activació de l'elongació dels telòmers per part de la telomerasa també estaria regulada per la longitud telomèrica, de manera que la telomerasa elongaria preferentment aquells telòmers que presentin un nombre menor de repeticions telomèriques (Hemann, *et al.*, 2001a; Cristofari i Lingner, 2006).

Donat que en els mamífers – deixant de banda el cas del ratolí – la telomerasa és un enzim que només és present i/o funcional en uns tipus cel·lulars molt concrets, la seva expressió a les cèl·lules somàtiques de l'organisme es considera una situació anòmala, com és el cas de les cèl·lules canceroses (Webb, *et al.*, 2013), en les quals la telomerasa permet que escapa del

procés de senescència replicativa (Apunt 4). Però cal esmentar que la seva deficiència genera també un gran problema per al l'organisme. Determinades mutacions en els síndromes components de la telomerasa s'han relacionat amb molalitats humanes rares d'origen genètic, com la disceratosi congènita (Mitchell, *et al.*, 1999; Vulliamy, *et al.*, 2001) o la fibrosi pulmonar idiopàtica (Armanios, *et al.*, 2007; Tsakiri, *et al.*, 2007). Aquestes malalitats estan associades a telòmers curts i/o dysfunctional s i tots estos presenten una característica fracàs en la capacitat regenerativa dels teixits (com per exemple la medul·la òssia) i hiperpigmentació severa de la pell.

1.3.2.3. TERRA

Els telòmers s'havien considerat tradicionalment regions cromosòmiques transcriptionalment silents, en part degut a que es conocia l'efecte repressor que exerceixen sobre l'expressió gènica en direcció *upstream*, és a dir el TPE (vegeu apartat 1.3.1) (Ottaviani, *et al.*, 2008). Aquest concepte però, ha canviat recentment amb la descoberta que els telòmers es transcriuen produint molècules de l'RNA telomèric anomenat TERRA (Azzalin, *et al.*, 2007) (Fig. 1.8).

Estructura de TERRA

TERRA és un RNA no codificant exclusivament nuclear que és transcrit per la RNA polimerasa II (RNAPII) (Fig. 1.8) (Azzalin, *et al.*, 2007; Schoeftner i Blasco, 2008). La seqüència de les molècules de TERRA inclou una regió complementària a seqüències subtelomèriques diferent en funció del suport telòmer a partir del qual s'hagi transcrit, i una regió complementària a les repeticions telomèriques de la cadena AATCCC d'entre 100 pb i 9 kb, la qual varia amb la longitud dels telòmers (Fig. 1.8) (Azzalin, *et al.*, 2007; Schoeftner i Blasco, 2008; Porro, *et al.*, 2010; Arnoult, *et al.*, 2012; Van Beneden, *et al.*, 2013).

Les molècules de TERRA formen una estructura de quadruplex G a partir de les seves repeticions telomèriques, la qual també forma *in vitro* amb el DNA telomèric (Xu i Komiyama, 2012). A l'extrem 5' TERRA té un cap 7-metilguanosina que el protegeix de la degradació per part de les exonucleases, i l'extrem 3' està poliadenilat en aproximadament un 10% de les molècules de TERRA, les quals corresponen a la fracció associada a la cromatina telomèrica mitjançant interaccions amb les repeticions telomèriques així com amb les proteïnes del complex shelterina (Fig. 1.8) (Deng, *et al.*, 2009b; Porro, *et al.*, 2010). Des del seu descobriment, TERRA ha estat descrit en cèl·lules somàtiques de nombroses espècies incloent-

hi llevats (*Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*) (Luke, *et al.*, 2008; Bah, *et al.*, 2012), pl antes (*Arabidopsis thaliana*) (Vrbsky, *et al.*., 2010), peixos (*Danio rerio*) (Schoeftner i Blasco, 2009), mamífers (*Mus musculus* i *Homo sapiens*) (Azzalin, *et al.*, 2007; Schoeftner i Blasco, 2008), i fins i tot existeixen treballs anteriors (Morcillo, *et al.*, 1988 ; Rudenko i Van der Ploeg, 1989; Solovei, *et al.*, 1994) que indiquen l'existència de transcripció telomèrica en tripanosomes, dípters i aus. No obstant, la majoria d'estudis sobre l'estructura, funció i regulació de TERRA s'han dut a terme en línies cel·lulars d'origen humà.

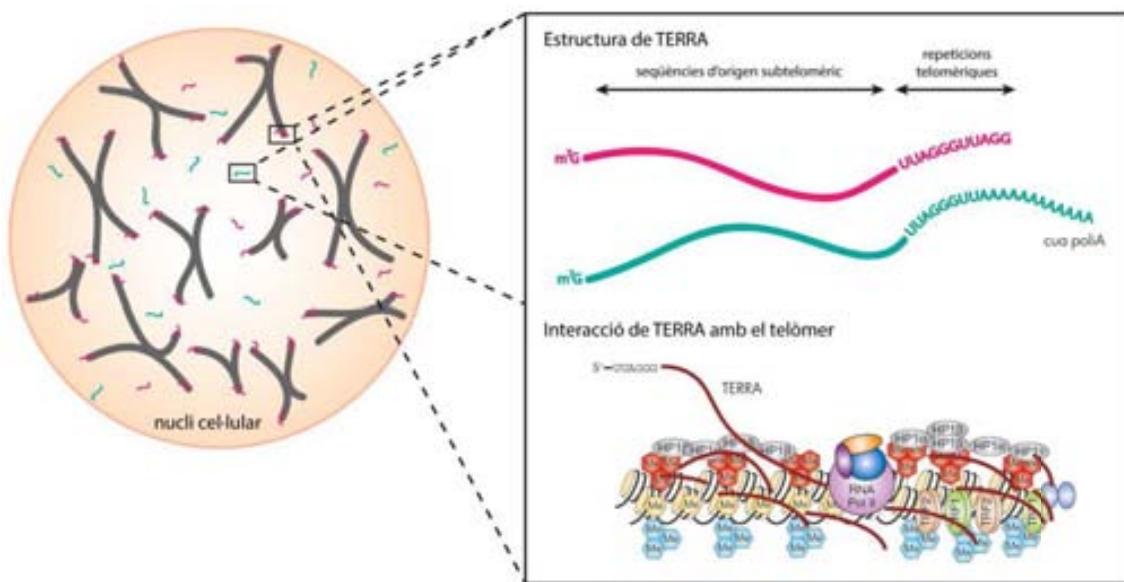


Figura 1.8. Estructura i distribució nuclear de les molècules de TERRA i interacció amb l'estructura telomèrica. Esquema de la distribució nuclear de TERRA (panel esquerre) i de la seva estructura i interacció amb els telòmers (panel dret). Les molècules de TERRA poliadénilades (en verd) es mostren lliures dins el nucli cel·lular, contràriament a les molècules de TERRA sense cua poliA (en granat), les quals interactuen amb els extrems dels cromosomes (en gris). A l'esquema de l'interacció de TERRA amb el telòmer, adaptat de Schoeftner i Blasco (2008), les molècules de TERRA interactuen amb el DNA telomèric, seqüències subtelomèriques (encara per demostrar), i amb la RNAPII (en blau, lila i groc). Les línies negres indiquen el DNA enrollat a voltant dels nucleosomes (en blau), els quals presenten diferents marques heterocromàtiques com metilacions (groc) i trimetilacions (blau i vermell), així com l'associació de variants de la proteïna heterocromàtica HP1 (gris) (per més informació vegeu apartat 1.3.1).

Regulació i funció de TERRA

La RNAPII transcriu TERRA a partir d'una seqüència promotora que en humà es troba a l'subtelòmer, i que està formada per seqüències riques en dinucleòtids CpG (anomenades illes CpG) i elements de DNA repetitiu (Nergazde, *et al.*, 2009) (Fig. 1.9). L'activitat del promotor de TERRA en humans, varia en funció dels requeriments de cada telòmer (Deng, *et al.*, 2012a; Hijssen, *et al.*, 2013), i està regulada per la metilació repressiva de les illes CpG, marques repressives en histones i elements que participen en l'organització de l'heterocromatina telomèrica (vegeu apartat 1.3.1) (Yehezkel, *et al.*, 2008; Caslini, *et al.*, 2009;

Nergazde, *et al.*, 2009; Deng, *et al.*, 2009b; Deng, *et al.*, 2010; Arnoult, *et al.*, 2012; Scheibe, *et al.*, 2013).

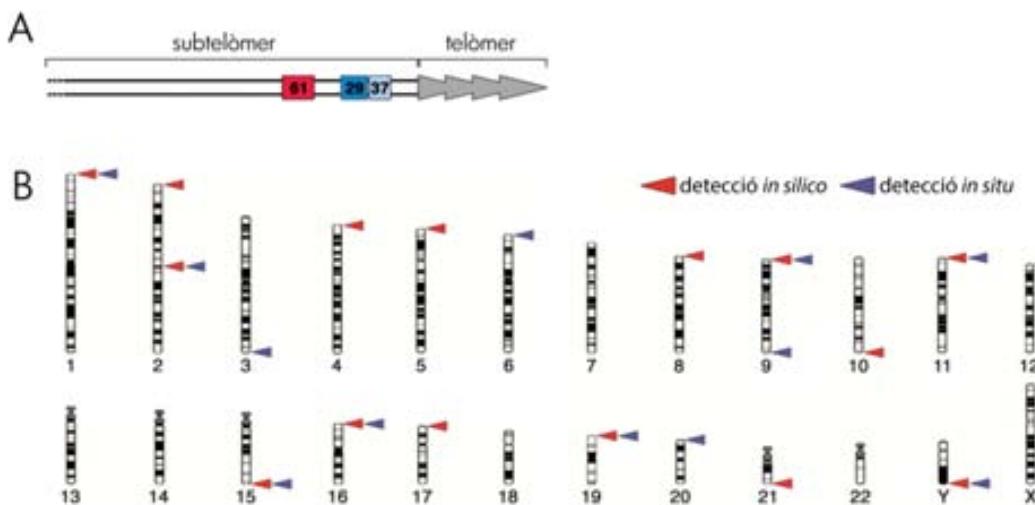


Figura 1.9. Promotor de TERRA en humà i distribució cromosòmica. (A) El promotor de TERRA en humà està format per tres seqüències repetitives de la regió subtelomèrica: una de 61 nt (vermell), una de 29 nt (blau fosc) i una altra de 37 nt (blau clar). (B) Mitjançant un àlisi per BLAST (caps de fletxa vermells) d'una banda, i experiments d'hibridació (caps de fletxa blaus) de l'altra, la seqüència del promotor de TERRA ha estat identificat a les regions subtelomèriques de la majoria dels cromosomes humans. Adaptat de Nergazde, *et al.* (2009).

Des del punt de vista cel·lular, els nivells de TERRA depenen de característiques específiques de la cèl·lula com són el seu grau de diferenciació o la fase del cicle cel·lular en què es troba. En particular, els nivells de TERRA són superiors en cèl·lules indiferenciades (Marion, *et al.*, 2009; Yehezkel, *et al.*, 2011), durant el cicle cel·lular assoleixen el seu màxim a l'inici de G₁ i el seu mínim durant la fase S (Porro, *et al.*, 2010; Redon, *et al.*, 2013), i incrementen com a resposta a episodis d'estrès cel·lular (Schoeftner i Blasco, 2008; Arora, *et al.*, 2012) o amb l'avanç de l'estadi tumoral (Schoeftner i Blasco, 2008; Sampl, *et al.*, 2012). En canvi, queden encara moltes qüestions per resoldre pel que fa a la regulació de la localització i distribució de TERRA dins el nucli. S'ha vist, per exemple, que factors cel·lulars que pertanyen al mecanisme de control de qualitat de mRNA (anomenat *nonsense-mediated RNA decay*, NMD), així com la poliadensilació de l'extrem 3' de les molècules de TERRA desafavoririen l'associació de les molècules de TERRA amb els telòmers (Azzalin, *et al.*, 2007; Porro, *et al.*, 2010). En canvi, els telòmers curts i la telomerasa promourien el reclutament de TERRA als extrems dels cromosomes (Cusanelli, *et al.*, 2013). No obstant, en tots els casos la rellevància d'aquests mecanismes encara està per descobrir.

Donat que TERRA es transcriu a partir dels telòmers, la primera funció que se li va atribuir és la d'element integrant de l'estructura telomèrica (Fig. 1.8). D'una banda, les analisis mitjançant RNA-FISH han revelat que TERRA, un cop transcrit, efectivament es localitza amunt dels telòmers (Azzalin, *et al.*, 2007; Schoeftner i Blasco, 2008; Arora, *et al.*, 2012; Farnung, *et al.*,

2012). De l'altra, experiments d'espectrometria de masses han demostrat que TERRA s'associa a proteïnes del complex shelterina com TRF1 o TRF2 (Deng, *et al.*, 2009b; López de Silanes, *et al.*, 2010; Biffi, *et al.*, 2012; Scheibe, *et al.*, 2013). No obstant, aquests darrers estudis indiquen també que TERRA s'associa a d'altres factors relacionats amb el manteniment de l'estructura telomèrica, de manera que sembla que TERRA no només formaria part del telòmer sinó que la seva funció aniria més en llà. De fet, el perquè de la transcripció dels telòmers en molècules d'RNA no codificants és una de les qüestions que s'han mantingut en debat aquests últims anys. Per exemple, existeixen nombrosos estudis sobre l'efecte de la sobre-regulació o de s-regulació dels nivells de TERRA sobre el telòmer. La disminució dels nivells de TERRA (Deng, *et al.*, 2009b; Deng, *et al.*, 2012a) o l'alteració de les proteïnes associades a TERRA (López de Silanes, *et al.*, 2010) provoca dany en el DNA telomèric. Però la inducció de la transcripció de TERRA bé sigui mitjançant la depleció de proteïnes del mecanisme NMD (Azzalin, *et al.*, 2007), bé a partir de promotores de TERRA artificialment induïbles (Pfeiffer i Lingner, 2012) provoca la pèrdua de repeticions telomèriques. De fet, cèl·lules que presenten constitutivament una reducció anòmala de la longitud telomèrica, com ara cèl·lules tumorals de ratolí (Deng, *et al.*, 2012b) o cèl·lules del síndrome humà d'immunodeficiència, i nestabilitat de la regió centromèrica i anomalies facials (més conegut com síndrome ICF) (Yehezkel, *et al.*, 2008), mostren nivells cel·lulars de TERRA marcadament elevats. En conseqüència, sembla evident que TERRA participaria en la regulació i/o el manteniment de l'estructura dels telòmers, però probablement per així de senvolupament d'aquesta funció cal també una a curada regulació dels seus propis nivells cel·lulars.

En nombroses ocasions s'ha proposat que TERRA exerciria una regulació directa sobre la longitud dels telòmers. D'una banda, estudis recents en llevats (Balk, *et al.*, 2013; Pfeiffer, *et al.*, 2013) suggeren que TERRA estaria relacionat pròpiament amb la regulació *in situ* de la replicació dels telòmers, o bé formant d'híbrids DNA-RNA i/o regulant l'activitat de l'exonucleasa que genera la cua G dels telòmers (Pfeiffer i Lingner, 2012). Però la qüestió que genera més controvertència és la teoria proposada inicialment per Schoeftner i col·laboradors (2008) sobre la possible inhibició de la telomerasa mitjançant la unió de TERRA a les seves subunitats TR i TERT. A favor d'aquesta teoria, hi ha estudis que han demostrat que oligonucleòtids que contenen la seqüència UUAGGG de TERRA tenen la capacitat d'inhibir l'activitat de la telomerasa *in vitro* (Schoeftner i Blasco, 2008; Redon, *et al.*, 2010; Redon, *et al.*, 2013). Alhora, alguns autors han descrit una correlació negativa dels nivells cel·lulars de TERRA tant amb la longitud dels telòmers (Yehezkel, *et al.*, 2008; Marion, *et al.*, 2009; Arnoult, *et al.*, 2012; Yehezkel, *et al.*, 2011), com amb l'expressió de la telomerasa durant el cicle cel·lular (Porro, *et al.*, 2010; Redon, *et al.*, 2013). De fet, l'activitat telomerasa és màxima durant la fase S (Tomlinson, *et al.*, 2006), contràriament als nivells de TERRA (Porro, *et al.*,

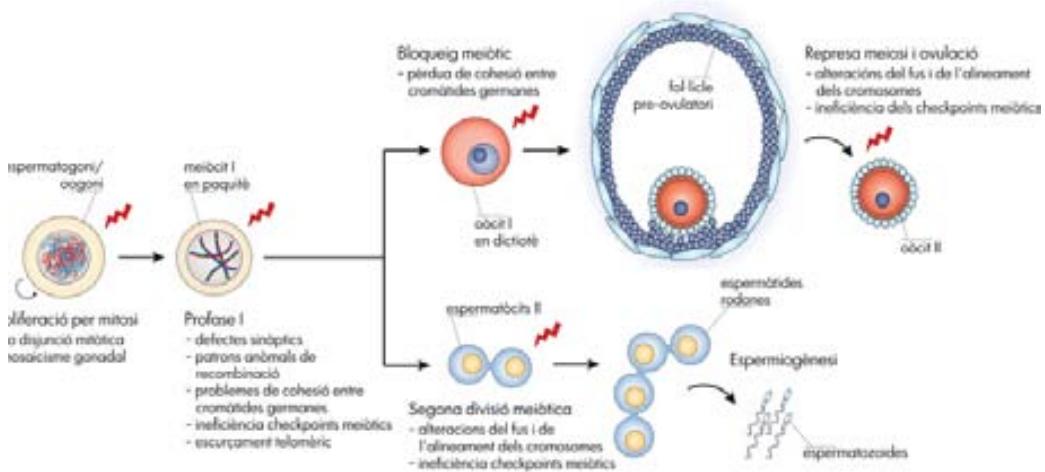
2010). No obstant, recentment s'han publicat resultats en un sentit totalment oposat (Farnung, *et al.*, 2012; Smirnova, *et al.*, 2013): Smirnova i col·laboradors (2013), no van trobar relació entre els nivells de TERRA i la longitud telomèrica de diverses línies cel·lulars tumorals humanes. En el mateix sentit, Farnung i col·laboradors (2012), van proporcionar evidències de que l'elongació d els telòmers per part de la telomerasa no es veu afectada pels canvis en la transcripció de TERRA, i alhora l'escurçament dels telòmers és independent de la inhibició de la telomerasa per part de TERRA. De fet, l'estudi més recent al respecte (Cusanelli, *et al.*, 2013), dut a terme en llevats, suggereix que la transcripció de TERRA seria un senyal emès pels telòmers massachusetts, a l'hora que serviria per regularitzar la telomerasa a aquells telòmers mitjançant la formació de clústers TERRA-telomerasa. Per tant, tot i que sembla que TERRA tindria la capacitat d'associar-se a la telomerasa (Redon, *et al.*, 2010) – probablement degut a la complementarietat de les seqüències de TERRA i de l'RNA motlle de la subunitat TR –, la funció d'aquesta possible associació encara no està resolta.

1.3.3. Els telòmers en la línia germinal

A les cèl·lules germinals, els telòmers són una estructura fonamental ja que no només tenen la funció de protegir el DNA cromosòmic de la inestabilitat genòmica, sinó que alhora participen activament en els processos cromosòmics que tenen lloc a les cèl·lules perecursores dels gàmetes. Tal com hem explicat, el comportament més característic i també més conegut dels telòmers durant la gametogènesi és la seva unió amb l'embolcall nuclear durant la profase I (Apunt 1). Tot i que aquest fenomen no és exclusiu de la meiosi (Ludérus, *et al.*, 1996; Molenaar, *et al.*, 2003; Pandita, *et al.*, 2007), és especialment important en aquest procés ja que recentment s'ha vist que és imprescindible tant per a la sinapsi entre homòlegs com per a la correcta resolució dels COs (Link, *et al.*, 2013). De fet, l'associació dels telòmers a l'embolcall nuclear es produeix tant a pre-leptotè (Fig. 1.4), com per a la formació del *bouquet* (Apunt 1). Concretament, ja durant l'etapa de pre-leptotè els telòmers s'uneixen a l'embolcall nuclear, facilitant així la cerca entre els homòlegs i promovent la iniciació del aparellament entre aquests a les regions subtelomèriques (Boateng, *et al.*, 2013). Aquest aparellament telomèric es manté durant l'entrada de la cèl·lula a profase, quan l'aparellament inicial entre les seqüències no telomèriques es perd probablement per evitar associacions i entrelaçaments no desitjats entre cromosomes. Després, tal i com s'explica a l'Apunt 1, l'agrupació dels telòmers a l'inici de la profase formant el del *bouquet* promou altre cop l'alineació i aparellament entre cromosomes homòlegs.

Apunt 5. L'origen multifactorial de les aneuploidies en l'espècie humana

Determinades circumstàncies, com la ineficiència dels *checkpoints* meiòtics o el llarg període de latència que pateix l'oòcit durant la seva formació, fan que la majoria d'estudis sobre la infertilitat humana coincideixin en la disruptió de la primera divisió meiòtica de l'oòcit com a principal font de gàmetes aneuploïdes, la qual cosa va estretament lligada a l'edat materna. Per exemple, en ratolins masculs l'abolició de proteïnes esencials per als processos de síntesi i recombinació comporta la interrupció de la gametogènesi, mentre que en les femelles oòcits aneuploïdes poden complementar la seva maduració i ser fecundats (Edelmann, *et al.*, 1996; Woods, *et al.*, 1999; Yuan, *et al.*, 2000; Celeste, *et al.*, 2002; Yuan, *et al.*, 2002). Alhora, com més gran és la mare més llarg és el període de dictiotí que han patit els oòcits ovulats que han donat origen al zigot, la qual cosa s'aniria en detriment de la cohesió entre cromàtides germanes, ja que perdrien estabilitat donant lloc a una separació prematura d'aquestes (Lamb, *et al.*, 1997; Wolstenholme i Angell, 2000). Cal tenir en compte però, que l'alteració d'altres punts del procés de gametogènesi, en molts casos, tindrien com a conseqüència el mateix resultat, i que determinades aneuploidies fins i tot són més freqüentment d'origen patern, com és el cas de la trisomia XYY (Egozcue, *et al.*, 2000a; Hassold, *et al.*, 2007).



Tant els factors genètics (Martin, 2008; Matzuk i Lamb, 2008) com els ambientals (Kaufman i Bain, 1984; Hunt, 1987; Zenges, *et al.*, 1995; Robbins, *et al.*, 1997; Sharpe i Franks, 2002; Brieño-Enríquez, *et al.*, 2011; revisió de Ruiz-Herrera, *et al.*, 2012; Anderson, *et al.*, 2008), poden exercir un fort impacte en els diferents esdeveniments i processos que conformen la gametogènesi, tan si és femenina com masculina. La figura mostra diversos exemples de com l'acció d'aquests factors pot provocar lesions en múltiples etapes del procés, les quals, a més, serien acumulatives. Això posa de manifest la importància de considerar tots aquests punts sensibles per tal de poder identificar la/s possible/s causa/es que condueixen a l'aparició d'un fenotip infèrtil. Figura adaptada de Hassold i Hunt (2009) i Li i Albertini (2013) a partir d'informació extreta de Egozcue, *et al.* (2000b), Hassold, *et al.*, (2007) i Nagyoka, *et al.*, 2012. Els llampes en vermell assenyalen punts clau de la gametogènesi susceptibles de resultar danyats per agents externs.

L'alteració de l'estructura del telòmer i/o de la seva longitud comprometen seriosament tant els gàmetes com els seus processos de formació, la qual cosa està íntimament relacionada amb la senescència reproductiva així com amb la infertilitat i la generació de gàmetes aneuploïdes (Apunt 5) (revisat per Keefe, *et al.*, 2006; Hanna, *et al.*, 2009; Thilagavathi, *et al.*, 2012). De fet, un elevat nombre d'estudis han relacionat l'escurçament telomèric anòmal amb diversos durant la gametogènesi, apoptosis de les cèl·lules germinals i reducció de la fertilitat (Hemann, *et al.*, 2001b; Liu i Keefe, 2002; Liu, *et al.*, 2002a; Treff, *et al.*, 2011; Turner i Hartshorne, 2013;

Thilagavathi, *et al.*, 2013a; Thilagavathi, *et al.*, 2013b; Ferlin, *et al.*, 2013). Resultats obtinguts en ratolins *knock out* (KO) per el gen TR de la telomerasa (Liu, *et al.*, 2002a; Liu, *et al.*, 2004) indiquen que quan els telòmers assoleixen una longitud crítica, es produeixen defectes en la sinapsi i recombinació entre homòlegs, així com en la formació del fus meiòtic. A més, els seus espermatozoides presenten una evada fragmentació del DNA i manifesten problemes en el procés de fecundació, i fins i tot s'han observat alteracions dels primers estadios del desenvolupament embrionari (Liu, *et al.*, 2002b; Rodríguez, *et al.*, 2005). En humà, s'ha vist que els oòcits II aneuploides tendeixen a presentar telòmers més curts que els euploides (Treff, *et al.*, 2011), alhora que els telòmers d'els oòcits procedents de dones amb abortaments recurrents són més curts que els de les dones sense problemes de fertilitat (Thilagavathi, *et al.*, 2013b). De la mateixa manera, s'ha observat una reducció de la longitud telomèrica en els espermatozoides d'homes infèrtils (Thilagavathi, *et al.*, 2013a; Thilagavathi, *et al.*, 2013b; Ferlin, *et al.*, 2013), la qual cosa sembla promoure'n la fragmentació del DNA així com alterar les interaccions que es produeixen entre els seus telòmers (Moskovtsev, *et al.*, 2010; Santiso, *et al.*, 2010).

Tenint en compte el “problema de la replicació dels extrems” durant la mitosi, és necessari que existeixi algun mecanisme per evitar que es produeixi un escurçament excessiu dels telòmers durant les múltiples divisions cel·lulars que es duen a terme al llarg del desenvolupament embrionari i crèixement postnatal d'un organisme. D'una banda, alguns autors afirman que l'elongació dels telòmers es produiria durant les primeres etapes de l'embriogènesi, de manera que s'establiria una longitud telomèrica de partida per al desenvolupament embrionari i fetal subsegüents (Wright, *et al.*, 1996; Wright, *et al.*, 2001; Schaetzlein, *et al.*, 2004; Liu, *et al.*, 2007b). D'altra banda, s'ha vist que els telòmers dels espermatozoides serien més llargs que els de les cèl·lules somàtiques (De Lange, *et al.*, 1990; Allsopp, *et al.*, 1992; Achi, *et al.*, 2000; Tanemura, *et al.*, 2005), per tant hauria d'existir algun mecanisme per allargar els telòmers bé sigui a en les cèl·lules germinals, o bé en les seves precursores.

Una de les teories més acceptades és que la telomerasa és activa durant la gametogènesi, però no existeix un consens pel que fa a el moment i grau d'activació d'aquest enzim. En mascle, tot i algunes discrepàncies (Tanemura, *et al.*, 2005; Turner i Hartshorne, 2013), l'opinió més estesa és que l'activitat telomerasa i la longitud telomèrica estarien inversament relacionades. És a dir, l'activitat telomerasa seria màxima als espermatogonis i disminuiria progressivament al llarg de l'espermatogènesi fins a desaparèixer als espermatozoides. I al mateix temps, la longitud dels telòmers aniria incrementant durant tot el procés fins a ésser màxima als espermatozoides (Wright, *et al.*, 1996; Eisenhauer, *et al.*, 1997; Ravindranath, *et al.*, 1997; Yamamoto, *et al.*, 1999; Achi, *et al.*, 2000; Riou, *et al.*, 2005). No obstant, els estudis duts a terme en ratolí són

molt reduïts i estan centrats en l'estudi d'una soca mutant per a la telomerasa (Hemann, et al., 2001b; Liu, et al., 2004; Tanemura, et al., 2005). En humà, la gran majoria estan restringits a l'anàlisi de mostres senceres de testicle o mostres de semen (espermatozoides) (Baird, et al., 2006; F erlin, et al., 2013 ; Thilagavathi, et al., 2013a; T hilagavathi, et al., 2013b; Turner i Hartshorne, 2013), cosa que dificulta el coneixement i la comprensió dels mecanismes que intervenen en la regulació de la longitud telomèrica al llarg de la gametogènesi en general.

En femella, les diferències entre els estudis que existeixen en relació a la telomerasa i els telòmers en les cèl·lules germinals encara són més marcades. D'una banda, s'han observat resultats contradictoris pel que fa als nivells d'activitat telomerasa als oòcits folliculars (Wright, et al., 1996; Eisenhauer, et al., 1997; Betts i King, 1999; Wright, et al., 2001). De l'altra, sembla que l'activitat telomerasa seria baixa o molt baixa als oòcits en metafase II (Eisenhauer, et al., 1997; Betts i King, 1999; Xu i Yang, 2000; Wright, et al., 2001; Liu, et al., 2007b). La longitud telomèrica dels oòcits ha estat analitzada en comptades ocasions, la majoria de les quals corresponen a estudis realitzats en oòcits humans descartats de procediments de reproducció assistida (Keefe, et al., 2007; Turner i Hartshorne, 2013; Wang, et al., 2013), i només existeix un exemple en ratolí en què es comparen oòcits WT amb oòcits procedents de mutants per a la telomerasa (Liu, et al., 2007b). De la mateixa manera, tampoc no existeix consens entre espècies. Liu i col·laboradors (2007b) observen que els telòmers dels oòcits en metafase II de ratolí són més curts que a les cèl·lules somàtiques. Turner i col·laboradors (2013) en canvi, observen telòmers més llargs als oòcits humans en profase I i metafase II en comparació amb els espermatozoides. Aquesta manca d'acord tant per a l'activitat telomerasa com per a la longitud telomèrica en els oòcits podria venir donada per la diversitat d'espècies model utilitzades (ratolí, rata, vaca, humà), pel tipus d'oòcit utilitzat en cada cas, o també per la metodologia utilitzada. Cal destacar però, que en general el nombre d'estudis sobre aquests dos paràmetres en les cèl·lules germinals són més aviat escassos i poc elaborats. Per tant, avui dia no existeix cap teoria ferma pel que fa al manteniment i/o elongació de la longitud telomèrica de les cèl·lules germinals durant la seva formació.

2. OBJECTIUS

La recerca del nostre grup ha estat dirigida principalment a l'estudi de la gametogènesi en els mamífers per tal d'entendre'n tan el funcionament, com l'origen i les conseqüències dels errors que hi tenen lloc. En la literatura general, l'estudi de la gametogènesi ha estat molt focalitzat a entendre els processos cromosòmics que es produueixen durant la primera profase meiòtica així com els complexos mecanismes hormonals i genètics que permeten i controlen la maduració dels gàmetes al llarg d'aquest procés. En els últims anys, però, ha començat a prendre rellevància la idea de que el manteniment de l'homeòstasi telomèrica seria imprescindible per a la formació de gàmetes euploïdes i viables per al desenvolupament d'un nou individu.

En el moment en què es va plantejar el present estudi, la presència i funcions de l'RNA telomèric no codificant TERRA en la línia germinal eren del tot desconegudes. Alhora, tot i que es coneixia el promotor de TERRA en humans i que existien múltiples estudis describint els mecanismes que regulen l'expressió de TERRA en les cèl·lules d'aquesta espècie, en ratolí aquests mecanismes no havien estat descrits fins al moment. D'altra banda, el paper de la telomerasa durant la progressió de la gametogènesi generava molts interrogants, ja que no existia un consens ni pel que fa a la seva expressió ni a la possible relació entre la seva activitat i el manteniment o elongació de les repeticions telomèriques al llarg d'aquest procés.

En aquest context, l'objectiu principal d'aquest treball ha estat de estudiar l'homeòstasi dels telòmers en les diferents etapes de la gametogènesi, fent especial èmfasi en el paper de TERRA i la telomerasa. Per aquest motiu, utilitzant com a espècies model l'humà i el ratolí, es van definir diversos objectius específics:

1. Identificar i descriure la seqüència promotora de TERRA (en ratolí).
2. Caracteritzar TERRA i la telomerasa en les cèl·lules germinals masculines i femenines de mamífer:
 - 2.1. Posar a punt la combinació de les tècniques d'immunofluorescència i RNA-fluorescent *in situ hybridization* per a la identificació de TERRA a les diferents cèl·lules germinals de mamífer.
 - 2.2. Analitzar la localització i distribució nuclears de TERRA i la telomerasa, així com la seva relació espacial amb els telòmers i entre ambdues molècules.
 - 2.3. Estudiar la possible relació de TERRA i la telomerasa amb la longitud telomèrica de les diferents cèl·lules germinals de mamífer.
3. Analitzar si els paràmetres telomèrics estudiats es veuen afectats a les cèl·lules germinals d'individus de l'espècie humana amb fenotip infètil d'origen desconegut.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. Material biològic

3.1.1. Ovaris fetals humans

Per a l'estudi d'oòcits I humans es van utilitzar ovaris de fetus dins el període gestacional en que els oòcits duen a terme la profase de la primera divisió meiòtica (Taula 3.1.1). Totes les mostres es van obtenir d'interrupcions voluntàries de la gestació realitzades per l'equip mèdic del Departament de Ginecologia i Obstetricia de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron (Barcelona), havent estat cedides pels progenitors so pena de consentiment informat. Així mateix, totes les pràctiques i protocols dutos a terme amb aquestes mostres van ser aprovades pel Comitè Ètic de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron.

Totes les mostres utilitzades (Taula 3.1.1), van ser inicialment processades per l'equip del Departament de Patologia del mateix hospital, es van recollir el mateix dia i seva obtenció en medi de cultiu Dulbecco's *Modified Eagle Medium* (DMEM) i es van transportar al laboratori conservades en fred. El processament de les mostres sempre es va dur a terme dins un màxim de dues hores posteriorment a la seva obtenció.

Taula 3.1.1. Característiques dels fetus dels que es van obtenir els ovaris.

Mostra	Setmanes gestació	Pes (g)	Cariotip	Diagnòstic
V204	22	540	46,XX	Patologia psiquiàtrica
V208	22	626	46,XX	Fissura palatina
V214	22	445	46,XX	Anomalia neurològica congènita
V232	21	390	46,XX	Anomalia neurològica congènita

3.1.2. Biòpsies testiculares humanes

L'anàlisi d'espermatoцитes I humans es va realitzar a partir de biòpsies del testicle humà d'individus adults (Taula 3.1.2) cedides pel Centre de Reproducció Assistida Fecunmed (Granollers). Totes les mostres procedien d'individus que es van sotmetre a una intervenció quirúrgica per problemes de fertilitat o bé per vasectomia, i van ser cedides so pena de consentiment informat. Tots els procediments dutos a terme amb aquestes mostres van ser aprovats pel Comitè Ètic de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Les mostres es van recollir en fresc o bé congelades dins una paületa tèrmosegellada en nitrogen líquid. Les biòpsies recollides en fresc es van transportar conservades en fred en PBS i es van processar abans de les 2h posteriors a l'extracció. Les mostres congelades, es van transportar al laboratori en nitrogen líquid i es van conservar a -80°C fins al seu ús.

Taula 3.1.2. Característiques seminals i reproductives dels donants de les mostres d'biòpsies testiculars humans.

Mostra	Edat	Cariotip	Diagnòstic	Cicles de FIV (Oo _F /Oo _T)	Gestació
C1	48	N.D.	Normozoospermia ^a	N.D.	N.D.
P1	20	N.D.	Criptozoospermia	1 (0/12)	No
P2	34	46,XY	Azoospermia	1 (9/12)	Sí
P3	39	46,XY	Criptozoospermia	0	No
P4	33	46,XY	Oligoastenozoospermia	1 (7/10) ^b	Sí

(N.D.) No disponible

(C) control; (P) pacient infèrtil

(Oo_F/Oo_T) Oòcits fecundats/Oòcits totals

^aPacient vasectomitzat

^bInterrupció de la gestació per cariotip 45X del fetus

Els individus diagnosticats amb problemes de fertilitat, presentaven reducció o bé absència d'espermatozoides per causes desconegudes. En cap cas, es va observar una obstrucció del tracte genital o bé un cariotip anòmal.

3.1.3. Ovaris fetals de ratolí

Per a l'estudi d'oòcits en profase I es van utilitzar els ovaris de tres fetus femella de ratolí de la sèrie C57BL6 a 18-19 dpc. Les femelles gestants, adquirides a Charles River, van ser sacrificades mitjançant intoxicació per CO₂. Els ovaris es van processar immediatament després de l'extracció seguint el protocol descrit a l'apartat 3.4.2.1. Tots els procediments dutos a terme amb aquestes mostres van ser aprovats pel Comitè Ètic de la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.1.4. Testicles de ratolí

El teixit testicular del ratolí adult es va obtenir per dissecció de 3-3 individus de la sèrie C57BL6 d'aproximadament 4 mesos d'edat, adquirits de la colònia de l'estabulari de la

Universitat Autònoma de Barcelona. Tots els testicles es van processar immediatament després de l'extracció i es van congelar en i sopentà a -80°C fins al moment de la utilització. Tots els procediments duts a terme amb aquestes mostres van ser aprovats pel Comitè Ètic de la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.1.5. Cèl·lules HeLa

Les cèl·lules HeLa es van cultivar en condicions estàndard. Es sàdixen en medi DMEM suplementat amb 10% de sèrum boví fetal, 100 U/ml de penicil·lina i 100 mg/ml d'estreptomicina, a 37°C i 5% de CO₂. A l'apartat 3.4.1.1 es detalla el protocol seguit tant per a l'extracció del cultiu de cèl·lules HeLa com per al seu subcultiu.

3.2. Eines bioinformàtiques

Per tal d'identificar les seqüències subtelomèriques candidates a analitzar mitjançant tècniques de biologia molecular, es va dur a terme un estudi *in silico* dels subtelòmers del genoma de ratolí. Els programes utilitzats es detallen, per ordre, a continuació:

1. *Map viewer* del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): Mostra la informació general de la part seqüenciada de cadascun dels cromosomes. Va permetre, identificar els extrems seqüenciats dels cromosomes de ratolí.
2. *Nucleotide basic local alignment tool* (BLAST) del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): Permet a linear una seqüència problemàtica amb un genoma sense localitzar en quins punts es troba. En el nostre cas es va contrastar la seqüència (TTAGGG)₅ amb el genoma de ratolí per tal d'identificar els telòmers dels quals es disposava de seqüència.
3. *Mouse BLAST-like alignment tool* (BLAT) de l'University of California, Santa Cruz (UCSC) Genome Browser (Kent, 2002) (<http://genome.ucsc.edu>): Té la mateixa funció que el BLAST, però proporciona uns resultats més sensibles i a l'hora més limitats i concrets. Es va utilitzar per al primer rastreig, i sobretot per a la posterior localització de les seqüències promotores putatives dins el genoma de ratolí.
4. *Repeat Masker* (<http://www.repeatmasker.org/>): Identifica les regions repetitives dins una seqüència. Per tant, va permetre delimitar la frontera entre les repeticions telomèriques i les subtelomèriques dels subtelòmers seqüenciats.

5. *Cpgplot* de l'European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS) (<http://www.ebi.ac.uk/>): Distingeix i identifica les seqüències riques en dinucleòtids CpG. Amb aquesta eina es va localitzar la presència/absència d'illes CpG als subtelòmers de ratolí.
6. *Neural Network Promoter Prediction* (NNPP) (<http://www.fruitfly.org>): Troba seqüències promotores procariotes i eucariotes basant-se en la cerca de seqüències consens que formen part d'aquests promotores. En el cas dels eucariotes, cerca elements que s'uneixen a la RNAPII com són la *TATA-box* i l'element iniciador (per a més informació vegeu Bajic, *et al.*, 2006 i Sandelin, *et al.*, 2007). A partir d'aquests paràmetres, es va poder identificar seqüències amb putativa activitat promotora dins seqüències problema.
7. AmplifX (<http://crn2m.univ-mrs.fr/>): Es va utilitzar per al disseny de les seqüències encebadores (encebadors o *primers*) per amplificar les seqüències subtelomèriques d'interès, ja que identifica encebadors dins una seqüència problema. També permet provar virtualment l'eficiència d'amplificació d'un parell de encebadors prèviament dissenyats, i alhora indica les propietats de cada encebador (temperatura de fusió, percentatge de CGs, estabilitat de l'extrem 3' i formació de dímers).
8. E@sy Oligo (Sigma-Aldrich): Indica les propietats de les seqüències triades com a encebadors. Amb aquest programa es va contrastar la informació del software AmplifiX en relació als encebadors dissenyats per nosaltres.
9. EnzymeX (<http://nucleobytes.com>): Identifica dianes de restricció dins una seqüència problema. Va permetre trobar dianes de restricció adequades per incloure-les dins les seqüències dels encebadors per a l'amplificació de les seqüències a analitzar, i per comprovar posteriorment els vectors construïts i clonats.

3.3. Tècniques de biologia molecular

Per a la descripció del promotor de TERRA en ratolí es va dur a terme un "assaig per gen reporter" (*reporter gene assay*). És a dir, es va comprovar si determinades seqüències subtelomèriques del genoma de ratolí mostren activitat promotora mitjançant la seva inserció en un vector que conté el que s'anomena un "gen reporter". Els reporters genètics s'utilitzen generalment com a indicadors per a l'estudi de l'expressió gènica o processos cel·lulars associats a questa. Normalment, es clona el gen reporter juntament amb una seqüència de DNA d'interès dins un vector d'expressió que després es transfereix dins de cèl·lules capaces d'expressar aquest gen. Aleshores, en les cèl·lules transfectades s'analitza la presència del gen reporter mitjançant la quantificació del RNA missatger transcrit, o bé a

partir de l'anàlisi directe de la proteïna reportera expressada i/o la seva activitat enzimàtica. Un bon gen reporter, serà aquell que sigui de fàcil identificació i que a lhora s'hi pugui quantificar l'expressió a les cèl·lules o organismes d'interès.

Així doncs, el nostre assaig es basa en la inserció de seqüències subtelomèriques problema dins un vector plasmídic que conté com a gen reporter la *green fluorescent protein* (GFP), una proteïna bioluminescent descrita per primer cop en invertebrats (Chalfie, 1995). Aquest vector, es va clonar mitjançant cèl·lules bacterianes competents d'*E. coli*, i finalment es va transfectar en cèl·lules HeLa. A continuació es descriuen les tècniques utilitzades al llarg de tot el procés de construcció i clonació del vector.

3.3.1. Amplificació de seqüències de DNA per *polymerase chain reaction*

La tècnica de la *polymerase chain reaction* (PCR) es basa en l'amplificació controlada de determinades seqüències de DNA. Per això s'utilitza una DNA polimerasa termostable que és capaç de funcionar a elevades temperatures sense desnaturalitzar-se. Per a que es dugui a terme la reacció de polimerització, la polimerasa requereix: (1) un parell d'encebadors (un per a cada una de les cadenes de DNA) que li serviran de molles per poder iniciar la reacció, (2) dinucleòtids fosfat (dNTPs) per anar-los incorporant a la cadena sintetitzada *de novo*, i (3) un tampó específic per a la polimerasa. La reacció es controla variant la temperatura de la reacció. Per tant, cal conèixer la temperatura óptima d'activitat de la polimerasa, la temperatura óptima d'hibridació dels encebadors amb el DNA (*annealing*), i la temperatura de desnaturalització del complex polimerasa-encebadors-DNA. El protocol de PCR es va utilitzar tant per amplificar les regions d'interès del DNA genòmic de ratolí com per fer la selecció de colònies d'*E. coli* transformades amb el vector d'interès.

Materials

- DNA genòmic o plasmídic
- dNTPs) (Roche)
- Encebadors *forward* (F) i *reverse* (R) (Sigma-Aldrich) (Taula 3.3.1)
- Polimerasa GoTaq (Promega)
- Dimetilsulfòxid (DMSO) (Sigma-Aldrich)
- Tampó per a la polimerasa GoTaq (Promega)
- Aigua miliQ esterilitzada per autoclau
- Termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf)
- Agarosa (Merck)

- Bromur d'etidi (Sigma-Aldrich)
- Tampó Tris-acetate-EDTA (TAE): 40 mM Tris, 20 mM àcid acètic, 1 mM EDTA, pH 8,4

Taula 3.3.1. Seqüències dels encebadors utilitzats per a l'amplificació de les diferents seqüències subtelomèriques analitzades.

Encebador	Seqüència	T° annealing
2qF	atactcgaaCAGGTGGACAGCTCAGAGACA	60°C
2qR	ggtaattCCCTAACCATATTAAACTTCATAGATGT	60°C
5qF	attaagttGCAACTCAACAGAGACACCACT	58/59°C
5qR	atagaattcTTGGTGCCTCACAACTCATC	58/59°C
11qF	ataCTCgAGATGAGCATGTAGACAGCACTGGA	60°C
11qR	attAAGCTTCCTAACCTCTGGGACTTGCAC	60°C
18qF	attAAGCTCCAAGAAAAGATTCCCATGA	58/59°C
18qR	aatGGATCCTCCTTAGAAACTCTCACACTTCA	58/59°C
XqF	attCTCgAGGATACCAATTGGCAGGCAC	60°C
XqR	cttAAGCTTCCATCTGCTGGTTCTGTATTGTC	60°C

Protocol

1. Es prepara la mescla de reacció, preferentment, en el següent ordre:
 - 10 mM dNTPs
 - 100 ng/ml encebadors F i R
 - 1x tampó per la polimerasa GoTaq
 - 5% DMSO
 - Aigua esterilitzada per autoclau fins a un volum final de 25µl
 - 0,75U de polimerasa GoTaq
2. Es programa el termociclador amb la seqüència de temps, nombre de cicles i temperatures determinades en funció dels encebadors utilitzats i de la seqüència a amplificar. El protocol que generalment és va utilitzar és el següent:

3 cicles	2min – 95°C
	1min – 95°C
	1min – T°C*
	Mmin* – 72°C
27 cicles	40s – 95°C
	40s – T°C*
	Mmin* – 72°C
	5min a 72°C

*On (T) correspon a la temperatura òptima d'*annealing* del parell de encebadors i (M) correspon al temps d'elongació de la polimerasa en funció de la longitud de la seqüència a amplificar.

3. Es comproven els resultats de la PCR mitjançant electroforesi en un gel d'agarosa a l'1% en tampó TAE suplementat amb bromur d'etidi (1/25000).

3.3.2. Purificació de DNA

Un mètode molt útil per aïllar un fragment amplificat de DNA és la separació d'aquest fragment mitjançant electroforesi en gel d'agarosa, ja que una cop se parada la banda d'interès, es pot tallar i finalment aïllar mitjançant el protocol de purificació escrit a continuació (A). No obstant, aquest protocol també és útil per eliminar enzims del producte d'una reacció enzimàtica (per exemple una digestió de restricció) quan aquests enzims no es poden inactivar amb calor (B).

Materials

- Mostre: DNA en gel d'agarosa, amplificat per PCR o digerit amb ERs.
- *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega):
 - Solució d'unió a membrana
 - Solució de rentat de membrana
 - Minicolumnes
 - Tubs col·lectors
- Aigua miliQ esterilitzada amb autoclau.

Protocol

1. Preparació de la mostra
 - A. Dissolució del gel d'agarosa
 - i. Es talla la banda d'interès del gel d'agarosa, es pesa i es posa dins un tub eppendorf d'1,5ml.
 - ii. S'afegeix 10µl de la solució d'unió a membrana per cada 10mg de gel. Es mescla en un vòrtex i s'incuba a 50 -60°C fins que el gel estigui completament dissolt.
 - B. Processament de la reacció
 - i. S'afegeix el mateix volum de la solució d'unió a membrana a la reacció.
2. Unió del DNA
 - i. Es col·loca una minicolumna dins un tub col·lector.
 - ii. Es transfereix el gel dissolt o la reacció mesclats amb la solució d'unió a membrana a la minicolumna. S'incuba a TA durant 1min.

iii. Es centrifuga a 16000g durant 1 min. Es d'escarta l'eluït i es posa la minicolumna dins un nou tub col·lector.

3. Rentat

- i. S'afegeix 700µl de la solució d'elutat de membrana. Es centrifuga a 16000g durant 1min. Es descarta l'eluït i es posa la minicolumna en un nou tub col·lector.
- ii. Es repeteix el pas anterior amb 500µl de solució de rentat de membrana. Es centrifuga a 16000g durant 5min.
- iii. Es buida el tub col·lector i es torna a centrifuguar la columna durant 1min sense la tapa del centrifugador per permetre l'evaporació de l'etanol residual.

4. Elució

- i. Es transfereix la minicolumna a un tub eppendorf d'1,5ml.
- ii. S'afegeix el volum desitjat d'aigua miliQ esterilitzada per autoclau a la minicolumna. S'incuba durant 1 min a TA. Es centrifuga a 16000g durant 1min.
- iii. Es descarta la minicolumna i es conserva el DNA a 4°C o -20°C.

3.3.3. Desfosforilació

L'objectiu d'ella desfosforilació d'un vector plasmídic linearitzat mitjançant digestió enzimàtica és impedir-ne la recircularització. És especialment important per obtenir una bona eficiència en una reacció de lligació quan els extrems del plasmidi han estat tallats amb el mateix ER, ja que en aquells casos, els extremos resultants de la digestió són complementaris i podrien recircularitzar enllot d'unir-se a la seqüència a inserir.

Material

- DNA plasmídic digerit
- *shrimp alkaline phosphatase* (SAP; Fermentas)
- Tampó específic per a la SAP (Fermentas)
- Aigua miliQ esterilitzada per autoclau
- Termobloc

Protocol

1. Es prepara la mescla de reacció:
 - 1U/ μ g SAP
 - 1x tampó específic per la SAP
 - Aigua miliQ esterilitzada per autoclau fins a un volum final de 20 μ l
2. S'incuba 1h a 37°C
3. S'atura la reacció incubant la mescla 15min a 65°C

3.3.4. Lligació

La reacció de lligació serveix per inserir seqüències de DNA d'interès en una localització concreta d'una altra seqüència de DNA, per exemple d'un vector plasmídic prèviament linearitzat mitjançant la digestió amb ERs.

Material

- DNA amplificat i digerit
- DNA plasmídic digerit (vector pQL2; Fig. 3.3.4)
- DNA lligasa T4 (Promega)
- Tampó de lligació (Promega)
- Aigua miliQ esterilitzada per autoclau

GCACTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTTATTTCTAAATACATT
 CAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTATAATGCTCAATAATATTGAA
 AAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTCGTGTCGCCCTATTCCCTTTTGC
 GGGCATTTCCTGTTTGCTCACCCAGAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTG
 AAGATCAGTGGgtgcacGAGTGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGTAAGA
TCCTTGAGAGTTTCGCCCCGAAAGAACGTTTCCAATGATGAGCACTTTAAAGTTC
TGCTATGTGGCGGGTATTATCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCC
GCATACACTATTCTCAGAACATGACTGGTGAGTACTCACCAAGTCACAGAAAAGCATC
TTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCAGTAGTGATA
ACACTGCGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTT
TTTGCACACATGGGGATCATGTAACTCGCCTGATGTTGGAACCGGAGCTGA
ATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAA
CGTTGCGCAAACATTTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTCCGGCAACAAATTAA
TAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAAGGACCACTTCTCGCCTCGGCCCTCCGG
CTGGCTGGTTATTGCTGATAAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCA
TTGCAGCACTGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCGTATCGTAGTTACACGACGG
GGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCAC
TGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTACTCATATATACTTAGATTGATT
AAAAACTTCATTTAATTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTGATAATCTCA

TGAccaaaatccctaacgtgagtttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaa
 agatcaaaggatcttcttgagatccttttctgcgcgtaatctgctgctgc当地
 caaaaaaaaccaccgctaccagcggtggttgcggatcaagagctaccaactc
 ttttccgaaggtaactggctcagcagagcgcagataccaaatactgtcctctag
 tgtagccgttagttaggccaccactcaagaactctgttagcaccgcctacatacctcg
 ctctgctaattctgttaccagtggctgcccagtggcgataagtcgtgtcttaccg
 ggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctgaacgggg
 gttcgtgcacacagccagttggagcgaacgacactacaccgaactgagataacctac
 agcgtgagctatgagaaagcgccacgctccgaagggagaaaggcggacaggtatc
 cggtaaggcggcagggtcggAACAGGAGAGCgcacgagggagttccagggggaaacg
 cctggtatctttatagtcctgtcgggttgcacacttgacttgagcgtcgatTTT
 tgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgcgcagcaacgcggccTTT
 TACGGTTCCTGGCCTTTGCTGGCCTTGCTCACATGTTCTTCCTGCGTTATCCC
 CTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTGAGTGAGCTGATACCGCTGCCGCA
 GCCGAACGACCAGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAAATAC
 GCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAGCAGCTGGCACGACAGGT
 TTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGAACGCAATTAGTGTAGTTAGCTCACTC
 ATTAGGCACCCCAGGCTTACACTTATGCTTCCGGCTGTATGTTGTGGAATTG
 TgagcggataacaattcacacaggaaacagctatgaccatgATTACGCCAAGCTCG
 AAATTAACCCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGTACCGGGCCCCCTCGAGctcAA
 GCTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGGGGCCGGATCCACCGGTCGCCAccat
 ggTGAGCAAGGGCGAGGAGCTTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTGAGCTGGA
 CGCGACGTAAACGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCAC
 CTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCAACCGCAAGCTGCCGTGCCCTG
 GCCCACCCCTCGTACCGACCCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGTACCCGA
 CCACATGAAGCAGCACGACTTCTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGA
 GCGCACCATCTTCAAGGACGGACGGCAACTACAAGACCCGCGCAGGGTGAAGTT
 CGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGATCGACTCAAGGAGGA
 CGGCAACATCCTGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGTCTATAT
 CATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACAT
 CGAGGACGGCAGCGTGCAGCTGCCGACCAACTACCAAGCAGAACACCCCCATCGCGA
 CGGCCCGTGTGCTGCCGACAACCAACTACCTGAGCACCCAGTCCGCTGAGCAA
 AGACCCCAACGAGAACGCGATCACATGGCCTGCTGGAGTCGTGACCGCCGCGG
 GATCACTCTGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGCCGCGActctagaTCATA
 ATCAGCCATACCACATTGTAGAGGTTTACTGCTTAAAAAACCTCCCACACCTC
 CCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTAACTGTTATTGCA
 GCTTATAATGGTTACAAATAAGCAATAGCATCACAAATTCAAAATAAGCATTT
 TTTTCACTGCATTCTAGTTGTTGCTCAAACCTCATCAATGTATCTTAAGGCGTA
 AATTGTAAGCGTTAATATTTGTTAAATTCGCGTAAATTGTTAAATCAGCTC
 ATTTTTAACCAATAGGCCAACATCGGAAAATCCCTATAAATCAAAGAATAGAC
 CGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGT
 GGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACGATCCAG
 ACATGATAAGATACTGATGAGTTGGACAAACCACAACCTAGAAATGCAGTGAAAAA
 AATGCTTATTGTAAGGAGGTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATT
 GCAATAAACAGTTAACAAACAATTGCATTCAATTGTTATGTTCAAGGTTGAGGGGG
 AGGTGTGGGAGGTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATT
 ATGATCCTCTAGAGTCGGTGGCCTCGGGGGCGGGTGCAGGGTCAAGGGGCC
 GGGTCGGCTCGGTAGGAGGccatggGGTCGTGCGCTCCTTCGGTCAGGGCGCTGCGG

GTCGTGGGCGGGCGTCAGGCACCGGGTTGCAGGTATGCACCAGGTGCGCGGTCC
 TTGGGCACCTCGACGTCGGCGGTGACGGTGAAGCCGAGCCGCTCGTAGAAGGGGAG
 GTTGCAGGGCGGGAGGTCTCAGGAAGGCGGGCACCCGGCGCTCGCCGCTC
 CACTCCGGGAGCACGACGGCGTGCAGGCCAGACCTTGCCCTGGTGGTGGCGAGAC
 GCCGACGGTGGCCAGGAACCACGCCGGCTCCTGGCCGGTGCAGGCCAGGAGGCC
 TTCCATCTGTTGCTGCGCCAGCCGGAACCGCTCAACTCGGCATGCGCGGCC
 GATCTCGCGAACACCGCCCCCGCTTCAGCAGCTCTCCGGCGTGGTCCAGACCGCAC
 CGCGCGCCGCGTCCCGACCCACACCTGCGATGTCAGGCCGACGCGCGTGG
 GAAGAGTTCTGAGCTCGGTGACCCGCTCGATGTCAGGCCGACGGTGTG
 GCGCGTGGCGGGTAGTCGGCGAACGCGGGCAGGGTGCACGGCCGGGAGC
 GTCGTGCGGGTGGCGAGGCGCACCGTGGCTGTACTCGGTCACTGGTGTCT
 CCTTGAGGGTCAGGGCGTGGTCAGGGATGGTGGCGCACCGGTGTCGGCG
 CCGACCTGCAGGCATGCAAGCTAGCTTTGAAAGCCTAGGCCTCCAAAAAGCC
 TCCTCACTACTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCCTGCATAAAAT
 AAAAAAAATTAGTCAGGcatggGGCGGAGAATGGGCGgaactgggcggagtttagggG
 CGGGATGGCGGGAGTTAGGGCGGGACTATGGTGTGACTAATTGAGATGCATGCT
 TTGCATACTTCTGCCTGCTGGGAGCCTGGGACTTCCACACCTGGTGTGACTA
 ATTGAGATGCATGCTTGCAACTCTGCCTGCTGGGAGCCTGGGACTTCCACA
 CCCTAACTGACACACATTCCACAGGGCTTCCCCGTCAGCTCTAAATGGGGCTC
 CCTTAGGGTCCGATTAGTGCCTACGGCACCTCGACCCAAAAACTTGATTAG
 GGTGATGGTCACGTAGTGGCCATGCCCTGATAGACGGTTTCGCCCTTGACG
 TTGGAGTCCACGTTCTTAATAGTGGACTCTGTTCCAAACTGGAACAAACACTCAAC
 CCTATCTCGGTCTATTCTTGATTATAAGGGATTTGCCGATTCGCCCTATTGG
 TTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAATTAAACGCGAACCTAACAAATTAAACG
 CTTACAATTAGGTG

Figura 3.3.4. Seqüència del vector pQL2. El vector pQL2 conté una seqüència de resistència a l'ampicil·lina (en vermell), i de resistència a puromicina (en blau), el gen de la GFP (en verd), un origen de replicació (subratllat) i un multicolonin site (en groc).

Protocol

1. Es prepara reacció de lligació a partir de la fórmula: $\frac{\text{ng pQL2} \cdot \text{kb insert}}{\text{kb pQL2}} \cdot \frac{3}{1} = \text{ng insert}$

La mescla de reacció conté:

- DNA plasmídic (vector pQL2; Fig. 3.3.4)
- Seqüència de DNA a inserir
- Lligasa T4
- 1x tampó de lligació
- Aigua miliQ esterilitzada per autoclau fins a un volum final de 10μl

2. S'incuba tota la nit (*overnight*; ON) a 4°C.

3.3.5. Digestió enzimàtica

Elsenzims de restricció (ERs) sónenzims bacterians que reconeixen i tallen seqüències específiques d'entre 4 i 8 parells de bases (pb), anomenades llocs de restricció. La digestió de DNA a partir d'ERs es va dur a terme per a diferents passos del procés experimental: (1) per digerir el vector i els diferents fragments subtelomèrics amplificats per PCR de manera que tinguessin extrems complementaris, (2) per linearitzar els plasmidis peròviament a la transfecció, i (3) per comprovar que el plasmidi contenia l'insert esperat.

Material

- ERs (Taula 3.3.2)
- Tampó adequat per a l'ER (Taula 3.3.2)
- Aigua miliQ esterilitzada per autoclau
- Termobloc

Taula 3.3.2. Condicions i casa comercial de cadascun dels ERs utilitzats en aquest protocol.

ERs	Casa comercial	Tampó ^a	Casa comercial
Bam HI	Fermentas	TB	Roche
Eco RI	Fermentas	TH/TB	Roche
Hind III	Boehringer Manheim	TB (TH 75%)	Roche
Nde I	Fermentas	TH	Roche
Pst I	Fermentas	TH	Roche
Xho I	Roche	TH (TB 75%)	Roche
Sca I	Fermentas	específic per Sca I	Fermentas

(a) Tots els tampons excepte els indicats proporcionen un rendiment del 100% per a cadascun delsenzims.

Protocol

1. Es prepara en un tub eppendorf de 0,5 ml la mescla de reacció:
 - DNA a digerir
 - 5U enzimàtiques per μg ($\text{U}/\mu\text{g}$) d'ER
 - Tampó específic per cada ER
 - Aigua miliQ fins a 25 μl
2. S'incuba un mínim de 3h a 37°C.

3.3.6. Transformació de cèl·lules competents d'*E.coli*, selecció de colònies transformades i cultiu bacterià

La transformació de cèl·lules d'*E.coli* és el mètode més utilitzat per a la clonació de seqüències de DNA, ja que la seva inserció dins el plasmidi és relativament senzilla i, alhora, són una espècie de bacteris que creix ràpidament i no requereix condicions de cultiu complexes. Generalment, els plasmidis que s'utilitzen per a la clonació han estat optimitzats per a aquest ús. La majoria tenen una longitud menor de la que es troba a la natura, i estan formats bàsicament per un origen de replicació, un gen de resistència a un antibòtic concret i una regió amb diferents dianes d'estracció on s'hi pot inserir una seqüència de DNA exogen (*multicloning site*) (per a un exemple vegeu Fig. 3.3.4). Cal esmentar, que un pas important en l'optimització de l'obtenció del vector clonat va ser el cultiu de les cèl·lules d'*E.coli* a una temperatura més baixa de la óptima per a seu creixement exponencial màxim, és a dir, a 30°C. D'aquesta manera, es fa alentir el creixement d'aquestes cèl·lules i el funcionament del seu metabolisme en general, la qual cosa feia que la replicació del vector dins les cèl·lules es produís més lentament i fos més fidedigna, reduint així el nombre de falsos positius.

Material

- Cèl·lules competents d'*E. coli* de la soca DH5 λ (congelades a -80°C amb glicerol al 20%)
- Reacció de lligació (vector amb insert desitjat)
- Medi de cultiu no selectiu *super optimal broth* (SOB: 2% triptona, extracte de llevat 0,5%, 10mM NaCl, KCl 2,5mM, 10mM MgSO₄)
- Medi selectiu *lysogeny broth* (LB: 5g/l extracte de llevat, 10g/l triptona, 10g/l NaCl)
- Per al cultiu en placa, es suplementa el medi LB amb 15mg/ml d'agar i se'l deixà solidificar en plaques de Petri
- Ampicil·lina (Sigma-Aldrich)
- Gel
- Termobloc
- Incubador amb agitació

Protocol

1. Un cop descongelades les cèl·lules competents d'*E. coli*, s'afegeix 10μl de reacció de lligació per cada 100μl de suspensió de cèl·lules.

2. Per tal que incorporin el plasmidi, se li es su tmet a un xoc tèrmic: s'incuben les cèl·lules bacterianes en gel 20min, a continuació s'incuben a 42°C durant 90s, i finalment s'incuben 2min en gel.
3. Es cultiven en S OB 1h a 30°C en agitació a 250 revolucions per minut (rpm) (precultiu).
4. Es fa un cultiu en estria en plaques de LB suplementat amb 20µg/ml d'ampicil·lina i s'incuba ON a 30°C.
5. Es seleccionen les colònies que han crescut a la placa picant-les amb la punta d'una pipeta i posant-les dins un tub eppendorf d'1,5ml amb 300 µl de medi LB líquid suplementat amb 20µg/ml d'ampicil·lina.
6. Es cultiven ON a 30°C en agitació a 250rpm.

3.3.7. Extracció de DNA

Per tal de poder finalment transformar eficientment cèl·lules europees cariotítes amb el vector dissenyat i poder fer les repliques necessàries per a la validació de l'experiment, cal obtenir una quantitat mínima de DNA plasmídica (vegeu apartat 3.4.1.2). Per a aquest propòsit existeixen dos mètodes principals, el mètode clàssic i el kit comercial. Tots dos mètodes tenen una primera fase de lisi cel·lular i una segona fase d'aïllament i purificació del DNA. La diferència principal entre les dues tècniques recau en el procediment de purificació del DNA, que en el mètode clàssic és manual – a partir de la combinació de fenol i cloroform –, i en el mètode comercial es duu a terme mitjançant columnes que contenen una resina capaç d'unir exclusivament el DNA i descartar-ne les impureses (bàsicament proteïnes i RNA) per elució. En la posada a punt del mètode d'obtenció dels vectors plasmídics que contenen les diferent seqüències subtelomèriques a analitzar, es va fer servir tots dos mètodes. Inicialment, es van dur a terme *minipreps* (preparacions de DNA a partir d'un volum de ~10ml de cultiu bacterià per obtenir fins a 100µg de DNA) a partir del mètode clàssic. Tot i que aquest protocol va permetre extreure el vector de les cèl·lules bacterianes, la quantitat de DNA no va ser suficient. Es va optar d'ones, pel mètode de *midiprep* comercial (preparacions de DNA a partir de ~100ml de cultiu bacterià per obtenir fins a 350 µg de DNA plasmídico). Per aquest motiu, a continuació es detallen tots dos protocols d'extracció i obtenció de DNA plasmídico. Finalment però, es va optar pel mètode comercial, ja que proporcionava un major rendiment pel que fa a la quantitat i la pureza del DNA.

3.3.7.1. Miniprep pel mètode clàssic

Material

- LB (5g/l extracte de llevat, 10g/l triptona, 10g/l NaCl)
- Ampicil·lina (Sigma-Aldrich)
- Incubador amb agitació per rotació
- Glicerol
- Criotubs
- TE (1M Tris-HCl pH ~8, 0,1M EDTA)
- Solució I (de resuspensió): 50mM g lucosa; 25mM Tris HCl pH 8; 10mM *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA)
- Solució II (de lisí alcalina): 10mM NaOH; 10% *sodium dodecyl sulfate* (SDS). Cal preparar-la nova per a cada experiment.
- Solució III (de neutralització): 3M acetat de potassi, 11,5% àcid acètic glacial
- Ribonucleasa A de pàncrees boví (RNasa A) (20mg/ml; Sigma-Aldrich)
- Termobloc
- Proteïnasa K (10mg/ml; Sigma-Aldrich)
- Fenol (Panreac)
- Cloroform preparat amb 24 parts de cloroform (BDH) i 1 part d'alcohol isoamílic (Baker)
- NaCl en solució (5M)
- Isopropanol (Panreac)
- Etanol (Panreac)
- Termobloc
- Aigua miliQ esterilitzada per autoclav
- Nanodrop (NanoPhotometer; Implen)
- Agarosa
- Tampó TAE (40 mM Tris, 20 mM àcid acetic, 1 mM EDTA, pH 8,4)

Protocol

1. Es duu a terme un cultiu d'una colònia d'*E.coli* positiva per a l'vector am b la seqüència d'interès en 10ml d'LB suplementat amb 20µg/ml d'ampicil·lina. S'incuba ON en agitació a 250rpm a 30°C.
2. Es prepara el glicerat: s'afegeixen 200µl de glicerol en 800µl de cultiu dins un criotub i es conserva a -80°C per a posteriors utilitzacions.
3. Es centrifuga a velocitat màxima durant 10 minuts i es descarta el sobredenant.

4. Es renten les cèl·lules resuspenent-les en 5ml de 1x TE.
5. Es centrifuga a velocitat màxima durant 10 minuts i es descarta el sobredenant.
6. Es resuspenen les cèl·lules en 500µl de solució I.
7. S'afegeixen 500µl de solució II i es mescla per inversió. Es deixa reposar la mescla un màxim 5 min a TA.
8. S'afegeixen 375µl de solució III, es mescla bé per inversió, i s'incuba en gel 1-2min (màxim 5min).
9. Es centrifuga a velocitat màxima 10min a 4°C i es recupera el sobredenant en un altre tub.
10. S'afegeix RNasa A 200µg /ml i s'incuba 1h a 37°C.
11. S'afegeix 0,5µl de proteïnasa K per cada 100µl de sobredenant i s'incuba 1h a 60°C.
12. S'afegeix 1 volum (V) de fenol:cloroform (V/V) i es mescla bé per inversió.
13. Es centrifuga 5min a velocitat màxima a TA i es recupera el sobredenant.
14. Es repeteixen els passos 13 i 14, recuperant sempre el sobredenant.
15. S'afegeix 1V de cloroform i es mescla bé.
16. Es centrifuga 15 min a velocitat màxima a TA i es recupera el sobredenant.
17. Es repeteixen els passos 16 i 17.
18. Es precipita el DNA afegint 2 µl de NaCl en solució per cada 100µl de mescla, i 0,7V d'isopropanol, i es mescla bé.
19. Es centrifuga 15 min a velocitat màxima a 4°C i es descarta el sobredenant.
20. S'afegeixen 500µL d'etanol al 70% i es mescla bé.
21. Es centrifuga 10 min a velocitat màxima a 4°C i es descarta el sobredenant.
22. Es deixa assecar el DNA a TA o a 37°C i es resuspen en el volum desitjat d'aigua miliQ esterilitzada per autoclav.
23. Es mesura la concentració amb un nanodrop i mitjançant el electroforesi en un gel d'agarosa a 1'1% en tampó TAE. Es calcula la mitjana de les dues lectures per conèixer la concentració de DNA plasmídic final.

3.3.7.2. Midiprep pel mètode comercial (Qiagen)

Material

- LB (5g/l extracte de llevat, 10g/l triptona, 10g/l NaCl)
- Ampicil·lina (Sigma-Aldrich)
- Incubador amb agitació per rotació.
- Tubs d'ultracentrifugador de 50ml
- Ultracentrifugador

- Qiagen Plasmid Midi Kit:
 - Tampó de resuspensió P1
 - Tampó de lisi P2
 - Tampó de neutralització P3
 - Columnes d'elució
 - Tampó per equilibrar columnes QBT
 - Tampó de rentat QC
 - Tampó d'elució QF
- Isopropanol (Panreac)
- Etanol (Panreac)
- Termobloc
- Aigua miliQ esterilitzada per autoclau
- Agarosa
- Tampó TAE (40 mM Tris, 20 mM àcid acetic, 1 mM EDTA, pH 8,4)

Protocol

1. Es fa un precultiu a partir de 200µl del cultiu d'una colònia positiva per al vector d'interès (vegeu apartat 3.3.2.6) en 5ml de medi LB suplementat amb 20 µg/ml d'ampicil·lina. S'incuba durant tot el dia (8-9h) a 30°C i 250rpm.
2. Es dilueix el precultiu 500 cops en 250ml de medi LB suplementat amb ampicil·lina i s'incuba ON a 30°C en agitació a 250rpm.
3. Es preparen glicerinats, si cal (800µl cultiu en 200µl glicerol esterilitzat per autoclau).
4. Es centrifuga el cultiu 30min a 6000g i 4°C. S'elimina el sobredendant.
5. Es resuspen tot el cultiu en 4ml de buffer P1 (fred en gel).
6. S'afegeixen 4ml de buffer P2. Es mescla per inversió 6 cops i s'incuba a TA un màxim de 5min.
7. S'afegeixen 4ml de buffer P3 (fred en gel). Es mescla 6 cops per inversió i s'incubar 15min en gel.
8. Es centrifuga 30min a 4°C i 20000g. Es recupera el sobredendant.
9. Es repeteix la centrifugació durant 15min a 20000g i 4°C.
10. Es col·loquen les columnes en posició vertical dins el suport adequat i s'equilibren amb tampó QBT.
11. S'aplica el sobredendant a la columna i es deixa fluir.
12. Es renta la reïna aplicant-hi 10ml de tampó QC, 2 cops.
13. Es canvia de tub i s'elueix el DNA aplicant 5ml de buffer QF a la columna.

14. S'afegeixen 3,5ml d'isopropanol (0,7V) a TA per precipitar DNA. Es mescla bé i es reparteix en tants tubs eppendorff com calgui.
15. Es centrifuga 30min a 15000g i 4°C i es descarta el sobredemanant.
16. S'afegeixen 50µl d'etanol al 70%. Es mescla bé per inversió.
17. Es centrifuga 15min a TA i 15000g i es descarta el sobredemanant.
18. Es deixa assecar el pellet de DNA a 37°C.
19. S'afegeixen 10µl d'aigua miliQ esterilitzada per au toclau a cada tub i es dilueix dissoldre el DNA en l'aigua ON a 4°C.
20. L'endemà, s'uneix el contingut de tots els tubs en un de sol.
21. Es mesura la concentració amb un nanodrop i mitjançant l'electroforesi en un gel d'agarosa a 1% en tambó TAE. Es calcula la mitjana de les dues lectures per conèixer la concentració obtinguda de DNA plasmídic.

3.4. Tècniques de biologia cel·lular

3.4.1. Cultiu i transfecció de cèl·lules HeLa

3.4.1.1. Subcultiu de cèl·lules HeLa

Material

- Medi de cultiu DMEM (Gibco) complementat amb:
 - 10% sèrum boví fetal (Sigma-Aldrich)
 - 100 U/ml de penicil·lina (Invitrogen)
 - 100 mg/ml d'estreptomicina (Invitrogen)
- Tripsina 0,025% (Gibco)
- 1x PBS estèril (Sigma-Aldrich)
- Flascons de cultiu

Protocol

Es treballar sempre en condicions estèrius i sota campana de flux laminar horitzontal.

1. S'aspira el medi amb una pipeta i es renta el flascó amb PBS estèril.
2. S'afegeixen 3ml de tripsina prèviament es calentada a 37°C. S'incuben les cèl·lules dins l'incubador durant 1 min o fins que les cèl·lules estiguin totalment desenganxades de la superfície del flascó.

3. S'afegeixen 3V de D MEM p ràviament esca lfat a 37°C per a turar la reacció de tripsinització.
4. S'aspira tot el contingut del flascó i es centrifuguen les cèl·lules a velocitat baixa durant 10min.
5. Es descarta el sobredendant i es resuspen el pellet de cèl·lules en 1ml de DMEM.
6. Es reparteix la suspensió cel·lular en diferents flassons de cultiu i s'afegeixen 3-5ml de medi a cada flascó.
7. S'incuba a 37°C i 5% de CO₂.

3.4.1.2. Transfecció de cèl·lules HeLa amb vectors plasmídics

Per a la transfecció dels diferents constructs amb les seqüències subtelomèriques problema es van utilitzar cèl·lules HeLa ja que (1) són una línia cel·lular molt resistent en cultius llargs (de múltiples passes); (2) han estat àmpliament utilitzades per a experiments de transformació gènica (Smogorzewska, *et al.*, 2000; Arnoult, *et al.*, 2012; Smirnova, *et al.*, 2013); (3) s'hi ha dut a terme múltiples estudis sobre la funció dels telòmers i de TERRA (Zhu, *et al.*, 2000; Azzalin, *et al.*, 2007; Flynn, *et al.*, 2011); i (4) donen molt bona eficiència de transfecció mitjançant vectors plasmídics.

Material

- DNA plasmídic:
 - 4µg de DNA del vector amb seqüència subtelomèrica problema
 - 4µg de DNA del mateix vector amb la seqüència del promotor de citomegalovirus (CMV): control positiu
 - 4µg de DNA del mateix vector sense cap seqüència promotora: control negatiu
- Medi DMEM suplementat amb 10% sèrum fetal boví (sense antibòticos)
- Puromicina (Sigma-Aldrich)
- Cobreobjectes
- Plaques de Petri
- Lipofectamine 2000 (Invitrogen)
- 1x PBS
- Paraformaldehid 2% en 1x PBS (pH 7)
- 4,6-diamidino-2-169 phenyindole (DAPI)
- Portaobjectes

Protocol

1. Un dia abans de la transfecció, es duu a terme un cultiu inicial de 100000-150000 cèl·lules HeLa sobre un cobreobjecte (dins una placa de Petri) en 2 ml medi DMEM, suplementat amb sèrum boví fetal i sense antibòtic, sobtadoncions estàndard (37°C, 5% de CO₂).
2. En un tub, es dilueix la lipofectamina en 50µl de medi DMEM i s'incuba la mescla 5min a TA.
3. Al mateix temps, en un altre tub, es dilueixen 4µg de DNA plasmídic en 50µl del DMEM en que s'ha diluit la lipofectamina.
4. Es mescla el contingut dels dos tubs (1/1) i s'incuba 5min a TA.
5. S'afegeixen 2ml de medi DMEM a la suspensió de lipofectamina-DNA i s'aboca la mescla a la placa de cèl·lules.
6. S'incuben les cèl·lules ON a 37°C i 5% CO₂.
7. L'endemà, es renova el medi DMEM suplementat amb sèrum boví fetal i puromicina (l'antibiòtic que conté el plasmidi).
8. Es sacrifica el cultiu 48h posteriorment al canvi de medi transfecció:
 - i. Es renta el cobreobjecte amb les cèl·lules amb 1x PBS dos cops.
 - ii. Es fixen les cèl·lules amb paraformaldehid 2% durant 10min.
 - iii. Es fan dos rentats més amb 1x PBS.
 - iv. Es tenyeixen els nuclis incubant les cèl·lules 3min en 200mg/ml de DAPI en 1x PBS a TA.
 - v. Es renta un cop amb 1x PBS i fixar el cobreobjecte en un portaobjectes.
 - vi. S'avalua l'expressió de la GFP observant les cèl·lules en un microscopi òptic d'epifluorescència.

3.4.2. Preparacions cel·lulars per microscòpia

En la major part de l'experimental del present treball s'han utilitzat cèl·lules germinals derivades de molostres fresques de teixit ovàric i testicular. Això implica que a questes cèl·lules són úniques ja que no es poden multiplicar en un cultiu cel·lular. Per aquest motiu, és especialment important l'acurada optimització de les tècniques d'extensió cel·lular, ja que la incorrecta manipulació d'aquestes molostres pot comprometre la pèrdua i/o destrucció d'una bona part de les cèl·lules.

3.4.2.1. Extensions per RNA-Fluorescent in situ hybridization (RNA-FISH) i immunofluorescència (IF)

Donat que l'RNA és una molècula molt labil i que es degrada fàcilment, cal mantenir condicions d'esterilitat i lliure de RNases durant tot el protocol d'extensió de les cèl·lules. Per aquest motiu, es va treballar sempre en fred, sota campada de flux laminar horitzontal i totes les solucions i material que es va utilitzar, tan per a les extensions com per a la IF/RNA-FISH, estaven esterilitzades per autoclau o bé filtrades. A més, és important que l'estructura de les cèl·lules quedi alterada el mínim possible, de manera que sempre es va treballar en condicions isotòniques i molt poc agressives.

Material

- Etanol de 96°
- RNase Zap (Life Technologies)
- Filtres de porus de 22µm de diàmetre (Millipore)
- Agulles de xeringa de 40x0,9mm de 20G
- 1x PBS esterilitzat per autoclau pH 7,2-7,4
- Tampó *cytoskeletal* (CSK): 100mM NaCl, 300mM sucrosa, 3mM MgCl₂, 10mM PIPES (pH 7). A liquidar i emmagatzemar a -20°C i supplementar amb 0,5% de Triton X-100 un cop descongelat
- Paraformaldehid al 4% en 1x PBS (pH 7)
- *Vanadyl ribonucleoside complex* (NEB)
- Col·lagenasa (Worthington Biochemicals): només per al processament dels ovaris de ratolí
- *Hank balanced salt solution* (HBSS) (Sigma-Aldrich)
- Portaobjectes
- Lupa amb llum inferior
- Gel

Protocol

1. Es neteja els portaobjectes amb etanol de 96° i RNase Zap i s'assequen bé. Es col·loquen sobre una cambra humida refredada amb gel.
2. Es disagrega el teixit amb un parell d'agulles primer i després amb una P100. Es fa sota la lupa en 1ml de 1x PBS fred fins que les cèl·lules germinals quedin en suspensió i es pugui separar l'estroma del teixit. En el cas dels ovaris de ratolí, prèviament a la disagregació mecànica i per a favorir l'aïllament del màxim nombre

d'oòcits, cal a afegir un pas de digestió enzimàtica. S'incuben en 2.5m g/ml de collagenasa en HBSS, durant 20min a 37°C.

3. Es repeteix la suspensió de cèl·lules sobre els portaobjectes (~50µl/porta).
4. S'afegeix tampó C SK fred suplementat amb 10m M de *vanadyl ribonucleoside complex*, s'incuba durant 10min.
5. Es fixa incubant durant 10min en paraformaldehid fred i filtrat.
6. S'esbandeix en etanol al 70%.
7. Es conserven les extensions congelades a -80°C.

3.4.2.2. Extensions per anàlisi de la recombinació

Per a l'estudi dels punts de recombinació és important que els complexos sinaptonemals dels espermatòcits I estiguessin totalment desestos. Per aquest motiu, va ser necessari fer un tractament hipotònic a les cèl·lules de manera que s'inflessin i es desestructuren la membrana cel·lular, quedant així adherides al portaobjectes en tota la seva superfície.

Material

- 1x PBS pH 7,2-7,4
- Agulles de xeringa de 40x0,9mm de 20G
- Portaobjectes
- Lupa amb llum inferior
- Gel
- Solució hipotònica: 1% lipsol en aigua miliQ
- Solució fixadora: 4% paraformaldehid, 0,15% Triton X-100 en aigua miliQ; pH 9,8)
- Solució de rentat: 1% PhotoFlo (Kodak) en aigua miliQ
- Cambra humida
- DAPI (125ng/ml) en *antifade*
- *Antifade*: Vectashield (Vector Laboratories)

Protocol

1. Es disgrega el teixit en 20µl de 1x PBS amb un parell d'agulles de xeringa en un portaobjectes i sota la lupa. Cal que no s'assequin les vores de la gota de PBS (afegir 20µl de PBS, si fos necessari).
2. Es reparteix la suspensió cel·lular resultant de la disgregació sobre diversos portaobjectes (aprox. 5µl/porta) i s'estén la gota amb la punta de la pipeta.
3. S'afegeixen 80-90µl/portaobjecte de solució hipotònica i s'incuba 10-15min.

4. S'afegeixen 90-100ul de solució fixadora i s'incuba durant 15 min en una cambra humida tancada. És important que els portaobjectes estiguin completament horitzontals, ja que la més mínima inclinació esplàçarà les cèl·lules durant la fixació i es trencaran els complexos sinaptonemals.
5. Es deixa que les vores de les extensions cel·lulars s'assequin a l'aire.
6. Es renten 3 cops durant un minut amb solució de rentat.
7. Es tenyeixen els nuclis amb DAPI en *antifade* per avaluar l'estat de les extensions.

3.4.3. Marcatge fluorescent per microscòpia i separació cel·lular

El marcatge fluorescent és un molt bon mètode per visualitzar tan estructures com molècules dins el seu context cel·lular i analitzar-ne la seva distribució en estat fisiològic. A més a més, permet la classificació de les cèl·lules en diferents categories o distingir entre regions d'un mateix teixit. Així doncs, les tècniques de biologia cel·lular utilitzades en el present treball es basen en l'ús de la fluorescència aplicada a diverses - immunofluorescència (IF), RNA-fluorescent *in situ hybridization* (RNA-FISH), quantitative-FISH (Q-FISH) i *Fluorescent activated cell sorting* (FACS) – tal com es detalla a continuació.

3.4.3.1. Fluorescent activated cell sorting (FACS)

Per tal de poder estudiar les característiques dels telòmers de diferentes poblacions de cèl·lules germinals d'estratolíquens d'adults a llarg de l'espermatoogènesi, es van utilitzar aquestes poblacions cel·lulars mitjançant *fluorescent activated cell sorting* (FACS) en base al mètode publicat per Bastos i col·laboradors (2005). La separació per FACS es fonamenta en el marcatge fluorescent de les cèl·lules. En aquest cas, es va dur a terme la tinció de les cèl·lules amb Hoechst 33342, un colorant fluorescent que difon per la membrana plasmàtica i que s'uneix amb elevada afinitat a les seqüències poli(d[AT]) del solc menor del DNA. A més, s'ha descrit que el Hoechst emet dues longituds d'ona, una d'espectre blau i l'altra d'espectre vermell, permetent així la detecció de variacions en el contingut de DNA (emissió vermella) i en l'estructura de la cromatina (emissió blava) (Watson, *et al.*, 1985). Normalment, la tinció amb Hoechst es complementa amb la tinció amb iodur de propidi, un fluorocrom que només pot penetrar per la membrana de les cèl·lules mortes i, per tant, permet excloure-les de l'anàlisi. El protocol que es descriu a continuació deriva de l'estudi

dut a terme per Bastos i col·laboradors (2005) on van d'escriure les característiques de diferents tipus de cèl·lules germinals que pertanyen al procés d'espermatogènesi en ratolí.

Material

- DNase I de pàncreas boví (Sigma-Aldrich)
- GBSS (Sigma-Aldrich)
- Tripsina pàncreas boví (Sigma-Aldrich)
- Col·lagenasa CLS-4 (Worthington Biochemicals)
- Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich)
- Filtres de 70µm de diàmetre del porus (BD Biosciences)
- Filtres de 30µm de diàmetre del porus (Partec)
- Sèrum fetal boví (Sigma-Aldrich)
- Iodur de propidi (Sigma-Aldrich)
- Pipetes Pasteur de vidre
- Tubos Falcon de 50ml
- Bany amb agitació
- Gel
- RNAlater (Life Technologies)

Protocol

Disgregació dels túbuls seminífers:

1. S'extreuen els testicles del ratolí i se'n treu la túnica albugínia.
2. S'incuba el teixit testicular en 10ml de GBSS 0,5mg/ml de col·lagenasa i 1µg/ml de DNase a 33°C durant 15min amb agitació constant. Es mescla 10 cops per inversió cada 5min.
3. Es deixen sedimentar els túbuls seminífers durant 4min i es descarta el sobredentat.
4. S'incuben els túbuls seminífers en 10ml de GBSS amb 0,5mg/ml de tripsina i 1µg/ml de DNase a 33°C durant 15min amb agitació constant.
5. Es dispersen els agregats cel·lulars pipetejant el teixit Durant 3min a TA.
6. S'afegeixen 500µl (per cada 10 ml) de sèrum fetal boví (5%).
7. Es filtra la suspensió cel·lular amb un filtre de 70µm de diàmetre del porus.
8. Es centrifuga les cèl·lules durant 3min a 3000rpm i es descarta el sobredentat.
9. Es resuspenen les cèl·lules en GBSS suplementat amb 5% de sèrum boví fetal fins obtenir una concentració final de cèl·lules de 5M/ml.

10. Es tenyeixen les cèl·lules amb $5\mu\text{g}/\text{M}$ cells de Hoechst 33342 i $50\mu\text{g}/\text{ml}$ de iodur de propidi en GBSS complementat amb 5% de sèrum boví fetal durant 45min a 33°C en agitació constant. Durant la incubació s'afegeix $1\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNasa.
11. Es conserva la suspensió cel·lular en fred fins al moment del *sorting*.
12. Abans d'introduir la mostra al citòmetre, filtrar la suspensió cel·lular amb un filtre de $30\mu\text{m}$ de diàmetre del porus.

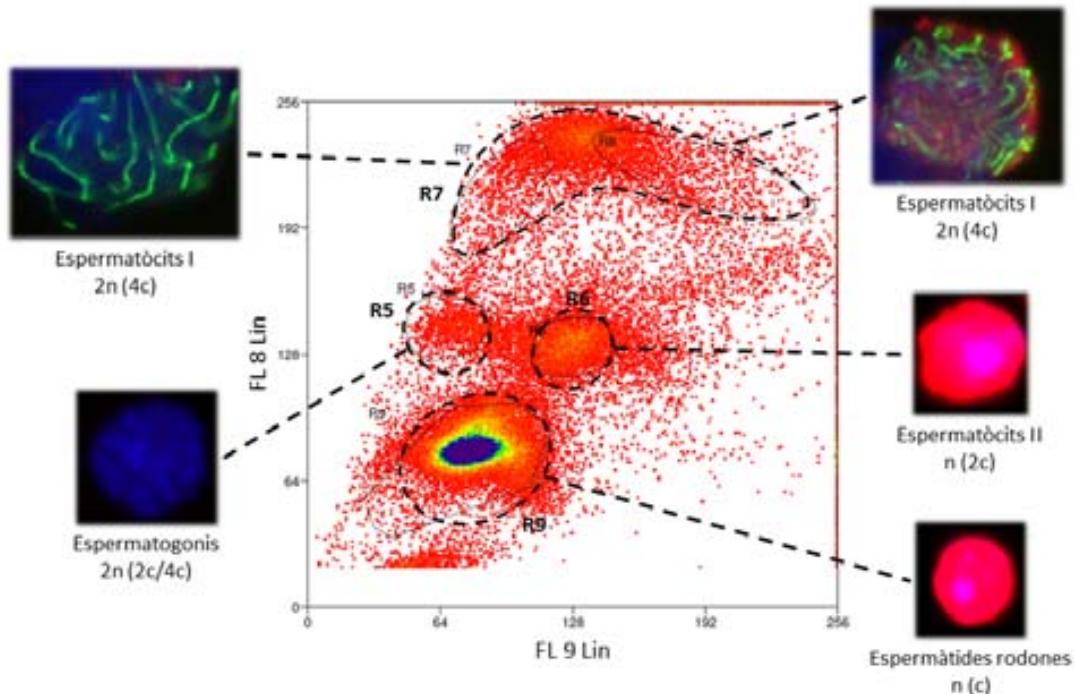


Figura 3.4.3.1. Exemple de gràfic resultant d'un experiment de FACS. La població R5 correspon a la fracció enriquida d'espermatogonis (DAPI en blau). La població R7 correspon a la fracció enriquida d'espermatòcits I (SYCP3 en vermell) i tardans (H1t positiu en vermell). Les poblacions R6 i R9 corresponen, respectivament, a les fraccions enriquides d'espermatòcits II i espermàties rodones. L'eix del filtre FL 8 indica la quantitat de DNA detectada a partir de la fluorescència blava del colorant Hoechst 33342. L'eix del filtre FL 9 indica la complexitat de la cromatina detectada mitjançant la fluorescència vermella emesa pel mateix colorant. (c) correspon al nombre de cromàtides per cromosoma; (n) correspon a la dotació cromosòmica de les cèl·lules.

Sorting:

La separació dels diferents tipus cel·lulars es va dur a terme en un *sorter* model M oflo Legacy *high-speed* equipat amb tres làsers: un de 488 nm, un de 633nm i un de 355 nm. El Hoescht 33342 es va excitar mitjançant el làser UV 355 nm (Innova 90C DSU XCYTE UV 998085) a una potència de 30 mW, mentre que per al iodur de propidi es va utilitzar el làser blau de 488 nm (I-Cyt Lyt 00S) a 30 mW. L'emissió blava del Hoescht es va detectar mitjançant un filtre de 670/40-nm (FL 9), mentre que la combinació de l'emissió vermella del Hoescht i del iodur de propidi es va detectar amb un filtre 405/30-nm (FL 8), ja que

aquesta combinació de filtres és la que proporciona millor resolució per aquest tipus d'anàlisi (Sales-Pardo, *et al.*, 2006). Es van separar quatre poblacions simultàniament generant un camp elèctric carregant les plaques a 4000 volts i a una pressió de 60psi (*pound-force per square inch*). Una cop obtingudes, les diferents fraccions es van diàfragma en 5 V d'RNAlater, tal com indiquen les instruccions del fabricant. Finalment, l'enriquiment per a cada població es va comprovar mitjançant immunofluorescència (vegeu apartat 3.4.3.2).

3.4.3.2. Immunofluorescència

La immunofluorescència (IF) es fonamenta en el principi de que cada anticòs reconeix específicament una regió concreta d'una molècula (un epítop). Normalment, per millorar l'eficiència de la tècnica i alhora ampliar les possibilitats de marcatge simultani de diverses proteïnes, s'utilitzen dos anticossos: un de primari i un de secundari. En general, l'anticòs primari reconeix un epítop específic d'una proteïna; i l'anticòs secundari està conjugat a un fluorocrom, i reconeix la regió constant – i específica d'espècie – d'un altre anticòs (primari). La combinació de múltiples anticossos primaris i els seus respectius anticossos secundaris en una mateixa mostra permet, mitjançant un únic experiment, la visualització i identificació de diverses proteïnes simultàniament en una mateixa cèl·lula o teixit.

Mitjançant aquesta tècnica, es va poder de detectar i estudiar simultàniament la localització nuclear a les cèl·lules germinals tant de proteïnes aïllades com d'estructures proteïques complexes. Cadascuna de les proteïnes marcades, tenia la seva finalitat específica:

- TRF2: localitzar el complex shelterina dels telòmers (Fig. 1.5).
- TERT: analitzar la distribució nuclear de la subunitat proteica de la telomerasa (Fig. 1.7).
- H1t: distingir entre espermatòcits primerencs i tardans, i entre espermatogonis i espermàrides rodones, ja que la *Histone cluster 1* (H1t) s'expressa a les cèl·lules germinals masculines a partir de paquitè mitjà (Grimes, 2004).
- MLH1: assenyalar els nòduls de recombinació de meiòcits en paquitè (Fig. 1.1; Apunt 2).
- SYCP3: proteïna dels elements laterals del complex siaptonemal que s'incorpora progressivament al complex a mesura que avança la profase I de la meiosi i, per tant, permet distingir-ne les diferents etapes (Fig. 1.1; Apunt 2). A més, permet identificar els meiòcits que es troben exclusivament en profase I.

- Sèrum CREST humà: sèrum humà procedent de plasma sanguini d'individus amb els síndrome *complication of Raynaud's phenomenon, esophageal dysfunction, sclerodactyly and telangiectasia* (CREST). És molt útil per marcar els centròmers ja que conté anticossos contra les diferents proteïnes centromèriques (CENP) i se'n requereix molt poc per a cada marcatge.

A continuació, es detallen els tres protocols d'IF utilitzats, cadascun optimitzat per a una finalitat diferent. El primer protocol correspon al marcatge per a l'avaluació de l'enriquiment cel·lular obtingut per FACS desenvolupat per nos altres (vegeu apartat 3.4.3.1). El segon protocol, dut a terme anteriorment per Codina-Pascual i col·laboradors (2005), correspon al marcatge realitzat en espermatòcits I per a l'avaluació dels punts de recombinació. El tercer protocol, correspon al marcatge de proteïnes dut a terme prèviament a l'RNA-FISH (vegeu apartat 3.4.3.3).

Material per als 3 protocols

- Cambra humida: caixa de portaobjectes amb paper mullat dins
- Cubetes Coplin
- Filtres de porus de 22µm de diàmetre (Millipore)
- Solució PTBG (0,2% BSA, 0,2% 163 gelatina, 0,1% Tween-20 en 1x PBS pH 7,2-7,4)
- *Vanadyl ribonucleoside complex* (NEB)
- Solució PBST (Tween-20 al 0,1% en 1x PBS pH 7,2-7,4)
- 2x tampó saline sodium citrate (SSC): 0,3M NaCl en 30mM citrat de sodi, pH 7,0
- *Antibody dilution buffer* (ADB): 0,05% Triton X-100, 1x PBS pH 7,2-7,4
- Anticossos primaris (tots els anticossos primaris es van utilitzar a dilució 1/100 a no ser que s'indiqui el contrari):
 - Anti-TERT de conill (600-401-252S; Rockland Immunochemicals)
 - Anti-TERT de rata (Diesse Ricerche)
 - Anti-SYCP3 de ratolí o de conill (ab97672 i ab15093; Abcam)
 - Anti-TRF2 de ratolí (05-521; Millipore) i de conill (proporcionat per la Dra. T. De Lange, The Rockefeller University, EUA)
 - Anti-H1t de porc de Guinea (proporcionat per la Dra. M.A. Handel, The Jackson Laboratory, EUA)
 - Anti-MLH1 de ratolí (554073; BD Pharmingen)
 - Sèrum CREST (proporcionat pel Dr. M. Fritzler, University of Calgary, Canadà)

- Anticossos secundaris conjugats a les cianines 3 i 5 (Cy5), i a *fluorescein isothiocyanate* (FITC) o DyLight 488. Tots els anticossos secundaris es van utilitzar a dilució 1/100 a no ser que s'indiqui el contrari:
 - Anti-ratolí Cy5 de cabra (Jackson Immunoresearch)
 - Anti-conill Cy5 de ratolí (Jackson Immunoresearch)
 - Anti-conill FITC de cabra (Jackson Immunoresearch)
 - Anti-ratolí FITC de cabra (Jackson Immunoresearch)
 - Anti-conill Cy3 de cabra (Jackson Immunoresearch)
 - Anti-ratolí Cy3 de cabra (Jackson Immunoresearch)
 - Anti-porc de Guinea Cy3 de cabra (Jackson Immunoresearch)
 - Anti-rata DyLight 488 de cabra (KPL)
 - Anti-humà Cy5 de cabra (Jackson Immunoresearch)
- Paraformaldehid (Merck) al 4% en 1x PBS pH 7
- DAPI (125ng/ml) en *antifade*
- *Antifade*: Vectashield (Vector Laboratories)

Protocol 1: IF per l'avaluació del protocol de FACS

1. Es bloquegen les extensions cel·lulars durant 10min en PTBG a TA dins una cambra humida (totes les incubacions, a no ser que s'indiqui el contrari, es duen a terme dins una cambra humida).
2. S'incuben les cèl·lules ON a 4°C amb els anticossos primaris corresponents (1/500 anti-H1t, 1/200 anti-SYCP3) diluïts en PTBG.
3. Es renten els portaobjectes 3 cops en PBST durant 5min a TA dins una cubeta.
4. S'incuben les cèl·lules 1h a 37°C amb els anticossos secundaris corresponents (1/200 anti-porc de Guinea Cy3, 1/200 anti-conill FITC), diluïts en PBST.
5. Es renten 3 cops amb PBST durant 5min a TA.
6. Es tenyeix el DNA del nucli de les cèl·lules amb DAPI en *antifade*.

L'enriquiment de les diferents poblacions de cèl·lules germinals separades per FACS es va avaluar en funció de la presència/absència de les proteïnes SYCP3 i H1t, conjuntament amb l'anàlisi de la seva morfologia nuclear mitjançant la contratinció de la cromatina amb DAPI (Yamamoto, *et al.*, 1999; Bastos, *et al.*, 2005):

- Espermatogonis: cèl·lules SYCP3 i H1t negatives; nucli rodona i mitjana (menor que els espermatoцитs I però major que els espermatoцитs II i les espermàrides rodones).

- Espermatòcits I: cèl·lules SYCP3 positives i H1t negatives (profase I primerenca) o positives (profase I tardana); nucli gran i irregular.
- Espermatòcits II: cèl·lules SYCP3 negatives i H1t positives; binucleades o nucli en divisió amb dues taques brillants (que corresponen als dos nuclèols).
- Espermàtides rodones: cèl·lules SYCP3 negatives i H1t positives; un sol nucli petit i rodó amb una taca brillant (nuclèol).

Protocol 2: IF per l'anàlisi d'MLH1

1. Es renten les extensions cel·lulars en 1x ADB durant 30min
2. S'incuben les cèl·lules ON a 37°C amb els anticossos primaris corresponents (1/100 anti-MLH1, 1/200 anti-SYCP3, i 1/200 sèrum CREST) diluïts en 1x PBS.
3. Es renten dos cops en 1x PBS durant 20min.
4. S'incuben les cèl·lules a 37°C durant 90min amb els anticossos secundaris corresponents (1/200 anti-conill Cy3, 1/200 anti-humà Cy5, i 1/200 anti-ratolí FITC) diluïts en 1x PBS.
5. Es renten 3 cops durant 10, 20 i 30min respectivament en agitació.
6. Es submergeixen els portaobjectes en 2x SSC suplementat amb Triton X-100 a 0,1%.
7. Es tenyeixen els nuclis amb DAPI en *antifade*.

Protocol 3: IF prèvia a l'RNA-FISH

1. Es bloquegen les extensions cel·lulars amb P-TBG filtrat durant 10 min a TA suplementat amb *vanadyl ribonucleoside complex*.
2. S'incuben les cèl·lules amb els anticossos primaris, diluïts en PTBG filtrat, 45min a TA.
3. Es renten les extensions 3 cops en PBST esterilitzat per autoclau durant 5min a TA dins una cubeta.
4. S'incuben les cèl·lules amb els anticossos secundaris corresponents, diluïts en PBST, a 37°C durant 30min.
5. Es renten 3 cops amb PBST esterilitzat per autoclau durant 5min a TA.
6. Fixar en paraformaldehid filtrat a TA durant 30min.
7. Es renten 2 cops en 2x SSC esterilitzat per autoclau durant 5min.
8. A continuació es duu a terme el protocol d'RNA-FISH (vegeu apartat 3.4.3.3).

Visualització al microscopi

El marcatge de les diferents extensions cel·lulars es van observar mitjançant un microscopi d'epifluorescència Nikon Eclipse 90i, equipat amb els filtres adequats per als corresponents fluorocroms i/o tinció fluorescent, i amb una càmera a coblada i connectada al software d'anàlisi Isis (Metasystems).

3.4.3.3. RNA-Fluorescent *in situ hybridization*

El mètode de l'*RNA-Fluorescent in situ hybridization* (RNA-FISH) permet visualitzar *in situ* molècules d'RNA de seqüència complementària. Es basa en la hidròbridació d'una sonda de seqüència complementària a l'RNA d'interès conjugada a un fluorocrom. El protocol d'RNA-FISH és molt similar al d'una FISH estàndard. Les principals diferències rauen en que la mostra no s'ha de desnaturalitzar – l'RNA és sempre de cadena simple –, i en que tot el protocol s'ha de dur a terme en condicions estèriks, lliures d'RNases i poc agressives.

Material

- Etanol fred (4°C) al 70, 85 i 100%
- Sonda d'oligonucleòtids de seqüència (CCCTAA)₃ conjugada a Cy3 (XX Integrated DNA Technologies)
- Tampó d'hibridació: 1 part de 20X SSC, 2 parts de BSA 10 mg/ml, 2 parts de dextram sulfat al 50%, 5 parts de formamida ultrapura (emmagatzemar a -20 °C)
- Cobreobjectes de 18x18 mm
- 2x SSC esterilitzat per autoclau pH7
- Formamida desionitzada (Sigma-Aldrich)
- DAPI en *antifade*
- *Antifade* Vectashield (Vector Laboratories)

Protocol

1. Es deshidraten les cèl·lules mitjançant una sèrie d'etanols freds (70%, 85% i 100%) de 5min cadascuna.
2. S'assequen les extensions cel·lulars a l'aire.
3. S'apliquen 10 µl de sonda 25nM diluïda en tampó d'hibridació sobre les cèl·lules.
4. Es col·loca la mostra amb un cobreobjecte de 18x18 mm i es segellat amb pegament.
5. S'incuba a 37°C ON en una cambra humida (protegida de la llum).

6. Es treuen els cobreobjectes amb 2x SSC a TA.
7. Es renten les extensions seguint la següent seqüència, 5 min per cada pas:
 - i. 2x SSC, formamida desionitzada al 50% (pH 7) a 39°C, 3 cops.
 - ii. 2x SSC (pH 7) a 39°C, 3 cops.
 - iii. 2x SSC (pH 7) a TA, 1 cop.
8. Es tenyeixen els nuclis amb DAPI en *antifade*.

3.4.3.4. Quantitative-Fluorescent *in situ hybridization*

La longitud telomèrica correspon exclusivament al nombre de repeticions TTAGGG dels telòmers. Així doncs, una bona opció per a obtenir informació de la longitud de telòmers i cèl·lules individuals és el marcatge dels telòmers mitjançant la hibridació de les repeticions TTAGGG amb una sonda oligomèrica conjugada a un fluorocrom, és a dir la tècnica de *quantitative-fluorescent in situ hybridization* (Q-FISH) (Zijlmans, *et al.*, 1997). Els avantatges d'aquest tipus de sondes recauen en que són sondes de mida petita – per tant amb bona capacitat d'penetració i accés a la cèl·lula –, no cal de snaturalitzar-les perquè són de cadena simple, i la seva síntesi és totalment controlada. No obstant, l'eficiència de la hibridació de les repeticions telomèriques amb sondes oligomèriques de DNA no ha permès obtenir dades quantitatives. En canvi, la hibridació de sondes de *peptid nucleic acid* (PNA) de seqüència complementària a les repeticions telomèriques resulta en duplexs més estables que els DNA/DNA, amb major especificitat i reproductibilitat, i que donen menor soroll de fons. Al PNA, l'esquelet de desoxiribosa-fosfat amb càrrega negativa del DNA és substituït per un esquelet sense càrrega d'unitats d'N-(2-aminoetil)-glicina unitades per enllaços peptídics. La seqüència de la sonda de PNA utilitzada en aquest treball correspon a (CCCTAA)₃, ja que dóna millors resultats que la seqüència contrària. El protocol que es detalla a continuació és el protocol recomanat per la casa comercial de la sonda (Panagene) amb lleus modificacions.

Material

- Pepsina 0,5%: 2,5ml de solució stock de pepsina al 10% (Sigma-Aldrich) en 50ml d'HCl 0,01M en aigua miliQ
- Formaldehid (Panreac)
- 1x PBS pH 7,2-7,2
- Etanol freds al 70%, 85% i 100%
- Sonda PNA (CCCTAA)₃ (TelC) conjugada a *fluorescein amidite* (FAM) (Panagene)

- Tampó d'hibridació: 10mM NaHPO₄ (pH 7,4), 10mM NaCl, 20mM Tris (pH 7,5), 70% formamida (Sigma-Aldrich)
- Cobreobjectes 18x18mm
- Solució de rentat I: 0,1% Tween-20 en 1x PBS
- Solució de rentat II: 0,1% Tween-20 en 2x SSC
- Banys i estufes
- Cambra humida
- Cubetes Coplin
- DAPI (125ng/ml) en *antifade*
- *Antifade*: Vectashield (Vector Laboratories)

Protocol

1. S'assequen les extensions cel·lulars durant 10min dins una estufa a 67±2°C.
2. Es rehidraten en 1x PBS durant 15min.
3. Es fixen les cèl·lules en formaldehid al 4% en 1x PBS durant 4min.
4. Es renten les extensions durant 5min en 1x PBS (2 cops).
5. Es submergeixen en pepsina al 0,005% durant 4min a 37°C
6. Es renten amb 1x PBS durant 3min (2 cops)
7. Es deshidraten les cèl·lules amb etanols fred al 70%, 85% i 100% durant 1min per cada etanol.
8. Es deixen assecar els portaobjectes a l'aire.
9. S'afegeixen a cada porta 15μl de sonda PNA TelC 800 ng /ml en t ampó d'hibridació.
10. Es cobreixen les extensions cel·lulars amb un sobreobjecte.
11. Es desnaturalitzen les mostres durant 5min a 80°C. La desnaturalització s'ha de fer a un mínim de 80°C i un màxim de 90°C. Una temperatura de desnaturalització per sota de 75°C malmet els resultats severament.
12. S'incuben els portaobjectes durant 90min a TA (protegits de la llum).
13. Es submergeixen les extensions cel·lulars en solució de rentat I a TA per treure els sobreobjectes.
14. Es renten els portaobjectes en solució de rentat I durant 20min a 57°C.
15. Es renten els portaobjectes en solució de rentat II durant 1min a TA.
16. Es tenyeixen els nuclis amb DAPI en *antifade*.

4. RESULTATS

Resultats

4.1. Identificació del promotor de TERRA en ratolí

TERRA és transcrit en direcció 5' → 3' per la RNAPII a partir d'una seqüència promotora que es troba als subtelòmers dels cromosomes eucariotes. En humà, s'ha descrit que la seqüència promotora de TERRA és rica en illes CpG, i s'ha localitzat en 20 de les 46 subtelòmers del genoma. No obstant, tot i que se sap que TERRA s'expressa també al nucli de les cèl·lules de ratolí, el seu promotor encara no ha estat identificat. En aquest capítol, mitjançant l'aproximació *reporter gene assay*, s'han estudiat els subtelòmers del genoma de ratolí en un intent d'identificar en aquesta espècie el promotor de TERRA i les seves característiques.

Resultats:

Dades no publicades, resultants de l'estada al laboratori del grup dirigit per la Dra. Elena Giulotto *Instabilità del genoma nella cancerogenesi e nell'evoluzione: telomeri, centromeri ed elementi mobili* del Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani” de la Universitat de Pavia, Itàlia.

Resultats

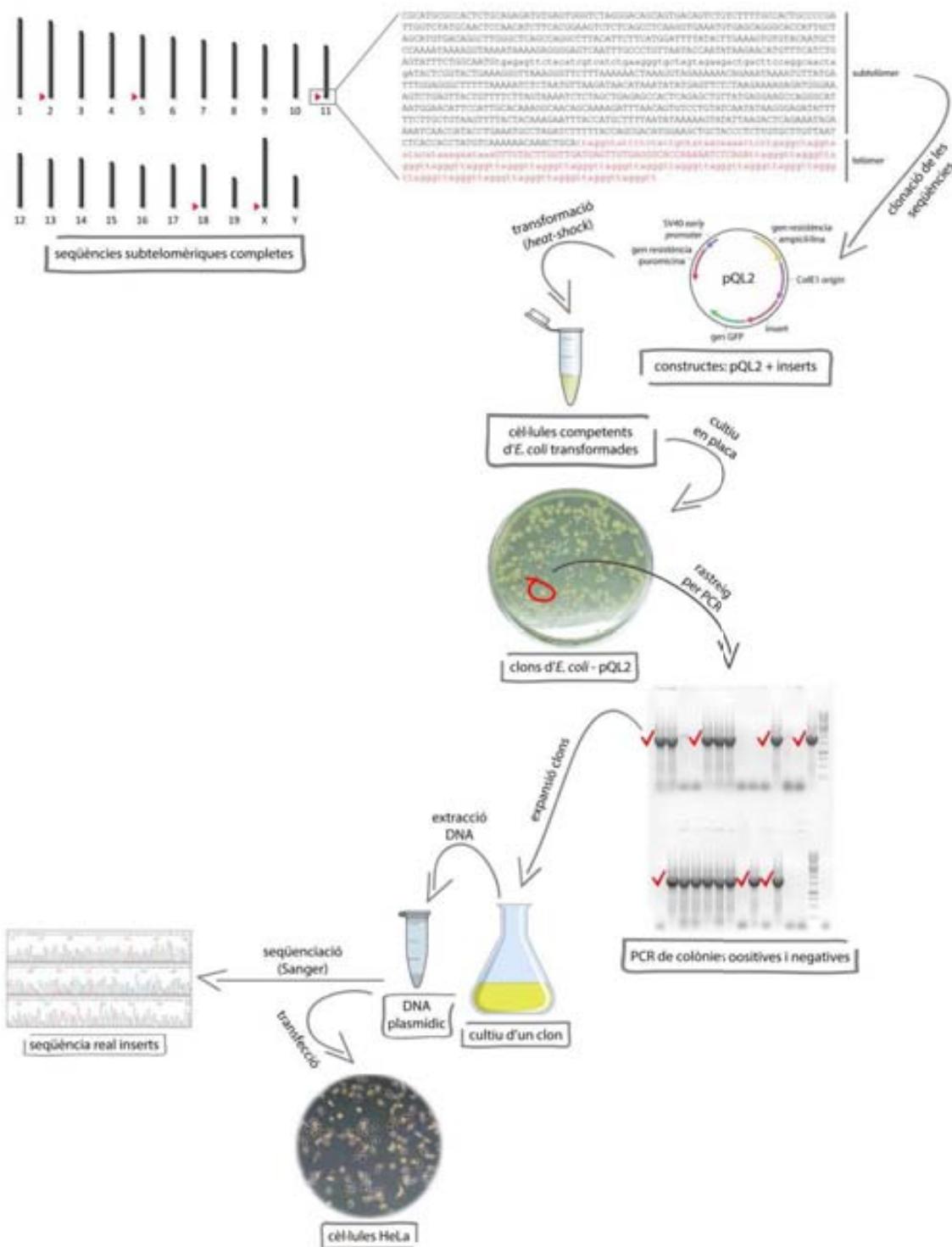
INTRODUCCIÓ

Els telòmers són estructures ribonucleoproteïques fonamentals per mantenir l'estabilitat genòmica de la cèl·lula, ja que protegeixen els extrems dels cromosomes de ser reconeguts com a trencaments de DNA de doble cadena per part de la maquinària de reparació del DNA (Palm i de Lange, 2008). Aquesta funció és possible gràcies a l'assemblatge de la complexa estructura que formen conjuntament els diferents components del telòmer, és a dir, les repeticions en tàndem de seqüència TTAGGG, les proteïnes d'unió als telòmers, i l'RNA telomèric TERRA. TERRA és un RNA no codificant que es troba exclusivament al nucli de les cèl·lules, ja sigui unit a l telòmer o bé de forma lliure (Azzalin, *et al.*, 2007; Porro, *et al.*, 2010). L'RNAPII transcriu TERRA en direcció entròmer-telòmer utilitzant com a molteles seqüències subtelomèriques i telomèriques (Azzalin, *et al.*, 2007; Schoeftner i Blasco, 2008). De fet, en humà s'ha descrit que el promotor de TERRA es troba inclòs dins el subtelòmer, el qual ha estat identificat en 19 cromosomes diferents (Nergazde, *et al.*, 2009). La seva seqüència està formada per tres elements de DNA repetitiu de 61, 29 i 37 nucleòtids (nt), anomenats conjuntament repeticions 61-29-37, als quals s'hi uneix la RNAPII (Nergazde, *et al.*, 2009). El grau màxim de transcripció de TERRA s'observa només quan la seqüència del promotor conté tots tres elements, mentre que la delecció del 61 nt disminueix la síntesi de TERRA i la delecció del 29 nt o del 37 nt provoca la seva abolició total. Així doncs, tots tres elements són importants per a la transcripció de TERRA, però només les repeticions de 29 i 37 nt són imprescindibles per a l'activitat del promotor. Precisament aquests dos últims elements formen una regió de DNA rica en dinucleòtids CpG (Nergazde, *et al.*, 2009), la qual cosa és una característica comuna en les seqüències promotores associades a l'RNAPII en mamífers (Sandelin, *et al.*, 2007). La transcripció de TERRA està regulada negativament per factors epigenètics com la metilació de les illes CpG (Yehezkel, *et al.*, 2008; Nergazde, *et al.*, 2009) i/o de les histones telomèriques (Arnoult, *et al.*, 2012), així com pel factor repressor de la transcripció CTCF (*CCCTC-binding factor*) (Deng, *et al.*, 2012a). D'altra banda, el fet que l'element repetitiu de 37 nt conté un únic lloc d'inici de la transcripció o *transcription start site* (TSS) (Nergazde, *et al.*, 2009) contradiu la idea inicial de que la longitud variable de TERRA és deguda a la variabilitat en la regió subtelomèrica transcrita (Porro, *et al.*, 2010), mentre que concorda amb els últims estudis en què s'ha vist que la longitud de les molècules TERRA dependria de la longitud de les repeticions UUAGGG i, per tant, estaria estretament lligada al nombre de repetitions del DNA telomèric de cada cromosoma (Arnoult, *et al.*, 2012; Van Beneden, *et al.*, 2013). Així doncs, el promotor de TERRA en humà correspondria efectivament a un promotor de tipus *sharp*, és a dir, a un promotor amb un únic TSS (Sandelin, *et al.*, 2007).

No obstant, malgrat que TERRA sembla ser un RNA no codificant molt conservat en els organismes eucariotes – ha estat possible identificar-lo en especies tan diferents com llevats (Luke, *et al.*, 2008; Bah, *et al.*, 2012), plantes (Vrbsky, *et al.*, 2010), peixos i mamífers (Schoeftner i Blasco, 2008) –, el promotor de TERRA no ha estat mai descrit en cap altra espècie eucariota apart de la humana. En el cas del ratolí, estudis iniciais van demostrar que TERRA forma *foci* discrets al núcli de les cèl·lules somàtiques (Schoeftner i Blasco, 2008; Deng, *et al.*, 2012b). En canvi, existeixen evidències de que la regulació de la transcripció de TERRA en ratolí no es produiria de la mateixa manera que en les cèl·lules d'origen humà, ja que la metilació de les seqüències subtelomèriques en ratolí no exerceix cap efecte repressor sobre la síntesi de TERRA (Schoeftner i Blasco, 2008; Marion, *et al.*, 2009). No obstant, sembla plausible que, igual que en humà, el promotor de TERRA es trobi a la regió del subtelòmer, ja que (1) les molècules de TERRA de les cèl·lules de ratolí contenen seqüències UUAGGG complementàries a les repeticions telomèriques (Schoeftner i Blasco, 2008; Deng, *et al.*, 2012b) i, (2) ha estat possible retrotranscriure molècules de TERRA en ratolí a partir d'encebadors de seqüència subtelomèrica (Deng, *et al.*, 2012b). Així doncs, en aquest treball es va plantejar identificar el promotor de TERRA de ratolí i determinar-ne les seves característiques mitjançant l'estudi *in silico* i molecular dels subtelòmers del genoma de ratolí.

MATERIAL I MÈTODES

L'estudi per a la identificació del promotor de TERRA en ratolí es va basar en la metodologia anomenada assaig per gen reporter. En aquest cas, l'assaig consistia en la clonació d'una seqüència “problema” dins un vector plasmídic que contenia la seqüència d'un gen reporter que s'expressaria només si la seqüència clonada tenia activitat promotora. El procés experimental incloïa una primera part d'anàlisi *in silico* del genoma de ratolí, que va permetre identificar aquelles regions subtelomèriques de les quals se'n coneixia la seqüència fins al seu límit amb les repeticions telomèriques. Es va escollir, part d'aquestes seqüències, segons uns criteris concrets d'escrits més endavant, es van clonar dins un vector plasmídic que contenia el gen reporter, amb el qual seguidament es van transformar cèl·lules competents d'*Escherichia coli* (*E. coli*). Un cop identificats i verificats els clons d'*E. coli* amb els constructes correctes, se'n va amplificar i extreure el DNA plasmídic per, finalment, transfectar cèl·lules HeLa (Fig. 4.1.1).



Anàlisi bioinformàtica

Mitjançant les eines bioinformàtiques NCBI *map viewer* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), *Mouse BLAT search* de la UCSC *Genome Browser* (Kent, 2002) i *Repeat Masker* (<http://www.repeatmasker.org/>) es van localitzar les seqüències telomèriques i subtelomèriques del genoma de ratolí (Fig. 4.1.1). La cerca de possibles illes CpG i seqüències promotores es va

Resultats

dur a terme mitjançant els programes EMBOSS *Cpgleplot* (<http://www.ebi.ac.uk/>) i l'NNPP (<http://www.fruitfly.org>).

Taula 4.1.1. Encebadors utilitzats per a l'amplificació de les seqüències analitzades, condicions òptimes d'annealing i dianes de restricció incloses dins les seqüències dels encebadors.

Encebador	Seqüència ^a	ER	T° annealing ^b	Mida amplicó
2q				
<i>F</i>	atactcgaaCAGGTGGACAGCTCAGAGACA	Xho I	60°C	
<i>R</i>	ggtaattCCCTAACATAATTAAACTTCATAGATGT	EcoR I	60°C	1503 pb
5q				
<i>F</i>	attaagcttGCAACTAACAGAGACACCACT	Hind III	58/59°C	
<i>R</i>	atagaattcTTGGTGCCCTCACAACTCATC	EcoR I	58/59°C	2673 pb
11q				
<i>F</i>	ataCTCgAGATGAGCATGTAGACAGCACTGGA	Xho I	60°C	
<i>R</i>	attAAGCTTCCCTAACCTCTGGGACTTGCAC	Hind III	60°C	1743 pb
18q				
<i>F</i>	attAAGCTTCCAAGAAAAGATTCCCATGA	Hind III	58/59°C	
<i>R</i>	aatGGATCCTCCTTAGAAACTCTCACACTTCA	BamH I	58/59°C	2343 pb
Xq				
<i>F</i>	attCTCgaaGGAATACCAATTGGCAGGCAC	Xho I	60°C	
<i>R</i>	cttAAGCTTCATCTGCTGGTTCTGTATTGTC	Hind III	60°C	1484 pb

(ER) Enzims de restricció: Xho I (Roche), Eco RI (Fermentas), Pst I (Fermentas), Hind III (Boehringer Mannheim); (pb) parells de bases

- (a) Les seqüències marcades en gris indiquen la diana de cadascun dels ERs.
- (b) Les temperatures (T°) òptimes d'annealing es van testar amplificant el mateix DNA de ratolí utilitzant un gradient de temperatures d'annealing.

PCR

Tant la clonació i amplificació de les seqüències subtelomèriques d'interès a partir de DNA de ratolí (*Mus musculus domesticus*), com el rastreig i identificació de les còlonies bacterianes transformades amb cada una de les seqüències es va dur a terme per PCR (Fig. 4.1.1). Els encebadors per a cada una de les seqüències subtelomèriques identificades es van dissenyar mitjançant els programes AmplifX (<http://crn2m.univ-mrs.fr/>) i E@sy Oligo (Sigma-Aldrich) (Taula 4.1.1). Cada mescla de reacció, a més del DNA corresponent, contenia, dNTPs (10mM) (Roche), encebador forward i encebador reverse (100ng/ml) (Taula 4.1.1), tampó específic per a la polimerasa GoTaq (1x) (Promega), 0.75u de polimerasa GoTaq (Promega), 5% de DMSO i aigua miliQ lliure de nucleases fins a un volum total de 25μl. Les condicions de PCR utilitzades són: 2min a 95°C; 3 cicles d'1min a 95°C, 1min a t°C i Mmin a 72°C (on t correspon a la temperatura òptima del parell de encebadors, i M correspon al temps d'elongació en funció de la longitud del segment a elongar; Taula 4.1.1); 27 cicles de 40s a 95°C, 40s a t°C i Mmin a 72°C; i 5min a 72°C. Per cada reacció es va comprovar la correcta amplificació de les seqüències mitjançant electroforesi en gel d'agarosa a l'1% supplementat amb bromur d'etidi.

Purificació del DNA plasmídic

L'obtenció i comprovació de l'amplificació de les diferents seqüències subtelomèriques per a la posterior inserció dins el vector plasmídic, es va dur a terme mitjançant electroforesi en gel a l'1% d'agarosa suplementat amb bromur d'etidi, del qual se'n va tallar la banda de la longitud corresponent a la seqüència teòrica. Aleshores, el DNA contingut dins l'agarosa, es va obtenir i purificar mitjançant un kit comercial de purificació de DNA (Promega). Breument, l'agarosa es va dissoldre a 60°C a fegint-hi un tampó que promou la unió del DNA a la membrana de la columna de purificació. Un cop dissolt, es va introduir la mescla dins la columna de purificació i es va centrifugar. La columna es va robar amb el tampó de retentat, es va centrifugar, i finalment el DNA es va eluir afegint-hi aigua liure de nucleases i realitzant una última centrifugació.

Es va utilitzar el mateix protocol, excloent el pas de la dissolució de l'agarosa, per tal d'eliminar els ERs restants tan del DNA plasmídic com de les diferents seqüències subtelomèriques un cop digerits, i prèviament a la lligació dels constructes.

Digestió enzimàtica

Per poder inserir els fragments subtelomèrics amplificats dins els vectors bacterians (pQL2; Fig. 4.1.2) i generar els constructes (vegeu Annex), així com per linearitzar els plasmidis prèviament a la transfecció de les cèl·lules HeLa, es va dur a terme la digestió de les diferents seqüències mitjançant els enzims adequats a cada cas (Taula 4.1.1). La reacció de digestió contenia, a més del DNA a digerir, 5U/μg de DNA, tampó específic per a cada enzim (1x) i aigua miliQ fins assolir un volum de 25μl. La reacció es va incubar un mínim 3h a 37°C.

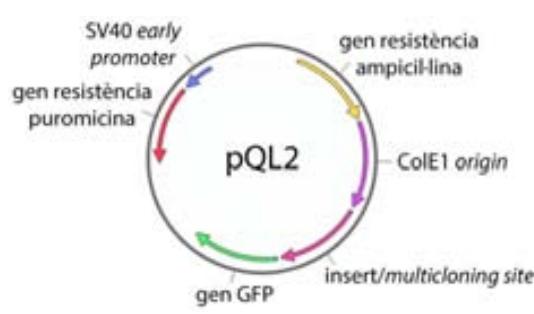


Figura 4.1.2. Estructura del plasmidi pQL2 utilitzat com a vector per a l'assay d'activitat promotor de les seqüències subtelomèriques de ratolí analitzades. pQL2 correspon a un plasmidi dissenyat pel laboratori de Pavia el qual conté un gen bacterià de resistència a l'ampicil·lina, un gen amb promotor eucariota (SV40 early promoter) de resistència a la puromicina, un origen de replicació bacterià (ColE1 origin), una regió amb múltiples dianes de restricció on es va inserir la seqüència d'interès (multicloning site), i el gen reporter de la GFP.

Per tal de comprovar, prèviament a la seqüenciació, que la colònia bacteriana seleccionada contenia el plasmidi amb l'insert esperat es va realitzar una digestió amb enzims de restricció que tallassin els constructes en diferents fragments de longitud coneguda (Taula 4.1.2). D'aquesta manera, mitjançant l'anàlisi de les bandes obtingudes en gel d'agarosa, es va poder

confirmar si les longituds dels constructes corresponen a les esperades o no i, alhora, estimar la concentració de DNA obtingut durant l'extracció.

Taula 4.1.2. Digestions dels diferents constructes per comprovar la longitud de l'insert.

Subtelòmer	ERs	Longitud dels fragments	Longitud total del constructe
2q	Nde I	5482 pb + 1195 pb	6677 pb
5q	Pst I	4639 pb + 2275 pb + 942 pb	7856 pb
11q	BamH I	5733 pb + 1192 pb	6925 pb
18q	Sca I	3508 pb + 3987 pb	7495 pb
Xq	EcoR I	5516 pb+1149 pb	6665 pb

(ERs) Enzims de restricció: Nde I, Pst I, Sca I, Bam HI, Eco RI (tots de Fermentas).

Desfosforilació i lligació

Els constructes es van obtenir inserint les diferents seqüències subtelomèriques amplificades dins el vector pQL2 (Fig. 4.1.2), dissenyat prèviament pel grup de la Universitat de Pavia, el qual conté els gens de resistència als antibiòtics ampicil·lina i puromicina, el gen *reporter* de la *green fluorescent protein* (GFP), una regió amb múltiples dianes de restricció (*multicloning site*) i un origen de replicació bacterià (Fig. 4.1.2). Un cop digerit amb els enzims de restricció adequats per a cada insert, el plasmidi es desfosforilava per impedir-ne la recirculació mitjançant SAP (Fermentas) seguint el protocol del fabricant. Breument, la mescla de reacció contenia el DNA plasmídic, tampó específic per a la SAP (1x), SAP (1U/μg), i aigua lliure de nucleases fins a arribar a un volum de 20μl. La reacció es va incubar a 37°C 1h i es va aturar incubant-la 15min a 65°C.

La reacció de lligació dels diferents fragments es va calcular en funció de la següent fórmula:

$$\frac{\text{ng pQL2} \cdot \text{kb insert}}{\text{kb pQL2}} \cdot \frac{3}{1} = \text{ng insert}$$

i es va dur a terme mitjançant un kit comercial de DNA lligasa T4 (Promega). Una cop preparada la mescla de la reacció de lligació, es va incubar tota la nit a 4°C.

Transformació de cèl·lules competents d'*E. coli*

Un cop descongelades les cèl·lules competents d'*E. coli* de la sèrie DH5 λ, se'ls van afegir 10μl de reacció de lligació per cada 100μl de suspensió de cèl·lules i es van incubar 20min en gel. Se'ls va aplicar un xoc tèrmic de 42°C durant 90s i 2min en gel. Aleshores, es van deixar créixer 1h a 37°C en un medi de cultiu no selectiu (SOB). Finalment, les cèl·lules d'*E. coli* es van

cultivar en e stria tota la nit a 37°C en plaques de medi LB suplementat amb ampicil·lina (Sigma-Aldrich).

Obtenció del DNA plasmídic (Midiprep)

La clonació d els constructes es va realitzar a partir del cultiu de grans volums d' aquelles colònies cultivades en placa on es va identificar un insert de longitud adequada mitjançant el rastreig per PCR (vegeu protocol PCR). En primer lloc, a partir de 200µl del cultiu realitzat durant el rastreig de les colònies, es va dur a terme un precultiu en 5ml de medi LB suplementat amb ampicil·lina durant ~8-9h a 250rpm i 30°C. D'aquest precultiu, se'n va fer una dilució 1:500 en 250ml de medi LB-ampicil·lina i es va incubar tota la nit a 30°C i 250rpm.

L'extracció del DNA plasmídic es va dur a terme mitjançant un kit comercial (Qiagen). El cultiu es va sacrificar centrifugant-lo 30min a 6000g i 4°C, i resuspenent les cèl·lules en un tampó de resuspensió. A continuació, es va incubar el pellet 5min en tampó de lisi i es va aturar la reacció incubant-lo 15min en gel en tampó de neutralització. La barreja es va centrifugar 30min a 4°C i 20000g, descartant el pellet de detritus cel·lulars i conservant el sobredendant. Es va repetir la centrifugació 15min a 20 000g i 4°C per descartar de tot les possibles impureses, i el sobredendant es va aplicar i deixar fluir per una columna que conté una reïna que capture el DNA plasmídic. Es va rentar la columna aplicant-hi 10ml de tampó de rentat (2 cops) i, finalment es va eluir el DNA plasmídic aplicant-hi 5ml de tampó d'elució a la columna. Per precipitar el DNA, es va afegir a l'elució 3,5ml d'isopropanol (0,7V) a temperatura ambient (TA) i es va centrifugar 30min a 15000g i 4°C. Es va descartar el sobredendant, s'hi va afegir etanol al 70% per rentar el DNA precipitat, i es va centrifugar 15min a TA i 15000g. Finalment, un cop descartat el sobredendant, es va deixar assecar el DNA a 37°C i es va resuspendre en aigua miliQ esterilitzada per autoclau.

La verificació de les seqüències clonades es va realitzar mitjançant la seqüenciació pel mètode de Sanger del DNA obtingut (BMR Genomics).

Cultiu de cèl·lules HeLa i transfecció

La transfecció d els diferents constructes es va dur a terme en cèl·lules HeLa donada la seva elevada eficiència per a suportar protocols de transfecció mitjançant vectors plasmídics (Fig. 4.1.1). Per a cada experiment, es va transfectar un cultiu de cèl·lules HeLa per a cadascun dels vectors amb els inserts d'interès i, alhora, dos cultius més: un cultiu amb el vector pQL2 sense

Resultats

seqüència promotora davant el gen de la GFP i un altre amb el vector pQL2 amb el promotor de citomegalovirus (CMV).

Les cèl·lules HeLa es van cultivar en medi DMEM suplementat amb sèrum boví fetal sota condicions estàndard (37°C, 5% de CO₂). Per a la transfecció, un dia abans es van cultivar entre 100000-150000 cèl·lules sobre un cobreobjectes dins una placa de Petri de 2 ml. La transfecció es va dur a terme mitjançant Lipofectamina (Invitrogen) seguint les instruccions del fabricant. Breument, d'una banda, es va diluir la Lipofectamina en medi DMEM i es va incubar 5min, i de l'altra, es van diluir 4 µg de DNA plasmídic també en DMEM. Passat el temps d'incubació, es va reunir el contingut dels dos tubs i es va incubar 5min per tal que el plasmidi entrés dins els liposomes de la Lipofectamina. La suspensió resultant es va afegir a 2 ml de medi DMEM i la mescla es va abocar a les cèl·lules cultivades sobre el cobreobjectes. Finalment, es van incubar les cèl·lules tota la nit a 37°C i l'endemà se'ls va renovar el medi. Els cultius transfectats es van sacrificar passades 48h de la transfecció.

Preparació dels cultius per a l'observació al microscopi

Passades 48h de transfecció, les cèl·lules HeLa es van rentar amb 1x PBS dues vegades i es van fixar amb paraformaldehid al 2% en 1x PBS durant 10min. Aleshores, es van fer dos rentats més amb 1x PBS i se'n van tenyir els nuclis amb 200mg/ml de DAPI en 1x PBS durant 3min. Finalment es va fer un últim rentat amb 1x PBS i es va fixar el cobreobjectes amb les cèl·lules en un portaobjectes.

Captura i anàlisi de les imatges

Les imatges es van capturar amb un microscopi de fluorescència ZEISS Axioplan equipat amb una càmera CCD (Photometrics), i posteriorment es van processar mitjançant el programa de captura IPLab Scanalytics Software (Spectraservices). L'activitat promotora de les seqüències analitzades es va avaluar en funció de l'observació de fluorescència emesa per l'expressió del gen de la GFP. Les cèl·lules transfectades amb el vector “buit” i amb el constructe amb el promotor CMV es van utilitzar, respectivament, com a control negatiu i positiu de la transfecció cel·lular.

RESULTATS

Anàlisi *in silico*

Les seqüències subtelomèriques del genoma de ratolí es van identificar mitjançant diferents eines bioinformàtiques. En primer lloc, l'*NCBI map viewer* va permetre rastrejar cadascun dels cromosomes de ratolí per tal de saber si les bases de dades del genoma publicat de ratolí incloïen, a més de les zones codificant les cromosomes, les seqüències de DNA subtelomèriques i telomèriques. En segon lloc, introduint la seqüència problema (TTAGGG)₅ al programa *Mouse BLAT search* de la UCSC *Genome Browser* (Kent, 2002), es van poder localitzar els cromosomes que tenien seqüenciat el DNA telomèric. D'aquesta manera va ser possible excloure les seqüències subtelomèriques incompltes per que no tinguessin només a més aquelles que estaven seqüenciades en la seva totalitat. I en tercer lloc, el programa *Repeat Masker*, que distingeix les regions de DNA que contenen seqüències repetitives, va facilitar la identificació del límit entre telòmer i subtelòmer a partir de la detecció de l'inici de les repeticions TTAGGG telomèriques. Aquesta primera aproximació va permetre establir que els únics braços cromosòmics del genoma de ratolí on el subtelòmer estava completament seqüenciat són els braços 2q, 5q, 11q, 18q i Xq (Fig. 4.1.1).

Una cop determinades les seqüències subtelomèriques d'interès, es van explorar per localitzar-hi seqüències amb característiques específiques que indiquessin una possible activitat promotora, en base als resultats obtinguts per Nergadze i col·laboradors (2009) i a les característiques típiques dels promotores tipus *sharp* de mamífer (Sandelin, *et al.*, 2007). Tot i que, com s'ha explicat anteriorment, dos dels tres elements de DNA repetitiu que formen el promotor de TERRA en humà contenen illes CpG (Nergazde, *et al.*, 2009), el rastreig de les seqüències subtelomèriques de ratolí esmentades mitjançant el programa *EMBOSS Cpgplot* no va localitzar cap regió rica en dinucleòtids CpG. Per aquest motiu, la identificació de possibles seqüències promotores es va dur a terme mitjançant el programa NNPP (Reese i Eeckman, 1995), el qual identifica els tres elements característics dels promotores de mamífer als quals s'hi uneix la RNAPII, com són la caixa TATA (de seqüència TATAA 28–34 pb *upstream*, és a dir, en direcció 5' del TSS) o l'element iniciador (la seqüència consens del qual és un A és a la posició +1 del TSS, N pot ser qualsevol nucleòtid; Y pot ser C o T; i W pot ser A o T) (Sandelin, *et al.*, 2007). De totes les seqüències proposades pel programa, es van escollir per a l'estudi aquelles que tenien una millor puntuació proporcionada pel programa (*score* per sobre de 0.85) i que es trobaven més properes a la regió limítrofa amb les repeticions telomèriques (Taula 4.1.3; vegeu també Annex), donant que en aquesta regió està situat el promotor de TERRA identificat en humà (Nergazde, *et al.*, 2009).

Taula 4.1.3. Seqüències promotores putatives seleccionades per a l'estudi.

Subtelòmer	Score ^a	Seqüència promotora putativa
2q	0.97	agctttattgtaaaaaaggcaggggaaagagaaaaggtaaaaaaaagaga
	0.97	ctagctgcataatatatccaaaggatggcttagtcggccatcactggaaaga
	0.99	acgcccaggccaaaaagggggagtgggtggcaggggagtggggtgggt
5q	0.93	aaaacatgaataaagagtccggtaagagagagtggggcaatcagacag
	0.97	aaaggtaaaataaaagaggggagtcaattgcctgttaatccaatata
11q	0.90	actttaaaaggtaaaaaggaaagagaaacaacaagaccatttttta
	0.94	gaagataaaaattgtaaatacagagctgagagacggctcagcagttaag
18q	0.88	gaatcctgatgtaaatcgggcgtggcatacgccttaatccagea
Xq	0.99	gaagataaaaatgttaatacggagctgagagacggctcagcagttaag

(a) Puntuació proporcionada pel programa NNPP.

Anàlisi *in vitro*

A partir de les anàlisis *in situ* esmentades, es va delimitar i amplificar les regions del subtelòmer dels braços cromosòmics 2q, 5q, 11q, 18q i Xq, des de l'inici de les repeticions telomèriques fins aproximadament 1500-2700 nt *upstream*. Donat que les seqüències d'interès eren altament repetitives, es va haver d'optimitzar tant el cultiu de les cèl·lules bacterianes com l'obtenció del DNA plasmídic amb els diferents inserts. En primer lloc es va establir que la temperatura óptima per tal d'obtenir cultius de cèl·lules d'*E. coli* transformades que contingessin un elevat nombre de còpies del plasmidi era de 30°C. A 37°C, que correspon a la temperatura óptima per al creixement exponencial d'*E. coli*, la ràpida taxa de multiplicació i per tant, de replicació del DNA bacterià, afectava negativament a la correcta replicació de les seqüències altament repetitives que contenen els constructes. Això dificultava tant l'obtenció de colònies bacterianes que contingessin els inserts amb la seqüència correcta i completa (Fig. 4.1.3), com l'extracció de quantitats suficients de DNA plasmídic amb qualsevol dels protocols d'extracció testats (no se'n mostren les dades). A causa de la dificultat en la replicació dels constructes dins les cèl·lules d'*E. coli*, es va haver de provar diferents mètodes d'extracció de DNA plasmídic per tal d'obtenir-ne la quantitat suficient per a la transfecció. Finalment, es va optar per l'extracció mitjançant un protocol de Midiprep a partir d'un kit comercial (Qiagen), detallat a la secció de material i mètodes.

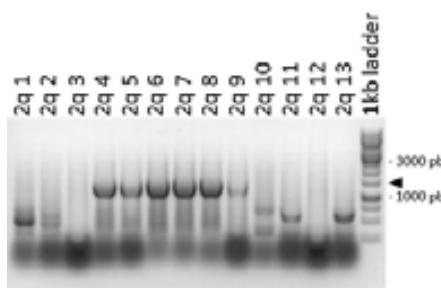


Figura 4.1.3. Rastreig de colònies d'*E. coli* transformades amb el constructe 2 q. Exemple de rastreig de tretze (2q1-2q13) colònies d'*E. coli* transformades amb el vector p QL2-2q. A l'adreta, el marcador de pesos moleculars d'1kb (1kb ladder; Fermentas) permet identificar les bandes de longitud equivalent a la seqüència inserida (1503 pb en aquest cas). El cap de fletxa (►) indica l'alçada del gel on es troben les seqüències de longitud correcta.

Un cop obtingut el DNA del vector amb l'insert teòricament correcte, es van seqüenciar les seqüències clonades dins els constructes (vegeu Annex), la qual cosa va permetre comprovar que en la majoria de les cases els inserts van coincidir amb les seqüències subtelomèriques identificades inicialment *in silico*. Només la seqüència 11q no va coincidir amb el subtelòmer esperat, sinó que va correspondre a la seqüència subtelomèrica del braç 8q. A més, en comparar les seqüències obtenudes amb les seqüències subtelomèriques del genoma de ratolí, es va observar que mentre les seqüències 2q, 5q i 11q coincidien amb las seqüències d'un únic subtelòmer, les seqüències 18q i Xq es localitzaven als subtelòmers de múltiples cromosomes i a algunes regions no telomèriques, probablement correspondents a les seqüències telomèriques intersticials (Fig. 4.1.4). Fins i tot, en molts casos les seqüències identificades del 18q i del Xq es localitzaven al mateix subtelòmer.

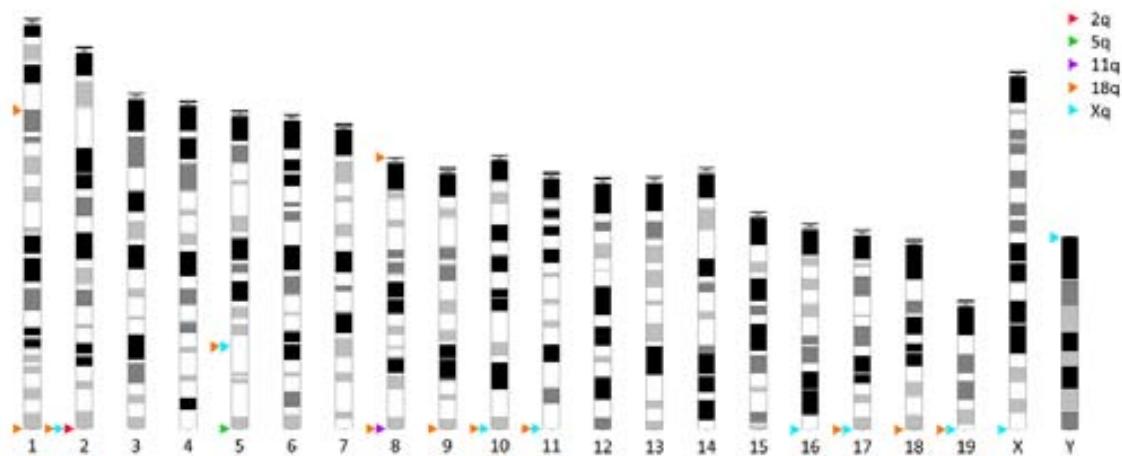


Figura 4.1.4. Localització de les seqüències subtelomèriques analitzades. Ideogramma del genoma de ratolí on s'hi assenyalen les regions amb seqüències coincidents amb cada una de les seqüències subtelomèriques analitzades (►).

Una vegada verificades les seqüències, els diferents constructes es van transfectar en cultius de cèl·lules HeLa es tàndard. Passades 48h de la transfecció, es va comprovar si les cèl·lules expressaven el gen de la GFP com a conseqüència de l'activitat promotora de les seqüències inserides, no es va observar en cap dels casos emissió de fluorescència verda al nucli de les cèl·lules HeLa (Fig. 4.1.5). En canvi, es va detectar fluorescència procedent de l'expressió de la GFP en les cèl·lules transfectades amb el plasmidi que contenia l'insert amb el promotor de CMV, un potent promotor viral que s'activa constitutivament en transfectar-lo en cèl·lules humanes.

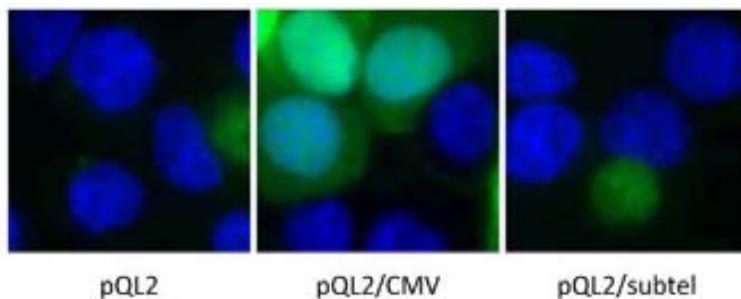


Figura 4.1.5. Expressió de la GFP en cèl·lules HeLa en funció del vector transfectat. Es mostren exemples de nuclis de cèl·lules HeLa tonyits amb DAPI (blau) on s'observa expressió o no del gen de la GFP (verd). (pQL2) Cèl·lules HeLa transfectades amb el vector pQL2 sense cap seqüència promotor. (pQL2/CMV) Cèl·lules HeLa transfectades amb el vector pQL2 que conté el promotor CMV. (pQL2/subtel) Exemple de cèl·lules HeLa transfectades amb el constructe pQL2-5q.

DISCUSSIÓ

Tenint en compte que els elements repetitius 61-29-37 del promotor de TERRA en humà es troben ~280 nt *upstream* de les repeticions telomèriques (Nergazde, *et al.*, 2009), es va dur a terme l'estudi i identificació *in silico* de les diferents regions subtelomèriques d'interès del genoma de ratolí que estan trobades immediatament *upstream* del telòmer (fins 2673 pb). En principi, el fet que les seqüències analitzades dels subtelòmers 2q, 5q i 11q (8q) es localitzen exclusivament al subtelòmer d'on ha vinent estat aïllades indicaria que la possible seqüència promotora de TERRA no es trobaria dins aquestes seqüències concretes, ja que l'associació de TERRA a les telòmers en les cèl·lules de ratolí s'ha observat en múltiples cromosomes (Schoeftner i Blasco, 2008), suggerint que, tal com s'ha vist en humà (Nergazde, *et al.*, 2009), TERRA es transcriuria a partir del telòmer dels diferents cromosomes de ratolí. En canvi, el fet que les seqüències subtelomèriques 18q i Xq es trobessin en un gran nombre de subtelòmers, indicava que es podrien tractar de possibles seqüències subtelomèriques conservades. Per tant, si considerem que en humà la seqüència promotora coneguda de TERRA es troba inclosa dins de gran part dels subtelòmers (Nergazde, *et al.*, 2009), es va considerar la possibilitat de que en cas que el promotor de TERRA de ratolí es localitza a la regió subtelomèrica dels cromosomes, estigués contingut en alguna d'aquestes dues seqüències (18q i/o Xq).

D'altra banda, la cerca de possibles seqüències promotores dins les regions subtelomèriques estudiades va posar de manifest que, en contrast amb els subtelòmers humans (Nergazde, *et al.*, 2009), en ratolí no existeixen regions riques en dinucleòtids CpG dins les seqüències subtelomèriques més properes a l'extrem 3' del cromosoma. De fet, la metilació de les illes CpG dels subtelòmers humans regula activament l'expressió de TERRA, ja que la inhibició tant de la histona desacetilasa (Azzalin, *et al.*, 2007) com de l'expressió de les DNMT1 i 3b

(Nergazde, *et al.*, 2009) en línies cel·lulars humanes provoca l'increment de la transcripció i dels nivells de TERRA. En canvi, s'ha vist que el bloqueig de l'expressió de les DNMT1 i 3a/b en cèl·lules marembrionàries de ratolí provoca una reducció dels nivells de TERRA (Schoeftner i Blasco, 2008). A més, tant les cèl·lules mare de ratolí, com les cèl·lules pluripotents induïdes i els fibroblasts d'origen embrionari d'aquesta espècie, presenten totes el mateix grau de metilació del DNA subtelomeric i, alhora, diferents nivells de TERRA (Marion, *et al.*, 2009). Aquestes observacions concorden amb el fet que no fos possible detectar illes CpG als subtelòmers estudiats, la qual cosa suggereix que la metilació de dinucleòtids CpG de les seqüències subtelomèriques podria no ser el mecanisme de regulació de la transcripció de TERRA en aquesta espècie i, per tant, el promotor de TERRA en ratolí podria no estar format per illes CpG.

Finalment, malgrat que les seqüències analitzades es localitzaven a la zona limítrofa amb les repeticions telomèriques i que dues d'elles coincidien en seqüència amb múltiples subtelòmers del genoma de ratolí, cap dels subtelòmers analitzats no va presentar activitat promotora. Aquest fet podria venir donat per diversos raons. D'una banda, és possible que la seva naturalesa altament repetitiva – que va dificultar la transformació de les cèl·lules competents d'*E. coli* i va reduir l'eficiència de replicació del plasmidi – afectés també negativament l'eficiència de transfecció de les cèl·lules HeLa, tot i que els controls positius negatius utilitzats per a la transfecció mostressin resultats coherents. I de l'altra, tenint en compte l'absència d'il·les CpG, així com les diferències en la regulació de la transcripció de TERRA observades en ratolí en comparació als resultats obtenuts en cèl·lules humanes (Azzalin, *et al.*, 2007; Schoeftner i Blasco, 2008; Marion, *et al.*, 2009; Nergazde, *et al.*, 2009), existeix la possibilitat de que el promotor de TERRA no es localitzi dins les regions subtelomèriques més properes a les repeticions telomèriques, sinó en seqüències més allunyades del telòmer.

CONCLUSIONS

En la literatura, mai no s'ha donat importància al fet que els (escassos) estudis sobre TERRA dut a terme en cèl·lules de ratolí suggeren que la regulació de la seva transcripció en aquesta espècie no seria equivalent a l'observada en cèl·lules humanes (Schoeftner i Blasco, 2008; Marion, *et al.*, 2009). En canvi, els nostres resultats de l'estudi del promotor de TERRA en ratolí proporcionen evidències en aquest sentit. D'una banda, el nostre estudi posa de manifest que la seqüència promotora de TERRA en ratolí no contindria illes CpG, tal com s'ha suggerit prèviament en llevats (Bah, *et al.*, 2012; Pfeiffer i Lingner, 2012). La qual cosa concorda també amb les diferències observades entre cèl·lules humanes i de ratolí pel que fa a l'efecte de la

metilació de les seqüències subtelomèriques sobre la transcripció de TERRA (Schoeftner i Blasco, 2008). D'altra banda, considerant que tant el promotor de TERRA en humà (Nergazde, et al., 2009) com el TSS de TERRA en llevats (Bah, et al., 2012; Pfeiffer i Lingner, 2012) s'han identificat pocs nucleòtids *upstream* de l'inici de les repeticions telomèriques, és poc probable que el promotor de TERRA en ratolí es situï fora dels subtelòmers. No obstant, els tres resultats indiquen que no es trobaria a la regió subtelomèrica adjacent al DNA telomèric. Així doncs, serà interessant i necessari estudiar en un futur altres regions de les seqüències dels subtelòmers de ratolí, així com les seqüències completes (un cop seqüenciades) de les regions subtelomèriques del genoma d'aquesta espècie.

BIBLIOGRAFIA

- Arnoult, N., Van Benden, A. i Decottignies, A., 2012. Telomere length regulates TERRA levels through increased trimethylation of telomeric H3K9 and HP1α. *Nat Struct Mol Biol*, doi: 10.1038/nsmb.2364.
- Azzalin, C. M., et al., 2007. Telomeric repeat-containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science*, 31:798-801.
- Bah, A., Wischnewski, H., Schepachev, V. i Azzalin, C. M., 2012. The telomeric transcriptome of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res*, 40:2995-3005.
- Deng, Z., et al., 2012a. A role for CTCF and cohesin in subtelomere chromatin organization, TERRA transcription, and telomere end protection. *EMBO J*, 31:4165-78.
- Deng, Z., et al., 2012b. Formation of telomeric repeat-containing RNA (TERRA) foci in highly proliferating mouse cerebellar neuronal progenitors and medulloblastoma. *J Cell Sci*, 125:4383-94.
- Kent, W., 2002. BLAT- the BLAST-like alignment tool. *Genome Res*, 12:656-64.
- Luke, B., Panza, A., Redon, S. i et al., 2008. The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*, 21:465-77.
- Marion, R. M., et al., 2009. Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 4:141-54.

- Nergazde, S. G., *et al.*, 2009. CpG-island promoters drive transcription of human telomeres. *RNA*, 15:2186-94.
- Palm, W. i de Lange, T., 2008. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet*, 42:301-34.
- Pfeiffer, V. i Lingner, J., 2012. TERRA promotes telomere shortening through exonuclease 1-mediated resection of chromosome ends. *PLoS Genet*, 8:e1002747.
- Porro, A., Feuerhahn, S., Reichenbach, P. i Lingner, J., 2010. Molecular dissection of telomeric repeat-containing RNA biogenesis unveils the presence of distinct and multiple regulatory pathways. *Mol Cell Biol*, 30:4808-17.
- Reese, M. G. i Eeckman, F. H., 1995. Novel neural network algorithms for improved eukaryotic promoter site recognition. *The Seventh International Genome Sequencing and Analysis Conference, Hilton Head Island, South Carolina*.
- Sandelin, A., *et al.*, 2007. Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet*, 8:424-36.
- Schoeftner, S. i Blasco, M. A., 2008. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nature*, 10:228-36.
- Van Beneden, A., Arnoult, N. i Decottignies, A., 2013. Telomeric RNA expression: length matters. *Front Oncol*, 3:178.
- Vrbsky, J., Akimcheva, S., Watson, J. M., Turner, T. L., Daxinger, L., *et al.*, 2010. siRNA-mediated methylation of Arabidopsis telomeres. *PLoS Genet*, 6:e1000986.
- Yehezkel, S., *et al.*, 2008. Hypomethylation of subtelomeric regions in ICF syndrome is associated with abnormally short telomeres and enhanced transcription from telomeric regions. *Hum Mol Genet*, 17:2776-89.

ANNEX

A continuació es detallen les seqüències de cadascun dels constructes que es van dissenyar i generar en aquest treball. En minúscules s'assenyalen les seqüències repetitives. En vermell s'indiquen les seqüències promotores putatives dins les seqüències subtelomèriques de ratolí inserides (subratllades) en el vector pQL2. S'indica també la longitud de cada un dels constructes.

pQL2 amb subtelòmer 2q (6677 nt)

```

GCACCTTTCGGGAAATGTGCGCGAACCCCTATTGTTATTTCTAAATACATTCAAATATGTATCC
GCTCATGAGACAATAACCTGATAATGCTTCATAAATATTGAAAAAGGAAGACTATGAGTATTCAACAT
TTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTGCGGCATTTGCCTCCTGCTACCCAGAAACGCTGG
TGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGgtgcacGAGTGGTTACATCGAACTGGATCTAACAGCGG
TAAGATCCTTGAGAGTTTCGCCCGAAGAACGTTTCCAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGT
GGCGCGGTATTATCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATG
ACTTGGTTGAGTACTCACAGAACAGCATCTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAG
TGCTGCCATAACCAGTAGTGATAACACTGCGGCCACTTACTCTGACAACAGATCGGAGGACCGAAGGAG
CTAACCGCTTTTGACAAACATGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTGGAAACCGGAGCCTGAATG
AAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACATT
AACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCGGACAACATTAATAGACTGGATGGAGGCGATAAGTTGCA
GGACCACTCTCGCCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAAATCTGGAGGCCGGTAGCGTG
GGTCTCGCGGTATCATTGACGACTGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCGTATCGTAGTTATCTACACGAC
GGGGAGTCAGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCGCTACTGATTAAGCAT
TGGTAACTGTCAGACCAAGTTACTCATATATACTTAGATTGATTTAAACTTCATTTAATTAAAAA
GGATCTAGGTGAAGATCCTTTGATAATCTCATGAccaaaatccctaacgtgagtttcgttccactg
agcgtcagaccccttagaaaagatcaaaggatcttcttgagatctttctgcgcgtaatctgctgc
ttgcaaaaaaccaccgcgtaccagcggtgggtttgccggatcaagagctaccaactctttc
cgaaggttaactggctcagcagagcgcagataccaaactgtcctctgttagtgttagccgttaggcca
ccacttcaagaactctgttagcaccgcctacatacctcgctctgtaatcctgttaccagtggctgctgcc
agtggcgataagtctgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggcgg
gctgaacgggggtcgtgcacacagcccagttggagcgaacgcacactgagataccata
gcgtgagctatgagaaagcgcacgcgtcccaaggagaaaggcggacaggtatccgtaagcggcagg
gtcgaaacaggagagcgcacgcggagcttcagggggaaacgcctggatcttatacgatgtcgtcggt
ttcgccacctctgacttgagcgtcgattttgtatgtcgctcaggggggcggagcctatggaaaaacgc
cagcaacgcggccTTTTACGGTTCTGGCCTTTGCTGGCCTTGCTCACATGTTCTTCCTGCGTTA
TCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTGAGTGGACTGATACCGCTGCCGCAGCCGAACGA
CCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCG
TTGGCCGATTCTGAGTAACTGAGCTGGCACGAGGTTCCGACTGGAAAGCGGGAGTGAGCGCAACGCA
ATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTACACTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGT
GTGGAATTGTgagcggtataacaattcacacaggaaacagctatgaccatgATTACGCCAGCTCGAAAT
TAACCCCTCACTAAAGGAACAAAAGCTGGTACCGGGCCCCCtcgaGaCAGGTGGACAGCTCAGAGACA
TGAAAGTGTCTGcataggcagtaaatcctgatggctacagagttctcaagtcttagcatgccatactt
tcaaacggcatggtaggaatttacattacagttggatacatggccaaacagacttcaaaagttgat
gcctttatccttgcactaagagcaaagactcatctctaactgaattgtgcacactgcacatcccat
acatatgttaacgcagaaatgtgttacttggatacatgtttgcagaatgaaagaaccataga
ccaaagaagacaagtgcggcaggtgattcgcctcagagactgctgcagctattgttccctcaaacatct
gcatccagacaaaagcatttatgctgctaaatggacttccagtgtagtcacaaactgttccagccagga

```

ctggagttaaggccctgcacttccacaacacacagaaactggataacaatattatcactagtttcttaa
cactgatcaatattccaggttcttggcacccctcaaaaacctgatgccccaaatagcagaaagcaat
attgagataatgatactccattctcaaaaagtgttagtaattttgtcatttaggaggtatcttttat
tgttattagtcaaagagaaacaaaataagggaggttagattcaaacattttctcttttttc
ttttctatatacttctctcctatataatgtttagggaaagtggaaagaaaaataaaaagaaaaag
gaaggagctaaaggatctgcaaccctataggtaacaacattatgaactaaccgtaccccgagctc
ttgactctagctgcataatatataaaaagatggcctagtcggccatcactggaaagagggccattggac
ttgcaaaactttatgccccagtagcaggggaacgccaggccaaaaaggggagtggtggcagggag
tggtgggtgggtgggtgtggggacttttgtatagcattggaaatgtaaatgagctaatacctaataaaa
aaatggaaaaaaaagaaaaaaaagaaaaaggggaaacatcagaatgataagataaaggatattattg
aatctacttttagagtaaagagaattaataagtacatgtatgcattttactcttttgtttaaggtattgt
acctgttgcactcattataatgaaactttaatcgttttaaaagttgttattacaaaAGT
CCTTTAAAAGTTATTACAAACTGTCAGGATAATTAAAAATGAAAATCAAAGAAAAATAAAAAGA
GAAAGTCATATGGAATCCTAATTATAACACACAAACATCTATGAAGTTAATTATggtagggAATTCT
GCAGTCGACGGTACCGCGGGCCGGATCCACCAGGTGCCAccatggTGAGCAAGGGCAGGAGCTGTC
ACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCAGCTGGACGGCACGTAAACGCCACAAGTCAGCGTGTCCGGCG
AGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCGT
GCCCTGGCCCACCCCTGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTGAGTGCCTCAGCCGCTACCCCGACCACATG
AAGCAGCACGACTTCTTCAGTCCGCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTCTTCAGG
ACGACGGCAACTACAAGACCCGGCCGAGGTGAAGTTGAGGGGACACCCCTGGTAACCGCATCGAGCT
GAAGGGCATTGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCAC
AACGTCTATATCATGGCCACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCG
AGGACGGCAGCGTCAGCTGCCGACCACCTACAGCAGAACACACCCCCATCGCGACGGCCCCGTGCTGCT
GCCGACAACCAACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCATCACATG
GTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGATCACTCTGGCATGGACCGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCC
GCGActctagaTCATAATCAGCCATACCACATTGTAGAGGTTACTTGCTTAAAAACCTCCCACAC
CTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTAACCTGTTATTGCAAGCTTATAATG
GTTACAAATAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTGTTACTGCATTCTAGTTGTGG
TTTGTCCAACCTCATCAATGTATCTTAAGCGTAAATTGTAAGCGTTAATATTGTTAAAATTGCGTT
AAATTGTTAAATCAGCTATTGTTAACCAATAGGCCGAAATCGCAAACCTTATAAAATCAAAA
GAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACT
CCAACGTCAAAGGGCAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGCCACGATCCAGACATGATAAGATACTTG
ATGAGTTGGACAAACCACAACAGAATGCACTGAAAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
TGCTTTATTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAAGTTAACACAATTGCAATTCTGTTATTGCTAT
CAGGTTAGGG
TCGGAGccatggGGCGTGCCTTCGGTGGCGCTGGCGCTGGGGCGTGGGGCGTGGGGGGGGGGGGGGGG
GCTTGCGGGTATGCACCAGGTGCGCGGCTTCGGCACCTCGACGTGGCGGTGACGGTAAGCCGAG
CCGCTCGTAGAAGGGGAGGTTGCGGGCGCGAGGTCTCAGGAAGGCCGACCCGGCGCGCTCGGCC
GCCTCCACTCCGGGGAGCACGACGGCGTCCCAGACCCCTGGCTGGTGGCGAGACGCCGACGG
TGGCCAGGAACCACGCGGCTCCTGGGCGGTGCGCGCCAGGAGGGCTTCATCTGTTGCTGCGCGGC
CAGCCGGGAACCGCTCAACTCGGCCATGCGCGGGCGATCTCGCGAACACGCCCGCTCGACGCTC
TCCGGCGTGGTCCAGACGCCACCGCGGGCGCTCGTCCCGACCCACACCTGCGATGTCAGGCCGA
CGCGCGTGGAGGAAGAGTCTTGCAGCTGGTACCCGCTCGATGTGGCGGTCCGGGTGACGGTGTGGCG
CGTGGCGGGGTAGTCGGCAACGCGGGCGAGGGTGTGAGGCCCCGGGGACGTCGTGCGGGGGGG
AGGCGCACCGTGGGCTTGACTCGGTATGGAAGGTCGTCTCTTGAGGGGTGAGGGCGTGGGTGAG
GGGATGGTGGCGGCACCGGTGCGGGCGACCTGCAAGCTAGCTTGTCAAAGCCTAG
GCCTCCAAAAAAAGCCTCTCAACTACTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCCTCGCATAA
ATAAAAAAATTAGTCAGccatggGGCGGAGAATGGCGGAactggcgaggttagggGCGGGATGGGCG
GAGTTAGGGGGGGACTATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTGCATACTTCTGCCTGCTGGG
GCCTGGGGACTTCCACACCTGACTAATTGAGATGCATGCTTGCATACTTCTGCCTGCTGGG
GAGCCTGGGGACTTCCACACCTAAGCACACACATTCCACAGGGCTTCCCGTCAAGCTCTAAATCG

Resultats

GGGGCTCCCTTAGGGTTCCGATTAGTGCTTACGGCACCTCGACCCCCAAAAACTGATTAGGGTGAT
GGTTCACGTAGTGGGCCATGCCCTGATAGACGGTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTA
ATAGTGGACTCTTGTCTCAAACACTGGAACAACACTCAACCCTATCTGGTCTATTCTTTGATTATAAGG
GATTGGCCATTCTGGCTATTGGTAAAAAATGAGCTGATTAAACAAAATTAAACGCAATTAAAC
AAAATATTAAACGCTTACAATTAGGTG

pQL2 amb subtelòmer 5q (7856 nt)

GCACCTTCGGGAAATGTGCGCGAACCCCTATTGTTATTTCTAAATACTAAATATGTAT
CCGCTCATGAGACAATAACCTGATAATGCTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCA
ACATTCCTGTGCCCTTATTCCCTTTGCGGCATTGCTCCTGTTTGCTCACCCAGAAA
CGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTGGgtgcacGAGTGGTTACATCGAACTGGATCTC
AACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTGCCCCGAAGAACGTTTCCAATGATGAGCACTTTAAAGT
TCTGCTATGTGGCGCGTATTATCCCATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGTCGCCGCATACACT
ATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATTTACGGATGGCATGACAGTA
AGAGAATTATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCACTTACTCTGACAACGAT
CGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTGACAACATGGGGATCATGTAACTCGCCTGATCGTT
GGGAACCGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTACACCACGATGCCGTAGCAATGGCA
ACAACGTTGCGCAAACATACTGGCAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTG
GATGGAGGCGGATAAAGTTGAGGACCACTTCTGCCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTG
ATAAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCC
TCCCGTATCGTAGTTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGC
TGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTACTCATATATACTT
TTGATTAAAACCTCATTAAATTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTGATAATCTCATGAcc
aaaatccctaactgtagttcgccactgagcgtcagacccgtagaaaagatcaaaggatctc
ttgagatccttttctgcgcgtaatctgctgctgcaaaacaaaaaccaccgttaccagcggtgg
ttgtttccggatcaagagactccaactctttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagata
ccaaatactgtcctctagtgttagccgttagccaccactcaagaactctgttagcaccgcctac
atacctcgctctgtaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggt
tggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctggctgaacgggggttcgtgcacacag
cccagctggagcgaacgacccactacccgaacttagatacagcgtgagctatgagaaagcgcac
gcttccgaagggagaaaggcggacaggatccggtaagcggcagggtcggacaggagagcgcac
gggagctccaggggaaacgcctgttatctttagtgcctgtgggttcgcacactctgacttgag
cgtcattttgtgtcgtagccgttagggggggcggagcctatggaaaaacgcgcac
ACGGTTCTGGCTTTGCTGGCTTTGCTCACATGTTCTTCCCTGCTTATCCCTGATTCTGTGG
ATAACCGTATTACCGCTTGAGTGAAGCTGATACCGCTGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAG
TCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGCAAACCGCCTCCCCGCGCGTTGGCGATTCA
TTAATGCACTGGCACGACAGGTTCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTATGTGA
GTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTACACTTATGCTTCCGGCTGTATGTTGTGGAATT
GTgagcggataacaattcacacagggaaacagctatgaccatgATTACGCCAAGCTCGAAATTAAACCC
TCACTAAAGGAACAAAGCTGGTACCGGGCCCCCTCGAGCtcaAgcttGCAACTCAACAGAGACA
CCACTGTCTGCTGAAGCAAAGAATTGAAAGCAAGCACAGACAATTTCAGGTTGATGACTACAAAC
AAATTATGTCTGAATATCTAGATGTTCAATAGGTGATAGTCATGCCCTATTTGCTTACTG
ACACATAAAATTAGACTGAGCACCTAATTAACTCTAGGCTCAATTACCAAAATTCCCTAAA
GCTATTATGGGATAGAACCCACTCGGCAGCAATGGGTATAATTTCACATTCTGAAAATAAGAGCA
AAGCAACAAAGAGGAAAATGCTTATTGGAAAGAGCATTGTTAGAAAGAATTAAAGCACACAGTTGGG
AGTTTGACTCCTGGGTTTCACTCTGTCATGGAACGTGAGAGGAGAGAAAATGTTGAAGTGAAC
ACCTTGTCAGAGAGAGAGGATATCAATGGACAGGTCTGGTGTGATCCAAATGGTAAACTGTAATTCA
GACAAGGGGAGCTGCAAATACAATGGGTGTAGTTACCTTTACATGTATCAGTCAAAGAGTC
AAGCGAATGTGTAACTAATCATAGAATAAAAGCTAGAACTAAACCAATTTCAGAAGGGAGGC
TGTGCCAGGCAATGACTTCTAGCTGCCACTAATTGATAAAAGTTCAAAGAGTGTAAACTTGG

Resultats

CCTTCGGGCACCTCGACGTCGGCGGTGACGGTGAAGCCGAGCCGCTCGTAGAAGGGGAGGTTGCGGGG
CGCGGAGGTCTCCAGGAAGGCGGGCACCCCGCGCCTCGGCCCTCACTCCGGGAGCACGACGG
CGCTGCCAGACCCCTGCCCTGGTGGTCGGCGAGACGCCGACGGTGCCAGGAACCACGCCGGCTCC
TTGGGCCGGTGC GGCGCAGGAGGCCTTCATCTGTTGCTGCGCGCCAGCGGGAACCGCTCAACTC
GGCCATGCCGGGCCGATCTCGCGAACACCGCCCCCGCTCGACGCTCTCCGGCGTGGTCCAGACCG
CCACCGCGCGCCCGTCCCGCACCCACACCTGCGATGTCGAGCCGACGCCGTGAGGAAGAGT
TCTTGAGCTCGGTGACCCGCTCGATGTCGGTCCGGTCCACGGTGTGGCGCGTGGCGGGTAGTC
GGCGAACCGGGCGAGGGTGCCTGACGGCCGGGGACGTCGTCGCGGGTGGCGAGGCGCACCGTGG
GCTTGACTCGGTATGGAAGGTCGTCCTTGAGGGGTCAAGGGCGTGGTCAGGGGATGGTGGC
GGCACCGGTCGTGGCGGCCACCTGCAGGCATGCAAGCTAGCTTGTCAAAGCCTAGGCCTCCAAA
AAAGCCTCTCACTACTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCCTCGCATAAATAAAAAA
AAATTAGTCAGGccatggGGCGGAGAATGGGCggaaactgggcccggagtttagggGCGGGATGGCGGAGTT
AGGGCGGGACTATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTGCATACTCTGCCTGCTGGGAGCC
TGGGGACTTCCACACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTGCATACTCTGCCTGCTGGG
AGCCTGGGACTTCCACACCTTAACCTGACACACACATTCCACAGGGCTTCCCGTCAAGCTCTAAATC
GGGGCCTCCCTTAGGGTCCGATTAGTGTCTTACGGCACCTCGACCCCAAAACTTGATTAGGGT
GATGGTTACGTAGTGGGCCATGCCCTGATAGACGGTTTGCCTTGACGTTGGAGTCCACGTT
CTTAATAGTGGACTCTTGTCCAAACTGGAACAACACTCAACCTATCTGGTCTATTCTTGATT
TATAAGGGATTTGCCGATTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAATTAACGCG
AATTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAGGTG

pQL2 amb subtelòmer 11q (6931 nt)

GCACCTTCGGGGAAATGTGCGCGAACCCCTATTGTTATTTCTAAATACATTCAAATATGTAT
CCGCTCATGAGACAATAACCTGATAATGCTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCA
ACATTCCTGTCGCCCTTATTCCCTTTTGCGGCATTTGCCTCCTGTTTGCTCACCCAGAAA
CGCTGGTAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGgtgcacGAGTGGTTACATCGAACTGGATCTC
AACAGCGTAAGATCCTTGAGAGTTTCCGGCGAACGACGTTTCAATGATGAGCAGCTTTAAAGT
TCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGTCGCCGCATACACT
ATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTA
AGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCCAACCTACTTCTGACAACGAT
CGGAGGACGAAGGAGCTAACGCTTTTGACAAACATGGGGATCATGTAACTCGCCTGATCGTT
GGGAAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAAACGACGAGCGTACACCACGATGCCCTGAGCAATGGCA
ACAACGTTGCCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTCCGGCAACAATTAATAGACTG
GATGGAGGCGATAAAGTGCAGGACCACTCTGCGCTGGCCCTCCGGCTGGTTATTGCTG
ATAAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCACTGGGCCAGATGGTAAGCCC
TCCCGTATCGTAGTTATCACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGC
TGAGATAGGTGCCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTACTCATATATACTT
TTGATTTAAACTCATTAAATTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTGATAATCTCATGAcc
aaaatcccttaacgtgagtttgcgttccactgagcgtcagacccgtagaaaagatcaaaggatctc
ttgagatccttttctgcgtaatctgtcgtcaaaacaaaaaccaccgtaccagcggtgg
tttgcgttgcggatcaagagctaccaactctttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagata
ccaaatactgtcctctagtgttagccgttaggcaccacttcaagaactctgttagcaccgcctac
atacctcgctctgctaattcctgttaccagtggctgtccagtggcgataactgtgtcttaccgggt
tggactcaagacgatgttaccggataaggcgcagcggctggctgaacgggggggtcgtgcacacag
cccagctggagcgaacgacccataccggacttagagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgcac
gcttcccgaaaggagaaaggcggacaggatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcac
ggagactccaggggaaacgcctgttatctttagtgcgtcgggttgcgcacactctgacttgag
cgtcgattttgtgatgcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgcccagcaacgcggcctttt
ACGGTTCCCTGGCCTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTCCTGCCATTCCCTGATTCTGTGG
ATAACCGTATTACCGCCTTGAGTGAAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGCAGCGAG

TCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCA
 TTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTATGTGA
 GTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTACACTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGGAATT
 GTgagcgataacaattcacacagggaaacagctatgaccatgATTACGCCAAGCTGAAATTAAACCC
 TCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGTACCGGGCCCCCCTCgAGATGAGCATGTAGACAGCACTGGAAAG
 AAAATAGCCTAAGCAAAAGCTCAGGGTAGGAGCAAAACACTTTAAAAGGTTAAAAGGAAGAGAAC
AAACAAGACCATCTTTTAAGGAATACCAATTGGCAGGCACAACAAAGTCTAAATTGTATTCAAAT
TATAACCCCACAATAATATCCTGCATATATGTAGGTTATCTGCACCGAGTTACATTATAACATGATCTA
ACGAGTCCTTCATGTCAGTGTCAATGCAGCTCACCACCTGCTATTTACTAGCATGGAAAAGCAG
CAGACAGGACAATGGTCAGCAAGATTGGGAATGATAAAGGATATTTCAGTTATAATATGAAATT
TAGGTACCCAGAACCTCAGAAGGCACAACCTCATAGATAGGTAAGGAGTACATGGACTTGTGAAAAAA
GCCATgaattcAAGAAGATAAAAATTGTAATACAgagctgagagacggctcAgagttaagacac
taactgtatcttcagaggtcctgagatcaattccagcaaccacatggtggtcacaaccatctgtaa
tgggatcctatgctcttctgtgtgtctgaagacagctacagtgtacttacataTaataaataa
ataaaataaataaataaattTGTTTTAAAAAATAGAAAAGAAAACTGAAGATAGAATGCTtttaat
ttaataaaaaataAGCTGATGGAAGATAAGAGTAATGGAAAGACAGTTACAGAAAACATGCTTCC
ACTTTAGTAGGACACCTACTACAAGGAGTAGAGCTAGAAATAAGAAATTGGGACAAAGGGTATTGCC
CCACTTGTACAGGACTACATGTCATTGGTCTTGCTCTCATAAAAGCTGCCATCTACACATCATGACA
GACTGCTTGCATATGGTCACGGCACATGCATTTCACTTCCGGACCCAACAGAGATTGTTGTCA
TTATTTAAAACACATAAATTTCAGCAGAagccgggtgtccagtgtcgtggcgcacgccttaatc
ccagcacttggagtcagactcaggcagattctgagttcgaggccagcctggctacagactgagtc
ccaggacagccaggctacacagagaaaccctgtctcgaaaaaaaacaaaaAAATCCAGCACAGAAC
Cctggaaatactaactcgtgtggcaggctaggcgtctgctgaggtccacagatccgtgccctgacac
atcttctgtgttccaatggcagatggAACACTggactctcagggtctttctaaggcggaga
accacactcatgagtaactccatgtggatacacacttgtgattgataatctgc当地ggctcatag
cacattaacctgtggtcccagttactacacgcagctcagaaggacataatgttCCACAGCACA
GAGGATTAGTATCTCAGTGGCTCAATCTAAAATCAAGAAAATAAGATCTGAGTGTCTGGTCTTTG
GAGAAGGGCTGGCTAGGGCTAAAGCTGACAATACAGAACAGCAGATGGTCCCTGGTAAAGGTCTA
AGCTGAATAGATTGTTATGTTATTCTCTAAGAAATACACTTCTGGAAAGCTAGGTGAGGGCGGACA
ACATGGCTCAAAGAGAAAAAAAGCATGTATCACATAAAACTTAAGACCTGAGTGCAAGTCCCAGAg
gttaggAAGCTTCGAATTCTGCAGTCAGGGTACCGCGGGCCGGATCCACCGTGCACCGGCAccatggT
GAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGTGGTGCCATCCTGGTCAGCTGGACGGCGACGTAAACG
GCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTC
ATCTGCACCAACCGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCAACCTACGGCGTGCA
GTGCTTCAGCCGCTACCCGACCATGAAGCAGCACGACTTCTCAAGTCCGCATGCCGAAGGCT
ACGTCCAGGAGCGCACCATCTCTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCGCGCCGAGGTGAAGTTC
GAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCT
GGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACACAGCCACAACGTCTATATCATGGCGACAAGCAGAAC
GCATCAAGGTGAACCTCAAGATCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCGACCAACTAC
CAGCAGAACACCCCATGGCGACGGCCCGTGCCTGCCGACAACCAACTACCTGAGCACCCAGTC
CGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGCTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCG
GGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGACTtagaTCATAATGCCATA
CCACATTGTAGAGGTTTACTTGCTTAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAA
ATGAATGCAATTGTTGTTAACTTGTTATTGAGCTTATAATGGTTACAAATAAGCAATAGCAT
CACAAATTTCACAAATAAGCATTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAAACTCATCAATG
TATCTTAAGGCGTAAATTGTAAGCGTTAATATTGTTAAACCTCGCTTAAATTGTTAAATCAG
CTCATTGTTAACCAATAGGCCAATCGGCAAATCCCTTATAAAATCAAAGAATAGACCGAGATAG
GGTTGAGTGTGTTCCAGTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGG
CGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACGATCCAGACATGATAAGACATATTGATGAGTTGGAC
AAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTATTGTAAGGAAATTGATGCTATTGCTTATT
GTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAGTTAACACAACAAATTGCATTCTATTGTTATGTTCA
GGGGGAGGTGTGGGAGGTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATC
CTCTAGAGTCGGTGGGCCCTCGGGGGCGGGTGCAGGGTGGCGCCGGCGGGTGGCTCGGCTCGG

Resultats

AGCcatggGGTCGCGCTCCCTTCCGGTCGGGCGCTGCAGGGTGTGGGGCGGGCTCAGGCACCGGGC
TTGCGGGTCACTGCACCAAGGTGCGCGGTCTTCGGGCACCTCGACGTGCGGGTGACGGTGAAGCCAG
CCGCTCGTAGAAGGGAGGTTGCGGGGCGCGAGGTCTCCAGGAAGGCAGGCACCCGGCGCTCGG
CCGCTCCACTCCGGGGAGCACGACGGCGTGCCTAGACCCCTGCCCTGGTGGTCGGCGAGACGCCG
ACGGTGGCCAGGAACCACGCGGGCTCCTGGGCCGGTGCAGGCCAGGAGGCCTTCATCTGTTGCTG
CGCGGCCAGCCGGAACCGCTCAACTCGGCCATGCGCGGGCGATCTGGCGAACACCGCCCCCGCTT
CGACGCTCTCCGGCGTGGTCCAGACGCCACCGCGGCCGTGTCGGCGACCCACACCTGCGGATG
TCGAGCCCAGCGCGTGGAGGAAGAGTTCTTGCAGCTCGGTGACCCGCTCGATGTGGCGGTCCGGGTC
GACGGTGTGGCGCGTGGCGGGTAGTCGGCGAACCGCGGGCGAGGGTGGTACGGCCGGGGGACGT
CGTCGCGGGTGGCGAGGCGACCGTGGGCTTGACTCGGTATGGAAGGTGCTCTTGTGAGGGGT
CAGGGCGTGGTCAGGGATGGTGGCGACCGGTGGCGACCTGAGGCGATGCAAGCTAG
CTTTTGCAAAAGCCTAGGCCTCAAAAAGCCTCCTCACTACTCTGAAATAGCTCAGAGGCCGAGG
CGGCCTCGGCCTTCGATAAATAAAAAAAATTAGTCAGcatggGGCGGAGATGGCGggactgggc
ggagtttagggGCGGGATGGCGGAGTTAGGGCGGGACTATGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCT
TTGCATACTTCTGCCTGCTGGGAGCCTGGGACTTTCCACACCTGTTGCTGACTAATTGAGATGCA
TGCTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGAGCCTGGGACTTTCCACACCTAAGTGCACACACATTCCAC
AGGGCTTCCCGTCAAGCTCAAATCGGGGCTCCCTTAGGGTCCGATTTAGTGTCTTACGGCAC
CTCGACCCCCAAAAACTGATTAGGGTATGGTTACGTAGTGGGCCATGCCCTGATAGACGGTTT
TCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAATAGTGGACTCTGTTCAAACACTGGAACAACACTCA
ACCCTATCTCGGTCTATTCTTGATTATAAGGGATTTGCGGATTTGGCCATTGGTAAACAAACT
GAGCTGATTAAACAAAATTAAACGCGAATTAAACAAAATTAAACGCTTACAATTAGGTG

pQL2 amb subtelòmer 18q (7495 nt)

GCACCTTTCGGGAAATGTGCGCGAACCCCTATTGTTATTTCTAAATACATTCAAATATGTAT
CCGCTCATGAGACAATAACCTGATAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCA
ACATTCCGTGCGCCTTATTCCCTTTGCGGCATTGCGCTCCTGCTCACCCAGAAA
CGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGgtgcacGAGTGGTTACATCGAACTGGATCTC
AACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTCGCCCCAAGAACGTTCCAATGATGAGCACCTTAAAGT
TCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCCGCATACACT
ATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTACGGATGGCATGACAGTA
AGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCAGTAGTGATAACACTGCGGCCACTTACTTCTGACAACGAT
CGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTGACACATGGGGATCATGTAACTGCCCTGATCGTT
GGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCGTAGCAATGGCA
ACAACGTTGCGBAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCGGCAACAATTAAAGACTG
GATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTCTCGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTG
ATAAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGACGACTGGGCCAGATGGTAAGCCC
TCCCGTAGCTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGC
TGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTACTCATATATACTTTAGA
TTGATTTAAAACCTCATTTAATTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTGATAATCTCATGAcc
aaaatccctaactgtagttcgccactgagcgtcagacccgtagaaaagataaaaggatcttc
ttgagatccttttctgcgcgtaatctgctgctgcaaaacaaaaaccaccgctaccagcggtg
tttggccgatcaagagactaccactctttccgaaggtaactggctcagcagagcgcagata
ccaaatactgtcctctagttagccgttagggcaccactcaagaactctgttagcaccgcctac
atacctcgctctgtaatccgttaccagtggctgcccagtgccgataagtcgttaccgggt
tggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcggctgaacgggggtcgacacag
cccagctggagcgaacgacccatcacccgaaactgagataccctacagcgttagctatgagaaagcgcac
gcttcccgaaaggagaaaggcggacaggatccggtaagcggcagggtcggacaggagagcgcac
gggagctccaggggaaacgcctggatctttatagtcctgtcgggttcggccacctctgactttag
cgtcgatttgtatgctcgtagggggcggagccatggaaaaacgcgcagcaacgcggctTTTT
ACGGTTCTGGCCTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGG

ATAACCGTATTACCGCCTTGAGTGAGCTGATACCGCTGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAG
TCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCA
TTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTATGTGA
GTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTACACTTATGCTCCGGCTGTATGTTGTGGAATT
GTgagcgataacaattcacacaggaaacagctatgaccatgATTACGCCAAGCTCGAAATTAAACCC
TCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGTACCGGGCCCCCTCGAGctcAAGCTCCAAGAAAAGATTCCA
TGAGCTTCAGTGAGTGTCCTAAGAAATGGTAGGCCATTAAAGTCATAGGCTCATGGATTATGT
CAGCATTITATGGTACCTGTCATCATAAAATATATTCTAGTGATAAAATGTATGTCATCAGGTAAGTA
TTTGCAACTGAGTCATGTTGGCTGTAAAAGCAAAAGAATTTAGAATCCTGATGTAAATCGgggcgt
ggttgcatacgccttAatcccagcactcaggagccagaggcaggcgattctgagttcaaggccag
cctggctacaaagttagttccaggacagccaaggctacacagagaaacctgtctcgaggaaaaaaa
aaaaAAAAAAAAGAATCCTGTTGTagccaggtgatgtggtacacatcttaatcccagcagtccagaa
gcagaggcagttggatctctgaattcgaggtcaccatgctacaaagttagttccaggaaactcaa
ggctacacagttagatcctgtctggaaaaGAAATCCTGGTCAATAAAGTGTAAATcaggacagc
aaggtaggcctcagctaaagtccaccaagtctgatgacactgagttcaattctggacacatatgggaa
agagaaaaactaacttccttgagttgtcttagttaatatgcacttctgaggttacataaacaca
cacacacacacaCagagagagagagagagagagTCACACAAGTACAATTAAATGGAGCATAGA
TCCATAGAAATATAAAATGCAAAACAAACATAAAATAAGAGAAGATTAAACATAAAAGAGAATAG
CGGGCTGGTGAGACGGCTCAGTGTTCATACTCAAATTACCCATATcacacacacatgcactcac
acacactcatacacactcacagaaacacatataactcacacacacaaactcaagcacactcacaAGT
GTATACACCTTCTTgattctgtgagacttgtgtccagccagctctaagatctctgtctccctcata
ctccacagaacttagataaaaacacattggcaccatgtctagtttcaggttagttctggcatttg
aactcaggtcctcatgctgcacaaaaatcattcaccactgagccatcttgcgtgtccCTAATT
GTTGACCTTAGACAAAAGCCTAGCAGCTTAAAGCGAAGGTTGTAGAACTCATTCTTCACCAGCAG
TCTTCAAGGTTTCAGCCTTTAATTCTTAATTGGTAGAGAGATTGAACCTGATCAAGACTCCT
AAATGGTATTATGAGTgtgccttactgcctgttactgtggcctgcttagcctgcttcttagat
cacaaggcttatatccacagtggctggcctccatataatgactgatgaagaaaatgtcttaa
aggctgcctataacccatcttacagaacattttatgtggttctcctctgagatgactccag
tttgggtcaattgacgtaaaattagacagaacaTAAATGTTAACTAAAAAAAGAATTCTGAAAAT
AAACTGATAGTGAAATCTGATTCTTAACCTCAATCTTAAGTATCAAATTATTCAATTCA
GTATTCTGGCTTTAGCCGGAAAGTCTTCAAGAAGGGATTATAATGTTTTAGTACTAGTACTT
TAGTGTAGGCAGAGCCACATAAAATTAATCTTTGAGATTAAATGCAACTTAAATGTATAATGT
ATGGTTCATCCTATTACCAAAAGTACAGGTGACATGGTGTACATTGAAACAGTTATTGTACACAAGGCTC
TCTGTAAAACAAAGATGATGATTGATATTATAAAGACAGAACAGTATGAGGAGTTCATGGTGAC
AAGCTGCTTGGGCTCCTGTTGAGAGTTGAACTGCTCCTCACTGATCCACAGTACAGAGGTGAGGC
CAGTGTAGTCAGTCTGCCCTCTTGGCCTGCCACAGATTAAATATAAACACATATAAAAtacattca
acatgaatggcttaacataccaaattaaaagatagcgcgtatccaactaattaaaaagcaataataa
actttgtactgttacaagaatATTATGGTGCATACCTAACCAAGTACTATTCTGAAGTCACTATAC
ATGTTGGAACAAGTAGAACTCAGAAGAAAAAAATTATGAAGAATGATACTGCTAAGGAGGAAAGG
CTAATTACTAAGAATATAGCAGTCACAAAGTATATGTATGAAGTGTGAGAGTTCTAAGGAGGAT
CCACCGGTCGCCAccatggTGAGCAAGGGCGAGGGAGCTGTTACCGGGGTGGGCCCATCCTGGTCGA
GCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACG
GCAAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCAACCGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCCACCCCTCGT
GACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCGCTACCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTCAA
GTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGGACGACGGCAACTACAAGA
CCCAGCGAGGTGAAGTTCAGGGCGACACCCCTGGTAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTC
AAGGAGGACGGCAACATCCTGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCAT
GGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCG
TGCAGCTCGCCGACCACCTACCGAGAACACCCCCATCGGCCACGGCCCCGTGCTGCCGACAAC
CACTACCTGAGCACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCAAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCT
GGAGTTCGTGACCGCCGGGATCACTCTGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGACT
ctagaTCATAATCAGCCATACCACATTGTAGAGGTTTACTTGCTTAAAAAACCTCCACACCTCC
CCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTAACATTGTTATTGCAAGCTTATAATGGT

Resultats

TACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCAAAATAAGCATTTCAGTGCATTCTAGTTGTGG
TTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAAGGCGTAAATTGTAAGCGTTAATATTGTTAAAATTCGCG
TTAAATTGGTAAATCAGCTCATTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAATCCCTATAAAATC
AAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACG
TGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAACCCTATCAGGGCGATGCCACGATCCAGACATGATAAG
ATACATTGATGAGTTGGACAAACCACAACAGTAAATGCAAGTAAAAAAATGCTTATTGTGAAATT
GTGATGCTATTGCTTATTGTAACCATTATAAGCTGAATAAACAAAGTTAACAAACAATTGCATT
CATTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAGGTGTTGGAGGTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATG
TGGTATGGCTGATTATGATCCTCTAGAGTCGGTGGCCTCGGGGGCGGGTGCAGGGTCTGGCGGGCCG
CCCAGGGTCTGGCTCGGAGCcatggGGTGTGCGCTCCTTCGGTCTGGCGCTGCGGGTCTGGGGCG
GCGGGCGTCAGGCACCGGGCTTGCAGGTATGCACCAAGGTGCGCGTCTCGGGCACCTCGACGTCG
GCGGTGACGGTGAAGCCGAGCCGCTCGTAGAAGGGGAGGTGCGGGGCGCGAGGTCTCCAGGAAGGC
GGGCACCCCGCGCGCTCGGCCCTCCACTCCGGGAGCACGACGGCGCTGCCAGACCCCTGCCCT
GGTGGTGGCGAGACGCCGACGGTGCCAGGAACCACGCGGGCTCTGGGCCGGTGCAGGCCAGG
AGGCCTTCATCTGTTGCTGCGCGGCCAGCGGGAAACCGCTCAACTCGGCATGCCAGGGCGATCTC
GGCGAACACCGCCCCCGCTCGACGCTCTCCGGCGTGGTCCAGACGCCACCGCGCGCGTCTCG
CGACCCACACCTGCCATGTCAGGCCGACGCGCGTGGAGAACAGAGTTCTGCAGCTCGTACCCGC
TCGATGTGGCGGTGGGTGACGGTGTGGCGCGTGGCGGGTAGTCGGCGAACGGCGGGAGGGT
GCGTACGGCCGGGGACGTCGTCGCGGGTAGCGCGGGTAGTCGGCGAACGGCGGGAGGGT
GTCGTCCTCTGTGAGGGGTGAGGGCGTGGGTCAAGGGGATGGTGGCGCACGGTCTGGCGGCCGA
CCTGCAGGCATGCAAGCTAGCTTTGCAAAAGCTAGGCCCTCCAAAAAAGCCTCCACTACTCTG
GAATAGCTCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGCATAAATAAAAAAAATTAGTCAGCcatggGGCG
GAGAATGGGCggaactggcgagtttagggGCGGGATGGCGGAGTTAGGGCGGGACTATGGTTGCT
GACTAATTGAGATGCATGCTTGACACTTCTGCCCTGCTGGGGAGCCTGGGACTTTCCACACCTGGT
TGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTGACACTTCTGCCCTGCTGGGGAGCCTGGGACTTTCCACACC
CTAACTGACACACATTCCACAGGGCTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGCTCCCTTAGGGTTCC
GATTTAGTGCTTACGGCACCTGACCCAAAAACTTGATTAGGGTAGGGTCACTGAGTGGCCA
TCGCCCTGATAGACGGTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTTAATAGTGGACTCTTGTT
CCAAACTGGAACAAACTCAACCCATCTGGCTATTCTGGTCAAGAGCAACTCGGTGCCGCATACACT
CGGCCTATTGGTAAAAATGAGCTGATTAAACAAAATTAAACGCAATTAAACAAAATTAAACG
CTTACAATTAGGTG

pQL2 amb subtelòmer Xq (6665 nt)

GCACCTTTCGGGAAATGTGCGCGAACCCCTATTGTTATTCTAAATACATTCAAATATGTAT
CCGCTCATGAGACAATAACCTGATAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCA
ACATTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTGCGGCATTGCTTCTGCTTGTCAACCCAGAAA
CGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGgtgcacGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTC
AACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTGCCCGAAGAACGTTCAATGATGAGCACTTTAAAGT
TCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCCGCATACACT
ATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAAGTCACAGAAAAGCATCTACGGATGGCATGACAGTA
AGAGAATTATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGCCAACCTACTTCTGACAACGAT
CGGAGGACGAAGGAGCTAACCGCTTTTGACAAACATGGGGATCATGTAACTCGCCCTGATGTT
GGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTACACCGACGATGCCGTAGCAATGGCA
ACAACGTTGCGCAAACATATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTCCCGCAACAATTAAAGACTG
GATGGAGGCGGATAAAGTTGCAAGGACCACTTCTGCGCTGCCCTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTG
ATAAAATCTGGAGGCCGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCACTGGGGCCAGATGGTAAGGCC
TCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGC
TGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACGTGCAAGACCAAGTTACTCATATATACTTGTAG
TTGATTAACCTCATTAAATTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTGATAATCTCATGAcc
aaaatccctaacgtgagttcgttccactgagcgtcagacccgtagaaagatcaaaggatcttc

Resultats

AATCAGCTCATTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGAAAATCCCTATAAATCAAAGAACAGACCG
AGATAGGGTTGAGTGTTCAGTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTC
AAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGT
TTGGACAAACCACAACAGTGAAGGGGGAGGTGTTAAAGCAAGTAAACAAACAATTGCATTCAATTGCTATTGCT
TTATTGTAACCATTATAAGCTGAATAAACAAAGTTAACAAACAATTGCATTCAATTGCTATTGCTATTGCT
GGTTCAGGGGGAGGTGTTAAAGCAAGTAAACACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATT
ATGATCCTCTAGAGTCGGTGGGCCTCGGGGGCGGGTGCAGGGTCTGGCGGGCCGGTCCGCTTC
GGTCGGAGccatggGGTGTGCGCTCCTTCGGTCGGCGCTGCGGGTGTGGGGGGCGTCAGGCA
CCGGGCTTGCGGGTCATGCACCAGGTGCGCGTCCCTCGGGCACCTCGACGTCGGCGGTGACGGTGAA
GCGGAGCCGCTCGTAGAAGGGGAGGTGCGGGGCGGGAGGTCTCCAGGAAGGCGGGCACCCCGCGC
GCTCGGGCGCCTCACTCCGGGAGCACGACGGCCTGCCAGACCCCTGCCCTGGTGGTCCGAG
ACGCCGACGGTGGCCAGGAACCACGCCGGCTCCCTGGGCCGGTGCAGGGCAGGAGGGCTTCATCTG
TTGCTGCGCGGCCAGCCGGAACCGCTCAACTCGGCATGCCGGGCCATCTGGCGAACACCGGCC
CCGCTTCGACGCTCTCCGGCTGGTCCAGACGCCACCGCGGCCGTGTCGCCGACCCACACCTTG
CCGATGTCGAGCCCAGCGCGTGGAGGAAGAGAGTTCTGCAGCTGGTGCACCGCTCGATGTGGCGGTC
CGGGTCGACGGTGTGGCGCTGGCGAGGGTAGTCGGCGAACGCGGGCGAGGGTGGTACGGCCCGGG
GGACGTCGTCGCGGGTGGCGAGGCGCACCGTGGCTGTACTCGGTATGGAAGGTCGTCCTTG
AGGGGTCAGGGCGTGGTCAGGGATGGTGGCGACCGGTCGTGGCGGCCACCTGCAGGATGCA
AGCTAGCTTTGCAAAAGCTAGGCCTCCAAAAAGCCTCCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGG
CCGAGGCGGCCTCGGCCTCGCATAAATAAAAAAAATTAGTCAGccatggGGCGGAGATGGCGgaa
ctgggcggagttaggGGGGATGGCGGAGTTAGGGCGGACTATGGTTGCTGACTAATTGAGATG
CATGCTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGACTTTCCACACCTGGTTGCTGACTAATTGA
GATGCATGCTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGAGCCTGGGACTTTCCACACCTAAGCACACA
TTCCACAGGGCTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGCTCCCTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTA
CGGCACCTCGACCCAAAAACTTGATTAGGGTGTGGTCACTAGTGGCCATGCCCTGATAGAC
GGTTTTGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTAAATAGTGGACTCTGTTCAAACGAAACAA
CACTCAACCCATCTGGTCTATTCTTTGATTATAAGGGATTGCGCATTGGCCTATTGGTTA
AAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTAAACGCAATTAAACAAATATTAACGCTTACAATTAGGT
G

4.2. TERRA i telomerasa a les cèl·lules germinals de mamífer

Resultats

4.2.1. TERRA i telomerasa als oòcits fetals humans

TERRA, tot i estar descrit en nombroses espècies i haver-se demostrat que la seva expressió està s'obreregulada en cèl·lules mare pluripotents, mai no havia estat identificat en la línia germinal eucariota. Aquest treball representa el primer estudi de TERRA en cèl·lules germinals de mamífer, la qual cosa va requerir posar a punt la combinació de les tècniques d'IF i RNA-FISH sobre oòcits fetals humans. D'aquesta manera, es va analitzar la presència i distribució nuclear de TERRA durant la primera profase de la meiosi en oòcits fetals humans en relació amb els telòmers dels cromosomes meiòtics. Alhora, es va estudiar si, tal i com s'ha proposat prèviament, existeix alguna relació entre la distribució de TERRA i la telomerasa al nucli dels oòcits humans.

Resultats: Reig-Viader, *et al.*, 2013

Reig-Viader, R., Brieño-Enríquez, M. A., Khouriauli, L., Toran, N., Cabero, L., Giulotto, E., Garcia Caldés, M. and Ruiz-Herrera, A. (2013). **Telomeric repeat-containing RNA and telomerase in human fetal oocytes.** *Human Reproduction*, 28(2), 414-422.

Factor d'impacte: 4.67

Q1 en Biologia de la Reproducció (2n de 28)

Q1 en Ginecologia i Obstetricia (3er de 78)

Resultats

Telomeric repeat-containing RNA and telomerase in human fetal oocytes

Rita Reig-Viader¹, Miguel Angel Brieño-Enríquez^{1,2}, Lela Khouriauli³, Núria Toran⁴, Lluís Cabero⁵, Elena Giulotto³, Montserrat Garcia-Caldés^{1,6}, and Aurora Ruiz-Herrera^{1,6,*}

¹Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus UAB, Cerdanyola del Vallès 08193, Spain ²Departamento de Farmacología y Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí 78210, México ³Dipartimento di Biologia e Biotecnologia ‘Lazzaro Spallanzani’, Università degli Studi di Pavia, Pavia 27100, Italy ⁴Departament de Patologia, Hospital de la Vall d’Hebron, Barcelona 08035, Spain ⁵Departament de Ginecologia i Obstetricia, Hospital de la Vall d’Hebron, Barcelona 08035, Spain ⁶Institut de Biología i Biomedicina. Universitat Autònoma de Barcelona, Campus UAB, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain

*Correspondence address. E-mail: aurora.ruizherrera@uab.cat

Submitted on May 21, 2012; resubmitted on September 10, 2012; accepted on September 12, 2012

STUDY QUESTION: What is the distribution of telomeric repeat-containing RNA (TERRA) and of telomerase in human fetal oocytes?

SUMMARY ANSWER: TERRA forms discrete foci at telomeres of human fetal oocytes and it co-localizes with both the shelterin component telomeric repeat-binding factor 2 (TRF2) and the catalytic subunit of human telomerase at the telomeres of meiotic chromosomes.

WHAT IS KNOWN ALREADY: TERRA is a structural element of the telomeric chromatin that has been described in somatic cells of many different eukaryote species. The telomerase enzyme is inactive in adult somatic cells but is active in germ cells, stem cells and in the majority of tumors; however, its distribution in oocytes is still unknown.

STUDY DESIGN, SIZE, DURATION: For this study, ovarian samples from four euploid fetuses of 22 gestational weeks were used. These samples were obtained with the consent of the parents and of the Ethics Committee of Hospital de la Vall d’Hebron.

PARTICIPANTS/MATERIALS, SETTING, METHODS: We analyzed the distribution of TERRA and telomerase in cells derived from human fetal ovaries. The co-localization of TERRA, telomerase and telomeres was performed by optimizing a combination of immunofluorescence (IF) and RNA-fluorescent *in situ* hybridization (RNA-FISH) techniques. The synaptonemal complex protein 3 (SYCP3), TRF2 and protein component of telomerase [telomerase reverse transcriptase (TERT)] were detected by IF, whereas TERRA was revealed by RNA-FISH using a (CCCTAA)₃ oligonucleotide. SYCP3 signals allowed us to identify oocytes that had entered meiosis and classify them into the different stages of prophase I, whereas TRF2 indicated the telomeric regions of chromosomes.

MAIN RESULTS AND THE ROLE OF CHANCE: We show for the first time the presence of TERRA and the intracellular distribution of telomerase in human fetal ovarian cells. TERRA is present, forming discrete foci, in 75% of the ovarian tissue cells and most of TERRA molecules (~83%) are at telomeres (TRF2 co-localization). TERRA levels are higher in oocytes than in ovarian tissue cells ($P = 0.00$), and do not change along the progression of the prophase I stage ($P = 0.37$). TERRA is present on ~23% of the telomeres in all cell types derived from human fetal ovaries. Moreover, ~22% of TERRA foci co-localize with the protein component of telomerase (TERT).

LIMITATIONS, REASONS FOR CAUTION: We present a descriptive/qualitative study of TERRA in human fetal ovarian tissue. Given the difficult access and manipulation of fetal samples, the number of fetal ovaries used in this study was limited.

WIDER IMPLICATIONS OF THE FINDINGS: This is the first report on TERRA expression in oocytes from human fetal ovaries. The presence of TERRA at the telomeres of oocytes from the leptotene to pachytene stages and its co-localization with the telomerase protein component suggests that this RNA might participate in the maintenance of the telomere structure, at least through the processes that take place during the female meiotic prophase I. Since telomeres in oocytes have been mainly studied regarding the bouquet structure, our results introduce a new viewpoint of the telomeric structure during meiosis.

STUDY FUNDING/COMPETING INTEREST(S): R.R.-V. is a recipient of a PIF fellowship from Universitat Autònoma de Barcelona. This work was supported by the Generalitat de Catalunya (2009SGR1107). The authors declare that no competing interests exist.

Key words: TERRA / telomere / telomerase / meiosis / human oocytes

Introduction

Mammalian telomeres are ribonucleoprotein complexes at the end of chromosomes, consisting of TTAGGG repeats and a complex of proteins termed shelterin (O'Sullivan and Karlseeder, 2010). Studies on somatic cells have revealed that telomeres prevent chromosomes from fusion and genomic instability, and that telomere shortening and/or dysfunction can be related to carcinogenesis (O'Sullivan and Karlseeder, 2010). But little is known about telomere maintenance and function through gametogenesis since most studies on telomeres in meiotic prophase I have been focused on their dynamics (Siderakis and Tarsounas, 2007). Meiosis is a specialized cell division occurring in organisms with sexual reproduction to produce haploid gametes and generate genomic variability by shrinking by half the chromosome number through a mechanism involving chromosome synapsis and DNA exchange between homologous chromosomes (Bhalla and Dernburg, 2008). To avoid meiotic chromosome missegregation, an appropriate development of synapsis and reciprocal homolog recombination are required, with both processes occurring during meiotic prophase I (Jones, 2008). This phase is subdivided into four different stages (leptonema, zygonema, pachynema, diplonema) according to specific cellular events, such as dynamics of meiotic chromosomes and their telomeres (Roig et al., 2005). In particular, telomeres play an important role in meiosis by means of the bouquet formation (Scherthan, 2007). The bouquet is a structure resulting from the clustering of telomeres; it is assembled during the leptonema–zygonema transition and is maintained until the pachytene stage (Scherthan, 2007). This structure promotes homologous chromosome alignment, which is essential for subsequent synapsis and recombination, and thus for appropriate meiotic progression (Scherthan, 2007; Bhalla and Dernburg, 2008; Jones, 2008).

Telomere dysfunction in oocytes has been postulated as a suitable explanation for reproductive senescence of women (Keefe and Liu, 2009) since studies in telomerase-deficient mice revealed that functional telomeres are required not only for the proper homologous synapsis and recombination, but also for the maintenance of the meiotic spindle integrity (Liu et al., 2002a,b, 2004). It is known that aberrant synapsis and recombination processes as well as abnormal meiotic spindle formation lead to apoptosis in spermatocytes while abnormal oocytes are able to escape meiotic checkpoints and complete meiosis (Jones, 2008; Keefe and Liu, 2009). Therefore, oocytes can reach maturity presenting some of the characteristic features of reproductive senescence such as chromosome reorganizations, and are responsible for the high incidence of aneuploidy and miscarriages reported in women with increased maternal age (Hassold and Hunt, 2001; Jones, 2008; Keefe and Liu, 2009). Moreover, a recent study (Treff et al., 2011) has shown that in human oocytes and cleavage stage embryos the presence of short telomeres is associated with increased aneuploidy; in particular, telomere loss is more frequent in aneuploid polar bodies from oocytes than in aneuploid embryonic cells, supporting the hypothesis that most aneuploidies can be attributed to a maternal origin (Hassold and Hunt, 2001).

The most common way by which cells maintain telomere length is the action of telomerase, a ribonucleoprotein enzyme composed of a reverse transcriptase [telomerase reverse transcriptase (TERT)] and an associated RNA template (telomerase RNA component), which

adds TTAGGG repeats at the 3' ends of chromosome termini (O'Sullivan and Karlseeder, 2010). In somatic cells, telomerase is localized to a subset of telomeres (Tomlinson et al., 2006). Results on telomerase activity in oocytes have been controversial due to technical and/or sample origin differences between experiments. Although some studies report no or low telomerase activity in mammalian oocytes, humans included (Wright et al., 1996; Betts and King, 1999; Xu and Yang, 2000; Liu et al., 2007), others find markedly high activity in immature and mature oocytes (Eisenhauer et al., 1997; Wright et al., 2001). Therefore, the presence and intracellular distribution of telomerase in human ovarian tissue, and more specifically in oocytes, remains to be elucidated.

The discovery that telomeres are actively transcribed into telomeric repeat-containing RNA (TERRA) (Azzalin et al., 2007; Schoeftner and Blasco, 2008) opened a new field of investigation with the goal of understanding its function. Early studies carried out by RNA-fluorescent *in situ* hybridization (RNA-FISH) using telomeric probes revealed that TERRA molecules consist of UUAGGG repeats and show nuclear localization in different cell types (Azzalin et al., 2007; Schoeftner and Blasco, 2008). In somatic cells, TERRA is mainly located at telomeres and is now considered an integral constituent of the telomeric chromatin, contributing to its stability (Azzalin et al., 2007; Schoeftner and Blasco, 2008). Moreover, Redon et al. (2010) suggested that a fraction of TERRA is associated with telomerase *in vivo*, and that TERRA acts as an inhibitor of telomerase *in vitro*. TERRA transcription shows a complex regulation (Azzalin et al., 2007; Schoeftner and Blasco, 2008; Caslini et al., 2009), and, in human somatic cells, is modulated by the methylation of specific subtelomeric CG rich region island promoters (Nergadze et al., 2009). Moreover, in human cells TERRA levels are modulated during the cell cycle (Porro et al., 2010) and, in mouse cells, during cell differentiation and development (Schoeftner and Blasco, 2008; Marion et al., 2009).

Thus, given the important role of telomeres in the meiotic process, and considering the fact that TERRA seems to regulate the telomeric chromatin structure during development, we studied the intracellular distribution of TERRA and of telomerase in human oocytes during prophase I. To this end, we have optimized a technique that combines immunofluorescence (IF) and RNA-FISH that allows TERRA detection in human fetal primary oocytes together with the telomeric repeat-binding factor 2 (TRF2), telomerase reverse transcriptase (TERT) and synaptonemal complex protein 3 (SYCP3). In this study, we show for the first time that TERRA and telomerase form discrete foci and co-localize at the telomeres of human oocytes during prophase I.

Materials and Methods

Ovarian sample processing

For this study, ovaries from four euploid fetuses of ~22 gestational weeks were used. The fetuses were donated by the Biobanc of Hospital de la Vall d'Hebron after legal abortion, authorized by parental consent and the approval of the Ethics Committee of the hospital. The inclusion criteria were the following: euploid fetuses, gestational age between 18 and 22 weeks, and <2 h from the end of the obstetric procedure and the start of the sample processing (Brieño-Enríquez et al., 2010). Details of the biological

Table I Fetal characteristics and experiments performed.

Sample	GW	FL	W	Diagnosis	Karyotype	Experimental procedures
V204	22	4.2	540	Maternal psychiatric pathology	46,XX	Validation of the technique and TERRA levels
V208	22	5.0	626	Cleft palate	46,XX	Validation of the technique, TERRA levels and TERRA-TRF2 co-localization
V214	22	3.8	445	Congenital neurological anomaly	46,XX	TERT-TERRA co-localization
V232	21	3.2	390	Congenital neurological anomaly	46,XX	TERT-TRF2 co-localization

GW, gestational weeks; FL, foot length in centimeters; W, weight in grams.

material used and the experiments carried out on each sample are shown in Table I. Each ovary was collected and processed as previously described (Brieño-Enríquez et al., 2010), keeping sterile and RNase-free conditions in every step of the protocol detailed hereafter. To be able to observe the cell structures of interest, the ovarian tissue was scattered on slides through mechanical disgregation following a methodology previously described for the cell culture of human oocytes (Brieño-Enríquez et al., 2010). This method allowed us to obtain an optimal isolation of ovarian cells. Then cells were permeabilized by 10 min incubation with CSK buffer [100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 10 mM PIPES, 0.5% Triton X-100® and 10 mM ribonucleoside-vanadyl complex (NEB)], fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde and washed with 70% ethanol. Finally, slides were processed or conserved at -80°C until use.

Cell culture

Human primary fibroblasts, HeLa, HT1080 and U2OS cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum and 100 U/ml penicillin plus 100 µg/ml streptomycin under standard conditions.

Immunofluorescence

The SYCP3, the shelterin component TRF2 and the protein component of telomerase (TERT) were detected by IF. IF experiments using an antibody against SYCP3 allowed us to identify oocytes that had entered meiosis. Prior to experimental procedures, two slides were analyzed per sample in order to evaluate cell morphology and synaptonemal complex integrity according to morphological criteria described in previous studies (García et al., 1987; Roig et al., 2005; Brieño-Enríquez et al., 2010). Only cells that fulfilled the established conditions were evaluated. This allowed us to discard degenerated and apoptotic oocytes from the analysis, given that the aim of our work was to study primary oocytes at normal steady-state conditions, showing a normal arrangement of the synaptonemal complex (Brieño-Enríquez et al., 2010). Moreover, oocytes were classified into the different prophase I stages according to the organization of the synaptonemal complex (Roig et al., 2005). At leptotene, chromosomes start condensation and individualization, while at the same time proteins of the synaptonemal complex start binding to the DNA of meiotic chromosomes. During zygotene, homolog pairing starts with the final result being the union of both pairs of sister chromatids (synapsis) by means of the progression of the synaptonemal complex formation. And at pachynema bivalents are fully synapsed. The pool of cells other than primary oocytes that were negative for the SYCP3 signal included pre-meiotic germ cells and somatic cells derived from the ovarian stroma (i.e. endothelial cells, fibroblasts, blood cells and immune cells), hereafter referred to as 'SYCP3-negative cells'.

Moreover, the telomeric regions of chromosomes and telomerase enzyme were detected using an antibody against the shelterin protein TRF2 and against the protein component of telomerase (TERT),

respectively. Additionally, the labeling of the shelterin component TRF2 was employed to analyze its relative position in relation to TERRA and TERT molecules.

For the IF experiments in the ovarian tissue, and in order to avoid unspecific epitope recognition by the employed antibodies, cells were previously treated with blocking solution [1× phosphate-buffered saline (PBS) with 5% bovine serum albumin, 0.1% Tween-20® and 10 mM ribonucleoside-vanadyl complex]. Then slides were incubated 45 min with different primary antibodies in a humid chamber at room temperature: cell spreads were labeled with rabbit anti-human SYCP3 (Abcam), together with a mouse anti-human TRF2 (Abcam) or a rat monoclonal antibody against human TERT (Diesse Ricerche; Soldateschi et al., 2005). The following secondary antibodies were used: mouse anti-rabbit Cy5, goat anti-mouse FITC or goat anti-mouse Cy3 (Jackson Immunoresearch) and goat anti-rat DyLight 488 (KPL). The slides were then incubated for 40 min in a humid chamber at 37°C. After each antibody treatment, slides were washed with 1× PBS 0.1% Tween-20®. Lastly, cells were fixed again with 0.4% paraformaldehyde, permeabilized with 1× PBS 0.5% Triton X-100® and washed with 70% ethanol.

For IF analysis of TERT in cell lines, cells were grown directly on slides. The following day, cells were fixed with ice-cold methanol for 10 min and incubated with the rat anti-TERT antibody diluted 1:100 in 1× PBS 2% skim milk at 37°C for 1 h. After washing with 1× PBS, slides were incubated with a goat anti-rat DyLight 488 conjugated secondary antibody at 37°C for 1 h. Then the cells were washed again with 1× PBS and stained with DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole).

RNA-fluorescent *in situ* hybridization

RNA-FISH was carried out immediately after IF in ovarian cells. After dehydration with ethanol series (70, 85 and 100%), cells were hybridized overnight at 37°C with a (CCCTAA)₃ oligonucleotide labeled with Cy3 (XX Integrated DNA Technologies) or with Digoxigenin at a concentration of 20 nM. Finally, slides were washed once with 2× saline-sodium citrate (SSC), three times with 50% formamide in 2× SSC at 39°C, three more times at 39°C with 2× SSC and once with 2× SSC at room temperature, 5 min for each wash. Before microscopic observation, cells were counterstained with DAPI. For each sample, a negative control was included. It consisted of slides treated 10 min with RNAse (Sigma) at a concentration of 100 µg/ml prior to RNA-FISH performance.

Data processing

Images were captured by a Nikon Eclipse 90i epifluorescence microscope connected to a charge-coupled device camera and the software Isis (Metasystems®). The statistical analysis was carried out by means of PAWS Statistics 18® software. TERRA levels in the different cell types were analyzed by a qualitative approach, i.e. by means of contingency tables and the χ^2 test. TERRA, TRF2 and TERT co-localization was evaluated by the ANOVA test, first applying the Test of Homogeneity of Variances.

Results

We analyzed human primary oocytes and SYCP3-negative cells obtained from ovaries of four euploid fetuses (Table I). To validate the technique, we performed RNA-FISH experiments in combination with IF, labeling the proteins TRF2 and SYCP3 in two fetus samples (V204 and V208; Table I) and in three different replicates (Table II). The RNA-FISH experiments were performed using a (CCCTAA)₃ oligonucleotide probe complementary to TERRA, given that it has been reported that, in mammalian cells, TERRA molecules consist of UUAGGG repeats (Azzalin *et al.*, 2007; Schoeftner and Blasco, 2008). The results obtained from the different fetuses were pooled together because no statistical differences were found in the presence of cellular TERRA between each sample replicate ($\chi^2 = 3.24$; $P = 0.198$) (Table II). By this way, both TERRA levels and distribution were analyzed in a total of 522 cells (297 oocytes and 225 SYCP3-negative cells). We found that TERRA molecules were present in both cell types, forming discrete foci (green signals in Fig. 1A–D and F). TERRA foci were detected in ~75% of the analyzed cells (Table II) and disappeared following treatment with RNase, confirming that they were due to telomeric RNA molecules (Fig. 1E). The mean number of TERRA foci observed per cell was 7.2 ± 0.7 for oocytes and 5.2 ± 0.3 for SYCP3-negative cells. To compare TERRA levels in SYCP3-negative cells and oocytes, cells were classified into 3 different categories according to the number of TERRA foci detected: cells showing 5 or fewer TERRA foci, cells with 6–10 foci and cells with more than 11 foci (Fig. 2). We found statistical differences in TERRA levels between SYCP3-negative cells and oocytes ($\chi^2 = 20.61$; $P = 0.000$), since the proportion of oocytes with more than 10 TERRA foci was higher when compared with SYCP3-negative cells (Fig. 2A). The same fetus samples (V204 and V208; Table I)

Table II Analysis of the presence/absence of TERRA in fetal cells.

	Cells		
	TERRA–	TERRA+	Total
Experiment			
Exp. 1 (V204)			
Count	16	51	67
Percentage	23.9	76.1	100
Exp. 2 (V204)			
Count	96	299	395
Percentage	24.3	75.7	100
Exp. 3 (V208)			
Count	21	39	60
Percentage	35.0	65.0	100
Total			
Count	133	389	522
Percentage	25.5	74.5	100

The fetus sample used in each experiment is indicated (V204 and V208). No statistical differences were found among experiments (see text for details).

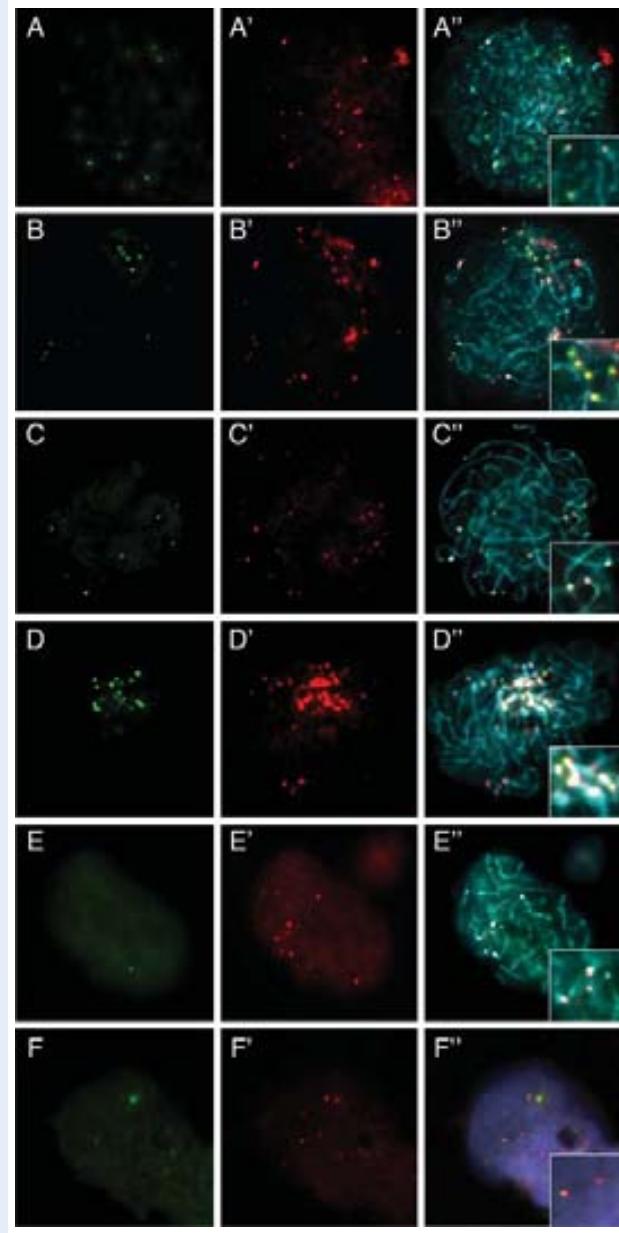


Figure 1 TERRA in human ovarian tissue. (A–E) Oocytes where TERRA (green), TRF2 (red) and SYCP3 (blue) were labeled by IF and RNA-FISH. (A) Late leptonema oocyte showing TERRA foci, (A') same oocyte showing TRF2 signals and (A'') merged image. (B) Zygote oocyte showing TERRA foci, (B') same oocyte showing TRF2 signals and (B'') merged image. (C) Late pachynema oocyte showing TERRA foci, (C') same oocyte showing TRF2 signals and (C'') merged image. (D) Zygote oocyte with the bouquet structure showing TERRA foci, (D') same oocyte showing TRF2 signals and (D'') merged image. (E, E' and E'') Oocyte at zygote stage treated with RNase, where only SYCP3 (blue) and TRF2 signals (red) can be observed. (F) An ovarian SYCP3-negative cell with DNA counterstained by DAPI (blue) and labeled for TERRA (green (F)) and TRF2 (red (F')). In each merged image, insets show enlarged regions with co-localization of TERRA and TRF2 signals (A''–D'' and F'').

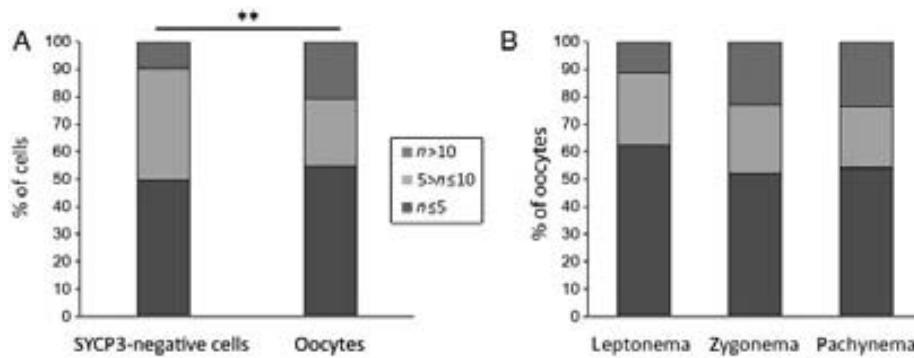


Figure 2 TERRA levels in the ovarian tissue. Comparison of TERRA levels between SYCP3-negative cells and oocytes (**A**), and between the prophase I stages (**B**), according to the established groups: <5 foci, between 6 and 10 foci and more than 10 foci. Asterisks indicate statistical differences between groups ($P = 0.000$).

were used to compare the number of TERRA foci per cell during prophase I progression (Fig. 2B). We detected primary oocytes at different prophase I stages: 20.5% of oocytes at leptonema, 47.1% at zygonema, 31.6% at pachynema and 0.7% at diplonema. The low percentage of oocytes found at diplonema was in agreement with previous reports that have studied meiotic progression in fetuses at the same developmental age (i.e. 22 gestational weeks) (Roig *et al.*, 2005). Therefore, since very few diplonema oocytes were present in the studied samples, they were not included in the analysis. We found that at zygonema and pachynema the distribution of the number of TERRA foci was similar; at leptonema, although oocytes with fewer foci seemed to be more represented, this difference was not statistically significant ($\chi^2 = 4.23$; $P = 0.37$). In addition, ~60% of the 57 oocytes found with chromosomes forming the bouquet structure were TERRA positive, and did not show statistically significant differences in TERRA levels when compared with oocytes in others stages of prophase I ($\chi^2 = 0.75$; $P = 0.69$) (data not shown). Therefore, these data suggest that modulation of TERRA levels in the ovary is related to the cell type (i.e. higher levels in oocytes), and does not depend on the progress of the first meiotic prophase.

To investigate the localization of TERRA molecules relative to the telomeres, we analyzed TERRA co-localization with TRF2 on cells derived from the V208 ovary (Table 1). With this aim, a total of 30 oocytes and 30 SYCP3-negative cells were analyzed. We observed that most TERRA foci (83%) co-localized with TRF2 giving rise to yellow signals (Fig. 1A''–D'' and F''), whereas the average fraction of the number of TRF2 signals co-localizing with TERRA foci was ~23% (Fig. 3). No statistical differences were found between the distributions in SYCP3-negative cells and oocytes ($F_{\text{TERRA}-\text{TRF2}} = 0.03$, $P = 0.86$; $F_{\text{TRF2}-\text{TERRA}} = 0.66$, $P = 0.42$). Thus, in the ovarian tissue cells, only a fraction of telomeres show TERRA signals but most TERRA molecules seem to be localized at telomeres.

To test whether TERRA could be physically associated with telomerase, we performed experiments using an antibody against human TERT (Soldateschi *et al.*, 2005) (green signals in Figs 4 and 5). As controls, we used two immortal cell lines known to be telomerase positive (HeLa and HT1080) and two telomerase negative cell lines (human primary fibroblasts and U2OS) (Fig. 4). It is known that U2OS cells maintain their telomeres via an alternative lengthening

of telomeres mechanism in the absence of telomerase (Jegou *et al.*, 2009). As expected, HeLa and HT1080 cells showed TERT foci distributed inside the nucleus (Fig. 4A and B), whereas human primary fibroblasts and U2OS cells did not (Fig. 4C and D). For the ovarian cells, we performed IF experiments combined with RNA-FISH using the anti-human TERT together with the antibody against SYCP3 (Fig. 5) on cells derived from the sample V214 (Table 1). A total of 30 oocytes and 30 ovarian SYCP3-negative cells were analyzed and the proportion of co-localization between TERRA and TERT was ~22% in both cell types (Fig. 3), showing no statistical differences between oocytes and SYCP3-negative cells ($F = 0.62$, $P = 0.43$). Finally, in order to analyze the localization of telomerase relative to telomeres, we performed a three-color IF experiment with the anti-TERT, the anti-TRF2 and the anti-SYCP3 antibodies on slides of a fourth euploid fetal ovary (V232; Table 1). The analysis of 30 oocytes and 30 SYCP3-negative cells showed that 22% of the TRF2 signals co-localize with TERT in both types of cells (Fig. 3), showing no statistical differences between oocytes and SYCP3-negative cells ($F = 0.12$, $P = 0.73$) and indicating that telomerase is detectable only on a subset of telomeres, similarly to what was previously described in somatic cells (Tomlinson *et al.*, 2006).

Discussion

Since its initial discovery (Azzalin *et al.*, 2007), TERRA has been described in many different tissues and cell lines from several vertebrate species, including humans and mice (Azzalin *et al.*, 2007; Schoeftner and Blasco, 2008). The results of the present study demonstrate for the first time that TERRA is also present in the human germ line. To reach this conclusion, we have optimized a protocol based on sequential IF and RNA-FISH, which allows ovarian cell structure preservation, identification of oocytes that have entered meiosis and TERRA localization in both oocytes undergoing prophase I and ovarian SYCP3-negative cells (Fig. 1).

We have shown that TERRA shows the typical focal co-localization with proteins of the shelterin complex in ovarian cells, mirroring previous RNA-FISH studies in somatic cell lines (Azzalin *et al.*, 2007; Schoeftner and Blasco, 2008). In addition to this pattern, previous studies have detected large subnuclear TERRA domains co-localizing

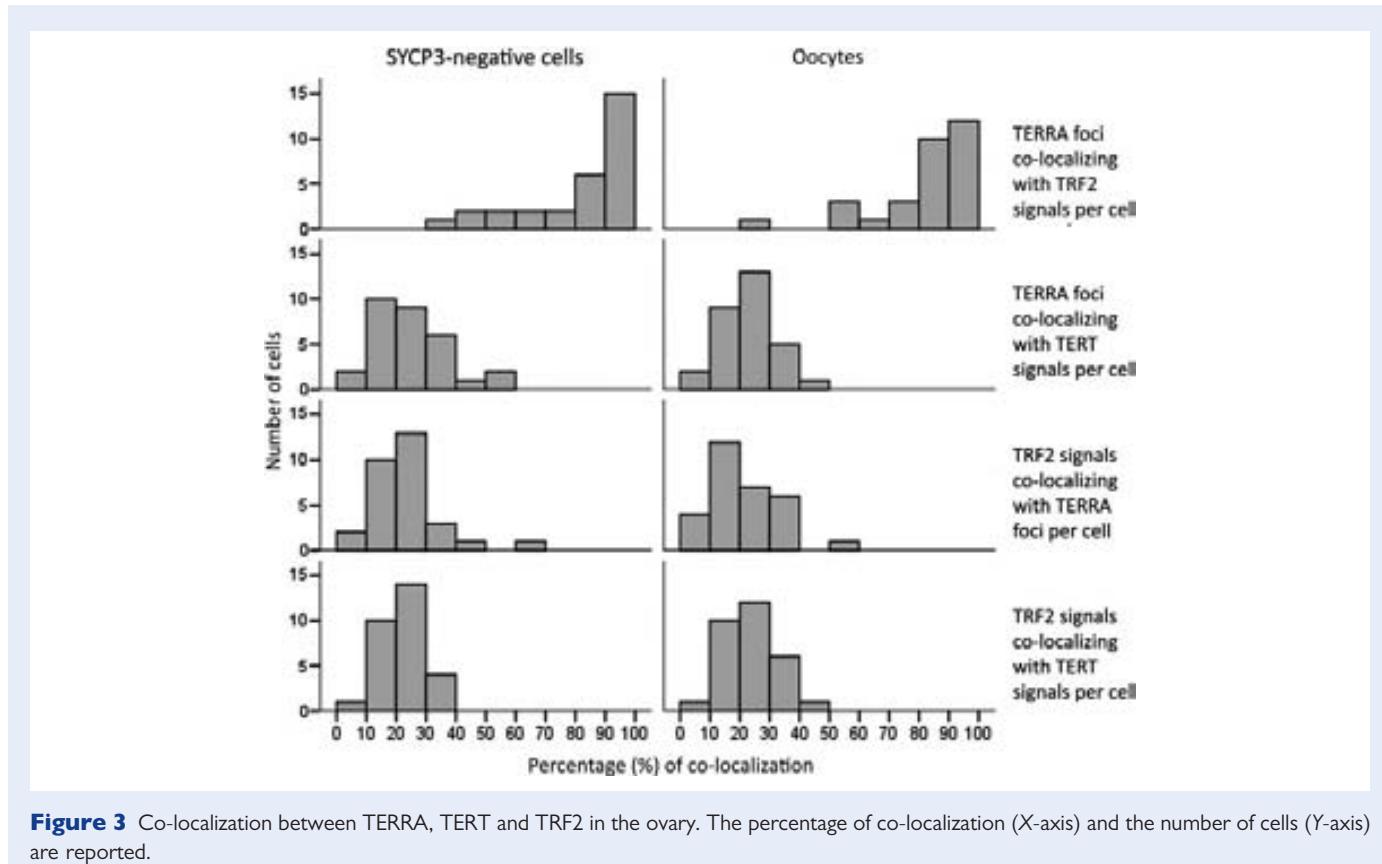


Figure 3 Co-localization between TERRA, TERT and TRF2 in the ovary. The percentage of co-localization (X-axis) and the number of cells (Y-axis) are reported.

with Xist RNA in both somatic and stem cells derived from mice (Schoeftner and Blasco, 2008; Zhang *et al.*, 2009). Since these large TERRA domains were not observed in human cells (Azzalin *et al.*, 2007; Schoeftner and Blasco, 2008; this study), the co-localization of TERRA and Xist RNA might be considered a species-specific phenomenon.

Moreover, our results indicate that TERRA levels are higher in oocytes than in SYCP3-negative cells and, in both cell types, TERRA is mainly localized at telomeres, similarly to what was previously described in somatic cells (Azzalin *et al.*, 2007; Schoeftner and Blasco, 2008). However, TERRA was detectable only in a fraction of chromosome ends, indicating that the amount of these RNA molecules bound to telomeres is variable. However, the association is maintained during all the stages of prophase I (Fig. 2). Although the localization of telomeres is dynamic throughout prophase I progression (Scherthan, 2007), mainly due to the bouquet formation, neither the prophase stage nor the presence of the bouquet seems to influence TERRA levels. However, our data show that TERRA levels at leptonema are slightly lower compared with the other prophase I stages, yet these differences were not statistically significant. It has been previously shown that TERRA levels are down-regulated during DNA synthesis (Porro *et al.*, 2010) and that the half-life of TERRA molecules in somatic cells is 3 h (Azzalin *et al.*, 2007); therefore, we can postulate that TERRA synthesis may start at leptonema or, alternatively, before the pre-meiotic S phase, being already present during oogonia proliferation. Subsequently, during meiosis TERRA would be kept attached to the telomeric structure by means of direct interactions with telomeric DNA or with some

element of the shelterin complex (Azzalin *et al.*, 2007; Schoeftner and Blasco, 2008; Xu *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2009). Therefore, both in metaphase (when telomeres are transcriptionally silent, Azzalin *et al.*, 2007) and in meiosis, the localization of TERRA to telomeres may depend on similar molecular interactions. On the other hand, variable amounts of TERRA were detected in a subset of telomeres (Fig. 2), mirroring previous reports (Azzalin *et al.*, 2007; Schoeftner and Blasco, 2008). These results support the hypothesis that TERRA is not a fixed element of the telomeric chromatin, but may play a transitory function at telomeres possibly depending on specific cellular contexts and/or on telomere-specific transcriptional regulation, as has been reported in yeast and human cell lines (Schoeftner and Blasco, 2008; Nergadze *et al.*, 2009; Farnung *et al.*, 2010; Porro *et al.*, 2010; Iglesias *et al.*, 2011).

It is known that, despite several differences between studies, telomerase enzymatic activity is present in immature oocytes (Eisenhauer *et al.*, 1997; Betts and King, 1999; Xu and Yang, 2000; Wright *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2007). Here, using an antibody against human TERT, we were able to detect the protein component of telomerase by IF in single cells not only at all prophase I stages but also in the ovarian SYCP3-negative cells (Fig. 5). As previously described in other non-meiotic cells (Tomlinson *et al.*, 2006), in ovarian SYCP3-negative cells, discrete telomerase foci are detectable in the nucleus, being localized to only on a subset (22%) of telomeres (Figs 3 and 5); in oocytes, a similar fraction of telomeres co-localize with telomerase foci. Interestingly, TERT is also associated with a fraction (23%) of TERRA foci (Figs 3 and 5). Therefore, our results show that TERRA and telomerase signals are detected on only a fraction of telomeres.

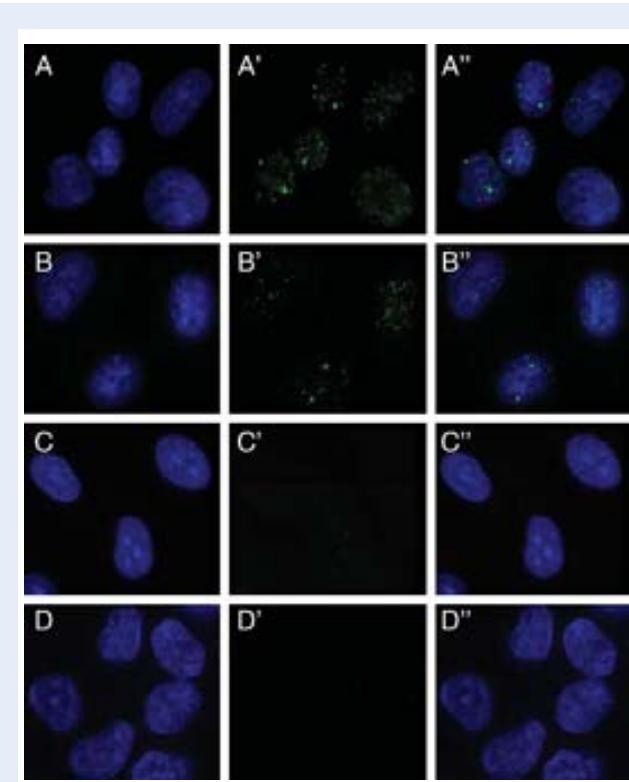


Figure 4 Telomerase in somatic cells. (A–D) Somatic cells where TERT (green) and chromatin (blue) were labeled by IF. (A') HeLa cells showing TERT signals, (A) same cells showing DAPI staining and (A'') merged image. (B') HT1080 cells showing TERT signals, (B) same cells showing DAPI staining and (B'') merged image. (C') Human primary fibroblasts showing no TERT signals, (C) same cells showing DAPI staining and (C'') merged image. (D') U2OS cells showing no TERT signals, (D) some cells showing DAPI staining and (D'') merged image.

At this stage, we do not know whether these molecules are completely absent from some telomeres or whether their levels are below the resolution limit of the method used or whether, at some telomeres, signals may be masked by particular cellular components. However, whatever the reason is for variation in the signal intensity, TERRA and telomerase localization at some telomeres and TERRA/telomerase co-localization remain the most relevant findings. It is tempting to postulate that co-localization of TERRA and TERT is indicative of some physical interaction between these molecules at the chromosomal ends of ovarian tissue cells. Although we have not simultaneously analyzed the three components (TERRA, TERT and TRF2), our results are in agreement with the hypothesis that TERRA, when localized at telomeres, may interact with telomerase, possibly regulating its activity in the ovarian tissue, mirroring previous observations in somatic cells (Redon et al., 2010). Although only low levels of telomerase activity have been reported in oocytes (Wright et al., 1996; Betts and King, 1999; Xu and Yang, 2000; Liu et al., 2007), we were able to detect the presence of TERT in the ovarian tissue. Although our co-localization experiments cannot prove that TERRA is physically bound to the shelterin complex, we can postulate that TERRA may interact with telomerase, or with telomerase molecules already

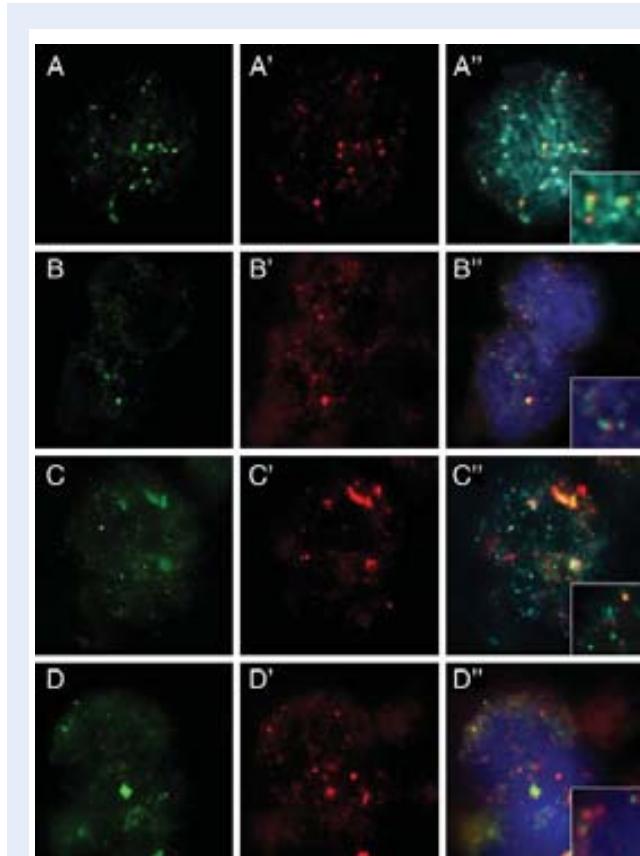


Figure 5 Telomerase in the human ovarian tissue. (A) and (B) show an oocyte (SYCP3 in blue) and ovarian SYCP3-negative cells (DNA stained with DAPI), respectively, immunostained for TERT (green (A) and (B)) and TRF2 (red (A') and (B')). (C) and (D) show the co-localization of TERRA (red (C') and (D')) with TERT (green (C) and (D)) in an early leptotene stage oocyte (SYCP3 in blue (C'')) and in ovarian SYCP3-negative cells (DAPI stained in blue (D'')), respectively. In each merged image (A''–D''), insets show enlarged regions with co-localization of TERT and TRF2 signals (A'' and B''), or TERRA and TERT signals (C'' and D'').

bound to the other telomeric proteins, as previous studies seem to indicate (Redon et al., 2010).

In the light of our results, we propose that TERRA may contribute to telomere integrity during meiosis. Throughout oogenesis, this integrity is thought to be compromised both by telomere shortening, suffered by oogonia through their proliferation phase before entering meiosis, and by prolonged exposure to products of the oxidative metabolism during the long cell quiescence in diapause prior to oocyte ovulation (Keefe and Liu, 2009). Studies in mice have shown that the alteration of telomeres affects homologous' alignment, synapsis, recombination and also meiotic spindle formation (Liu et al., 2002a,b, 2004), producing impaired and/or aneuploid oocytes. Therefore, since damaged oocytes are removed inefficiently (Jones, 2008), they may contribute to some of the characteristic features of reproductive senescence in women and their fecundity may lead to genome instability in the embryos (Keefe and Liu, 2009). An accurate regulation of TERRA levels at telomeres is essential for telomeric integrity (Azzalin et al., 2007; Maicher et al., 2012). The presence of TERRA

attelomeres of oocytes from leptotene to pachynema and also on chromosomes forming the bouquet, suggests that this RNA might participate in telomeric stability at least all through the complex process of the female first meiotic prophase.

Conclusion

We were able to optimize a technique combining IF and RNA-FISH that allowed us to detect TERRA molecules in human fetal ovarian tissue. Our results show that TERRA forms discrete foci at telomeres of all cell types from the ovarian tissue, co-localizing with the shelterin component TRF2. Interestingly, TERRA co-localizes with a fraction of telomerase foci, suggesting that these molecules may physically interact at telomeres. Moreover, TERRA was detected from the leptotene to pachytene stages, and also when chromosomes are organized in the bouquet structure, indicating that TERRA levels might stay steady all through meiotic prophase I. Overall, our results open a new area for the study of the development and regulation of oogenesis in female reproduction.

Acknowledgements

We thank DIESSE Ricerche from Siena for providing us the anti-TERT antibody. We are very grateful to the clinicians and biologists of the Fetal Tissue Bank, Pathology and Gynecology Departments of the Hospital de la Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

Authors' roles

R.R.-V., E.G., M.G.C. and A.R.-H. were involved in the study concept and design, and the analysis and interpretation of data. R.R.-V., M.A.B.-E., L.K., N.T. and L.C. took part in the acquisition of data. R.R.-V., E.G., M.G.C. and A.R.-H. played a role in the drafting of the manuscript and in critical revision of the manuscript for intellectual content.

Funding

R.R.-V. is a recipient of a PIF fellowship from Universitat Autònoma de Barcelona. This work was supported by the Generalitat de Catalunya (2009SGR1107).

Conflict of interest

None declared.

References

- Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriauli L, Giulotto E, Lingner J. Telomeric repeat-containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* 2007;31:798–801.
- Betts DH, King WA. Telomerase activity and telomere detection during early bovine development. *Dev Genet* 1999;25:397–403.
- Bhalla N, Dernburg AF. Prelude to a division. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008; 24:397–424.
- Briño-Enríquez MA, Robles P, García-Cruz R, Roig I, Cabero L, Martínez F, García Caldés M. A new culture technique that allows meiotic prophase development of fetal human oocytes. *Hum Reprod* 2010;25:74–84.
- Caslini C, Connelly JA, Serna A, Broccoli D, Hess JL. MLL associates with telomere and regulates telomeric repeat-containing RNA transcription. *Mol Cell Biol* 2009;29:4519–4526.
- Deng Z, Norseen J, Wiedmer A, Riethman H, Lieberman PM. TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres. *Mol Cell* 2009;35:403–413.
- Eisenhauer KM, Gerstein RM, Chiu CP, Conti M, Hsueh AJ. Telomerase activity in female and male rat germ cells undergoing meiosis and in early embryos. *Biol Reprod* 1997;56:1120–1125.
- Farnung BO, Giulotto E, Azzalin C. Promoting transcription of chromosome ends. *Transcription* 2010;1:1–4.
- Garcia M, Dietrich M, Freixa L, Vink ACG, Ponsa M, Egoscue J. Development of the first meiotic prophase stages in human fetal oocytes observed by light microscopy. *Hum Genet* 1987;77:223–232.
- Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2001;2:280–291.
- Iglesias N, Redon S, Pfeiffer V, Dees M, Lingner J, Luke B. Subtelomeric repetitive elements determine TERRA regulation by Rap1/Rif and Rap1/Sir complexes in yeast. *EMBO Rep* 2011;12:587–593.
- Jegou T, Chung I, Heuvelman G, Wachsmuth M, Görisch SM, Greulich-Bode KM, Boukamp P, Lichter P, Rippe K. Dynamics of telomeres and promyelocytic leukemia nuclear bodies in a telomerase-negative human cell line. *Mol Biol Cell* 2009;20:2070–2082.
- Jones KT. Meiosis in oocytes: predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age. *Hum Reprod Update* 2008;14:143–158.
- Keefe DL, Liu L. Telomeres and reproductive aging. *Reprod Fertil Dev* 2009; 21:10–14.
- Liu L, Blasco MA, Keefe DL. Requirement of functional telomeres for metaphase chromosome alignments and integrity of meiotic spindles. *EMBO Rep* 2002a;3:230–234.
- Liu L, Blasco MA, Trimarchi J, Keefe DL. An essential role for functional telomeres in mouse germ cells during fertilization and early development. *Dev Biol* 2002b;249:74–84.
- Liu L, Franco S, Spyropoulos B, Moens PB, Blasco MA, Keefe DL. Irregular telomeres impair meiotic synapsis and recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:6496–6501.
- Liu L, Bailey SM, Okuka M, Muñoz P, Li C, Zhou L, Wu C, Czerwic E, Sandler L, Seyfang A et al. Telomere lengthening early in development. *Nat Cell Biol* 2007;9:1436–1441.
- Maicher A, Kastner L, Luke B. Telomeres and disease: enter TERRA. *RNA Biol* 2012;9:1–8.
- Marion RM, Strati K, Li H, Tejera A, Schoeftner S, Ortega S, Serrano M, Blasco MA. Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2009;4:141–154.
- Nergadze SG, Farnung BO, Wischnewski H, Khoriauli L, Vitelli V, Chawla R, Giulotto E, Azzalin CM. CpG-island promoters drive transcription of human telomeres. *RNA* 2009;15:2186–2194.
- O'Sullivan JO, Karlseeder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:171–181.
- Porro A, Feuerhahn S, Reichenbach P, Lingner J. Molecular dissection of telomeric repeat-containing RNA biogenesis unveils the presence of distinct and multiple regulatory pathways. *Mol Cell Biol* 2010; 30:4808–4817.
- Redon S, Reichenbach P, Lingner J. The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucl Acids Res* 2010;38:5797–5806.
- Roig I, Robles P, García R, Martín M, Egoscue J, Cabero L, Barambio S, García M. Evolution of the meiotic prophase and of the chromosome pairing process during human fetal ovarian development. *Hum Reprod* 2005;20:2463–2469.

- Scherthan H. Telomere attachment and clustering during meiosis. *Cell Mol Life Sci* 2007; **64**:117–124.
- Schoeftner S, Blasco MA. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* 2008; **10**:228–236.
- Siderakis M, Tarsounas M. Telomere regulation and function during meiosis. *Chromosome Res* 2007; **15**:667–679.
- Soldateschi D, Bravaccini S, Berti B, Brogi A, Benicchi T, Soldatini C, Medri L, Fabbri F, De Paola F, Amadori D et al. Development and characterization of a monoclonal antibody directed against human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *J Biotechnol* 2005; **118**:370–378.
- Tomlinson RL, Ziegler TD, Supakorndej T, Terns MP. Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Mol Biol Cell* 2006; **17**:955–965.
- Treff NR, Su J, Taylor D, Scott RT Jr. Telomere DNA deficiency is associated with development of human embryonic aneuploidy. *PLoS Genet* 2011; **7**:e1002161.
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 1996; **18**:173–179.
- Wright DL, Jones EL, Mayer JF, Oehninger S, Gibbons WE, Lanzendorf SE. Characterization of telomerase activity in the human oocyte and preimplantation embryo. *Mol Hum Reprod* 2001; **7**:947–955.
- Xu J, Yang X. Telomerase activity in bovine embryos during early development. *Biol Reprod* 2000; **63**:1124–1128.
- Xu Y, Kimura T, Komiyama M. Human telomere RNA and DNA form an intermolecular G-quadruplex. *Nucl Acids Symp Ser* 2008; **52**:169–170.
- Zhang LF, Ogawa Y, Ahn JY, Namekawa SH, Silva SS, Lee JT. Telomeric RNAs mark sex chromosomes in stem cells. *Genetics* 2009; **182**:685–698.

4.2.2. TERRA i telomerasa són components dels telòmers durant la gametogènesi dels mamífers

L'estudi inicial de la relació de TERRA i la subunitat TERT de la telomerasa amb els telòmers del cromosomes meiòtics en oòcits fetals humans va posar sobre la taula la possibilitat de que aquestes dues molècules participessin en el manteniment de l'estabilitat telomèrica tant durant la meiosi com al llarg de la gametogènesi dels mamífers. Per aquest motiu, en aquest estudi es va analitzar la distribució nuclear i en relació als telòmers de TERRA i TERT així com la longitud de les repeticions telomèriques de diferents tipus de cèl·lules germinals humanes i de ratolí. D'aquesta manera, es va poder observar el comportament d'aquestes dues molècules al llarg del procés de formació dels gàmetes i alhora comprovar si les diferències en les característiques telomèriques de les dues espècies estudiades es veuen reflectides en TERRA i TERT.

Resultats: Reig-Viader, *et al.*, 2014a

Reig-Viader, R., Vila-Cejudo, M., Vitelli, V., Sabaté, M., Giulotto, E., Caldés, M. G., & Ruiz-Herrera, A. (2014). **Telomeric Repeat-Containing RNA (TERRA) and Telomerase Are Components of Telomeres During Mammalian Gametogenesis.** *Biology of Reproduction*, 90(5), 103, 1-13.

Factor d'impacte: 4.027

Q1 en Biologia Reproductiva (5è de 28)

Telomeric Repeat-Containing RNA (TERRA) and Telomerase Are Components of Telomeres During Mammalian Gametogenesis¹

Rita Reig-Viader,^{3,4} Marta Vila-Cejudo,^{3,4} Valerio Vitelli,⁵ Rafael Buscà,⁶ Montserrat Sabaté,⁶ Elena Giulotto,⁵ Montserrat Garcia Caldés,^{3,4} and Aurora Ruiz-Herrera^{2,3,4}

³Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus UAB, Cerdanyola del Vallès, Spain

⁴Genome Integrity and Instability Group, Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus UAB, Cerdanyola del Vallès, Spain

⁵Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani," Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italy

⁶Fecunmed, Casals s/n, Granollers, Spain

ABSTRACT

Telomeres are ribonucleoprotein structures at the end of chromosomes composed of telomeric DNA, specific-binding proteins, and noncoding RNA (TERRA). Despite their importance in preventing chromosome instability, little is known about the cross talk between these three elements during the formation of the germ line. Here, we provide evidence that both TERRA and the telomerase enzymatic subunit (TERT) are components of telomeres in mammalian germ cells. We found that TERRA colocalizes with telomeres during mammalian meiosis and that its expression progressively increases during spermatogenesis until the beginning of spermiogenesis. While both TERRA levels and distribution would be regulated in a gender-specific manner, telomere-TERT colocalization appears to be regulated based on species-specific characteristics of the telomeric structure. Moreover, we found that TERT localization at telomeres is maintained throughout spermatogenesis as a structural component without affecting telomere elongation. Our results represent the first evidence of colocalization between telomerase and telomeres during mammalian gametogenesis.

meiosis, oocytes, Q-FISH, spermatocytes, spermatogenesis, telomeres, TERRA, TERT

INTRODUCTION

Telomeres are ribonucleoprotein structures located at the end of eukaryotic chromosomes and composed of three different elements: telomeric DNA, specific-binding proteins, and noncoding RNA. Telomeric DNA consists of TTAGGG tandem repeats associated with an array of telomere binding proteins that constitute the shelterin complex [1, 2]. This telomeric architecture is associated with a noncoding RNA, named telomeric repeat containing RNA (TERRA), which is transcribed from CpG island promoters located at subtelo-meres, and it has been suggested to be an essential component

of the telomeric heterochromatin structure [3–5]. Given that telomeric dysfunction is involved in cellular senescence, genome instability, and carcinogenesis, both the telomeric structure and its regulation have been widely studied in mammalian somatic cells [6, 7]. Studies in the germ line, however, are less abundant due to the intrinsic complexities of mammalian gametogenesis, which hinder accessing suitable samples, especially in the case of females [8–13].

Oogenesis differs from spermatogenesis in several ways, such as gametes morphology, differentiation, place, and timing [14]. Whereas males have the ability to produce spermatozoa continuously during the adult life, oogenesis initiates early in fetal development, becomes arrested before birth, and resumes at puberty. Once meiosis is reactivated during ovulation, it is completed only if fertilization occurs. This means that primary oocytes are halted at the end of the first meiotic division for long periods of time (up to 50 yr). Once spermatogonia or oogonia differentiate to spermatocytes or oocytes, respectively, developing germ cells do not undergo DNA synthesis. Since telomerase acts during the S phase of the cell cycle [15], telomerase would not be expected to influence telomere reserve in germ cells. Nevertheless, telomeres must be long enough to cope with the entire gametogenic process, which includes two meiotic divisions, as well as with all the subsequent embryonic divisions occurring after fertilization. In fact, meiotic progression involves chromosome movements and chromatin rearrangements that must be carefully regulated to generate healthy gametes. The most critical chromosome movements occurring during the first meiotic prophase include alignment, pairing, synapsis, and recombination between homologues. It is in this context where telomeres play an essential role since they promote homologue pairing and synapsis by forming the bouquet structure during prophase I [16]. Disruption of the telomere structure and/or telomeric shortening seriously compromises meiotic progression [17–19]. In fact, the maintenance of telomeric length is crucial for the formation of the germ line given that telomere erosion has often been related to apoptosis, generation of aneuploid gametes, and reproductive aging [20–24]. But, notwithstanding its importance, the regulation of telomeric length by telomerase during the different stages of gametogenesis is still not well understood, especially in oogenesis. In the male germ line, it is known that telomerase activity negatively correlates with telomere length [25, 26]. Its activity is especially high in spermatogonia, decreasing progressively through spermatogenesis, until it disappears in spermatozoa [25, 27–29]. By contrast, reports in female germ cells have provided heterogeneous results so far [30–35], and there is a lack of a

¹Supported by the Generalitat de Catalunya (2009SGR1107). R.R.-V. is a recipient of a PIF fellowship from Universitat Autònoma de Barcelona. The E.G. laboratory was supported by European Commission Euratom (EpiRadBio) and Ministero dell'Istruzione dell'Università e della Ricerca (FIRB 2011).

²Correspondence: E-mail: aurora.ruizherrera@uab.cat

Received: 18 December 2013.

First decision: 7 January 2014.

Accepted: 25 March 2014.

© 2014 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.

eISSN: 1529-7268 http://www.biolreprod.org

ISSN: 0006-3363

consensus view of how telomerase activity is regulated during oogenesis.

An additional important element in the maintenance of telomere structure is TERRA, a noncoding RNA restricted to the nucleus, either as free molecules or colocalizing with telomeric binding proteins at chromosome ends [3]. TERRA levels are cell cycle regulated [36, 37], and its transcription in somatic cells is subjected to methylation and histone modifications [5, 38, 39]. This molecule was initially described in somatic cells, but its presence and/or expression in the germ line are largely unknown [40]. Given that telomeres are important for the meiotic process and taking into account the role of TERRA in the stability of the telomeric structure and its specific regulation during the cell developmental stage [3, 4, 41–46], it is important to understand the role of TERRA during gametogenesis and, in particular, its interactions with other molecules related to telomeric homeostasis. In this respect, there has been a long-standing debate regarding the relationship between TERRA and telomerase. Initial studies suggested that TERRA-like oligonucleotides suppress telomerase activity *in vitro* [4, 47], and evidence of an inverse correlation between TERRA levels and telomere length was reported in different cell lines [39, 41]. These observations, however, have been questioned by recent studies in which no relationship between telomere length and TERRA expression levels *in vivo* was found [48–51]. In this regard, we have recently reported the presence and intracellular distribution of TERRA in human oocytes I as well as its colocalization with telomeres and telomerase during meiotic prophase I, suggesting that TERRA could contribute to telomeric stability during the meiotic process and may be related to meiotic telomerase function [40].

Given this background, the main goal of this work was to shed light on the telomeric structure in mammalian gametogenesis. More specifically, we aimed to study the presence and nuclear distribution of the different telomere components during the formation of the germ line as well as the relationship between them. Is there any specific architecture that characterizes telomeric structure during mammalian germ cell development? And, if so, is it influenced by gender- and/or species-specific characteristics? To this aim, we have investigated telomere homeostasis in both male and female gametogenesis by using human and mouse germ cells as model species with three specific objectives: 1) to study TERRA dynamics during gametogenesis, 2) to analyze the relationship between TERRA and telomerase in meiosis, and 3) to determine whether telomere length influences TERRA levels and distribution in the germ line.

MATERIALS AND METHODS

Biological Samples

Mouse testes samples were obtained from adult male mice (33 C57BL/6 animals, ~4 mo old), whereas the male human sample was derived from a 48-yr-old 46XY fertile vasectomized patient provided by the Assisted Reproduction Center Fecunmed (Granollers, Spain) after signing an informed consent. Mouse fetal ovaries were obtained from three C57BL/6 pregnant females within 18 and 19 days after vaginal plug detection. Moreover, HeLa cells were used as positive controls for telomerase detection and telomere length measurement.

Mouse testes were extracted and subsequently processed as described hereafter or otherwise frozen at -80°C in isopentane until use. The same processing protocol was used for the human biopsy immediately after its obtention and ice-cold transport to the laboratory. Mouse fetal ovaries were processed immediately after extraction. HeLa cells were cultured under standard conditions in DMEM (Life Technologies, Glasgow, Scotland, U.K.) with 10% fetal calf serum (FCS). The Ethics Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona approved all the protocols adopted herein.

Cell Spreads

Mammalian testes and HeLa cells were processed in order to obtain cell spreads as previously described [40]. Briefly, testicular tissue was scattered on slides by mechanical disaggregation, permeabilized with CSK (cytoskeleton) buffer (100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 10 mM PIPES, 0.5% Triton X-100 and 10 mM ribonucleoside-vanadyl complex [NEB, Ipswich, MA]), fixed with 4% paraformaldehyde, and finally washed with 70% ethanol. Slides were conserved at -80°C until use. For mouse fetal ovary cell spread preparation, an enzymatic step was added before mechanical disaggregation. Following extraction, ovaries were washed with 1× PBS and incubated in 2.5 mg/ml collagenase (Worthington Biochemicals, Lakewood, NJ) in Hank balanced salt solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 20 min at 37°C.

Immunofluorescence

Immunofluorescence (IF) was performed as previously described [40], with modifications. The efficiency of TERT antibody was initially tested in telomerase-positive (HeLa cells) and telomerase-negative cells (human primary fibroblasts) [40]. Slides were blocked 10 min with PTBG (1× PBS, 0.1% Tween-20, 0.2% BSA, 0.2% gelatin) and then incubated at room temperature for 45 min or overnight at 4°C with the following primary antibodies: mouse anti-telomeric repeat-binding factor 2 (TRF2; Millipore, Billerica, MA), rabbit anti-TRF2 (a kind gift from Dr. T. De Lange, The Rockefeller University, New York), mouse or rabbit anti-synaptonemal complex protein 3 (SYCP3; Abcam, Cambridge, Cambridge, U.K.), rat anti-telomerase reverse transcriptase (TERT; Diesse Ricerche, Siena, Italy), rabbit anti-TERT (Rockland, Gilbertsville, PA), and guinea pig anti-histone cluster 1 (H1t; a gift from Dr. M.A. Handel, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Slides were washed three times for 5 min in PBST (0.1% Tween-20 in 1× PBS) before 40 min of incubation at 37°C with the following secondary antibodies: goat anti-mouse Cy5, mouse anti-rabbit Cy5, goat anti-rabbit FITC, goat anti-mouse FITC, goat anti-rabbit Cy3, goat anti-mouse Cy3, goat anti-guinea pig Cy3 (all from Jackson Immunoresearch, Newmarket, Suffolk, U.K.), and goat anti-rat DyLight 488 (KPL, Gaithersburg, MD). Slides were washed again three times in PBST, fixed 10 min in 4% paraformaldehyde in 1× PBS (pH 7), and rinsed with 1× PBS. Finally, cells nuclei were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) diluted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

SYCP3 staining allowed for the identification of primary oocytes and spermatocytes among the different cell types of the gonadal tissue, negative for SYCP3 labeling (hereafter referred to as SYCP3[−] cells). In the ovarian tissue, SYCP3(−) cells correspond to fibroblasts and follicular cells, whereas in the testicular tissue they include mainly germ cells not performing the first meiotic prophase together with fibroblasts and Leydig and Sertoli cells.

RNA-Fluorescence *In Situ* Hybridization

TERRA levels in each single cell were qualitatively estimated through the analysis of the number of TERRA foci detected per nucleus, as previously described [3, 4, 40]. RNA-fluorescence *in situ* hybridization (RNA-FISH) was carried out immediately after IF as described previously [40]. RNA-FISH experiments were performed using a (CCCTAA)₃ oligonucleotide probe complementary to TERRA given that TERRA molecules consist of UUAGGG repeats in mammalian cells [3, 4]. Briefly, after dehydration with ethanol series, cells were hybridized overnight at 37°C with a 25-nM (CCCTAA)₃ oligonucleotide probe Cy3-conjugated (XX Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium) in hybridization buffer (10% of 20× SSC, 20% 10 mg/ml BSA, 20% of 50% dextran sulfate, and 5% formamide). Next, slides were washed with 50% formamide/1× SSC and 2× SSC at 39°C. Nuclei were counterstained with DAPI. A negative control consisting of a slide treated with RNase A was included in the experiments.

Quantitative-Fluorescence *In Situ* Hybridization

Quantitative-fluorescence *in situ* hybridization (Q-FISH) analysis was performed using a peptide nucleic acid (PNA) probe complementary to telomere G-rich strand (TelC; Panagene, Yuseong-gu, Daejeon, Korea) according to the manufacturer's protocol. Slides were dried at 67°C for 20 min and rehydrated for 15 min in 1× PBS. Cell fixation was carried out in 4% formaldehyde in 1× PBS for 4 min. After two washes in 1× PBS, cytoplasm was removed by incubating slides 4 min in 0.005% pepsin in 0.01M HCl at 37°C. Slides were then washed twice in PBS 1× for 3 min; dehydrated in 70%, 85%, and 100% ethanol series; and air-dried. Fifteen microliters of 800 ng/ml TelC FAM-conjugated probe (Panagene) in hybridization buffer (10 mM NaHPO₄, 10 mM NaCl, 20 mM Tris, 70% formamide) were added on each slide. After denaturation for 5 min at 85°C, slides were incubated for 1 h and 45

min at room temperature. Subsequently, slides were submerged in PBST to remove coverslips and washed 20 min at 57°C in PBST and 1 min at room temperature in 2× SSC 0.1% Tween-20. Before microscopic observation, nuclei were counterstained with DAPI. Fluorescence calibration was performed using green fluorescent beads (Life Technologies) before and after every image-capturing session. Telomere intensities were obtained by measuring spot optical densities using the TFL-Telo software [52]. Measures of telomeric signals were recorded as arbitrary telomere fluorescence units (TFUs) following previous studies [52]. For each experiment, an internal control consisting of cells with known telomere length, that is, HeLa cells [53], was included. Results were normalized expressing the TFUs obtained in mouse and human germ cells as the increment with respect to HeLa cells.

Fluorescence-Activated Cell Sorting

Purified cell fractions containing spermatogonia, spermatocytes I, spermatocytes II, and round spermatids were obtained using a fluorescence-activated cell sorting (FACS)-based method [54]. Mouse testes were decapsulated in 500 µl of Gey balanced salt solution (GBSS) (Sigma-Aldrich) immediately after extraction. Testes were incubated 15 min at 33°C in 10 ml of GBSS (for every two testes) with 0.5 mg/ml collagenase IV (Worthington Biochemicals, Lakewood, NJ) and 1 µg/ml DNase (Sigma-Aldrich). Dispersed seminiferous cords were isolated by sedimentation and then incubated in 10 ml of GBSS containing 0.5 mg/ml trypsin from bovine pancreas (Sigma-Aldrich) and 1 µg/ml DNase (Sigma-Aldrich) for 15 min at 33°C. Immediately after, 500 µl of FCS (Life Technologies) were added to the cell suspension to stop the enzymatic reaction. Cells were then filtered through a 70-µm strainer (BD Biosciences, San Jose, CA), centrifuged 3 min at 800 × g, and resuspended in 1 ml of GBSS supplemented with 5% FCS. Cells were stained with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) and propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich) and kept in ice until sorting.

Cell sorting was carried out in a MoFlo Legacy high-speed cell sorter equipped with three lasers, following conditions previously published [54] with some modifications. Hoechst 33342 and PI were excited by a UV 355-nm laser (Innova 90C DSU XCYTE UV 998085) at 30 mW of potency and a 488-nm laser (I-Cyt Lyt 00S) at 30 mW of potency, respectively. Blue Hoechst fluorescence was detected with a 670/40-nm filter (FL 9), whereas the combination of red Hoechst and PI fluorescence was detected with a 405/30-nm filter (FL 8), allowing a higher resolution [55]. Enrichment for each flow-sorted fraction was assessed by IF against SYCP3 and the H1t proteins. SYCP3 allowed us to distinguish primary spermatocytes, whereas H1t, which is synthesized at mid-pachytene on, labeled spermatocytes II and round spermatids [56]. In this way, spermatogonia were differentiated from secondary spermatocytes and round spermatids. Instead, secondary spermatocytes and round spermatids were distinguished by nucleus morphology revealed by DAPI staining [28, 54]. The mean enrichments obtained for each flow-sorted cell population were above 70% in all cases: 80.1% for the spermatogonia fraction, 71.3% for spermatocytes I, 79.0% for spermatocytes II, and 96.9% for round spermatids.

RNA Extraction and Real-Time PCR

Total RNA was extracted with Trizol and treated with DNaseI. Then RNA was retrotranscribed using (CCCTAA)₅ as primer for TERRA molecules and the reverse primer for U6 snRNA (used as control). Real time-PCR (RT-PCR) was performed on the resulting cDNA using two primer pairs specific for mouse TERRA: one for subtelomere 5q [57] and one for subtelomere 11q, designed by us (AGCAGATGGTCCCTGGTAAA; TTGTCCG CCCTCACCTAGCTT). The third primer pair was specific for U6 snRNA [50].

Microscopy

Preparations were evaluated using a Nikon Eclipse 90i epifluorescence microscope equipped with the appropriate filters and connected to a charge-coupled device camera. Images were captured and produced by the Isis software (Metasystems, Altlussheim, Germany). Additionally, a confocal microscope (Leica SP5) was used to evaluate protein localization and nuclear distribution at a higher level of resolution. Fluorophores were excited with four different lasers (405 UV, DPSS 561, HeNe 594, and HeNe 633), and the signal was captured by 420- to 495-nm and 647- to 800-nm photomultipliers. In order to obtain three-dimensional (3D) images, preparations were captured in an xyz mode, with a step size of 0.17 µm and a line average of 3, and processed through LasAF (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and Imaris (Bitplane, Zurich, Switzerland) software. An average of 25 sections per cell was captured.

Statistical Analysis

The statistical analysis was carried out by means of PAWS Statistics 18 software. The random effect of the variability among mouse samples was taken into account when contrasting our data by means of the univariate general linear model. Correlations between TERRA levels and TERRA colocalization with TRF2 were calculated through the Pearson coefficient. The analysis of variance (ANOVA) and t-tests were employed for the rest of the data analysis, first applying the test of homogeneity of variances. Moreover, the Scheffé post hoc test was applied to detect significantly different groups from the ANOVA. In order to analyze TERRA expression, two independent quantitative RT-PCR experiments were carried out, and data were analyzed with a one-way ANOVA followed by a Tukey HSD test using the VassarStats software.

RESULTS

TERRA Is Expressed During Spermatogenesis and Colocalizes with Telomeres of Mammalian Meiocytes

TERRA levels (expressed as the number of foci detected per cell), together with their intracellular distribution, were analyzed in both human and mouse germ line by IF/RNA-FISH. Our analysis revealed that TERRA formed discrete foci in 100% of the gonadal cells analyzed, although its levels followed a gender-specific pattern (Fig. 1, A and B; Supplemental Figure S1; all supplemental data are available online at www.biolreprod.org). In males, the mean number of TERRA foci observed per spermatocytes I ranged from 33 ± 13 in human to 40 ± 16 in mouse, whereas in mouse oocytes I, TERRA levels were much lower (18 ± 8 foci per cell). No statistical differences, however, were observed for TERRA levels in SYCP3(−) cells regardless of the gender and species (15 ± 8 foci per cell in mouse testes, 17 ± 9 foci per cell in human testes, and 16 ± 5 foci in mouse ovaries; Fig. 1, A and B). Following previously established criteria [40] and in order to compare TERRA levels among cell types, three different categories were established according to the number of TERRA foci detected: cells with less than 16 TERRA foci, cells with 16–30 TERRA foci, and cells with more than 30 TERRA foci (Fig. 1C). Primary meiocytes showed, on average, higher percentages of cells containing high levels of TERRA when compared to SYCP3(−) cells. Nevertheless, TERRA levels in oocytes I were remarkably lower than those observed in spermatocytes I regardless of the analyzed species (Fig. 1C).

Given the differences observed in TERRA levels when comparing spermatocytes I and oocytes I, we investigated further to check whether this pattern was also maintained when analyzing the localization of TERRA molecules relative to telomeres. We therefore estimated the percentage of TERRA foci colocalizing with the shelterin component TRF2 (Fig. 1D). Our results showed that in spermatocytes I, where TERRA levels were especially high, nearly half of TERRA molecules (44% in mouse and 47% in human) were localized at telomeres. Also, the proportion of telomeres showing TERRA foci was similar in mouse (41%) and human (40%) spermatocytes I. In contrast, these values decreased in mouse oocytes I, where the percentages of both TERRA-TRF2 (22%) and TRF2-TERRA (11%) colocalizations were lower than those observed in males (Fig. 1D), mirroring previous observations in humans [40]. Despite such observations, differences in TERRA localization at telomeres were found when comparing mouse and human ovaries (Fig. 1D). This could be related to the fact that TERRA levels in mouse ovarian tissue were clearly higher (18 ± 8 foci per cell) than those observed in human fetal ovarian samples (7.2 ± 0.7 foci per cell [40]).

In the light of our results, the localization of TERRA at telomeres could be interpreted as a dynamic process dependent

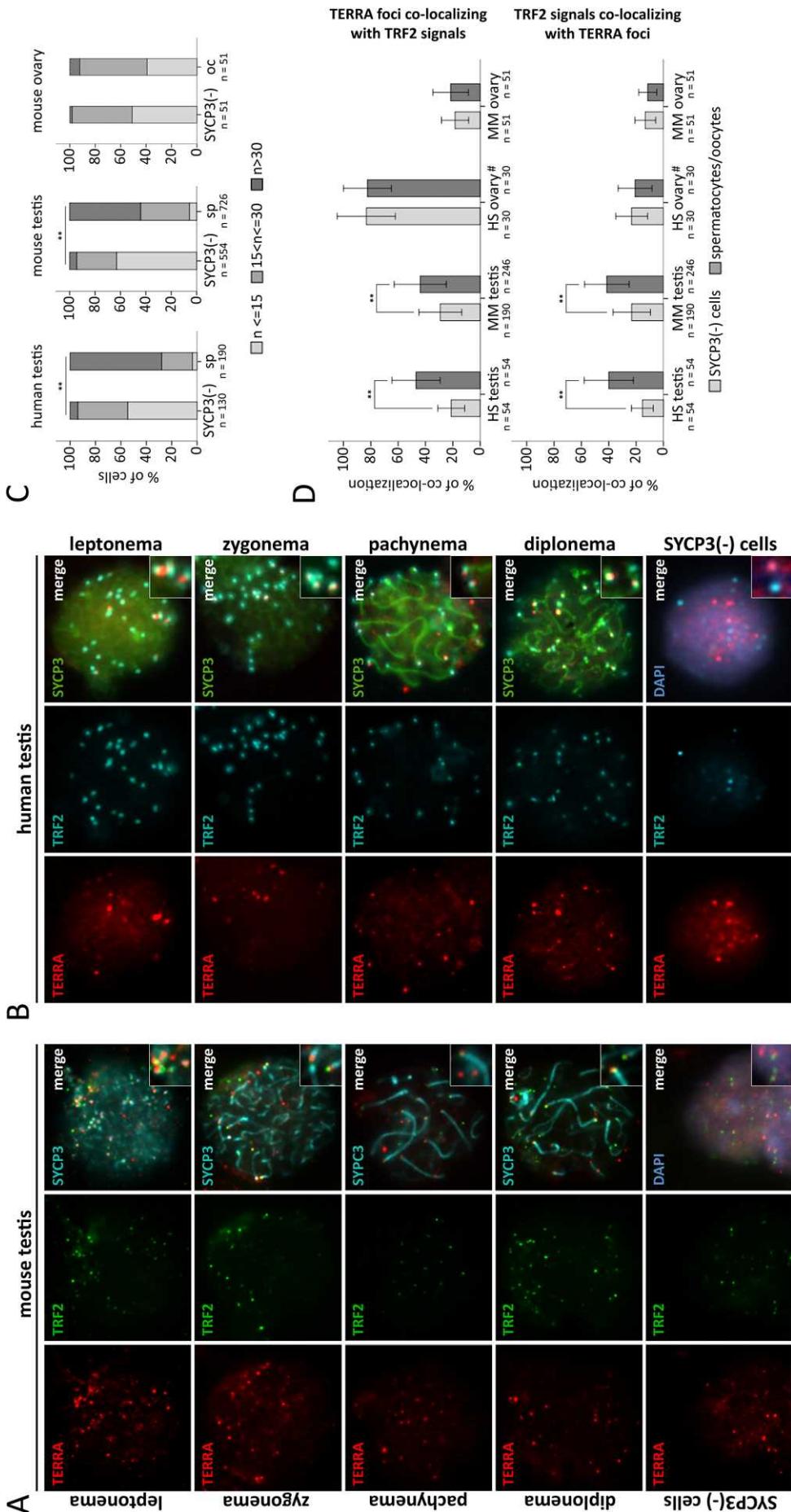


FIG. 1. TERRA levels and colocalization with TRF2. **A, B** Representative examples of IF RNA-FISH on (A) mouse and (B) human testis showing TERRA foci colocalizing with TRF2 signals. Different cell types are depicted: spermatocytes at different prophase I stages (leptonema, zygotene, pachynema, and diplotene), and SYCP3(-) cells, TERRA (red) and TRF2 (green/light blue) signals are revealed by the SYCP3 protein (light blue/green), and DNA is counterstained with DAPI (blue). All images were captured at $\times 100$. Insets indicate $\times 200$ enlarged regions showing TERRA-TRF2 colocalization. **C**) TERRA levels on mouse and human germ cells. Cells were classified into different groups depending on the number of TERRA foci: fewer than 16 foci, between 16 and 30 foci, more than 30 foci, sp, spermatocytes l; oc, oocytes l; SYCP3(-) cells. *Significant differences by univariate general linear model for mouse samples and one-way ANOVA for the human sample ($P < 0.001$); n = number of cells analyzed. **D**) Mean \pm SD of TERRA foci colocalizing with TRF2 signals and vice versa in both human and mouse samples, HS, *Homosapiens*; MM, *Mus musculus*; **Significant differences calculated by *t*-test ($P < 0.001$); n = number of cells analyzed; #, data from Reig-Viader et al. [40].

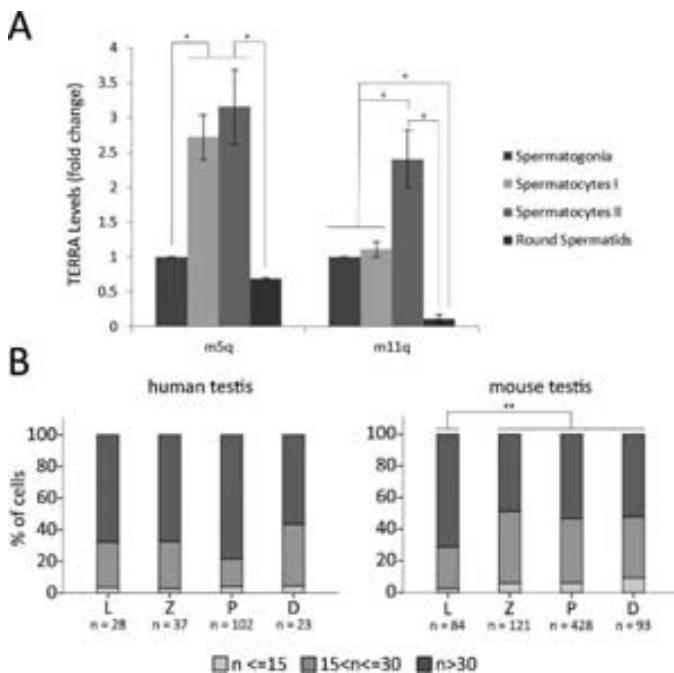


FIG. 2. TERRA transcription in germ cell populations selected by FACS. **A)** Quantitative real-time analysis of TERRA transcription in mouse spermatogonia, spermatocytes I and II, and round spermatids. Two primer pairs specific for the mouse 5q and 11q subtelomeres were used. The mean values for two independent experiments where each reaction was performed in triplicate are reported. Error bars represent standard deviations, and asterisks indicate statistically significant differences (one-way ANOVA, $P < 0.05$). **B)** TERRA levels on mouse and human prophase I spermatocytes. Cells were classified into different groups depending on the number of TERRA foci: fewer than 16 foci, between 16 and 30 foci, more than 30 foci. L, leptotene spermatocytes; Z, zygotene spermatocytes; P, pachytene spermatocytes; D, diplotene spermatocytes. **Significant differences calculated by univariate general linear model for mouse samples and one-way ANOVA for the human sample, both with Scheffé post hoc test ($P < 0.001$); n = number of analyzed cells.

on both TERRA levels and gender-specific features of telomeres. In order to test this hypothesis, we estimated the correlation coefficients between the number of TERRA molecules observed per cell and the percentages of TERRA-TRF2/TRF2-TERRA colocalizations (Supplemental Fig. S2). We observed that TERRA levels were positively correlated with the number of telomeres associated with TERRA but inversely correlated with the proportion of TERRA at telomeres (Supplemental Fig. S2). Most of these correlations were statistically significant for both meiocytes and SYCP3(–) cells only in male samples, where TERRA levels were markedly higher when compared to oocytes I. Given this scenario, we suggest that TERRA would localize at telomeres until a saturation threshold is reached, indicating that the localization of TERRA at telomeres could be a dynamic process regulated by the amount of TERRA molecules present in the nucleus.

Provided that TERRA levels were especially high in mouse spermatocytes I, we evaluated TERRA expression during mouse spermatogenesis. We first measured TERRA transcripts derived from two different subtelomeric regions (5q and 11q) by means of quantitative RT-PCR in four different mouse flow-sorted spermatogenic cell populations: spermatogonia, spermatocytes I, spermatocytes II, and round spermatids (Fig. 2A; Supplemental Figure S3). We observed that TERRA expression increased as spermatogonia proliferation and meiotic divisions proceed, but it underwent a sudden decrease at the

beginning of spermiogenesis (i.e., round spermatids), reaching levels similar to spermatogonia (5q) or even lower (11q) (Fig. 2A). However, TERRA expression seems to be differentially regulated, depending on the chromosome tested. The amount of TERRA derived from the 5q subtelomere was significantly higher both in spermatocytes I and II compared to spermatogonia and in round spermatids, while TERRA levels at the 11q subtelomere were significantly higher only in spermatocytes II.

To further dissect the dynamic changes of TERRA levels in the different prophase I stages (leptonema, zygonema, pachynema, and diplonema), we performed IF/RNA-FISH experiments both in human and mouse testes (Fig. 2B). We observed that the percentage of cells showing high levels of TERRA were maintained through prophase I (Fig. 1, A and B; Supplemental Figure S1). There was a tendency, however, for TERRA to be concentrated at the beginning of the process (i.e., leptonema), especially in mouse primary spermatocytes (one-way ANOVA, $P < 0.001$; Fig. 2B).

Telomerase Colocalizes with Telomeres in Mouse and Human Germ Cells

Although telomerase activity has been reported in mammalian testicular tissue [25–29, 31], direct evidence of the presence of endogenous telomerase in germ cells is restricted to human fetal ovarian tissue [40]. Therefore, whether this distribution can be extended to other germ cell types and species remains to be tested. To this aim, we studied the nuclear distribution of telomerase by means of immunodetection of the catalytic subunit of the enzyme (TERT) and TRF2 (Fig. 3, A and B). We found that telomerase is present in both mouse and human gonadal tissue as discrete foci colocalizing with TRF2 at the end of chromosomes (Fig. 3A; Supplemental Figure S1), mirroring previous observations in human fetal ovaries [40]. However, while in mouse spermatocytes I most telomeres (74%) showed telomerase signals, the percentage of TRF2-TERT colocalization in human spermatocytes I was reduced by half (36%; Fig. 3C). In the same way, mouse oocytes I presented 80% of telomeres with TERT signals, whereas only 22% of human fetal oocytes telomeres showed TERT signals (Fig. 1C) [40]. Thus, the proportion of telomeres showing telomerase foci was remarkably higher in mouse than in human germ cells. In fact, the same tendency was found in SYCP3(–) cells, where the proportion of telomeres localizing with telomerase in SYCP3(–) cells were remarkably higher in mouse (70% in male and 77% in female) than in human (18% in male and 22% in female; Fig. 3C). Similar values to human testis SYCP3(–) cells were found in HeLa cells (17%). In the light of these results, the localization of telomerase at telomeres could be more related to telomeric homeostasis of the species studied (human vs. mouse) than the specific characteristics associated with gender (male vs. female). In fact, the analysis of the flow-sorted mouse cell populations indicated that the proportion of telomeres showing telomerase signals did not change along the spermatogenic process (Fig. 3D), suggesting that telomerase colocalizes with the telomeric complex throughout spermatogenesis, at least in mouse.

Motivated by these findings, we analyzed TRF2-TERT colocalization by confocal microscopy in both human and mouse spermatocytes I, producing a 3D reconstruction of meiotic chromosomes (Fig. 4A; Supplemental Video S1). The 3D reconstructions showed that TRF2 and TERT were indeed colocalizing at the end of meiotic chromosomes. In mouse spermatocytes I, most telomeres (~70%) presented TRF2-TERT signals, while this proportion decreased up to 27% in human spermatocytes I. Fluorescence intensities were mea-

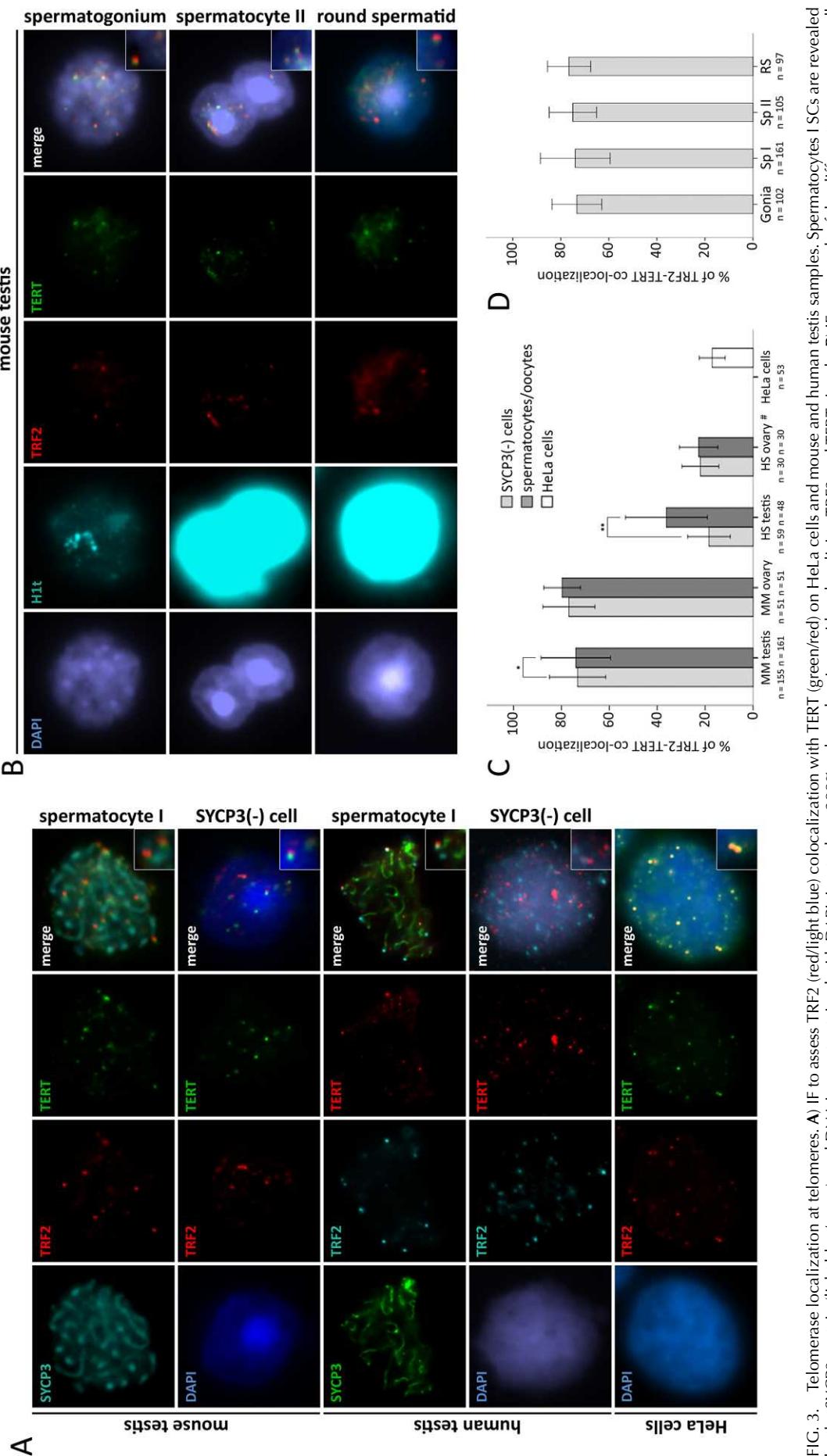


FIG. 3. Telomerase localization at telomeres. **A**) IF to assess TRF2 (red/light blue) colocalization with TERT (green/red) on HeLa cells and mouse and human testis samples. Spermatocytes I SCs are revealed by the SYCP3 protein (light blue/green), and DNA is counterstained with DAPI. Insets show 200% enlarged regions with colocalizing TRF2 and TERT signals. **B**) IF on spreads of the different mouse germ cell populations obtained by FACS. TRF2 (red) colocalizes with TERT (green) in the three SYCP3(-) cell populations. Late spermatocytes I, spermatocytes II, and round spermatids were identified by H1t expression (light blue), and DNA is counterstained with DAPI. All images were captured at $\times 100$. Insets show 200% enlarged regions with TRF2 and TERT signals colocalizing. **C**) Mean \pm SD of TRF2 signals colocalizing with TERT in mouse and human samples. Asterisks indicate significant differences by t-test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; MM, *Mus musculus*; HS, *Homo sapiens*; n = number of analyzed cells; #, data from Reig-Viader et al. [40]. **D**) Mean \pm SD of TRF2-TERT colocalization in the different mouse male germ cell populations obtained by FACS: Gonia, spermatogonia; Sp I, spermatocytes I; Sp II, spermatocytes II; RS, round spermatids. n = number of analyzed cells.

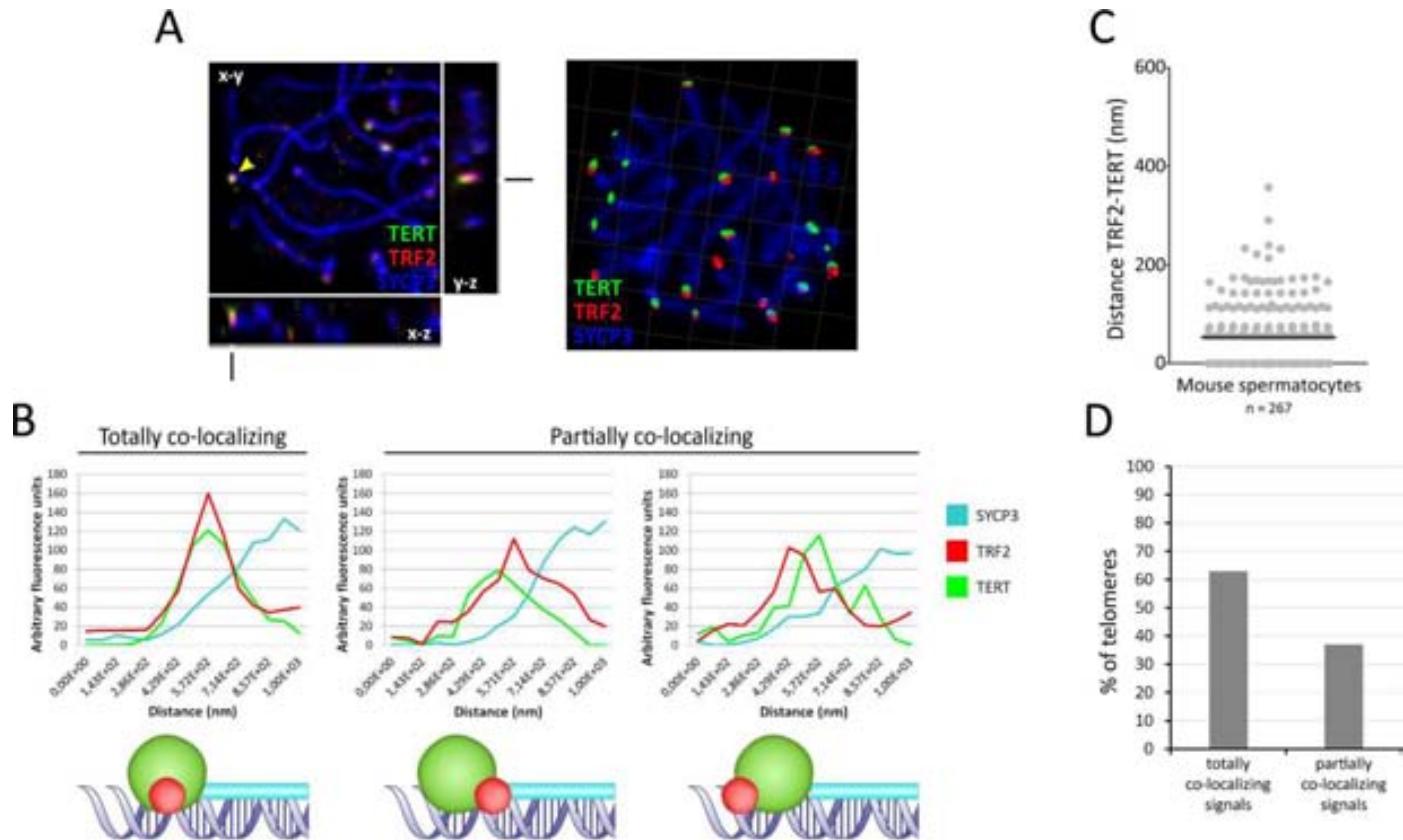


FIG. 4. Telomere structure of mouse spermatocytes I. **A)** Orthogonal section (x-y; indicated by lines) of a mouse spermatocyte I (left), where the yellow arrowhead points to a TRF2-TERT colocalizing signal detailed in the lateral panels (y-z and x-z), and 3D reconstruction of a mouse spermatocyte I (right), where TRF2 (red) and TERT (green) signals were masked to observe the relative position of these two molecules at the end of the meiotic complexes (blue). All images were captured at $\times 63$ with a digital zoom of 3.5. See Supplemental Video S1 for a complete 3D reconstruction of a z-stack of a mouse spermatocyte I obtained by confocal microscopy. **B)** Profiles obtained by the analysis of the fluorescence intensity (measured as arbitrary units) of those telomeres showing TRF2-TERT colocalizing signals in spermatocytes I. The pictures below illustrate the relative position of TRF2 and TERT molecules in relation to the SC (SYCP3) shown by the profile situated immediately above. **C)** Distances (nm) between TRF2 and TERT fluorescence signals obtained by the analysis of the profiles. $n =$ number of telomeres with TRF2-TERT colocalizing signals. The black line indicates the mean distance between TRF2 and TERT. **D)** Proportion of telomeres showing partially or totally colocalizing TRF2 and TERT fluorescence profiles.

sured as intensity profiles for each labeled protein (TRF2, TERT, and SYCP3; Fig. 4B; Supplemental Figure S4A). We estimated the relative distances between TRF2 and TERT fluorescence intensity peaks as well as the relative position of these molecules with respect to the synaptonemal complex (SC). In both mouse and human spermatocytes I, TRF2 and TERT molecules colocalized at the end limit of the SC or close to it (Fig. 4B; Supplemental Figure S4A). Mean distances between TRF2 and TERT intensity profiles were always less than 200 nm (Fig. 4C; Supplemental Figure S4B), which is the limit of resolution of the confocal microscope. Moreover, although the distance between TERT and TRF2 molecules was lower in mouse spermatocytes I than in human spermatocytes I (Fig. 4C; Supplemental Figure S4B), fluorescence intensity profiles of both molecules were always colocalizing, either partially or totally (Fig. 4D; Supplemental Figure S4C). These results suggest that TRF2 and TERT molecules are probably bound to telomeric DNA repeats at the end of meiotic chromosomes, being part of the telomeric complex.

Nontelomeric TERRA Foci Colocalize with Telomerase in Meiocytes

Given that telomerase colocalizes with TERRA in human fetal oocytes [40], we tested whether this is a common feature of mammalian germ cells and, if so, to what extent. We

observed that the proportion of TERRA foci colocalizing with TERT was considerably low in both mouse and human testicular tissue (Fig. 5), similar to what has been found previously in human fetal oocytes [40]. In fact, the proportion of TERRA foci colocalizing with TERT signals in mouse spermatocytes I was similar (18%) to that observed in human spermatocytes I (14%). These proportions were maintained in SYCP3(-) cells in both mouse (19%) and human (18%) testes (Fig. 5). Moreover, we noticed that, when analyzed separately, the percentages of TERRA and TRF2 signals colocalizing with telomerase in spermatocytes I were complementary one to each other (74% in mouse and 36% in human). In light of these observations, we analyzed whether TERRA foci were colocalizing with telomerase signals at the end of the SC or were otherwise free in the nucleus. In human spermatocytes I, half of the TERRA-TERT colocalizing signals (47.4%) were located at telomeres, whereas in mouse spermatocytes I, most of TERRA-TERT signals (70.7%) were found away from the telomere structure (i.e., free in the nucleus; Fig. 5C). Therefore, only a small proportion of telomerase molecules would colocalize with the pool of free TERRA molecules.

Telomere Length Is Maintained During Gametogenesis

We subsequently analyzed whether TERRA expression is affecting telomere length in mammalian germ cells by Q-FISH

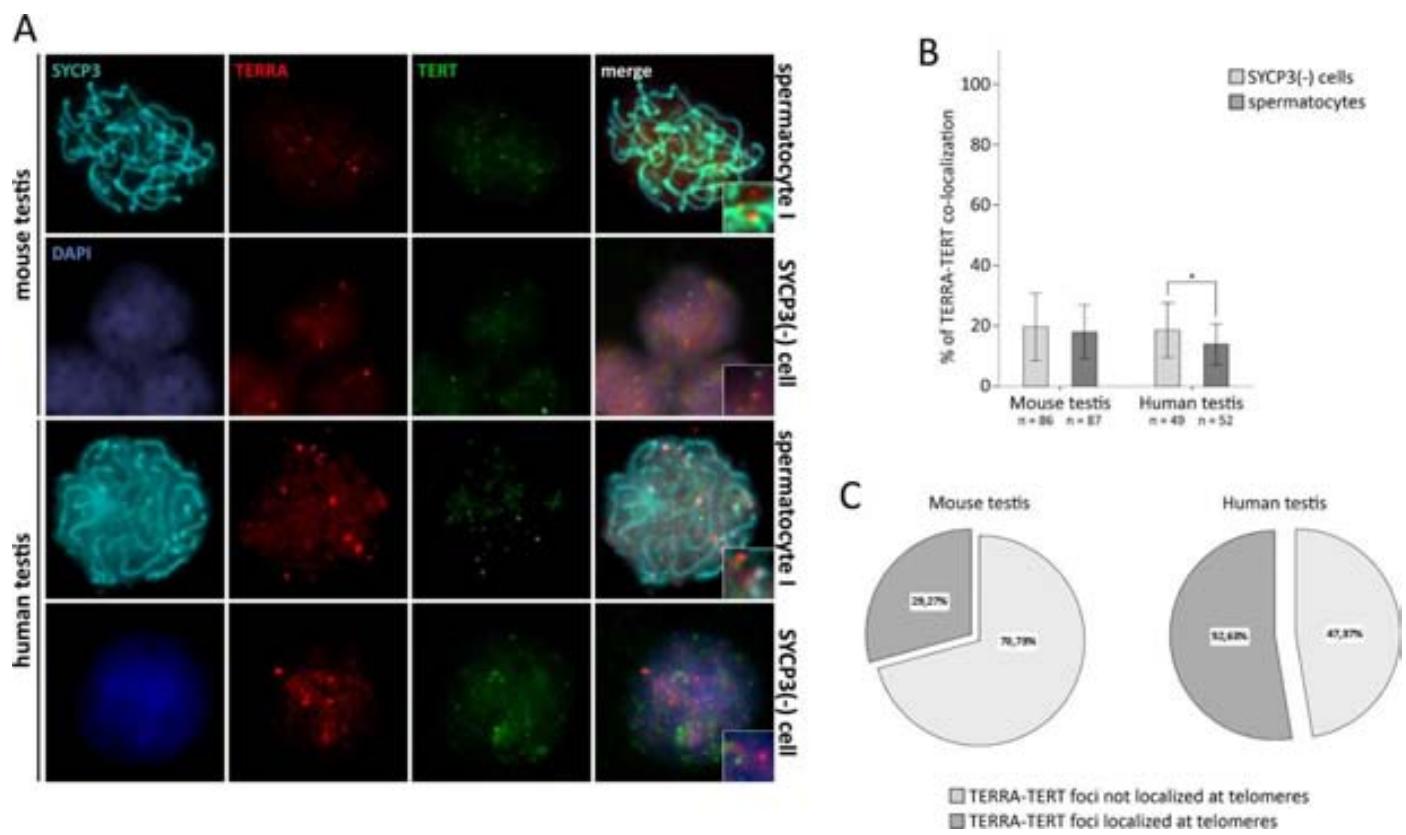


FIG. 5. Telomerase colocalization with TERRA in the nucleus. **A)** IF/RNA-FISH images showing TERRA (red) colocalization with TERT (green) in mouse and human spermatocytes I and SYCP3(–) cells. All images were captured at $\times 100$. Insets show 200% enlarged regions with TERRA and TERT colocalizing signals. **B)** Mean \pm SD of the proportion of TERRA foci colocalizing with TERT signals. Asterisks indicate significant differences by *t*-test ($P < 0.05$); n = number of analyzed cells. **C)** Proportion of TERRA-TERT colocalizing signals found at ends limit of the SC of human and mouse spermatocytes I.

(Fig. 6, A, and B). We found that telomeres of spermatocytes I were longer in mouse when compared to human spermatocytes I (1.34-fold TFUs; Fig. 6C, left panel) which, in turn, showed longer telomeres than mouse oocytes I (4.21-fold TFUs; Fig. 6C, left panel). When analyzed globally, the three groups of germ cells had, on average, significantly longer telomeres than HeLa cells (one-way ANOVA, $P < 0.001$), suggesting that germ cell telomeres elongate before meiosis, presumably during the proliferation stage of either primordial germ cells or spermatogonia. In order to test this hypothesis, we analyzed the distribution of the telomere lengths displayed by the different analyzed cells (Fig. 6D, left panel). We found that both mouse and human spermatocytes I showed wider length ranges than mouse fetal oocytes and HeLa cells, suggesting that at least the bulk of telomere elongation in oocytes I does not take place during meiosis.

Given that mouse spermatocytes I showed the longest telomeres, we analyzed telomere length throughout the gametogenic process in three additional germ cell populations: spermatogonia, spermatocytes II, and round spermatids (Fig. 6C, right panel). Indeed, the longest telomeres were found in spermatocytes I, compared to the rest of the analyzed germ cell types. This is probably due to the fact that a high proportion of the spermatocytes I were at the pachytene stage, where all of their telomeres are paired or synapsed; thus, each telomere signal corresponds to four telomeres. Therefore, the equivalent mean telomere length observed for each stage indicates that telomeres are not elongated during this process, at least until the beginning of spermiogenesis, since round spermatids, whose chromosomes are composed of a single chromatid, show

mean telomere length similar to the other cell populations. Comparing telomere length ranges in the different mouse male germ cell populations (Fig. 6D, right panel), we confirmed that spermatocytes I, represented mostly by pachytene spermatocytes, were those germ cells that exhibited the highest TFUs. However, although the only evidence of a possible elongation activity was found in round spermatids, the observed range of telomere lengths in this subpopulation was slightly narrower than the ones obtained for the other mouse germ cells subpopulations, suggesting that if elongation were taking place, it would not cause a dramatic net change in the lengths of the telomeres of round spermatids.

DISCUSSION

TERRA Dynamics During Mammalian Gametogenesis

The combination of IF and RNA-FISH techniques allowed us to study both nuclear levels and distribution of TERRA molecules in mouse and human germ cells. TERRA was found forming foci in germ cells of both species. The number of TERRA foci detected in mammalian germ cells was higher than what has been reported in somatic cells [3] but ranged within the values previously observed in mouse embryonic stem cells [4, 39, 58]. Moreover, both TERRA levels and the percentage of telomeres with TERRA signals were noticeably higher in male than in female germ cells of both mouse and human samples, indicating that TERRA dynamics might be associated with gender-specific characteristics regardless of the species.

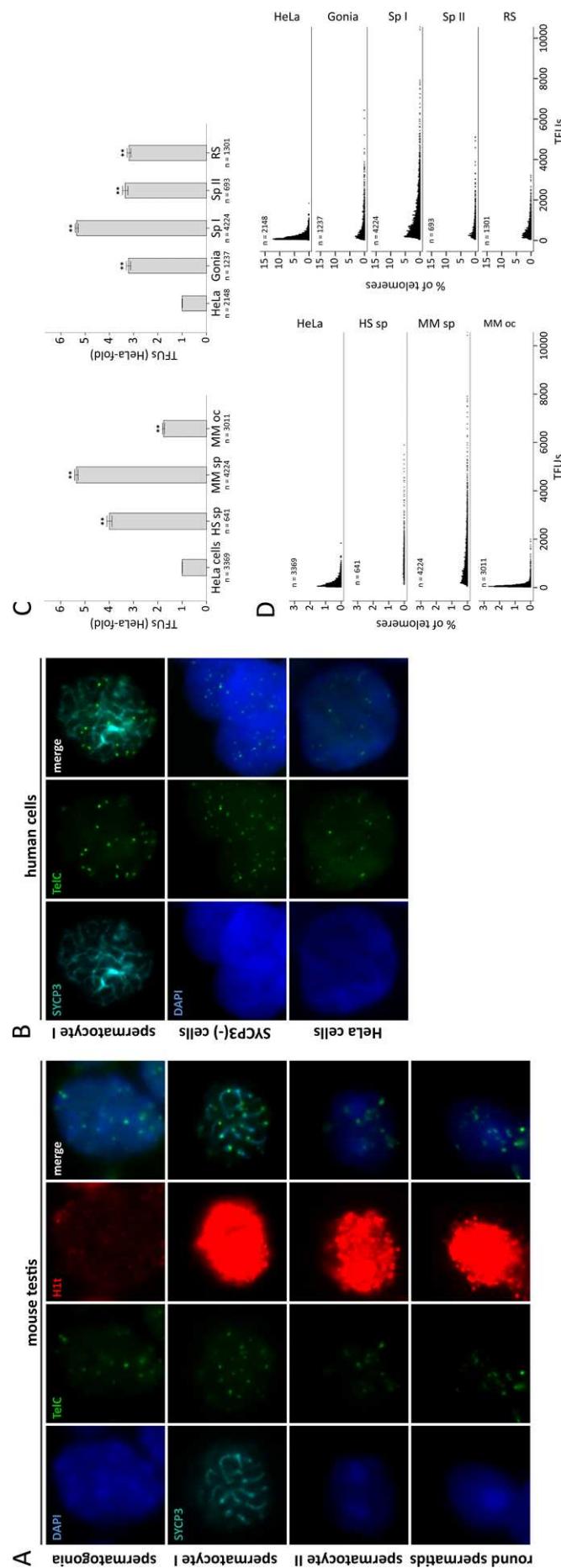


FIG. 6. Telomere length in male germ cells. **A, B**, IF/Q-FISH images of mouse (A) and human germ cells and HeLa cells (B). Telomeres are revealed by a TelC PNA probe (green), SYCP3 (light blue) reveals spermatocytes I, and H1t marks late spermatids (red). DNA is counterstained with DAPI. All images were captured at $\times 100$. **C**, Mean \pm SEM of telomere lengths observed in mouse and human samples (left) and in mouse germ cells populations (right) calculated as the increment of TFUs in relation to HeLa cells. **Significant differences compared to HeLa cells. **D**, Frequencies of telomeres for each measured TFU in mouse and univariate general linear model for mouse germ cell populations and one-way ANOVA for differences between species, both with Scheffé post hoc test ($P < 0.001$). HS, *Homo sapiens*; MM, *Mus musculus*; oc, oocytes I; Gonia, spermatogonia; Sp I, spermatocytes I; Sp II, spermatocytes II; RS, round spermatocytes II; Sp I, spermatogonia; Sp II, spermatocytes II; RS, round spermatids; n = number of analyzed telomeres.

Importantly, TERRA foci were localized mainly at the telomeres of all the analyzed germ cells, confirming previous observations in human fetal oocytes [40] and suggesting that TERRA would be an important player for the proper progression of the processes taking place throughout prophase I. In fact, we did not find differences in TERRA levels between prophase I stages in human spermatocytes I, and in mouse samples, leptotene spermatocytes showed the highest TERRA levels. This would support the idea that TERRA synthesis might begin during the premeiotic S phase or otherwise during the first stages of meiosis, when chromosome movements and chromatin rearrangements take place [40].

Strikingly, we observed a negative correlation between TERRA levels and the percentage of TERRA foci colocalizing with telomeres (TERRA-TRF2 colocalization). This tendency was inverted when considering the percentage of telomeres colocalizing with TERRA (TRF2-TERRA colocalization), suggesting that TERRA molecules would be located at telomeres until reaching a threshold beyond which TERRA would be released from the chromosome. Actually, these correlations were less pronounced in oocytes I, where TERRA levels were also lower than in spermatocytes I. In the case of females, the minimum threshold for TERRA levels would not be reached; thus, the available TERRA molecules would tend to remain associated with the telomeric complex. In fact, in human fetal oocytes, where TERRA levels were markedly low, most TERRA foci were located at telomeres, in sharp contrast to what was observed in mouse fetal oocytes. These observations suggest that TERRA-telomere association could be subjected to a threshold that is TERRA level dependent.

Moreover, the analysis of TERRA transcription in mouse flow-sorted germ cells populations indicated that TERRA is not uniformly synthetized across spermatogenesis, supporting the view that both TERRA transcription and its telomeric localization are independently regulated [59]. Specifically, TERRA transcription increased across spermatogenesis but decreased when spermiogenesis begins (Fig. 7). It is well known that two main transcription waves occur in spermatogenesis that precisely orchestrate differentiation stages of spermatogenic cells [60, 61]. DNA methylation increases along spermatogenesis [62] and correlates with chromatin compaction [63], which begins with spermiogenesis. Moreover, Porro et al. [37] described that TERRA is cell cycle regulated. Therefore, it seems plausible that TERRA would be synthetized during the first stages of spermatogenesis in order to localize at telomeres, contributing to telomeric stability during the meiotic process.

Furthermore, we detected different amounts of TERRA transcripts in primary spermatocytes, depending on the subtelomere analyzed. Studies on TERRA synthesis have reported that changes in telomeric heterochromatin due to cell homeostasis alterations, such as changes in shelterin components and/or DNA or histone methylation, could differentially affect telomeric transcription in specific chromosomes [44, 59, 64, 65]. Therefore, the differences observed in 5q and 11q telomeric transcription suggest that the telomere structure may be differentially regulated during the chromosomal events that take place during the first meiotic division. In fact, it has been described in human cancer cells that telomere transcription positively correlates with telomere movements, increasing its mobility [66]. Thus, in the light of our results, it is tempting to propose that TERRA, in addition to its structural role, could participate in the regulation of the telomere dynamics during the progression of chromosome events that take place during meiosis.

Telomerase: A Component of Mammalian Meiotic Chromosomes?

The role of telomerase during gametogenesis has been an open question given that studies describing its nuclear distribution in the germ line are rather scarce [26, 40]. Although telomerase is the main strategy developed by eukaryotic cells to counteract telomeric DNA shortening, a structural function has been recently attributed to telomerase [67]. It is in this new scenario where our 3D reconstructions of spermatocyte chromosomes suggest that telomerase physically localizes at telomeric complexes during gametogenesis, especially in mouse germ cells compared to human ones. It seems likely, then, that telomerase localization at telomeres could be differentially regulated, depending on species-specific telomeric characteristics. In fact, this telomeric localization is maintained throughout mouse spermatogenesis, indicating that telomerase would remain associated with telomeres during this process.

But are these telomeric telomerase molecules actively elongating telomeres during gametogenesis? We observed a high proportion of long telomeres in spermatocytes I when compared to oocytes I (Fig. 6, C and D, left panels). In fact, we did not find significant differences in telomeric length throughout mouse spermatogenesis (Fig. 6C, right panel), mirroring previous studies in human gametogenic cell populations [68]. These findings suggest that if telomere elongation were taking place during spermatogenesis, it would probably occur at the beginning of cell differentiation, from secondary spermatocytes to spermatids. This interpretation is sustained by the observation that round spermatids (haploid cells with a single chromatid per chromosome) showed mean telomere lengths similar to spermatogonia or spermatocytes II (whose chromosomes are composed of two chromatids). However, it must be noticed that the distribution of telomere lengths decreased in round spermatids. Therefore, and taking into account that telomeres of somatic cells are synthesized during the S phase of the cell cycle [69], our results suggest that telomere elongation would presumably take place not during spermatogenesis (Fig. 7) but during the mitotic proliferation of spermatogonia or, otherwise, along the premeiotic S phase.

Moreover, mouse oocytes I were the cells with the shortest telomeres (similar to HeLa cells). These results suggest that oocytes I would begin oogenesis with already short telomeres that would be elongated in later stages of gametogenesis or even after fertilization during embryo development, when high levels of telomerase activity have been reported in the literature [30, 32, 34, 35]. But the situation differed strikingly with spermatogenesis, where several studies have detected high telomerase activity in spermatogonia and/or in spermatids [26, 28, 29]. Our results indicate that telomerase is located at the telomeres of germ cells throughout spermatogenesis. Thus, the fact that we do not observe significant telomere elongation during this process reinforces the hypothesis that attributes a structural function to telomerase [70–74]. Furthermore, the analysis of telomerase RNA template (TR) subunit expression in different human spermatogenic cell populations carried out by Yashima et al. [75] revealed that primary spermatocytes showed the highest expression of TR, while spermatogonia and secondary spermatocytes showed intermediate levels of TR expression, and it was not detected in spermatids and spermatozoa. This could explain why, although we found TERT located at telomeres throughout spermatogenesis, previous studies on telomerase activity have reported high enzymatic activity at the beginning of spermatogenesis and low

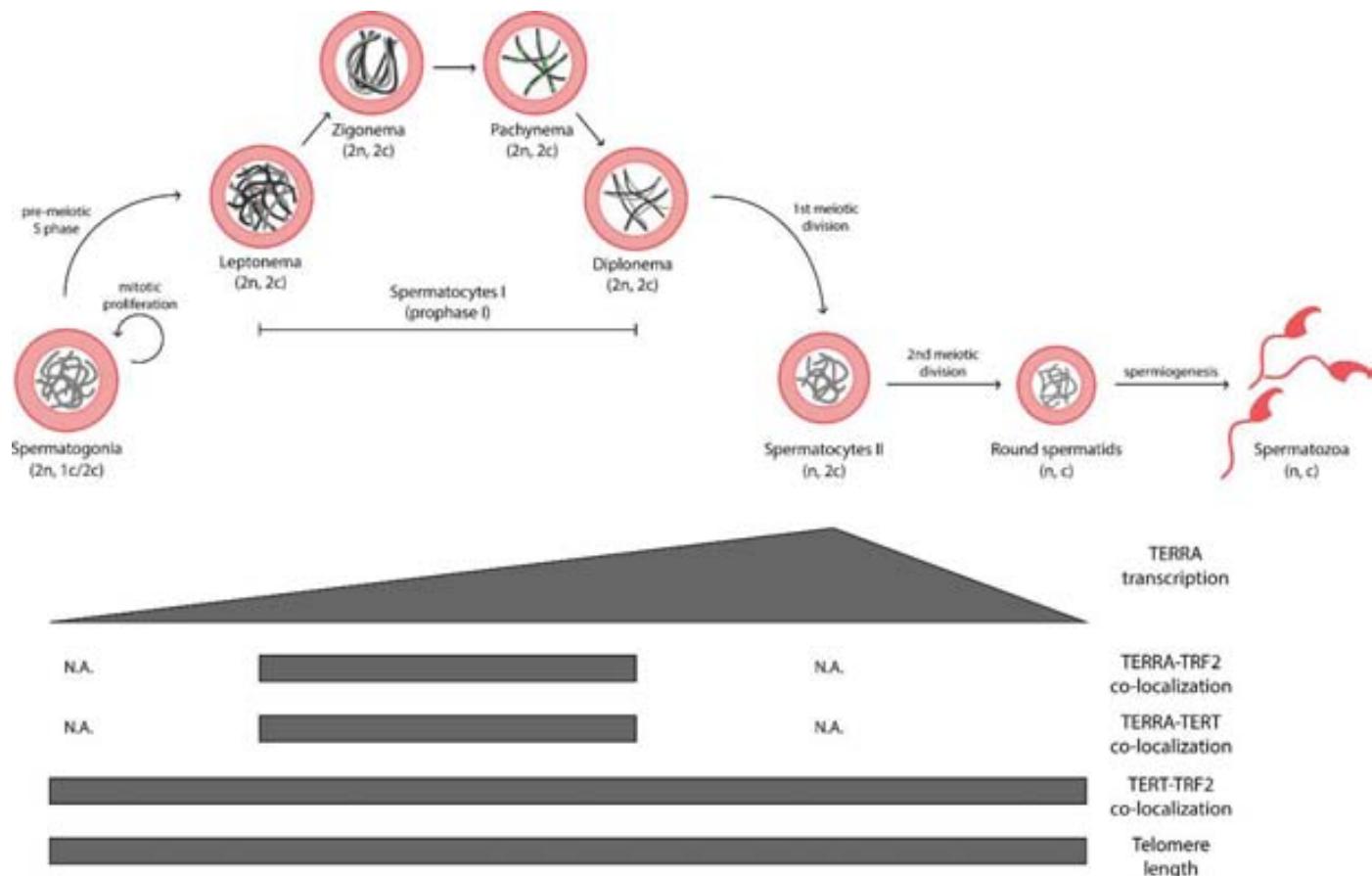


FIG. 7. Representation of telomere homeostasis throughout mouse spermatogenesis. TERRA transcripts increase until the beginning of spermiogenesis, and its association with telomeres is maintained along the meiotic prophase I. The protein component of telomerase is attached to the telomeric structure throughout spermatogenesis without adding TTAGGG repeats. TERRA and TERT molecules colocalize in the nucleus of primary spermatocytes. n, chromosome number per cell; c, number of chromatids per chromosome; N.A., not analyzed.

activity in the differentiation stages. In other words, if telomere elongation occurred during spermatogenesis, it would depend on TR expression but not on TERT association with telomeres. Therefore, rather than elongating telomeres, functional TERT might be associated with telomeres of germ cells forming part of the shelterin complex, contributing to the preservation of telomere stability throughout the multiple telomeric chromatin changes that take place during gametogenesis.

Telomere Length Homeostasis During Mammalian Gametogenesis: Is There a Cross Talk Between TERRA, Telomerase, and Telomeres?

Little is known about how telomeres structure and homeostasis are maintained during gametogenesis, including the cooperative role, if any, of TERRA, telomerase, and telomeres during the process. Here we have shown that a high proportion of telomerase foci colocalizing with TERRA were not located at the end of the meiotic chromosomes, indicating that, in germ cells, a pool of TERRA molecules is free within the nucleus and colocalizes with telomerase. Moreover, the proportions of TERT-TERRA colocalization observed in mouse and human spermatocytes I were approximately complementary to those observed for TERT-TRF2 colocalization. In fact, TERRA and telomerase association has been previously described in somatic cells [47], and it has been proposed that a free TERRA subpopulation might be associated with telomerase molecules [37]. Moreover, a close

relationship between TERRA levels, TERRA-mediated telomerase inhibition, and cell cycle progression has been described in somatic cells [37, 76]. Thus, in the light of our results, it seems plausible that TERRA molecules that are not associated with telomeres might be, once transcribed, released from telomere, recruiting free telomerase molecules in the nucleus and regulating the activity of telomerase.

The relationship between TERRA and telomere length has been more controversial. Initial studies suggested a direct relationship between TERRA transcription and telomere length [4, 39, 47, 77]; however, recent studies have challenged this hypothesis [48–51]. Current reports in yeast suggest that, on the one hand, the relationship between TERRA and telomere length would come from the regulation of telomere replication by the formation of a TERRA-telomeric DNA hybrid structure [78, 79] and that, on the other, TERRA would be transcribed in a telomeric length-dependent manner in order to recruit telomerase to the shortest telomeres [80]. We found that TERRA levels were higher in spermatocytes I than in oocytes I regardless of the species analyzed, consistent with the differences in telomere lengths between these cells, indirectly suggesting a link between TERRA levels and telomere lengths. Nevertheless, when comparing TERRA transcription and telomere lengths throughout spermatogenesis, this relationship seems unlikely since TERRA transcripts showed a dramatic increment with spermatogenesis progression, whereas telomeres lengths did not (Fig. 7). Moreover, the localization of telomerase at telomeres followed different patterns in mouse

and human germ cells and was constant across spermatogenesis despite the observed variations in TERRA transcription (Fig. 7). In somatic cells, TERRA localization at telomeres does not seem to be subject to telomere length [49]; nevertheless, in yeast, TERRA has been found to be an indicator of short telomeres, being transcribed when a telomere reaches a length threshold [80]. Therefore, the regulation of TERRA and TERT localization at telomeres in mouse and human germ cells might not depend on TERRA transcription or exclusively on telomere length. Instead, it could be associated with intrinsic telomere requirements and/or gender-specific (in the case of TERRA) and species-specific (in the case of TERT) characteristics of the telomeric structure homeostasis regulation.

In conclusion, we propose that both TERRA and TERT form part of the telomeric structure of mammalian germ cells as a way to provide the stability needed to deal with all the chromatin changes and chromosome movements that take place throughout the gametogenic process. Importantly, as happens with all telomeric components, both TERT and TERRA would be precisely regulated, depending on the cellular context, as well as species- and/or gender-specific features.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are especially thankful to the following colleagues for their insightful comments and technical advice: I. Sales-Pardo (UAT, Vall d'Hebron) for help with the flow sorter, S. Pacheco and I. Roig (IBB-UAB) for help with mice fetuses manipulation, M. Vendrell and M. Roldán (Servei Microscòpia, UAB) for help with the confocal microscopy, M. Martín for help with statistical analysis, and the professional English translator M. Muñoz-Moix for proofreading the manuscript.

REFERENCES

- Palm, W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet* 2008; 42:301–334.
- O'Sullivan JO, Karlseeder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11:171–181.
- Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriauli L, Giulotto E, Lingner J. Telomeric repeat-containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* 2007; 318:798–801.
- Schoeftner S, Blasco MA. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* 2008; 10:228–236.
- Nergadze SG, Farnung BO, Wischnewski H, Khoriauli L, Vitelli V, Chawla R, Giulotto E, Azzalin CM. CpG-island promoters drive transcription of human telomeres. *RNA* 2009; 15:2186–2194.
- Armanios M. Telomeres and age-related disease: how telomere biology informs clinical paradigms. *J Clin Invest* 2013; 123:996–1002.
- Günes C, Rudolph, KL. The role of telomeres in stem cells and cancer. *Cell* 2013; 152:390–393.
- Scherthan H, Jerratsch M, Li B, Smith S, Hultén M, Lock T, de Lange T. Mammalian meiotic telomeres: protein composition and redistribution in relation to nuclear pores. *Mol Biol Cell* 2000; 11:4189–4203.
- Franco S, Alsheimer M, Herrera E, Benavente R, Blasco MA. Mammalian meiotic telomeres: composition and ultrastructure in telomerase-deficient mice. *Eur J Cell Biol* 2002; 81:335–340.
- Liebe B, Alsheimer M, Höög 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.
- Viera A, Gómez R, Parra MT, Schmiesing JA, Yokomori K, Rufas JS, Suja JA. Condensin I reveals new insights on mouse meiotic chromosome structure and dynamics. *PLoS One* 2007; 2:e783.
- Adelfalk C, Janschek J, Revenkova E, Blei C, Liebe B, Göb E, Alsheimer M, Benavente R, De Boer E, Novak I, Höög C, Scherthan H, et al. Cohesin SMC1beta protects telomere in meiocytes. *J Cell Biol* 2009; 187: 185–199.
- Frohnert C, Schweizer S, Hoyer-Fender S. SPAG4L/SPAG4L-2 are testis-specific SUN domain proteins restricted to the apical nuclear envelope of round spermatids facing the acrosome. *Mol Hum Reprod* 2011; 17: 207–218.
- Morelli MA, Cohen PE. Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction* 2005; 130: 761–781.
- Ten Hagen KG, Gilbert DM, Willard HF, Cohen, SN. Replication timing of DNA sequences associated with human centromeres and telomeres. *Mol Cell Biol* 1990; 10:6348–55.
- Scherthan H. Telomere attachment and clustering during meiosis. *Cell Mol Life Sci* 2007; 4:117–124.
- Liu L, Blasco MA, Trimarchi J, Keefe, D. An essential role for functional telomeres in mouse germ cells during fertilization and early development. *Dev Biol* 2002; 249:74–84.
- Liu L, Blasco MA, Keefe, DL. Requirement of functional telomeres for metaphase chromosome alignments and integrity of meiotic spindles. *EMBO Rep* 2002; 3:230–234.
- Liu L, Franco S, Spyropoulos B, Moens PB, Blasco MA, Keefe DL. Irregular telomeres impair meiotic synapsis and recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:6496–6501.
- Hemann MT, Rudolph KL, Strong MA, DePinho RA, Chin L, Greider CW. Telomere dysfunction triggers developmentally regulated germ cell apoptosis. *Mol Biol Cell* 2001; 12:2023–2030.
- Keefe DL, Marquardt K, Liu L. The telomere theory of reproductive senescence in women. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006; 18:280–285.
- Hanna CW, Bretherick KL, Gair JL, Flucker MR, Stephenson MD, Robinson, WP. Telomere length and reproductive aging. *Hum Reprod* 2009; 24:1206–1211.
- Treff NR, Su J, Taylor D, Scott RT. Telomere DNA deficiency is associated with development of human embryonic aneuploidy. *PLoS Genet* 2011; 7:e1002161.
- Yamada-Fukunaga T, Yamada M, Hamatani T, Chikazawa N, Ogawa S, Akutsu H, Miura T, Miyado K, Tarín JJ, Kuji N, Umezawa A, Yoshimura Y. Age-associated telomere shortening in mouse oocytes. *Reprod Biol Endocrinol* 2013; 11:108.
- Achi MV, Ravindranath N, Dym, M. Telomere length in male germ cells is inversely correlated with telomerase activity. *Biol Reprod* 2000; 63: 591–598.
- Tanemura K, Ogura A, Cheong C, Gotoh H, Matsumoto K, Sato E, Hayashi Y, Lee HW, Kondo T. Dynamic rearrangement of telomeres during spermatogenesis in mice. *Dev Biol* 2005; 281:196–207.
- Ravindranath N, Dalal R, Solomon B, Djakiew D, Dym, M. Loss of telomerase activity during male germ cell differentiation. *Endocrinology* 1997; 138:4026–4029.
- Yamamoto Y, Sofikitis N, Ono K, Kaki T, Isovama T, Suzuki N, Miyagawa I. Postmeiotic modifications of spermatogenic cells are accompanied by inhibition of telomerase activity. *Urol Res* 1999; 27: 336–345.
- Riou L, Bastos H, Lassalle B, Coureuil M, Testart J, Boussin FD, Allemand I, Fouchet P. The telomerase activity of adult mouse testis resides in the spermatogonial alfa6-integrin-positive side population enriched in germinal stem cells. *Endocrinology* 2005; 146:3926–3932.
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 1996; 18:173–179.
- Eisenhauer KM, Gerstein RM, Chiu CP, Conti M, Hsueh AJ. Telomerase activity in female and male rat germ cells undergoing meiosis and in early embryos. *Biol Reprod* 1997; 56:1120–1125.
- Betts DH, King WA. Telomerase activity and telomere detection during early bovine development. *Dev Genet* 1999; 25:397–403.
- Xu J, Yang X. Telomerase activity in bovine embryos during early development. *Biol Reprod* 2000; 63:1124–1128.
- Wright DL, Jones EL, Mayer JF, Oehninger S, Gibbons WE, Lanzendorf SE. Characterization of telomerase activity in the human oocyte and preimplantation embryo. *Mol Hum Reprod* 2001; 7:947–955.
- Liu L, Bailey SM, Okuka M, Muñoz P, Li C, Zhou L, Wu C, Czerwic E, Sandler L, Seyfang A, Blasco MA, Keefe DL. Telomere lengthening early in development. *Nat Cell Biol* 2007; 9:1436–1441.
- Feuerhahn S, Iglesias N, Panza A, Porro A, Lingner J. TERRA biogenesis, turnover and implications for function. *FEBS Lett* 2010; 584:3812–3818.
- Porro A, Feuerhahn S, Reichenbach P, Lingner, J. Molecular dissection of telomeric repeat-containing RNA biogenesis unveils the presence of distinct and multiple regulatory pathways. *Mol Cell Biol* 2010; 30: 4808–4817.
- Caslini C, Connolly JA, Serna A, Broccoli D, Hess JL. MLL associates with telomere and regulates telomeric repeat-containing RNA transcription. *Mol Cell Biol* 2009; 29:4519–4526.
- Arnoult N, Van Beneden A, Decottignies A. Telomere length regulates TERRA levels through increased trimethylation of telomeric H3K9 and HP1α. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19:948–956.

40. Reig-Viader R, Brieño-Enríquez MA, Khouriauli L, Toran N, Cabero LL, Giulotto E, García-Caldés M, Ruiz-Herrera A. Telomeric repeat-containing RNA and telomerase in human fetal oocytes. *Hum Reprod* 2013; 28:414–422.
41. Yehezkel S, Segev Y, Viegas-Péquignot E, Skorecki K, Selig S. Hypomethylation of subtelomeric regions in ICF syndrome is associated with abnormally short telomeres and enhanced transcription from telomeric regions. *Hum Mol Genet* 2008; 17:2776–2789.
42. Deng Z, Norseen J, Wiedmer A, Riethman H, Lieberman PM. TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres. *Mol Cell* 2009; 35:403–413.
43. López de Silanes I, Stagno d'Alcontres M, Blasco MA. TERRA transcripts are bound by a complex array of RNA-binding proteins. *Nat Commun* 2010; 1:33.
44. Deng Z, Wang Z, Stong N, Plasschaert R, Moczan A, Chen HS, Hu S, Wikramasinghe P, Davuluri RV, Bartolomei MS, Riethman H, Lieberman PM. A role for CTCF and cohesin in subtelomere chromatin organization, TERRA transcription, and telomere end protection. *EMBO J* 2012; 31: 4165–4178.
45. Pfeiffer V, Lingner J. TERRA promotes telomere shortening through exonuclease 1-mediated resection of chromosome ends. *PLoS Genet* 2012; 8:e1002747.
46. Yehezkel S, Rebibo-Sabbah A, Segev Y, Tzukerman M, Shaked R, Huber I, Gepstein L, Skorecki K, Selig S. Reprogramming of telomeric regions during the generation of human induced pluripotent stem cells and subsequent differentiation into fibroblast-like derivatives. *Epigenetics* 2011; 6:63–75.
47. Redon S, Reichenbach P, Lingner J. The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic Acids Res* 2010; 38:5797–5806.
48. Iglesias N, Redon S, Pfeiffer V, Dees M, Lingner J, Luke B. Subtelomeric repetitive elements determine TERRA regulation by Rap1/Rif and Rap1/Sir complexes in yeast. *EMBO Rep* 2011; 12:587–593.
49. Farnung BO, Brun CM, Arora R, Lorenzi LE, Azzalin CM. Telomerase efficiently elongates highly transcribing telomeres in human cancer cells. *PLoS One* 2012; 7:e35714.
50. Smirnova A, Gamba R, Khoriauli L, Vitelli V, Nergadze SG, Giulotto E. TERRA expression levels do not correlate with telomere length and radiation in human cancer cell lines. *Front Oncol* 2013; 3:115.
51. Vitelli V, Falvo P, Khoriauli L, Smirnova A, Gamba R, Santagostino M, Nergadze SG, Giulotto E. More on the lack of correlation between TERRA expression and telomere length. *Front Oncol* 2013; 3:245.
52. Poon SS, Lansdorp PM. Measurements of telomere length on individual chromosomes by image cytometry. In: Darzynkiewicz Z, Crissman HA, Robinson JP (eds.), *Methods in Cell Biology: Flow Cytometry*. San Diego, CA: Academic Press; 2001:69–96.
53. Canela A, Vera E, Klatt P, Blasco, MA. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:5300–5305.
54. Bastos H, Lassalle B, Chicheportiche A, Riou L, Testart J, Allemand I, Fouquet P. Flow cytometric characterization of viable meiotic and postmeiotic cells by Hoechst 33342 in mouse spermatogenesis. *Cytometry A* 2005; 65:40–49.
55. Sales-Pardo I, Avedaño A, Martínez-Muñoz V, García-Escarp M, Celis R, Whittle P, Barquinero J, Domingo JC, Marin P, Petriz J. Flow cytometry of the side population: tips & tricks. *Cell Oncol* 2006; 28:37–53.
56. Grimes SR. Testis-specific transcriptional control. *Gene* 2004; 343:11–22.
57. Deng Z, Wang Z, Xiang C, Molczan A, Baubet V, Conejo-Garcia J, Xu X, Lieberman P, Dahmane N. Formation of telomeric repeat-containing RNA (TERRA) foci in highly proliferating mouse cerebellar neuronal progenitors and medulloblastoma. *J Cell Sci* 2012; 125:4383–4394.
58. Zhang LF, Ogawa Y, Ahn JY, Namekawa SH, Silva SS, Lee JT. Telomeric RNAs mark sex chromosomes in stem cells. *Genetics* 2009; 182:685–698.
59. Scheibe M, Arnoult N, Kappei D, Buchholz F, Decottignies A, Butter F, Mann M. Quantitative interaction screen of telomeric repeat-containing RNA reveals novel TERRA regulators. *Genome Res* 2013; 23:2149–2157.
60. Kimmins S, Kotaja N, Davidson I, Sassone-Corsi, P. Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ-cell differentiation. *Reproduction* 2004; 128:5–12.
61. Bettegowda A, Wilkinson MF. Transcription and post-transcriptional regulation of spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010; 365:1637–1651.
62. Messerschmidt DM. Should I stay or should I go: protection and maintenance of DNA methylation at imprinted genes. *Epigenetics* 2012; 7: 969–975.
63. Marchal R, Chicheportiche A, Dutrillaux B, Bernardino-Sgherri J. DNA methylation in mouse gametogenesis. *Cytogenet Genome Res* 2004; 105: 316–324.
64. Sampl S, Pramhas S, Stern C, Preusser M, Marosi C, Holzmann, K. Expression of telomeres in astrocytoma WHO grade 2 to 4: TERRA level correlates with telomere length, telomerase activity, and advanced clinical grade. *Transl Oncol* 2012; 5:56–65.
65. Thijssen PE, Tobi EW, Balog J, Schouten SG, Kremer D, Bouazaoui FE, Henneman P, Putter H, Slagboom PE, Heijmans BT, Van der Maarel SM. Chromatin remodeling of human subtelomeres and TERRA promoters upon cellular senescence: commonalities and differences between chromosomes. *Epigenetics* 2013; 8:512–521.
66. Arora R, Brun CM, Azzalin CM. Transcription regulates telomere dynamics in human cancer cells. *RNA* 2012; 18:684–693.
67. Chiodi I, Mondello C. Telomere-independent functions of telomerase in nuclei, cytoplasm, and mitochondria. *Front Oncol* 2012; 2:133.
68. Jørgensen PB, Fedder J, Koelvraa S, Graakjaer J. Age-dependence of relative telomere length profiles during spermatogenesis in man. *Maturitas* 2013; 75:380–385.
69. Tomlinson RL, Ziegler TD, Supakorndej T, Terns RM, Terns MP. Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Mol Biol Cell* 2006; 17:955–965.
70. Zhu J, Wang H, Bishop JM, Blackburn EH. Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:3723–3728.
71. Sharma GG, Gupta A, Wang H, Scherthan H, Dhar S, Gandhi V, Iliakis G, Shay JW, Young CSH, Pandita TK. hTERT associates with human telomeres and enhances genomic stability and DNA repair. *Oncogene* 2003; 22:131–146.
72. Kim M, Xu L, Blackburn EH. Catalytically active human telomerase mutants with allele-specific biological properties. *Exp Cell Res* 2003; 288: 277–287.
73. Masutomi K, Possemato R, Wong JMY, Currier JL, Tothova Z, Manola JB, Ganesan S, Lansdorp PM, Collins K, Hahn WC. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:8223–8227.
74. Mukherjee S, Firpo EJ, Wang Y, Roberts JM. Separation of telomerase functions by reverse genetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: E1363–E1371.
75. Yashima K, Maitra A, Rogers BB, Timmons CF, Rathi A, Pinar H, Wright WE, Shay JW, Gazdar AF. Expression of the RNA component of telomerase during human development and differentiation. *Cell Growth Differ* 1998; 9:805–813.
76. Le PN, Maranon DG, Altina NH, Battaglia CL, Bailey SM. TERRA, hnRNP A1, and DNA-PKcs interactions at human telomeres. *Front Oncol* 2013; 3:91.
77. Redon S, Zemp I, Lingner J. A three-state model for the regulation of telomerase by TERRA and hnRNPA1. *Nucleic Acids Res* 2013; 41:9117–9128.
78. Balk B, Maicher A, Dees M, Klermund J, Luke-Glaser S, Bender K, Luke B. Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-length dynamics and senescence. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20:1199–1205.
79. Pfeiffer V, Crittin J, Grolimund L, Lingner J. The THO complex component Thp2 counteracts telomeric R-loops and telomere shortening. *EMBO J* 2013; 32:2861–2871.
80. Cusanelli E, Romero CA, Chartrand, P. Telomeric noncoding RNA TERRA is induced by telomere shortening to nucleate telomerase molecules at short telomeres. *Mol Cell* 2013; 51:780–791.

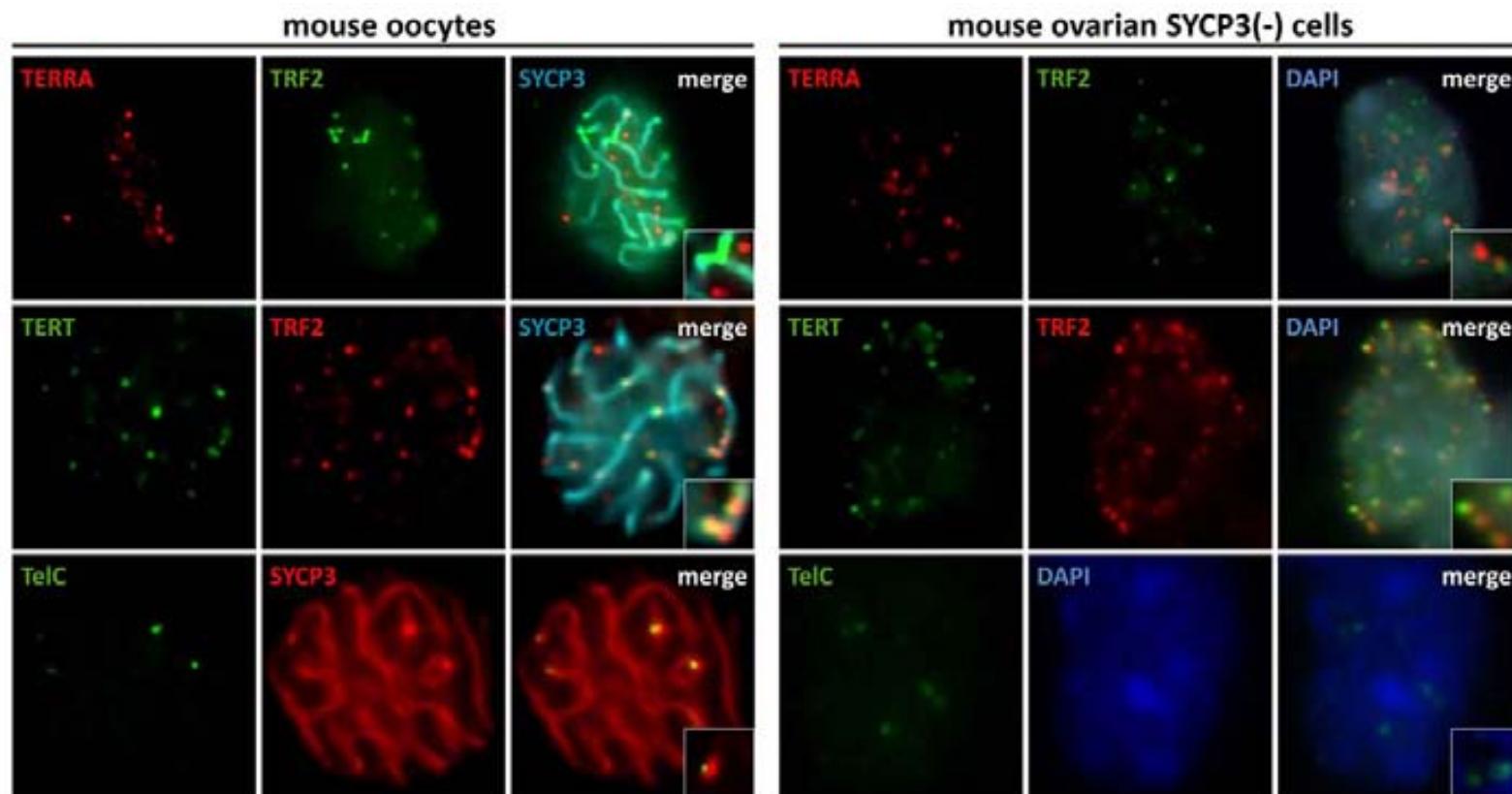
SUPPLEMENTARY MATERIAL

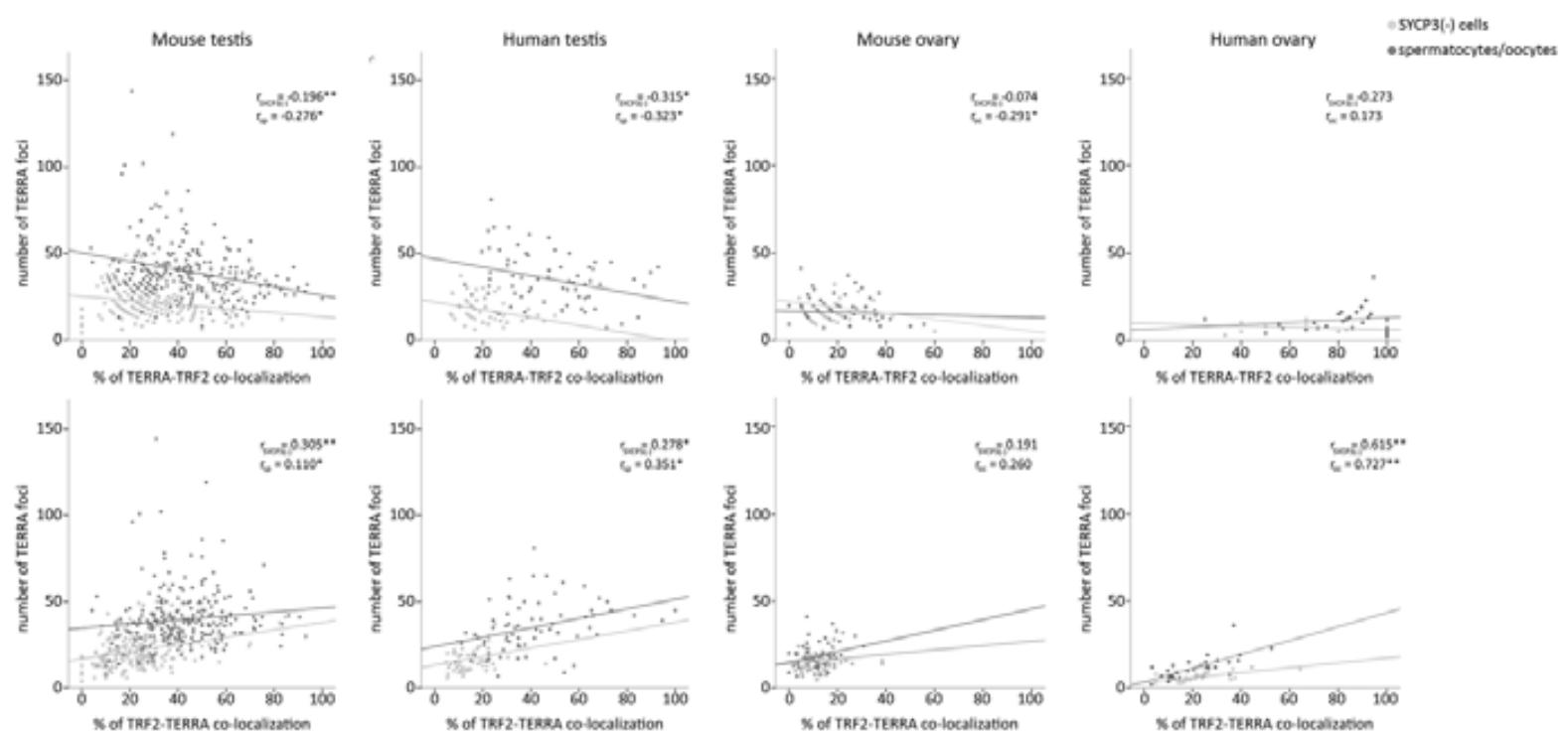
Figure S1. Mouse ovarian tissue cells labeled by the different cytogenetic techniques used. Oocytes I (left) and ovarian SYCP3(-) cells (right) showing TERRA (red) co-localization with TRF2 (green); TERT (green) co-localization with TRF2 (red); and telomeres marked with the telomeric PNA probe (green). Complexes are revealed by SYCP3 (light blue) and DNA is counterstained with DAPI (blue). All images were captured at 100x. Insets indicate 200% enlarged regions showing co-localizing signals.

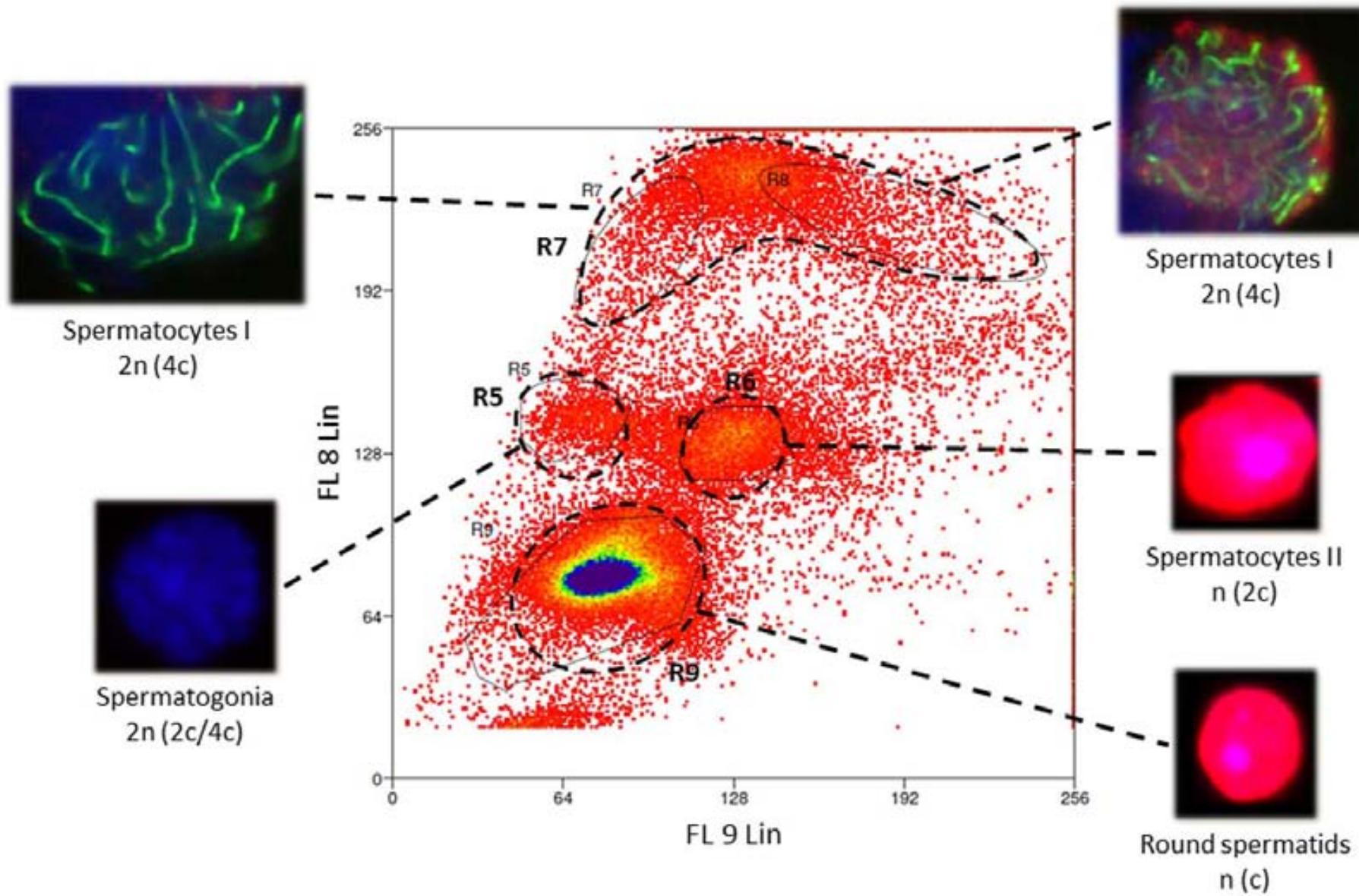
Figure S2. Correlations between TERRA foci and TERRA/TRF2 co-localization in mouse and human germ cells. TERRA foci and TERRA-TRF2 co-localization were inversely correlated in mouse and human samples and in both cell types. In contrast, TERRA foci and TRF2-TERRA co-localization were positively correlated in mouse and human samples and in both cell types. Asterisks indicate significant correlations calculated by Pearson's coefficient, (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.001$.

Figure S3. Mouse spermatogenic FACS populations. Example of a graph obtained after flow-sorting spermatogenic populations from mouse testes. Each point stands for a singular cell event. Red, yellow and blue zones indicate low, medium and high density of events, respectively. The Y-axis, FL 8 Lin (blue Hoechst fluorescence detector), measures DNA complexity whereas the X-axis, FL 9 Lin (red Hoechst fluorescence detector), measures DNA quantity. R5, R6, R7 and R9 populations correspond to spermatogonia, spermatocytes II, spermatocytes I and round spermatids populations, respectively. Images show cells stained by IF against H1t (red) and SYCP3 (green) proteins, and DNA counterstained with DAPI (blue) used to evaluate the enrichment achieved for each cell population. All images were captured at 100x. Numbers indicate the diploid number for each cell type and, between parentheses, the DNA content per cell.

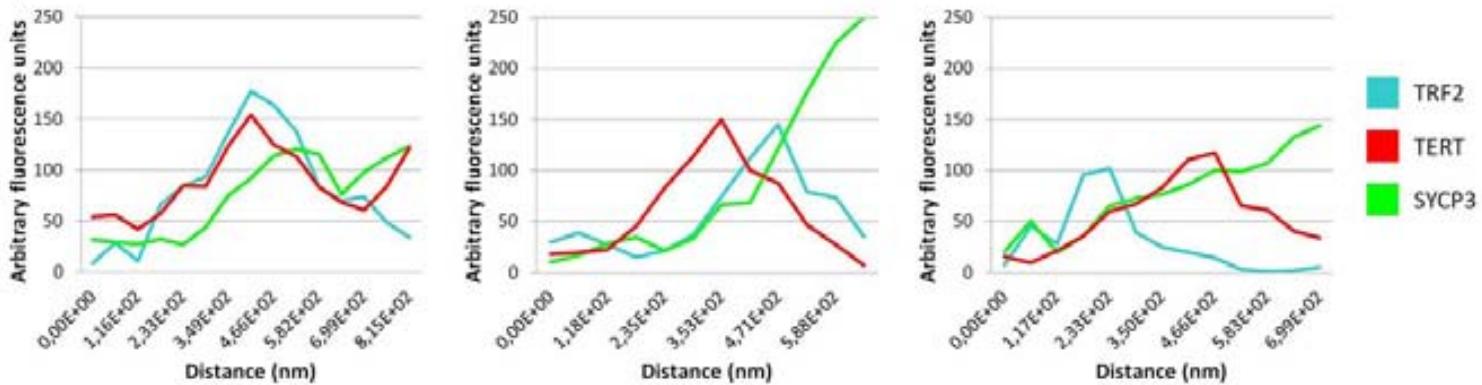
Figure S4. Telomere structure of human spermatocytes I. (A) Profiles obtained by the analysis in spermatocytes I of the fluorescence intensity (measured as arbitrary units) of TRF2-TERT co-localizing signals, schematically illustrated in the pictures below. (B) Distances between TRF2 and TERT fluorescence signals obtained by the analysis of the profiles expressed in nm. The black line indicates the mean of TRF2-TERT distance. n = number of telomeres with TRF2-TERT co-localizing signals. (C) Proportion of totally or partially co-localizing TRF2 and TERT fluorescence profiles.



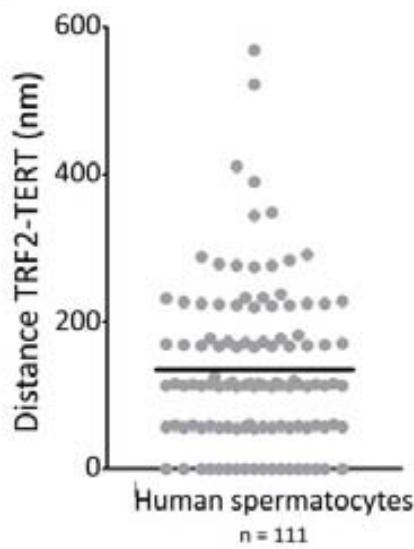




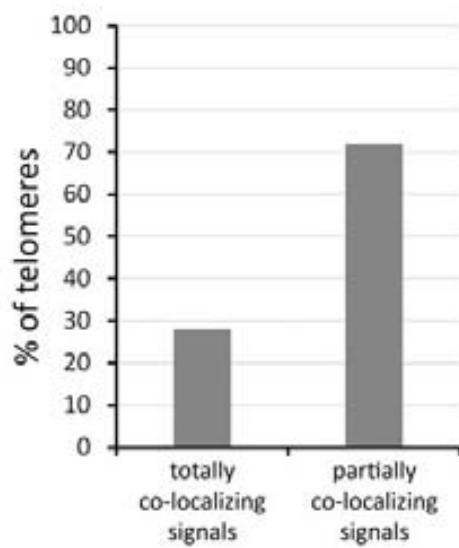
A



B



C



4.3. L'homeòstasi telomèrica es veu compromesa als espermatòcits de pacients amb infertilitat idiopàtica

Tot i que, en estudis previs, ha estat possible detectar alteracions en la meiosi en molts casos d'infertilitat idiopàtica masculina, molt sovint no se n'han pogut de terminar les causes cel·lulars. La disruptió de l'estructura telomèrica en les cèl·lules germinals comporta l'alteració de la gametogènesi fins a l'punkt que el seu sobreabundància resulta en gènates aneuploides i/o inviables. Els nous resultats previsos indiquen que tant TERRA com TERT formarien part i alhora contribuirien en el manteniment de l'estructura dels telòmers durant la gametogènesi. Per tant, canvis en la seva distribució telomèrica en ivells nuclears podríen ser el reflex de la perturbació de l'homeòstasi telomèrica de les cèl·lules germinals, la qual cosa podria ser origen d'una subsegüent perturbació del procés de divisió meiòtica.

Resultats: Reig-Viader, *et al.*, 2014b

Reig-Viader, R., Capilla, L., Vila-Cejudo, M., Garcia, F., Anguita, B., Garcia-Caldés, M., and Ruiz-Herrera, A. (2014). **Telomere homeostasis is compromised in spermatocytes from patients with idiopathic infertility.** *Fertility and Sterility*, doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.06.005.

In every end there is a beginning - Telomeres in male reproduction. Editorial dedicada a l'article anterior, escrita per el Dr David L Keefe per a la revista *Fertility and Sterility*.

Factor d'impacte: 4.174

Q1 en Biologia de la Reproducció (4rt de 28)

Q1 en Ginecologia i Obstetricia (4rt de 78)

Telomere homeostasis is compromised in spermatocytes from patients with idiopathic infertility

Rita Reig-Viader, M.Sc.,^{a,b} Laia Capilla, M.Sc.,^b Marta Vila-Cejudo, M.Sc.,^a Ferrán Garcia, M.D.,^c Begoña Anguita, Ph.D.,^c Montserrat Garcia-Caldés, Ph.D.,^{a,b} and Aurora Ruiz-Herrera, Ph.D.^{a,b}

^a Departament de Biologia Cel.lular, Fisiologia i Immunologia and ^b Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB), Universitat Autònoma de Barcelona, Campus UAB, Cerdanyola del Vallès; and ^c Fecunmed, Casals s/n, Granollers, Spain

Objective: To study whether the telomere structure of germ cells from idiopathic infertile men is altered and if this impairment is influenced by meiotic recombination and telomere length.

Design: We performed a detailed analysis of both telomeric repeat-containing RNA (TERRA) and telomerase distribution in testis cell spreads by combining immunofluorescence and RNA fluorescent *in situ* hybridization. In addition we analyzed meiotic recombination between homologous chromosomes by immunofluorescence and telomere length by quantitative fluorescent *in situ* hybridization.

Setting: University.

Patient(s): Men consulting for fertility problems.

Intervention(s): Unilateral testicular biopsies.

Main Outcome Measure(s): We observed that TERRA levels and its nuclear distribution were compromised in infertile patients. In addition, the presence of the protein component of telomerase at telomeres decreased in the affected patients. However, neither telomerase-TERRA association nor telomere length was altered in spermatocytes I of infertile samples compared with control individuals. In addition, we observed that meiotic recombination was reduced in infertile individuals.

Result(s): Telomere homeostasis is impaired in infertile patients, and this was translated into a decrease in TERRA levels together with an alteration of the TERRA-protein component of telomerase telomeric association in primary spermatocytes.

Conclusion(s): This study demonstrates for the first time that telomere structure and homeostasis in germ cells is compromised in infertile individuals. In the light of our results we propose that the analysis of telomeric structure (i.e., TERRA levels and telomere association with TERRA and telomerase) would provide new tools for our understanding of the origin of human infertility. (Fertil Steril® 2014; ■■■ - ■■■)

©2014 by American Society for Reproductive Medicine.

Key Words: TERRA, telomerase, infertility, telomeres, recombination, meiosis, spermatocytes

Discuss: You can discuss this article with its authors and with other ASRM members at <http://fertstertforum.com/reigviaderr-telomere-homeostasis-idiopathic-infertility/>



Use your smartphone to scan this QR code and connect to the discussion forum for this article now.*

* Download a free QR code scanner by searching for "QR scanner" in your smartphone's app store or app marketplace.

Fertility involves many genes, proteins, and regulatory pathways (1–5). Human reproduction, which includes several processes, such as gamete formation and transportation, fertilization, implantation, and embryo development in the uterus, is notoriously inefficient, with 20% of

fecundity efficiency (6). Worldwide 15% of couples do not achieve pregnancy within 1 year of intercourse (7), especially in developed countries where infertility is considered epidemic (8–10). In this context, a faithful control of meiosis is essential for assuring fertility.

Meiosis is a specialized division, which reduces by half the chromosome number of germ cells and increases genetic variability. These goals are achieved by synapsis and recombination between homologous chromosomes during the first meiotic prophase (1). However, male and female meioses differ in many aspects, including timing, synchrony, gamete production, arrest periods, morphology, and regulation (11). In fact, prophase I checkpoints are differently regulated in oocytes and spermatocytes. Although oocytes carrying synaptic and/or recombination errors are able to progress through gametogenesis, abnormal

Received April 7, 2014; revised and accepted June 4, 2014.

R.R.-V. has nothing to disclose. L.C. has nothing to disclose. M.V.-C. has nothing to disclose. F.G. has nothing to disclose. B.A. has nothing to disclose. M.G.-C. has nothing to disclose. A.R.-H. has nothing to disclose.

Supported by the Generalitat de Catalunya (2009SGR1107). R.R.-V. is a recipient of a Personal Investigador en Formación fellowship from Universitat Autònoma de Barcelona.

Reprint requests: Aurora Ruiz-Herrera, Ph.D., Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB) and Departament de Biologia Cel.lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus UAB, Cerdanyola del Vallès 08193, Spain (E-mail: aurora.ruizherrera@uab.cat).

Fertility and Sterility® Vol. ■■, No. ■■, ■■ 2014 0015-0282/\$36.00

Copyright ©2014 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.06.005>

spermatocytes cannot escape meiotic checkpoints, undergoing apoptosis and causing infertility due to the absence/reduction of mature spermatozoa (12–16). This faithful regulation is translated into a low incidence of aneuploidy in spermatozoa compared with oocytes (17, 18). Because recombination is necessary for the correct segregation of homologous chromosomes during meiosis, several studies have included the analysis of recombination as a marker for detecting alterations during the first meiotic division in both spermatocytes I and oocytes I (19–25). The general view that can be extracted from these studies is that the average number of meiotic crossovers is lower in infertile patients with nonobstructive idiopathic infertility than in control individuals (19, 20, 22–24).

Telomeres, the ribonucleoprotein structures capping chromosomal ends, are relevant to meiosis as they promote pairing and synapsis between homologous chromosomes by the formation of the bouquet (26). Short and/or damaged telomeres have been often related to many processes related to infertility, such as gametogenesis disruption, impairment of nuclear organization in spermatozoa, incidence of aneuploid gametes, and reproductive aging (27–29). Critical telomere attrition produces defects in synapsis and recombination between homologous chromosomes, affecting also the formation of the meiotic spindle (30–32). In addition, short telomeres have been shown to increase the incidence of aneuploidy in human oocytes II (33) and induce DNA fragmentation and disruption of telomere–telomere interactions in human spermatozoa (34–36).

Relevant to the maintenance of telomere integrity during the cell cycle are both the protein complex (shelterin) and the telomeric repeat-containing RNA (TERRA), which form part of the telomeric structure (37, 38). TERRA is a long noncoding RNA, transcribed from telomeric and subtelomeric sequences, which is found in the nucleus of mammalian somatic and germ cells, either as free molecules or associated with the telomeric structure (39–44). TERRA is involved in the maintenance of telomere integrity (39, 41, 45, 46). In the context of reproductive biology, we have recently reported that the localization of TERRA at telomeres during mammalian meiosis is subjected to gender-specific features, and that the regulation of its transcription is controlled during spermatogenesis (43, 44). In addition, evidence for an interaction between TERRA and telomerase has been recently reported (40, 47–49). Telomerase is the protein that maintains telomere length in specific cell types such as stem cells or cancer cells. Nevertheless, it can also act as a structural component of the telomeric complex in somatic (50–54) and germ cells (43, 44) when it associates with telomeres, probably contributing to the integrity of the telomeric structure, rather than being implicated in telomere elongation (44). This fact, together with the recent description of a TERRA–telomerase association in mammalian germ cells (43, 44), highlights the importance of telomere homeostasis in fertility.

In the present report we have analyzed meiotic recombination and telomere homeostasis in patients diagnosed with idiopathic infertility. We found that telomere homeostasis is impaired in infertile men, which was translated into a

decrease in TERRA levels together with an alteration of the telomeric–TERRA association in primary spermatocytes. Although we did not find a deficiency in telomere length in any of the individuals analyzed, we did observe a decrease in the localization of telomerase at telomeres in primary spermatocytes from infertile patients when compared with control individuals. Overall, our results highlight the importance of considering telomere homeostasis when studying human infertility.

MATERIALS AND METHODS

Biological Samples

Testis biopsies obtained from five men were used: four patients diagnosed with nonobstructive deficiency of spermatozoa due to unknown causes (i.e., idiopathic) (P1–P4) seeking for fertility treatment and one individual (C1) with proven fertility undergoing a vasectomy at the time of tissue retrieval (*Supplemental Table 1*, available online). All men had normal 46,XY karyotypes. Samples were provided by the Assisted Reproduction Center Fecunmed (Granollers, Spain), after signing an informed consent, and processed immediately and transported ice cold to the laboratory.

In addition, HeLa cells were used as control cells with known telomere length (55), cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum, under standard conditions.

Ethical Approval

Institutional Review Board approval was obtained. All the protocols adopted herein were approved in compliance with the guidelines and ethical approval by the *Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal y Humana* of the Universitat Autònoma de Barcelona.

Cell Preparation Methods

For the analysis of the telomere structure in testis samples, cell spreads were obtained as previously described (43). Briefly, testicular tissue was mechanically disaggregated, permeabilized with CSK buffer (100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 10 mM PIPES, 0.5% Triton X-100, and 10 mM ribonucleoside-vanadyl complex), fixed with 4% paraformaldehyde, and finally washed with 70% ethanol. Slides were kept at -80°C until use. Before experiments, two slides per sample were immunostained against SYCP3 and treated with 6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (see immunofluorescence section) to evaluate cell morphology, telomere integrity, the bouquet configuration, and synaptonemal complex integrity according to morphological criteria described in previous studies (21, 25, 56). HeLa cells were removed from flasks by trypsinization and subsequently processed following the same protocol used for testis samples.

For the analysis of meiotic recombination, spreads of primary spermatocytes were obtained following Ko and Martin (57). Testicular tissue was first mechanically disaggregated in 1× phosphate-buffered saline (PBS). Then cells were treated with a hypotonic solution (sucrose 500 mM) for 12–13 minutes and fixed for 15 minutes in 4% paraformaldehyde,

0.15% Triton X-100 at pH 9.8. Finally slides were air-dried for 15–20 minutes and washed in 1% PhotoFlo (Kodak).

Immunofluorescence

For the evaluation of telomere homeostasis, spermatocytes were immunostained as previously described [43]. Briefly, slides were blocked with PTBG (0.2% bovine serum albumin [BSA], 0.2% gelatin, 0.1% Tween-20, and 1× PBS) and then incubated with primary antibodies: mouse anti-TRF2 (Millipore), mouse or rabbit anti-SYCP3 (Abcam), and rabbit anti-TERT (Rockland). Next, slides were incubated with secondary antibodies: goat anti-mouse Cy5, mouse anti-rabbit Cy5, goat anti-rabbit fluorescein isothiocyanate conjugate (FITC), and goat anti-mouse FITC (Jackson Immunoresearch), and were fixed in 4% paraformaldehyde. Finally, DNA was counterstained with DAPI. The telomeric regions of chromosomes and telomerase enzyme were detected using an antibody against the shelterin protein TRF2 and against the protein component of telomerase (TERT), respectively, as previously described [43]. The efficiency of the TERT antibody was initially tested in telomerase-positive (HeLa cells) and telomerase-negative cells (human primary fibroblasts) [43].

Recombination events were evaluated by immunofluorescence using MLH1 (i.e., a marker for meiotic crossovers) in human spermatocytes following Ko and Martin [57]. Slides were washed for 30 minutes in 1× antibody dilution buffer (0.05% Triton X-100, 1× PBS), and then incubated overnight at 37°C with the following primary antibodies diluted in 1× antibody dilution buffer: mouse anti-MLH1 (BD Pharmigen), rabbit anti-SYCP3 (Abcam), and complication of Raynaud's phenomenon, esophageal dysfunction, sclerodactyly, and telangiectasia (CREST) serum. Slides were washed twice in 1× PBS, and incubated for 90 minutes at 37°C with the following secondary antibodies diluted in 1× PBS: anti-mouse FITC, anti-rabbit Cy3, and goat anti-human Cy5 (Jackson Immunoresearch). Finally, cells were washed three times in 1× PBS for 10, 20, and 30 minutes, and stained with DAPI. The CREST serum was used to label centromeres [58].

In all patients, the immunodetection of SYCP3, a protein of the lateral element of the synaptonemal complex, allowed us to classify testis cells according to different criteria [43]. We identified primary spermatocytes undergoing the first meiotic prophase, which were evaluated as a separate group from the cells negative for SYCP3 (for now onward, SYCP3(-) cells). SYCP3(-) cells include nonspermatocyte I germ cells, Sertoli and Leydig cells, as well as cells from the testicular stroma (e.g., fibroblasts). We classified spermatocytes I depending on the different prophase I stages (leptonema, zygonema, pachynema, and diplonema) following previous studies [21, 43].

RNA-fluorescent In Situ Hybridization

RNA-fluorescent in situ hybridization was carried out immediately after immunofluorescence, as described previously [43]. TERRA was detected through a (CCCTAA)₃ oligonucleotide probe given that the telomeric sequence of TERRA consists of UUAGGG repeats in mammalian cells [39, 40]. In

short, after dehydration, cells were hybridized with the oligonucleotide probe Cy3-conjugated (XX Integrated DNA Technologies). Next, slides were washed with different astringent solutions and, finally, cells were counterstained with DAPI. A negative control consisting of a slide treated with RNase A was included in the experiments. For the TERRA levels analysis, cells were classified into three groups depending on the number of TERRA foci observed: cells with less than 15 TERRA foci, cells with 15–30 TERRA foci, and cells with more than 30 TERRA foci.

Quantitative-fluorescent In Situ Hybridization

Quantitative-fluorescent in situ hybridization analysis was performed according to manufacturer's protocol (Panagene). In brief, cells were air-dried, fixed in 4% formaldehyde, and their cytoplasm was removed with 0.005% pepsin. After ethanol dehydration, cells were hybridized with TelC PNA probe FAM-conjugated (Panagene), complementary to G-rich strand. Finally, cells were washed in detergent solutions and were counterstained with DAPI. Fluorescence was calibrated before and after every image-capturing session by means of green fluorescent beads (Life Technologies). Telomere intensities were obtained as arbitrary telomere fluorescent units by measuring spot optical densities using the TFL-Telo software [59]. For each experiment, an internal control consisting of cells with known telomere length (i.e., HeLa cells) was included. Results were normalized expressing the telomere fluorescent units obtained in human germ cells as the increment with respect to HeLa.

Microscopy

Preparations were evaluated using a Nikon Eclipse 90i epifluorescence microscope equipped with the appropriate filters and connected to a charge-coupled device camera. Images were captured and produced by the Isis software (Metasystems).

Data Analysis

Data was statistically analyzed by means of PAWS Statistics 18 software (SPSS, IBM). Analysis of variance (ANOVA) and *t* tests were used to compare means between cell types and samples, first applying the test of homogeneity of variances. Similarities between different categories were analyzed through Scheffe's post-hoc test. Pearson's coefficient was used to calculate correlations between TERRA levels and TERRA/TRF2 colocalization.

RESULTS

Recombination Rates are Reduced in Infertile Patients

We analyzed the number of crossovers in spermatocytes from infertile and control men as a way to characterize our sample. It is well known that infertile human male patients have decreased numbers of crossovers when compared with control individuals [19, 20, 23, 24]. Therefore, we tested whether any alteration in the recombination pattern could be related to the infertile phenotype observed (Supplemental Table 1).

We analyzed meiotic recombination by means of immunodetection against MLH1 at pachynema (Fig. 1A). We found significant differences in the mean number of meiotic crossovers per cell detected in infertile patients when comparing with control individuals (Fig. 1B). The group of infertile patients presented, on average lower MLH1 foci per cell (45.2 ± 5.8) than the control sample (49.28 ± 3.9) (*t* test; $P < .001$) (Fig. 1B). In addition, spermatocytes I from infertile men showed a higher percentage of cells lacking one MLH1 foci per bivalent when comparing with control individuals (Fig. 1C).

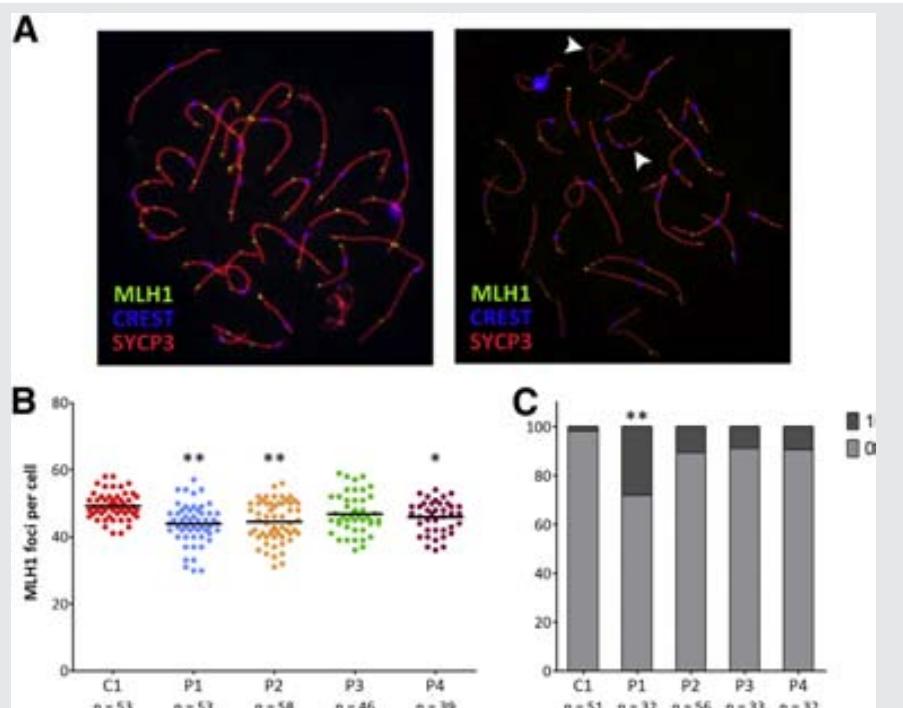
TERRA Levels and Nuclear Distribution are Disturbed in Infertile Patients

Previous studies have reported that, under normal conditions, TERRA molecules colocalize with telomeres at a high proportion in somatic cells [39, 40, 42, 60]. In the case of mammalian germ cells, we have recently shown that both TERRA levels and nuclear distribution are gender dependent, being especially high in males when compared with females in human and mouse [43, 44]. Therefore, we studied both TERRA levels and its nuclear distribution in testis samples to study whether the structure of telomeres of germ cells in men with idiopathic infertility is altered.

We observed TERRA as discrete foci in 100% of cells of the analyzed samples (Fig. 2A), and its levels were significantly higher in primary spermatocytes than in SYCP3(-) cells (χ^2 test; $P < .001$), irrespective of the fertility diagnosis (Fig. 2B). When comparing TERRA levels between samples, we found that spermatocytes I from infertile men showed significantly lower number of TERRA foci than control individuals (χ^2 test; $P < .001$), whereas only in one patient (P3) significant differences for SYCP3(-) cells were found (one-way ANOVA, $P < .05$) (Fig. 2B).

Regarding the distribution of TERRA at telomeres, both the proportion of telomeres showing TERRA signals and TERRA localization at telomeres were significantly higher in spermatocytes than in SYCP3(-) cells in all patients (*t* test, $P < .001$) (Fig. 2C). However, when we compared the distribution of TERRA at telomeres between samples, we found different tendencies from those observed for TERRA levels. In two patients (P1 and P2), TERRA-TRF2 colocalization in spermatocyte I was significantly higher than in control individuals (one-way ANOVA, $P < .001$) (Fig. 2C, left). In contrast, the proportion of telomeres associated with TERRA signals in spermatocytes (i.e., TRF2-TERRA colocalization) did not significantly change between samples (Fig. 2C, right). The same tendency was observed in SYCP3(-) cells in both TERRA-TRF2 colocalizations.

FIGURE 1



Recombination analysis in testis samples. (A) Examples of immunolocalization of meiotic recombination events in human spermatocytes at pachynema from control (top) and an infertile patient (bottom). MLH1 foci are depicted in green, centromeres in blue, and synaptonemal complexes in red. Arrowheads indicate bivalents lacking MLH1 signals. (B) Distribution of the mean numbers of MLH1 foci per cell observed in each sample. Means are indicated by a horizontal black line. (C) Percentage of pachytene spermatocytes showing one MLH1-negative bivalent. In both cases asterisks indicate the level of significance compared with control. * $P < .05$ (one-way analysis of variance [ANOVA] and *t* test); ** $P < .001$ (one-way ANOVA and *t* test).

Reig-Viader. Telomeric dysfunction in infertile men. *Fertil Steril* 2014.

FIGURE 2

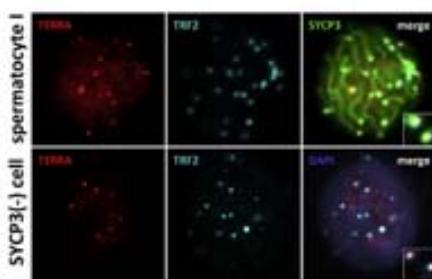
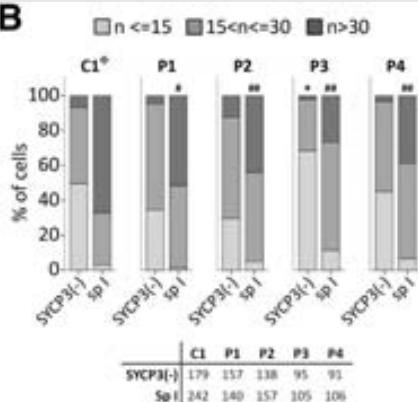
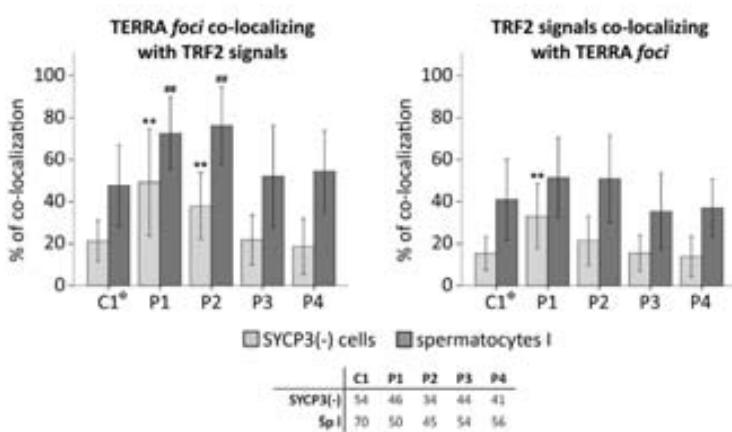
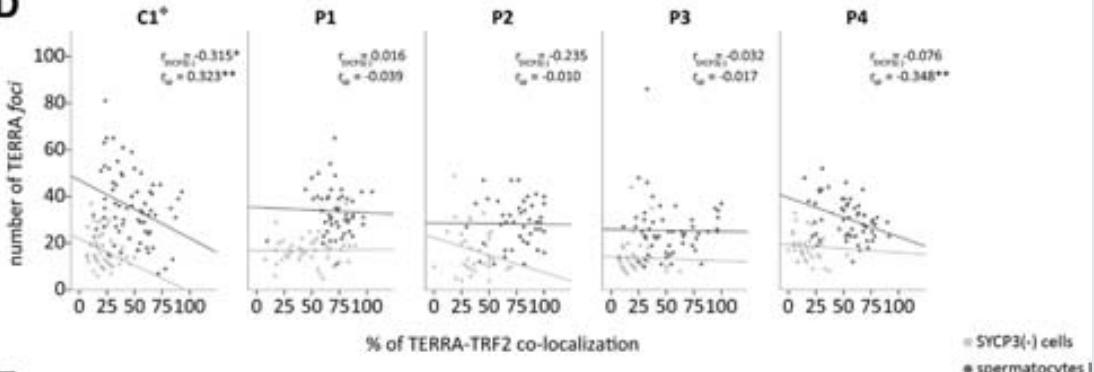
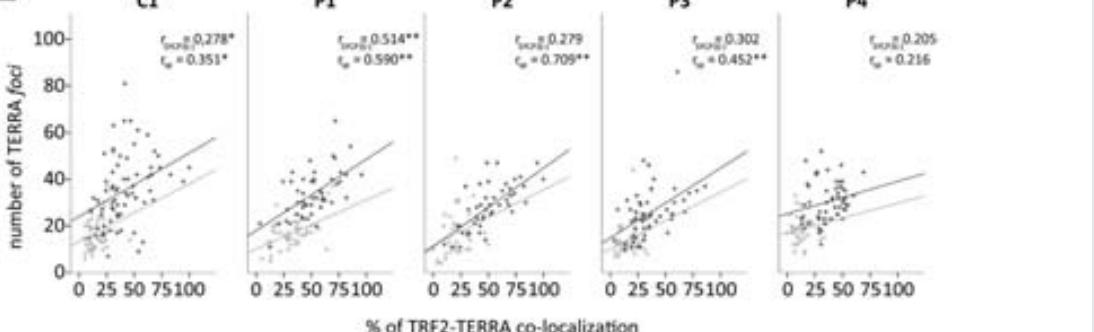
A**B****C****D****E**

FIGURE 2 Continued

TERRA levels and colocalization between TERRA and TRF2. (A) Representative images of a pachytene spermatocyte and a SYCP3(-) cell showing TERRA (red foci) localization at telomeres (light blue foci), the synaptonemal complex in green and the DNA counterstained with 6-diamino-2-phenylindole (DAPI). Insets show enlarged TERRA foci colocalizing with TRF2 signals. (B) TERRA levels expressed as the percentage of spermatocytes I (sp I) and SYCP3(-) cells included in each group according to TERRA levels: less than 15 foci, between 15 and 30 or more than 30 foci. (Clover indicates retrieved from Reig-Viader et al., 2014 [44]). Asterisks indicate significance for SYCP3(-) cells, and number signs (#) for spermatocytes I, both compared with the control sample (χ^2 test and one-way analysis of variance [ANOVA]). * or $^{\#}P < .05$; ** or $^{\# \#}P < .001$. The table below indicates the number of cells analyzed per sample and cell type. (C) Percentage of TERRA foci localizing at telomeres (left) and percentage of telomeres showing TERRA foci associated (right) in both primary spermatocytes and SYCP3(-) cells. (the clover symbol indicates data retrieved from Reig-Viader et al., [44]). Asterisks indicate significance for SYCP3(-) cells and number signs (#) for spermatocytes I, both compared with the control sample (one-way ANOVA). * or $P < .05$; ** or $^{\# \#}P < .001$. Tables below indicate the number of cells analyzed per sample and cell type. (D) Pearson correlations between the number of TERRA foci per cell and the percentage of TERRA localized at telomeres in spermatocytes I (sp) and SYCP3(-) cells for each sample. (E) Pearson correlations between TERRA foci and the proportion of telomeres showing TERRA in spermatocytes I (sp) and SYCP3(-) cells. Significance is indicated by asterisks: * $P < .05$; ** $P < .001$. (Clover indicates retrieved from Reig-Viader et al., 2014 [44]). See text for other acronyms.

Reig-Viader. Telomeric dysfunction in infertile men. *Fertil Steril* 2014.

More important, we observed that in the control sample the number of TERRA foci correlated negatively with the proportion of TERRA associated with telomeres, but positively with the proportion of telomeres showing TERRA signals (Fig. 2D and E), mirroring previous results in mice [44]. However, although the positive correlation between TERRA foci and TRF2-TERRA colocalization can also be observed in infertile patient cells (Fig. 2E), the negative correlation between TERRA foci and TERRA-TRF2 colocalization observed in the control sample was not statistically significant in most infertile samples (P1-P3; Fig. 2D). Thus, these results suggest the existence of an alteration in the nuclear distribution of TERRA molecules in infertile samples when compared with the fertile donor. This was translated into an increase in the proportion of telomere-free TERRA, whereas the association of TERRA at the telomeric structure would be maintained unaltered.

The Presence of TERT at Telomeres Decreases in Infertile Patients

Although it has been previously reported that a lack of functional telomerase can induce meiotic aberrations, apoptosis of male germ cells and disruption of zygote progression [29–32], little is known about how telomerase activity is regulated in human germ cells [61–64]. In this context, we have previously described the nuclear distribution of telomerase in mouse and human germ cells [43, 44] suggesting that, because telomerase is associated with telomeres throughout all gametogenesis stages, it might play a functional role in maintaining the telomeric structure. Therefore, we analyzed the telomerase distribution in relation to telomeres in infertile patients to test whether the relationship between these molecules is affected (Fig. 3A).

We observed that the proportion of telomeres showing telomerase signals was significantly higher in spermatocytes than in SYCP3(-) cells (t test, $P < .001$), but only in the control sample (Fig. 3B). In infertile samples, on the contrary, TRF2-TERT colocalization was similar in both cell types. In fact, spermatocytes I from infertile patients showed a significantly lower proportion of telomeres associated with telomerase signals compared with control individuals (one-way ANOVA,

$P < .001$). No significant differences between samples were found for SYCP3(-) cells, suggesting that the association of telomerase at telomeres would be differentially regulated in spermatocytes I and disrupted in infertile testicular biopsies.

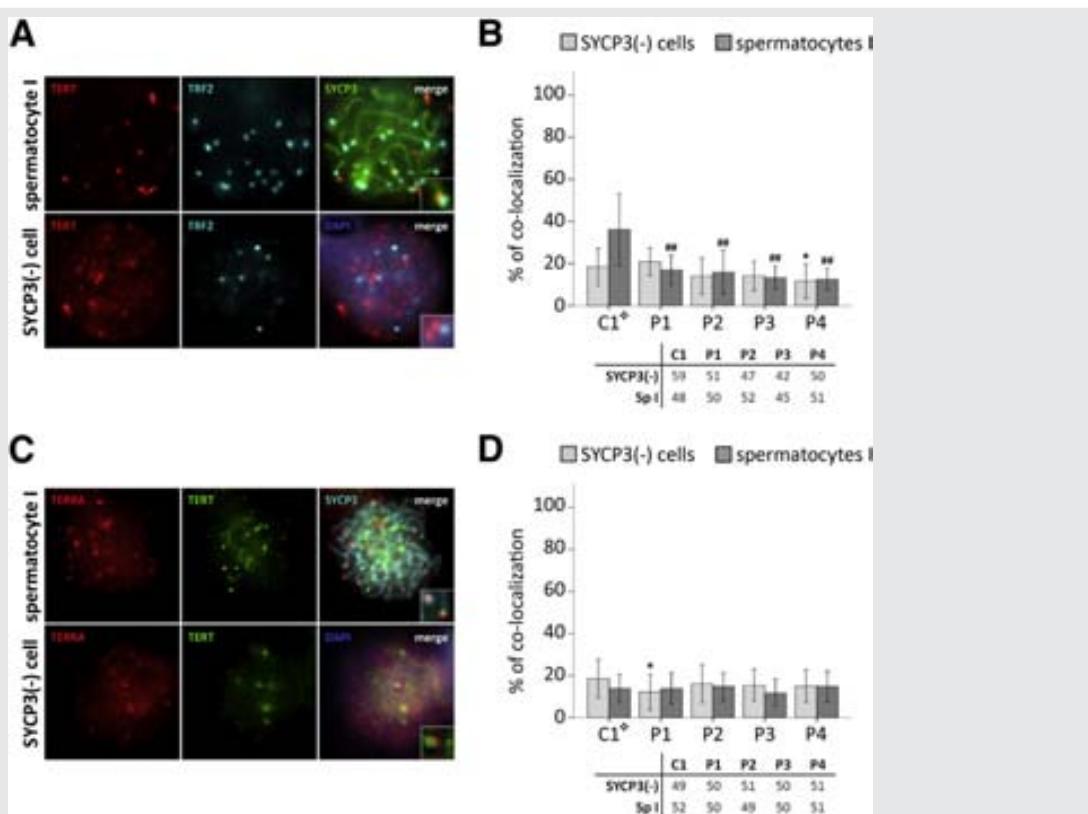
The TERRA-TERT Association is Not Altered in Spermatocytes I from Infertile Patients

Understanding the functional relationships between TERRA and telomerase has been a long-standing question, resulting in contrasting views [40, 42, 47–49, 65–68]. In the present study we analyzed whether the association between TERRA and telomerase (here exemplified as TERT) was altered in spermatocytes I from infertile men (Fig. 3C and D). Our results showed that, despite slight variations in the proportion of TERRA-TERT colocalization between cell types, no significant differences were found between spermatocytes I and SYCP3(-) cells among samples (one-way ANOVA, $P > .05$) (Fig. 3D). In addition, the colocalization of TERRA foci and telomerase was similar in spermatocytes I and SYCP3(-) cells in all samples. Therefore, it seems likely that the observed alterations of TERRA levels (i.e., low levels) or changes in telomeric TERRA and TERT distribution in samples from infertile individuals would not affect TERRA association with telomerase.

Telomere Length in Spermatocytes I is Highly Variable among Individuals

Many studies have suggested a causative role between short telomeres and gametogenic errors, germ cells apoptosis, or reduced fertility [30–33, 69–73]. However, in the case of human germ cells, reports on telomeric length are mainly restricted to spermatozoa [70–74], which makes it difficult to elucidate the mechanisms regulating telomere length throughout spermatogenesis. In this context, recent reports have suggested that telomeres would not undergo elongation during spermatogenesis [44, 75]. Thus, given that we detected a decrease in telomerase association with telomeres in germ cells of infertile patients (Fig. 3B), we analyzed by quantitative-fluorescent *in situ* hybridization whether this decrease would result in telomere length

FIGURE 3



Colocalization of TERT with telomeres and with TERRA. (A) Representative images of a pachytene spermatocyte and a SYCP3(-) cell where the protein component of telomerase (red), telomeres (light blue), and synaptonemal complexes (green) were immunodetected. DNA was counterstained with 6-diamino-2-phenylindole (DAPI). Insets show enlarged regions where TERT association to telomeres can be observed. (B) Percentages of telomeres showing TERT signals in primary spermatocytes (Sp I) and SYCP3(-) cells for each sample. Asterisks and number signs indicate significance for SYCP3(-) cells and spermatocytes I, respectively, compared with the control sample. One-way analysis of variance (ANOVA), * $P<.05$; ** $P<.001$. (C) Images showing a pachytene spermatocyte and a SYCP3(-) cell where TERRA (red) and TERT (green) have been labeled by immunofluorescence/RNA-fluorescent in situ hybridization. Synaptonemal complexes (light blue) and DNA (DAPI) are revealed. Insets show enlarged regions with TERRA foci colocalizing with TERT signals. (D) Proportion of TERRA foci colocalizing with TERT in spermatocytes I (Sp I) and SYCP3(-) cells for each sample. Asterisks indicate significance for SYCP3(-) cells compared with the control. One-way ANOVA, * $P<.05$. Tables below graphs indicate the number of analyzed cells per sample and per cell type. (the clover symbol indicates data retrieved from Reig-Viader et al., [44]). See text for other acronyms.

Reig-Viader. Telomeric dysfunction in infertile men. *Fertil Steril* 2014.

modifications (Fig. 4A). Both SYCP3(-) cells and primary spermatocytes showed longer telomeres than HeLa cells (one-way ANOVA, $P<.001$) (Fig. 4B and C), supporting the long-standing view that telomeres are longer in germ cells than in somatic cells (74, 76, 77). Nevertheless, spermatocytes I showed significantly longer telomeres when compared with SYCP3(-) cells in all samples (one-way ANOVA, $P<.001$) (Fig. 4B). This observation could be because most of the spermatocytes I analyzed were found at the pachytene stage, where one telomere signal corresponds to telomeres from four chromatids, whereas in SYCP3(-) cells each signal would be equivalent to a maximum of two telomeres.

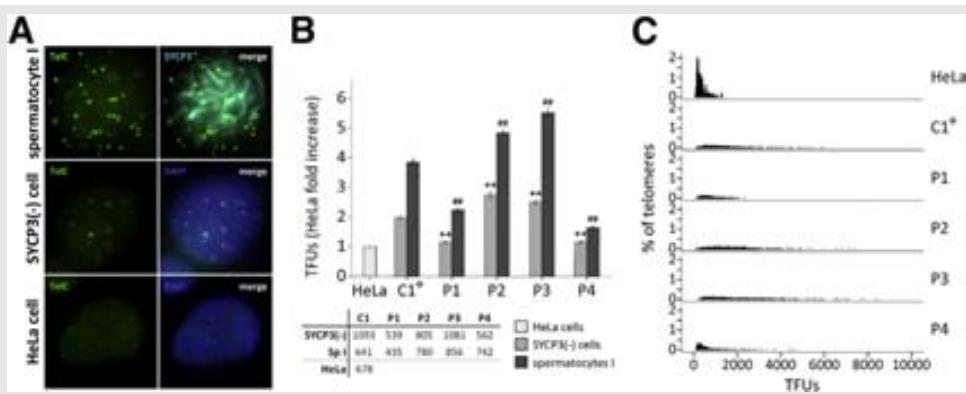
Although both spermatocytes and SYCP3(-) from the control sample were significantly different from infertile patients (one-way ANOVA, $P<.001$) (Fig. 4B), we found higher variability of telomeric length between individuals. Despite this behavior, we could appreciate a trend within samples; that is, those samples where spermatocytes I showed longer

telomeres than in control individuals also showed SYCP3(-) cells with longer telomeres and vice versa. In addition, the same variability in spermatocytes I was observed when comparing telomere length distributions (Fig. 4C), suggesting that telomere length would not be affected by the reduction of telomerase association at telomeres in primary spermatocytes of infertile individuals.

DISCUSSION

Infertility is a growing problem in developed countries (8–10), thus understanding cellular and molecular mechanisms underlying this process is of crucial importance. Although most studies on human infertility have been focused on the female factor (17, 18), male factor infertility remains poorly understood, and current diagnosis is mainly restricted to semen analysis (78). This is translated into a high percentage (30%–40%) of infertility patients whose cause is

FIGURE 4



Telomere lengths in human testis cells. (A) Images of a pachytene spermatocyte and a SYCP3(-) cell where telomeric sequences were revealed by means of a TelC PNA probe (green). Synaptonemal complexes (light blue) and DNA (6-diamino-2-phenylindole [DAPI]) are also shown. (B) Representation of the mean values \pm SEM of telomere lengths measured in the different samples displayed as HeLa-fold increase telomere fluorescent units. Asterisks indicate significance for SYCP3(-) cells and number signs for spermatocytes I, both compared with the control (one-way analysis of variance [ANOVA]). * or $^{\#}P < .05$; ** or $^{##}P < .001$. (C) Frequency distribution of measured telomeres for each telomere fluorescent unit (TFU) interval and for each sample. The table below the graph indicates the number of analyzed telomere signals per sample and per cell type. (the clover symbol indicates data retrieved from Reig-Viader et al., [44]). See text for other acronyms.

Reig-Viader. Telomeric dysfunction in infertile men. *Fertil Steril* 2014.

difficult to establish [7]. It is in this framework where the development of new approaches and/or markers for the detection and diagnosis of male factor infertility are much in need. Mirroring previous observations [20, 22, 24] we observed that primary spermatocytes from infertile idiopathic patients show reduced recombination rates. But, more important, infertile men showed, at the same time, an alteration of telomeric homeostasis. We propose, therefore, that future studies determine whether maintenance of the integrity of the telomere structure together with reduced recombination between homologues contribute to some cases of male factor infertility.

Reduced Recombination in Infertile Phenotypes

The cytogenetic study of meiotic recombination (here exemplified as the MLH1 protein) has been often applied to male factor infertility studies [19, 20, 24]. Our results indicate that primary spermatocytes from infertile patients showed a decrease in the mean number of MLH1 foci per cell, together with a higher proportion of bivalents without crossovers than control individuals. This is in agreement with previous studies, supporting the view that at least part of the origin of the infertile phenotype displayed by these patients could be explained by a reduction in the number of crossovers that could induce errors in homologue segregation and, therefore, lead to apoptosis and interruption of gametogenesis [22–24, 79, 80].

Nevertheless, a reduction in the recombination rate cannot solely explain the total or severe abolition of production of spermatozoa observed in these individuals, as the reduction in the mean number of MLH1 foci was highly variable. Therefore, the oligo-/azoospermia found in these patients can be also attributed to defects in the gametogenic process caused by additional factors. Considering the impor-

tance of telomeres for the proper development of synapsis and recombination between homologues, the reduction in recombination events could be related to alterations of the telomere homeostasis, reinforcing the idea that TERRA and TERT would be integral elements of the telomeric complex of germ cells.

Decrease in TERRA Levels Induce Alteration of TERRA Nuclear Distribution

The telomeric structure can be jeopardized by the deregulation of TERRA expression due to disruption of telomeric and/or TERRA-binding protein dynamics as well as to a modification of the telomere heterochromatin methylation pattern [39, 41, 45, 46, 65, 66, 81]. Thus, it seems plausible that TERRA homeostasis could also be involved in the maintenance of telomeric integrity in mammalian germ cells. In this regard, we compared the presence and distribution of TERRA across our sample. Mirroring previously observations in mouse and human germ cells [43, 44], TERRA was observed in all cell types analyzed, colocalizing with TRF2 at the end of the chromosomes, reinforcing the view that TERRA is an important component of the telomeric structure in germ cells. In fact, the percentage of telomeres showing TERRA signals was similar in spermatocytes I of all analyzed samples, showing a positive correlation with the number of TERRA foci. However, TERRA levels were significantly lower in patient samples when compared with the control sample, and negative correlations between TERRA levels and TERRA-TRF2 colocalization were not observed in most of the patients. Therefore, our results indicate that an alteration in TERRA levels may induce a reduction in the average pool of TERRA-free molecules present in the nucleus of primary spermatocytes from infertile patients. These results support the hypothesis that TERRA, when transcribed, tends

to be associated with telomeres until a threshold is reached, beyond which it would dissociate from the telomeric structure and be released to the nucleoplasm. As we previously reported in female germ cells (43), such low TERRA levels in spermatocytes I from infertile patients would not be sufficient to reach this threshold, therefore most of the synthetized TERRA molecules would be attached to telomeres and only a few of them would be released as TERRA-free molecules.

Deficiency of TERT Association with Telomeres Could Impair Telomeric Stability in Spermatocytes

Evidence in mice suggests that short telomeres induced by depletion of telomerase activity compromise gametogenic progression and embryo development (30–32, 69). Studies on telomerase function in the male germ line are scarce. At present most studies focused on telomerase activity have provided inconclusive results (82–86). In addition, studies in the human germ line are restricted to the assessment of telomerase activity in whole testicular samples (61, 62, 64). Only two studies have studied telomerase across the stages of spermatogenesis in mouse and humans (spermatogonia, primary and secondary spermatocytes and spermatids, and spermatozoa) (44, 63). The present study represents an advance from those previously reported in that it reports analysis of telomerase distribution in relation to telomeres in germ cells from different infertile patients. Interestingly, we observed a significant decrease in the percentage of TERT levels associated with telomeres in primary spermatocytes of infertile patients, although we found no significant differences between patients and control in SYCP3(-) cells. Therefore, the nuclear distribution of TERT appears to be affected in spermatocytes I in infertile individuals, suggesting a strong regulation TERT-telomere association presumably due to the complex chromosome dynamics occurring in prophase I. Such observations give further support to the recent view that considers the protein component of telomerase to be associated with the telomeric structure of mammalian germ cells (44), contributing to the maintenance of its stability, as it has been previously described in somatic cells (50–54).

The TERRA and TERT Association is Decoupled from Telomere Homeostasis and Telomere Length

Initial studies proposed that TERRA could inhibit telomerase activity based on two lines of evidence: [1] TERRA-like oligonucleotides associate with telomerase subunits (40, 47, 49), and [2] the existence of an inverse correlation between TERRA levels and telomeric length (48, 65, 66). Nevertheless, this hypothesis has been recently questioned, as no correlation between TERRA levels and telomerase expression was found in subsequent studies in other cell types (42, 67, 68). We have previously shown that, in mouse and human germ cells, a fraction of TERRA colocalizes with TERT signals outside the telomere structure (43, 44). In the present study we found that the proportion of TERRA associated with the protein component of telomerase was preserved in infertile patients. Therefore, although we observed an important reduction in both TERRA levels and

percentage of TERT-telomere association in spermatocytes I from infertile patients, the relationship between TERT and TERRA would not be affected.

Considering that the TERRA-TERT association does not seem to be affected in infertile patients, if a TERRA-mediated inhibition of telomerase existed we would not observe changes in telomere lengths in germ cells. Telomere shortening has often been associated with disruption of gametogenesis (30–33) and studies on telomere length in human spermatocytes indicate that telomere length is reduced in men with idiopathic infertility (70–74). However, these studies have been mainly focused in spermatozoa, and the mechanisms underlying telomere length regulation during spermatogenesis are still not well known. Interestingly, we did not find a differential pattern of telomere lengths displayed by spermatocytes I of infertile patients compared with control individuals. Nevertheless, we observed a noticeable interindividual variability, which lies within ranges published by previous studies (74, 76, 77, 87, 88). Thus, it seems likely that changes in TERRA levels in human male germ cells as well as in TERT association with telomeres would not directly affect telomere length, supporting the idea that both TERRA and TERT would have a structural function as components of the telomeric structure (39, 41, 44–46, 50–54), contributing to the preservation of telomere stability during the complex chromosome reorganization and movements that take place in gametogenesis.

Telomere Homeostasis in Spermatocytes I as a New Indicator of Human Idiopathic Infertility

In light of our results, we propose that future studies would help to determine the extent to which our findings apply to other cases of male factor infertility. In somatic cells (50–53), the insufficient or even absence of TERT protection at telomeres contribute to chromosome instability. In the present study we observed a significant decrease in TERT localization at telomeres in spermatocytes I from infertile patients. In the same way, we found that TERT, TERRA levels, and its telomeric association were also altered in primary spermatocytes from infertile patients, suggesting that an impairment of the telomeric homeostasis could be indicative for an infertile phenotype. Thus, considering that we observed a reduction in the mean number of crossovers in infertile individuals, changes in telomere homeostasis could affect homologue synapsis and recombination in spermatocytes undergoing meiotic prophase I. This could be translated into a disruption and/or interruption of spermatocyte meiosis due to the activation of meiotic checkpoint mechanisms, preventing the progression of meiotic division in cells displaying abnormal synapsis and recombination (89). Therefore, we propose that the study of TERRA, together with the TERT-telomere association, could be a useful indicator for infertility.

Acknowledgments: The authors are especially grateful to the clinicians and biologists of Fecunmed, Granollers, Spain. The telangiectasia (CREST) serum was kindly provided by M. Fritzler.

REFERENCES

1. Handel MA, Schimenti JC. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet* 2010;11:124–36.
2. Jan SZ, Hamer G, Repping S, de Rooij DG, van Pelt AM, Vormer TL. Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:1838–50.
3. Sánchez F, Smits J. Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:1896–912.
4. Waclawski A, Kurpisz M. Key functional genes of spermatogenesis identified by microarray analysis. *Syst Biol Reprod Med* 2012;58:229–35.
5. Li R, Albertini DF. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14:141–52.
6. Wilcox AJ, Weinberg CR, Baird DD. Timing of sexual intercourse in relation to ovulation. Effects on the probability of conception, survival of the pregnancy, and sex of the baby. *N Engl J Med* 1995;333:1517–21.
7. Jungwirth A, Diemer T, Dohle GR, Giwercman A, Kopa Z, Torunaye H, et al. Guidelines on male infertility. Male Infertility—European Association of Urology 2013. Available at: <http://www.uroweb.org/>. Last accessed June 26, 2014.
8. Lunenfeld B, van Steirteghem A. Bertarelli Foundation. Infertility in the third millennium: implications for the individual, family and society: condensed meeting report from the Bertarelli Foundation's second global conference. *Hum Reprod Update* 2004;10:317–26.
9. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med* 2012;9:e1001356.
10. Silber SJ, Barbey N. Scientific molecular basis for treatment of reproductive failure in the human: an insight into the future. *Biochim Biophys Acta* 1822;2012:1981–96.
11. Morelli MA, Cohen PE. Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction* 2005;130:761–81.
12. Edelmann W, Cohen PE, Kane M, Lau K, Morrow B, Bennett S, et al. Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. *Cell* 1996;85:1125–34.
13. Woods LM, Hodges CA, Baart E, Baker SM, Liskay M, Hunt PA. Chromosomal influence on meiotic spindle assembly: abnormal meiosis I in female *Mlh1* mutant mice. *J Cell Biol* 1999;145:1395–406.
14. Yuan L, Liu JG, Zhao J, Brundell E, Daneholt B, Höög C. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell* 2000;5:73–83.
15. Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, et al. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 2002;296:922–7.
16. Yuan L, Liu JG, Hoja MR, Wilbertz J, Nordqvist K, Höög C. Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science* 2002;296:1115–8.
17. Hunt PA, Hassold TJ. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends Genet* 2008;24:86–93.
18. Nagaoka SI, Hassold TJ, Hunt PA. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet* 2012;13:493–504.
19. Gonsalves J, Sun F, Schlegel PN, Turek PJ, Hopps CV, Greene C, et al. Defective recombination in infertile men. *Hum Mol Genet* 2004;13:2875–83.
20. Codina-Pascual M, Oliver-Bonet M, Navarro J, Campillo M, García F, Egózcue S, et al. Synapsis and meiotic recombination analyses: MLH1 focus in the XY pair as an indicator. *Hum Reprod* 2005;20:2133–9.
21. Roig I, Robles P, García R, Martínez-Flores I, Cabero L, Egózcue J, et al. Chromosome 18 pairing behavior in human trisomic oocytes. Presence of an extra chromosome extends bouquet stage. *Reproduction* 2005;129:565–75.
22. Sun F, Greene C, Turek PJ, Ko E, Rademaker A, Martin RH. Immunofluorescent synaptonemal complex analysis in azoospermic men. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:366–70.
23. Sun F, Turek P, Greene C, Ko E, Rademaker A, Martin RH. Abnormal progression through meiosis in men with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2007;87:565–71.
24. Ferguson KA, Wong EC, Chow V, Nigro M, Ma S. Abnormal meiotic recombination in infertile men and its association with sperm aneuploidy. *Hum Mol Genet* 2007;16:2870–9.
25. Brieno-Enriquez MA, Reig-Viader R, Cabero L, Toran N, Martinez F, Roig I, et al. Gene expression is altered after bisphenol A exposure in human fetal oocytes in vitro. *Mol Hum Reprod* 2012;18:171–83.
26. Scherthan H. Telomere attachment and clustering during meiosis. *Cel Mol Life Sci* 2007;64:117–24.
27. Keefe DL, Marquardt K, Liu L. The telomere theory of reproductive senescence in women. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006;18:280–5.
28. Hanna CW, Bretherick KL, Gair JL, Fluker MR, Stephenson MD, Robinson WP. Telomere length and reproductive aging. *Hum Reprod* 2009;24:1206–11.
29. Thilagavathi J, Venkatesh S, Dada R. Telomere length in reproduction. *Andrologia* 2013;45:289–304.
30. Liu L, Blasco MA, Keefe DL. Requirement of functional telomeres for metaphase chromosome alignments and integrity of meiotic spindles. *EMBO Rep* 2002;3:230–4.
31. Liu L, Blasco M, Trimarchi J, Keefe D. An essential role for functional telomeres in mouse germ cells during fertilization and early development. *Dev Biol* 2002;249:74–84.
32. Liu L, Franco S, Spyropoulos B, Moens PB, Blasco MA, Keefe DL. Irregular telomeres impair meiotic synapsis and recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:6496–501.
33. Treff NR, Su J, Taylor D, Scott RT. Telomere DNA deficiency is associated with development of human embryonic aneuploidy. *PLoS Genet* 2011;7:e1002161.
34. Rodríguez S, Goyanes V, Segrelles E, Blasco M, Gosálvez J, Fernández JL. Critically short telomeres are associated with sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2005;84:843–5.
35. Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JB. Disruption of telomere-telomere interactions associated with DNA damage in human spermatozoa. *Syst Biol Reprod Med* 2010;56:407–12.
36. Santiso R, Tamayo M, Gosálvez J, Meseguer M, Garrido N, Fernández JL. Swim-up procedure selects spermatozoa with longer telomere length. *Mutat Res* 2010;688:88–90.
37. O'Sullivan JO, Karlseeder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:171–81.
38. Feuerhahn S, Iglesias N, Panza A, Porro A, Lingner J. TERRA biogenesis, turnover and implications for function. *FEBS Lett* 2010;584:3812–8.
39. Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriauli L, Giulotto E, Lingner J. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* 2007;318:798–801.
40. Schoeftner S, Blasco MA. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nature* 2008;10:228–36.
41. Deng Z, Norseen J, Wiedmer A, Riethman H, Lieberman PM. TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres. *Mol Cell* 2009;35:403–13.
42. Farnung BO, Brun CM, Arora R, Lorenzi LE, Azzalin CM. Telomerase efficiently elongates highly transcribing telomeres in human cancer cells. *PLoS One* 2012;7:e35714.
43. Reig-Viader R, Brieño-Enríquez MA, Khoriauli L, Toran N, Cabero L, Giulotto E, et al. Telomeric repeat-containing RNA and telomerase in human fetal oocytes. *Hum Reprod* 2013;28:414–22.
44. Reig-Viader R, Vila-Cejudo M, Vitelli V, Sabaté M, Giulotto E, Caldés MG, et al. Telomeric repeat-containing RNA (TERRA) and telomerase are components of telomeres during mammalian gametogenesis. *Biol Reprod* 2014;90:103.
45. López de Silanes I, Stagno d'Alcontres M, Blasco MA. TERRA transcripts are bound by a complex array of RNA-binding proteins. *Nat Commun* 2010;1:33.
46. Deng Z, Wang Z, Stong N, Plasschaert R, Moczan A, Chen HS, et al. A role for CTCF and cohesin in subtelomere chromatin organization, TERRA transcription, and telomere end protection. *EMBO J* 2012;31:4165–78.
47. Redon S, Reichenbach P, Lingner J. The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic Acids Res* 2010;38:5797–806.
48. Arnoult N, van Beneden A, Decottignies A. Telomere length regulates TERRA levels through increased trimethylation of telomeric H3K9 and HP1α. *Nat Struct Mol Biol* 2012;20:244.

49. Redon S, Zemp I, Lingner J. A three-state model for the regulation of telomerase by TERRA and hnRNPA1. *Nucleic Acids Res* 2013;41:9117–28.
50. Zhu J, Wang H, Bishop JM, Blackburn EH. Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3723–8.
51. Sharma GG, Gupta A, Wang H, Scherthan H, Dhar S, Gandhi V, et al. hTERT associates with human telomeres and enhances genomic stability and DNA repair. *Oncogene* 2003;22:131–46.
52. Kim M, Xu L, Blackburn EH. Catalytically active human telomerase mutants with allele-specific biological properties. *Exp Cell Res* 2003;288:277–87.
53. Masutomi K, Possemato R, Wong JM, Currier JL, Tothova Z, Manola JB, et al. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *PNAS* 2005;102:8223–7.
54. Mukherjee S, Firpo EJ, Wang Y, Roberts JM. Separation of telomerase functions by reverse genetics. *PNAS* 2011;108:1363–71.
55. Canela A, Vera E, Klatt P, Blasco MA. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:5300–5.
56. Garcia M, Dietrich AJ, Freixa L, Vink AC, Ponsà M, Egoscue J. Development of the first meiotic prophase stages in human fetal oocytes observed by light electron microscopy. *Hum Genet* 1987;77:223–32.
57. Ko E, Martin RH. Immunofluorescence analysis of human spermatocytes. *Methods Mol Biol* 2009;558:401–18.
58. Segura J, Ferretti L, Ramos-Onsins S, Capilla L, Farre M, Reis F, et al. Evolution of recombination in eutherian mammals: insights into mechanisms that affect recombination rates and crossover interference. *Proc Biol Sci* 2013;280:20131945.
59. Poon SS, Lansdorp PM. Measurements of telomere length on individual chromosomes by image cytometry. In: Darzynkiewicz Z, Crissman HA, Robinson JP, editors. *Methods in cell biology: flow cytometry*. San Diego: Academic Press; 2001:69–96.
60. Arora R, Brun CM, Azzalin CM. Transcription regulates telomere dynamics in human cancer cells. *RNA* 2012;18:684–93.
61. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 1996;18:173–9.
62. Fujisawa M, Tanaka H, Tatsumi N, Okada H, Arakawa S, Kamidono S. Telomerase activity in the testis of infertile patients with selected causes. *Hum Reprod* 1998;13:1476–9.
63. Yashima K, Maitra A, Rogers BB, Timmons CF, Rathi A, Pinar H, et al. Expression of the RNA component of telomerase during human development and differentiation. *Cell Growth Differ* 1998;9:805–13.
64. Schrader M, Müller M, Heicappell R, Krause H, Schulze W, Miller K. Telomerase activity and expression of telomerase subunits in the testicular tissue of infertile patients. *Fertil Steril* 2000;73:706–11.
65. Yehezkel S, Segev Y, Viegas-Péquignot E, Skorecki K, Selig S. Hypomethylation of subtelomeric regions in ICF syndrome is associated with abnormally short telomeres and enhanced transcription from telomeric regions. *Hum Mol Genet* 2008;17:2776–89.
66. Yehezkel S, Rebibo-Sabbah A, Segev Y, Tzukerman M, Shaked R, Huber I, et al. Reprogramming of telomeric regions during the generation of human induced pluripotent stem cells and subsequent differentiation into fibroblast-like derivatives. *Epigenetics* 2011;6:63–75.
67. Smirnova A, Gamba R, Khoriauli L, Vitelli V, Nergadze SG, Giulotto E. TERRA expression levels do not correlate with telomere length and radiation sensitivity in human cancer cell lines. *Fron Oncol* 2013;3:115.
68. Vitelli V, Falvo P, Khoriauli L, Smirnova A, Gamba R, Santagostino M, et al. More on the lack of Correlation between Terra Expression and Telomere Length. *Front Oncol* 2013;3:245.
69. Hemann MT, Rudolph KL, Strong MA, DePinho RA, Chin L, Greider CW. Telomere dysfunction triggers developmentally regulated germ cell apoptosis. *Mol Biol Cell* 2001;12:2023–30.
70. Turner S, Hartshorne GM. Telomere lengths in human pronuclei, oocytes and spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2013;19:510–8.
71. Thilagavathi J, Kumar M, Mishra SS, Venkatesh S, Kumar R, Dada R. Analysis of sperm telomere length in men with idiopathic infertility. *Arch Gynecol Obstet* 2013;287:803–7.
72. Thilagavathi J, Mishra SS, Kumar M, Vemprala K, Deka D, Dhadwal V, et al. Analysis of telomere length in couples experiencing idiopathic recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:793–8.
73. Ferlin A, Rampazzo E, Rocca MS, Keppel S, Frigo AC, de Rossi A, et al. In young men sperm telomere length is related to sperm number and parental age. *Hum Reprod* 2013;28:3370–6.
74. Baird DM, Britt-Compton B, Rowson J, Amso NN, Gregory L, Kipling D. Telomere instability in the male germline. *Hum Mol Genet* 2006;15:45–51.
75. Jørgensen PB, Fedder J, Koelvraa S, Graakaer J. Age-dependence of relative telomere length profiles during spermatogenesis in man. *Maturitas* 2013;75:380–5.
76. De Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, et al. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol* 1990;10:518–27.
77. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10114–8.
78. Hamada A, Esteves SC, Nizza M, Agarwal A. Unexplained male infertility: diagnosis and management. *Int Braz J Urol* 2012;38:576–94.
79. Sun F, Mikhail-Philips M, Oliver-Bonet M, Ko E, Rademaker A, Turek P, et al. Reduced meiotic recombination on the XY bivalent is correlated with an increased incidence of sex chromosome aneuploidy in men with non-obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod* 2008;14:399–404.
80. De Vries M, Ramos L, de Boer P. Immunofluorescent characterization of meiotic recombination in human males with variable spermatogenesis. *Andrology* 2013;1:262–73.
81. Deng Z, Wang Z, Xiang C, Molczan A, Baubet V, Conejo-Garcia J, et al. Formation of telomeric repeat-containing RNA (TERRA) foci in highly proliferating mouse cerebellar neuronal progenitors and medulloblastoma. *J Cell Sci* 2012;125:4383–94.
82. Ravindranath N, Dalal R, Solomon B, Djakiew D, Dym M. Loss of telomerase activity during male germ cell differentiation. *Endocrinology* 1997;138:4026–9.
83. Yamamoto Y, Sofikitis N, Ono K, Kaki T, Isayama T, Suzuki N, et al. Postmeiotic modifications of spermatogenic cells are accompanied by inhibition of telomerase activity. *Urol Res* 1999;27:336–45.
84. Achi MV, Ravindranath N, Dym M. Telomere length in male germ cells is inversely correlated with telomerase activity. *Biol Reprod* 2000;63:591–8.
85. Riou L, Bastos H, Lassalle B, Coureuil M, Testart J, Boussin FD, et al. The telomerase activity of adult mouse testis resides in the spermatogonial alpha6-integrin-positive side population enriched in germinal stem cells. *Endocrinology* 2005;146:3926–32.
86. Tanemura K, Ogura A, Cheong C, Gotoh H, Matsumoto K, Sato E, et al. Dynamic rearrangement of telomeres during spermatogenesis in mice. *Dev Biol* 2005;281:196–207.
87. Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, et al. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 1996;5:685–91.
88. Baird DM, Rowson J, Wynford-Thomas D, Kipling D. Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nat Genet* 2003;33:203–7.
89. Roeder GS, Bailis JM. The pachytene checkpoint. *Trends Genet* 2000;16:395–403.

SUPPLEMENTAL TABLE 1**Characteristics of the analyzed patients.**

ID	Age (y)	Karyotype	Diagnosis	No. of IVF cycles (fecundated oocytes/total oocytes)	Pregnancy
C1	48	n.d.	Normozoospermia ^a	n.a.	n.a.
P1	20	n.d.	Cryptozoospermia	1 (0/12)	No
P2	34	46XY	Azoospermia	1 (9/12)	Yes
P3	39	46XY	Cryptozoospermia	1 ^b	Yes
P4	33	46XY	Oligoastenozoospermia	1 (7/10)	Yes ^c

Note: ID = patient identification label; C = control; P = infertile patient; n.d. = not determined; n.a. = not applied.

^a Vasectomized.

^b IVF with donor semen.

^c Induced abortion due to a X0 fetal karyotype.

Reig-Viader. Telomeric dysfunction in infertile men. *Fertil Steril* 2014.

In Every End There is a Beginning- Telomeres in Male Reproduction

David L. Keefe, M.D.

NYU Langone Medical Center

550 First Avenue, NBV 9N1-A

550 First Avenue

New York, New York 10016

Telephone: 212 263 0774

Email: david.keefe@nyumc.org

“Dans chaque fin, il y a un début.” (“In every end, there is a beginning.”)

– Libba Bray, *A Great and Terrible Beauty*

With the exception of a few rare conditions, such as azo- and severe oligospermia, the prognostic value of male infertility diagnoses remains poor¹. Improved understanding of the fundamental biology of meiosis in men may enhance our ability to diagnose male infertility. During meiosis two divisions reduce DNA copy number to produce haploid gametes. Chiasmata are essential for both male and female meiosis, not only to facilitate genetic recombination and therefore generate genetic diversity, but also to provide counter traction to the meiotic spindle, thus allowing proper kinetochore-spindle attachments and normal chromosome segregation. How do chiasmata form during early meiosis? In all organisms studied to date, including plants, yeast, mouse and humans, telomeres are essential to chiasma formation during early meiosis². Telomeres are tandem repeats of DNA (TTAGGn) and associated proteins (called shelterin), which cap and protect chromosome ends, and shorten with each DNA division as well as in non-dividing cells through the action of reactive oxygen^{3,4}. Telomeres tether chromosomes to the nuclear membrane, dynein like molecular motors attached to telomeres bundle the chromosomes into a bouquet like structure that facilitates chromosome pairing based on size. Synapsis then joins non sister chromatids to form chiasmata between homologous chromosomes².

Reproductive aging exerts the single most significant effect on fertility in women, and telomere attrition accounts for each of the principal features of reproductive aging, including the effects of reactive oxygen, mitochondrial dysfunction, embryo apoptosis, disruption of meiotic spindles, decreased synapsis and recombination, premature separation of sister chromatids during meiosis I, and predisposition to non-disjunction and aneuploidy^{3,4}. Telomeres mediate aging in species as diverse as plants, mice and humans, and mounting evidence implicates telomeres in age-related oocyte dysfunction in humans^{3,4}. Short telomeres in women are associated with failed IVF cycles and aneuploid blastocysts^{3,4}.

Men do not experience the same age related aneuploidy and decreased fertility so pervasive in women, and intriguingly the length of telomeres in sperm increases rather than decreases with age³. Presumably this marked difference between meiosis in men and women relates to the differential activity of telomerase, a reverse transcriptase capable of counteracting telomere attrition. Telomerase is expressed in spermatogonia, but not in adult oocytes, eggs, and cleavage stage embryos. So how are telomeres and telomerase regulated during spermatogenesis, and what happens to male fertility when telomeres and telomerase are deregulated?

The paper by Reig-Viader in this issue⁵ provides important insights into how telomeres and telomerase are regulated in the human testes. Under certain conditions telomeres transcribe a long, non-coding RNA, called TERRA. TERRA has been shown to have a number of roles in regulating telomeres and telomerase. TERRA regulates heterochromatin in the gene rich subtelomeric region of chromosomes. TERRA also can capture and tether the telomerase complex to the telomere, and therefore regulate telomere length. The manuscript by Reig-Viader et al reports studies on the relationships among

telomerase, telomeres, TERRA and meiotic recombination in testicular biopsy specimens from infertile and fertile men. They employed immunofluorescence to identify the regulated, catalytic subunit of telomerase (TERT), shelterin (TRF2), chiasmata (MLH1), synapsis (SCP2), RNA FISH to label TERRA and quantitative fluorescent hybridization (Q-FISH) to measure telomere length. The ability to study TERRA by RNA FISH and other aspects of chromosome and telomere biology by immunofluorescence in the same specimen, pioneered by this group, itself represents a significant breakthrough. Previously they applied similar methods to study TERRA, telomeres and telomerase during early meiosis in human fetal ovaries, and showed that TERRA and telomerase selectively co localize to oocytes during early meiosis . In the present study, the investigators compared these various aspects of telomere and chromosome biology in spermatocytes and SCP negative (i.e. non meiotic) cells, and in cells from infertile men to those from a normal, fertile male. They confirmed previously reported findings of reduced recombination in spermatocytes from infertile men compared to controls. They also discovered altered distribution and reduced levels of TERRA, and reduced TERT at telomeres in spermatocytes from infertile men compared to controls. They conclude that telomere structure and homeostasis are compromised in germ cells from infertile men, and propose that this finding could add to the diagnostic accuracy of male infertility.

The work of Reig-Viader et al represents an important contribution to our understanding of the basic biology of germ cell development in men, and opens the possibility that certain forms of male infertility may be understood through the lens of telomere biology. We expect that the new biology of telomeres and telomerase will continue to illuminate the dark mysteries of human infertility, that chromosome ends will provide new beginnings for reproductive research.

References

1. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA, Xu D, Vogel DL: National Cooperative Reproductive Medicine Network. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 2001 Nov 8;345(19):1388-93.
2. Keefe DL. Telomeres and meiosis in health and disease. *Cell Mol Life Sci* 2007 Jan;64(2):15-6.
3. Kalmbach KH, Fontes Antunes DM, Draxler RC, Knier TW, Seth-Smith ML, Wang F, Liu L, Keefe DL. Telomeres and human reproduction. *Fertil Steril* 2013 Jan;99(1):23-9.
4. Keefe DL, Liu L, Marquard K. Telomeres and aging-related meiotic dysfunction in women. *Cell Mol Life Sci* 2007 Jan;64(2):138-43.
5. Reig-Viader R, Capilla L, Vila-Cejudo M, Garcia F, Anguita B, Garcia-Caldes M, Ruiz-Herrera A. Telomere homeostasis is compromised in spermatocytes from patients with idiopathic infertility. *Fertil Steril* 2014 July 1. Pii:S0015-0282(14)00538-X (Epub ahead of print).

Resultats

5. DISCUSSIÓ

5.1. El promotor de TERRA en el ratolí

TERRA es va descriure per primer cop als telòmers de diferents tipus cel·lulars d'humà i de ratolí (Azzalin, *et al.*, 2007; Schoeftner i Blasco, 2008). Ara bé, essent el ratolí una de les primeres espècies on es va identificar la transcripció dels telòmers, tant el promotor com els mecanismes que regulen la síntesi de TERRA en aquesta espècie es mantenen totalment desconeguts. És més, a part d'aquells estudis inicials, quasi no existeixen dades sobre TERRA en cèl·lules de ratolí (López de Silanes, *et al.*, 2010; Deng, *et al.*, 2012b), i encapçalat s'ha aprofundit en l'anàlisi de les característiques de la funció de TERRA en aquesta espècie. Probablement, la identificació de la seqüència del promotor de TERRA a les regions subtelomèriques del genoma humà (Nergazde, *et al.*, 2009) hauria impulsat que l'estudi de la transcripció de TERRA s'hagi desenvolupat majoritàriament en línies cel·lulars humans (vegeu apartat 1.3.2.3) (Nergazde, *et al.*, 2009; Deng, *et al.*, 2012a; Sampl, *et al.*, 2012; Scheibe, *et al.*, 2013; Hijssen, *et al.*, 2013), deixant de banda al tres espècies relevantes per a l'estudi dels telòmers, com és el cas de ratolí.

Altrament, tot i que les cèl·lules humanes i de ratolí comparteixen enormes similituds pel que fa a l'estructura del complex telomèric i els components que el conformen (Griffith, *et al.*, 1999; Palm i de Lange, 2008; Linger i Price, 2009), els telòmers d'aquestes dues espècies difereixen notablement tant pel que fa al nombre de repeticions telomèriques com respecte la regulació de la seva longitud (vegeu apartat 1.3.1) (De Lange, *et al.*, 1990; Starling, *et al.*, 1990; Lansdorp, *et al.*, 1996; Zijlmans, *et al.*, 1997; Hemann i Greider, 2000; Smogorzewska i de Lange, 2002; Gomes, *et al.*, 2011; Vera, *et al.*, 2012). Així doncs, donat que la síntesi de TERRA es dóna tan a les cèl·lules de ratolí com a les humanes, es va proposar estudiar si l'origen de transcripció de TERRA era comú entre ambdues espècies.

Tal com ja s'ha comentat (vegeu apartat 4.1; Fig. 4.1.1), amb l'objectiu d'identificar i descriure el promotor de TERRA en ratolí es va dur a terme un assaig per gen reporter de seqüències subtelomèriques amb putativa activitat promotora. Els resultats obtinguts mitjançant les analisis *in silico* i *in vitro* van indicar que les particularitats que diferencien els telòmers humans i de ratolí es traduirien en diferències en el mecanisme de transcripció de TERRA (vegeu apartat 4.1). Tot i que no va ser possible identificar la seqüència promotora de TERRA en ratolí, se'n van poder identificar característiques importants que podrien estar relacionades amb les particularitats en la regulació de TERRA en aquesta espècie observades en estudis anteriors (Schoeftner i Blasco, 2008; Marion, *et al.*, 2009).

En primer lloc, es van identificar diferències en la distribució de les illes CpG subtelomèriques entre les dues espècies estudiades. A diferència de les repeticions telomèriques, les seqüències

subtelomèriques són riques en dinucleòtids CpG altament metilats tan en ratolí com en humà (Gonzalo, *et al.*, 2006; Yehzekel, *et al.*, 2008). No obstant, treballs anteriors (Steinert, *et al.*, 2004; Gonzalo, *et al.*, 2006; Pedram, *et al.*, 2006) suggerixen que els cromosomes d'aquestes dues espècies no comparteixen ni els patrons ni la regulació de la metilació subtelomèrica. En el nostre estudi, es va determinar *in silico* que la regió dels subtelòmers del genoma de ratolí localitzada fins 2300 pb *upstream* de les repeticions telomèriques no contenen regions riques en dinucleòtids CpG, contràriament a l'que s'ha escrit en humà (Nergazde, *et al.*, 2009). Això concordaria amb estudis anteriors on s'ha observat que la metilació de les illes CpG subtelomèriques provoca efectes opositors en les cèl·lules humanes i de ratolí pel que fa a la transcripció de TERRA (Azzalin, *et al.*, 2007; Schaeftner i Blasco, 2008; Nergazde, *et al.*, 2009). Concretament, mentre el bloqueig de l'expressió de les DNMT1 i 3b – principals responsables de la metilació del DNA – provoca l'acumulació de TERRA en línies cel·lulars humanes, en cèl·lules marembrionàries de ratolí desencadena la reducció dels nivells de TERRA. A més, la transcripció de TERRA varia notablement entre diferents tipus cel·lulars de ratolí (cèl·lules mare, cèl·lules pluripotents i induídes, i fibroblasts embrionaris) amb un gran equivalent de metilació de les regions subtelomèriques (Marion, *et al.*, 2009). Així doncs, si les regions subtelomèriques d'aquesta espècie no s'hi hauria de trobar la seqüència promotora de TERRA no contenen illes CpG, la regulació de la transcripció de TERRA en el ratolí s'hauria de donar per mecanismes alternatius. Alguns possibles candidats podrien ser l'acetilació d'histones o la unió als subtelòmers de factors heterocromàtics com CTCF (Deng, *et al.*, 2012a).

En segon lloc, cap de les seqüències analitzades candidates a contenir el promotor de TERRA de ratolí va mostrar activitat promotora (vegeu Fig. 4.1.5) malgrat dues d'aquestes seqüències (la Xq i la 18q) complien dues de les tres característiques atribuïdes a la seqüència promotora en humà. És a dir, estaven localitzades a prop de la zona adjacent a les regions telomèriques (fins 2300 pb aproximadament), i alhora eren seqüències comunes a una proporció dels subtelòmers (~20%) similar a l'observada en humà (~30%) (vegeu Fig. 4.1.4) – però no contenen illes CpG. Aleshores, quin seria el motiu pel qual cap d'aquestes dues seqüències (18q i Xq) va mostrar activitat promotora? Podria ser degut a la dificultat tècnica de clonar seqüències repetitives, ja que fàcilment formen estructures secundàries *in vivo* que impedeixen la seva correcta replicació, cosa que obstaculitzaria tan la seva clonació en cèl·lules bacterianes com la replicació de la seqüència del vector dins les cèl·lules eucariotes un cop transfectedes. De fet, durant el procés de clonació, es van haver de provar diferents mètodes d'extracció del DNA a bancs no es va aconseguir optimitzar l'obtenció del vector (vegeu apartat 3.3.7). Una altra possibilitat seria que les marcades diferències entre els telòmers humans i de ratolí pel que fa a la seva longitud (De Lange, *et al.*, 1990; Starling, *et al.*, 1990; Lansdorp, *et al.*, 1996; Zijlmans, *et al.*, 1997) podrien implicar diferències en les característiques de la seqüència promotora entre les dues espècies.

Per exemple, cal considerar que la seqüència promotora de TERRA, a part de no contenir illes CpG, podria trobar-se en una zona més *upstream* del telòmer en comparació a la localització observada al genoma humà (~2 kb) (Nergazde, *et al.*, 2009), la qual cosa podria estar relacionada amb el TPE (vegeu apartat 1.3.1). És a dir, la expressió de l'expressió génica exercida pels telòmers a les seqüències adjacents incrementa amb la longitud telomèrica (Baur, *et al.*, 2001; Benetti, *et al.*, 2007a), de manera que seria possible que el promotor de TERRA en ratolí necessitès estar més lluny de les repeticions telomèriques – en comparació amb el que s'ha observat en humà – per tal d'escapar de la repressió exercida per aquestes. Per comprovar aquesta suposició, caldria estendre l'anàlisi a d'altres regions dels subtelòmers del genoma de ratolí. Alhora, seria necessari coneixer completament les secuències subtelomèriques del genoma de ratolí ja que no tots els subtelòmers dels braços p han estat seqüenciats i només es coneix la seqüència completa de cinc subtelòmers dels braços q (2q, 5q, 11q, 18q i Xq). De totes formes, els nostres resultats proporcionen bases metodològiques i de coneixement per als futurs estudis dirigits a entendre la regulació de la transcripció de TERRA als telòmers d'aquesta espècie.

5.2. El paper de TERRA als telòmers de les cèl·lules germinals de mamífer

Els estudis dirigits a investigar l'estructura i funció dels telòmers eucariotes són molt nombrosos bàsicament gràcies al fet que estan estretament relacionats amb dues grans qüestions d'elevat interès científic i social: l'enveliment i la carcinogènesi (per més informació vegeu O'Sullivan i Karlseder, 2010 i Günes i Rudolph, 2013). En aquest sentit, són ben conegudes les funcions dels telòmers per la preservació de la integritat del genoma i el control de la via de replicativa de les cèl·lules. Dopototenes maneres, encara queden molts interrogants per resoldre sobre el manteniment i regulació de l'estructura del complex telomèric durant canvis i processos cel·lulars complexes com ara la diferenciació o la divisió cel·lular. En el cas concret de les cèl·lules germinals, malgrat que – entre d'altres funcions – els telòmers són imprescindibles per als processos meiòtics d'aparellament i sinapsi entre homòlegs (vegeu apartat 1.3.3) (Scherthan, *et al.*, 1996), la manca d'informació pel que fa a la regulació de la seva funció encara és molt més important.

Tal com s'ha explicat a la introducció (apartat 1.3.2.3), existeixen molts estudis coincidents en que TERRA seria un element constitutiu de l'estructura telomèrica essencial per al manteniment de la seva estabilitat (Azzalin, *et al.*, 2007; Yehezkel, *et al.*, 2008; Deng, *et al.*, 2009b; López de Silanes, *et al.*, 2010; Yehezkel, *et al.*, 2011; Deng, *et al.*, 2012a; Deng, *et al.*, 2012b). Així doncs, la importància dels telòmers durant la gametogènesi d'una banda, i el fet que TERRA

sembla ser una molècula altament conservada entre espècies i tipus cel·lulars de l'altra (cèl·lules tumorals, cèl·lules somàtiques i cèl·lules mare embrionàries) (Solovei, *et al.*, 1994; Azzalin, *et al.*, 2007; Schoeftner i Blasco, 2008; Zhang, *et al.*, 2009; Arnoult, *et al.*, 2012), suggeria que probablement TERRA t ambé formaria part dels telòmers de les cèl·lules germinals d'els mamífers. De fet, l'optimització de la combinació de les tècniques d'IF i RNA-FISH sobre mostres fresques de teixit ovàric fetal i teixit testicular adult tant d'humà com de ratolí (Reig-Viader, *et al.*, 2013; Reig-Viader, *et al.*, 2014a; Reig-Viader, *et al.*, 2014b) va permetre la detecció *in situ* de proteïnes i d'RNA, així com l'anàlisi de la seva distribució cel·lular. D'aquesta manera, va ser possible demostrar que, efectivament, TERRA forma *foci* discrets al nucli dels oòcits I fetales (a partir d'ara referits com a oòcits) i dels espermatòcits I de totes dues espècies model estudiades (humà i ratolí) (Fig. 1 de Reig-Viader, *et al.*, 2013; Figs. 1, i S1 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a).

Ara bé, en quin moment de la gametogènesi s'inicia la síntesi de TERRA? Tenint en compte que els principals processos cromosòmics on els telòmers intervenen directament (aparellament i sinapsi) succeeixen durant la primera profase de la meiosi, era d'esperar que la transcripció de TERRA es produís prèviament o a l'inici d'aquesta etapa. D'una banda, l'anàlisi detallada del nombre de senyals de TERRA per cèl·lula (d'ara en endavant "nivells de TERRA") – duta a terme en espermatòcits humans i de ratolí, i en oòcits humans – en les diferents etapes de la profase (Fig. 2 de Reig-Viader, *et al.*, 2013; Fig. 2 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a), va revelar la presència mantinguda de TERRA durant tota la profase, de leptotè a diplotè. D'altra banda, l'estudi mitjançant PCR quantitativa de la transcripció de TERRA (dels telòmers 5q i 11q) en diferents poblacions germinals de ratolí masculs enriquides per ACS (espermatogonis, espermatòcits I i II i espermàtides rodones; Fig. 2 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a) va permetre detectar productes de la transcripció dels telòmers als espermatogonis. Per tant, aquests resultats indicarien que la síntesi de TERRA ja s'estaria produint durant la fase proliferativa premeiotíca. Alhora, la quantificació de la transcripció de TERRA va revelar que el nombre de molècules d'aquest RNA incrementaria progressivament durant l'espermogènesi fins a la fase d'espermàtides rodones, etapa en què cauria significativament l'expressió (Fig. 2 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a). Aquest patró de transcripció de TERRA durant la primera onada de transcripció que té lloc en la gametogènesi (Kimmings, *et al.*, 2004) – ja que la segona es produeix durant la diferenciació de les espermàtides a espermatozoides. D'altra banda, el motiu pel qual aquest increment no s'aprecia en analitzar els nivells de TERRA mitjançant RNA-FISH durant la progressió de la profase pot ser degut a que (1) l'increment en el nombre de transcrits prodria estar camouflat pel fet que cadascun dels senyals de TERRA detectats per RNA-FISH pot corresponder a més d'una molècula d'RNA, i/o (2) les diferències en el nombre de transcrits en funció del cromosoma (en

el nostre cas e ls telòmers 5q i 11q) podrien compensar-se, em mascarant aquest increment, i impedint-ne la detecció mitjançant un ànalisi global dels nivells de TERRA. Alhora, els resultats de la quantificació de la síntesi de TERRA als espermatòcits I (Fig. 2 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a) mostren diferències pel que fa a la quantitat de molècules transcrites segons el telòmer analitzat només durant aquesta etapa de la profase I, moment en què el manteniment de l'estructura telomèrica seria crucial ja que e ls telòmers hi participen activament. Per tant, és possible que l'estat de l'estructura del telòmer exerceixi una influència directa sobre la presència nuclear de TERRA. De fet, estudis previs (Deng, *et al.*, 2012a; Sampl, *et al.*, 2012; Scheibe, *et al.*, 2013; Thijssen, *et al.*, 2013) suggereixen que un dels factors determinants per a la transcripció de TERRA seria l'estat del telòmer *per se*, degut tant a la seva longitud com al seu estat heterocromàtic.

Se sap que, un cop sintetitzat, TERRA té una vida mitjana més aviat llarga (de 3 a 8 hores *in vitro*) (Azzalin, *et al.*, 2007; Porro, *et al.*, 2014), és a dir, que la seva funció dins el nucli de la cèl·lula requereix que sigui estable en el temps. Probablement és per aquest motiu que pot exercir una funció estructural dinamic complex telomèric, proporcionant-li estabilitat a llarg termini. Així doncs, si TERRA contribuïs a l'estabilitat dels telòmers de les cèl·lules germinals, s'hauria de localitzar als extrems dels seus cromosomes. Per estudiar la distribució de TERRA al nucli de les cèl·lules germinals en relació als seus telòmers es va analitzar, paral·lelament als nivells de TERRA, la co-localització dels *foci* de TERRA amb els senyals de la proteïna telomèrica TRF2 en oòcits i espermatòcits I humans i de ratolí. D'aquesta manera, es van establir dos paràmetres: la proporció de telòmers que presentaven *foci* de TERRA, és a dir, telòmers TERRA-positius *vs.* telòmers TERRA-negatius; i la proporció de *foci* de TERRA que es localitzaven als telòmers, és a dir, *foci* de TERRA localitzats als telòmers *vs.* *foci* de TERRA fora del telòmer (al nucli). Així donc s, es va observar que, en efecte, part dels senyals de TERRA dels meiòcits primaris co-localitzaven amb la proteïna telomèrica TRF2, indicant una possible associació de TERRA amb l'estructura del telòmer (Figs. 1 i 3 de Reig-Viader, *et al.*, 2013; i Fig. 1 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a).

No obstant, el patró de distribució de TERRA per a cadascun dels tipus de cèl·lules germinals analitzats no era homogeni, sinó que variava en funció del gènere i del nombre de senyals detectats. Els espermatòcits I de les dues espècies van mostrar característiques similars: és on es van detectar majors nivells de TERRA, i quasi la meitat dels senyals de TERRA es localitzaven als telòmers, alhora que la mateixa proporció de telòmers presentava *foci* de TERRA (Fig. 1 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a). En canvi, els oòcits tant de ratolí com d'humà van mostrar diferències respecte els espermatòcits i també entre espècies. Els oòcits d'ambdues espècies presentaven un nombre menor de senyals de TERRA en comparació amb els espermatòcits I, especialment els oòcits humans (Fig. 2 de Reig-Viader, *et al.*, 2013; i Fig. 1 de Reig-Viader, *et al.*,

al., 2014a). Alhora, els nivells de TERRA als oòcits de ratolí eren superiors als dels humans, i precisament aquestes diferències en els nivells de TERRA es traduïren en diferències substancials pel que fa a la seva distribució respecte els telòmers. És a dir, els oòcits humans van mostrar una localització de TERRA als telòmers molt superior als oòcits de ratolí i als espermatòcits d'ambdues espècies (Fig. 1 de Reig-Viader, et al., 2014a). No obstant, a l'hora d'analitzar la proporció de telòmers amb senyals de TERRA, es va veure que els va alors observats en els oòcits eren menors que els dels espermatòcits d'ambdues espècies però no variaven entre els oòcits humans i de ratolí (Fig. 1 de Reig-Viader, et al., 2014a). Així doncs, sembla que existiria una regulació preferencial per la localització de TERRA a les telòmers segons si la cèl·lula germinal és masculina o femenina i segons els nivells de TERRA de la cèl·lula (Fig. 5.1).

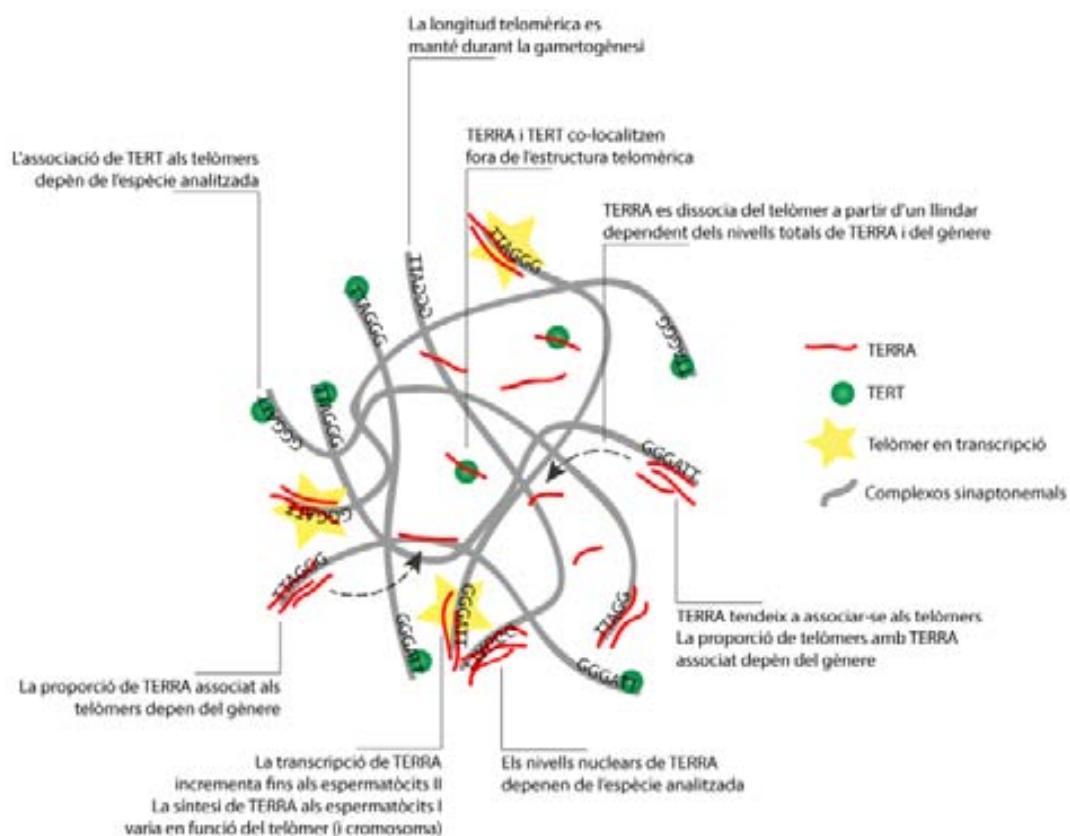


Figura 5.1. L'homeòstasi telomèrica de TERRA i TERT en les cèl·lules germinals de mamífer. Esquema resum dels principals resultats obtinguts en l'estudi de TERRA i de TERT en diferents tipus de cèl·lules germinals de ratolí i humà. La il·lustració representa un meiòcit en paquíte, però els resultats que s'indiquen són aplicables a d'altres etapes de l'espermatoxèesi. les fletxes discontinues representen la dissociació de TERRA del complex telomèric.

Per a profundir en la relació entre els nivells de TERRA i els dos paràmetres de localització telomèrica esmentats (la proporció de telòmers que presentaven *foci* de TERRA, i la proporció de *foci* de TERRA que es localitzaven als telòmers), es va analitzar si existia alguna correlació entre ells (Fig. S2 de Reig-Viader, et al., 2014a). En contrastar els nivells de TERRA contra la proporció de telòmers que presentaven *foci* de TERRA es va observar una correlació negativa

en els espermatòcits I de les dues espècies però no als oòcits. És a dir, la localització telomèrica de TERRA disminuïa amb l'increment de senyals de TERRA i, per tant, a majors nivells de TERRA, major era el nombre de *foci* de TERRA que es localitzava fora dels telòmers. Aquesta correlació negativa però, no es va detectar als oòcits humans i era molt poc marcada als oòcits de ratolí. La qual cosa suggeria que als oòcits humans (on s'havien observat els menors nivells de TERRA) la majoria de *foci* de TERRA detectats es trobaven associats als telòmers, mentre que als oòcits de ratolí part dels *foci* de TERRA es localitzaven fora del telòmer. En conjunt, aquests resultats indicarien que TERRA tendiria a localitzar-se als telòmers de les cèl·lules germinals fins al límit màxim de molècules de TERRA telomèriques. Sobrepassat aquest límit, TERRA seria directament alliberat al nucleoplasma un cop sintetitzat. De fet, tots quatre tipus cel·lulars (oòcits i espermatòcits humans i de ratolí) van presentar una correlació positiva estadísticament significativa entre els nivells de TERRA i la proporció de telòmers amb senyals de TERRA (Fig. S2 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a). Aquest fet dóna suport a la idea de que TERRA tendiria a mantenir-se unit als telòmers, potser fins que s'assolís una quantitat llindar de molècules de TERRA associades al complex telomèric (Fig. 5.1).

Però, quin és aquest llindar per a cadascun dels tipus cel·lulars? Malgrat les tècniques utilitzades en el present treball no permeten quantificar-lo, els nostres resultats suggereixen que el nombre límit de molècules de TERRA als telòmers l'assolirien abans les cèl·lules germinals femenines que les masculines. Per aquest motiu els oòcits humans mostren un grau de co-localització dels senyals de TERRA amb els telòmers tan elevat (Fig. 1 de Reig-Viader, *et al.*, 2013), perquè els nivells de TERRA d'aquestes cèl·lules es trobaria per sota el llindar esmentat, i la majoria de TERRA es mantindria unit als telòmers. Per aquesta mateixa raó, als oòcits humans no s'arriba a observar cap correlació negativa entre els nivells de TERRA i el grau de localització de TERRA als telòmers (Fig. S2 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a). Als oòcits de ratolí en canvi, aquesta correlació negativa sí que es detecta, alhora que disminueix marcadament la proporció de TERRA als telòmers – probablement perquè incrementa el nombre de senyals de TERRA del nucleoplasma (Figs. 1 i S2 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a). D'altra banda, el comportament nuclear de TERRA descrit per als oòcits no és vàlid per als espermatòcits. Aquests últims, tot i mostrar nivells superiors de TERRA en comparació amb els oòcits, presenten una major localització telomèrica de TERRA i una correlació negativa estadísticament significativa entre els nivells de TERRA i la seva localització als telòmers (Figs. 1 i S2 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a). Per tant, la regulació de la quantitat llindar de molècules de TERRA a partir de la qual aquest RNA seria alliberat del telòmer estaria subjecte al gènere de la cèl·lula germinal. De fet, en la literatura s'ha proposat la presència d'un llindar de característiques similars en llevats. Cusanelli i col·laboradors (2013) proposen que la transcripció de TERRA s'activaria a partir d'una determinada longitud mínima de repeticions telomèriques de manera que les molècules de

TERRA alliberades serien un mecanisme per al reclutament de la telomerasa a aquell telòmer concret. Així doncs, els nostres resultats donen suport a la idea de que la localització de TERRA als telòmers requereix una regulació molt precisa que depèn dels seus nivells d'expressió, tal i com apuntaven estudis previs, duts a terme en línies somàtiques humanes (Azzalin, *et al.*, 2007; Yehezkel, *et al.*, 2008; Deng, *et al.*, 2009b; Deng, *et al.*, 2012a; Deng, *et al.*, 2012b; Pfeiffer i Lingner, 2012). La qual cosa implicaria que la desregulació per sobre o per sota de la localització de TERRA als telòmers podría ser perjudicial per a l'homeostasi de l'estructura telomèrica. Per tant, TERRA seria necessari per a les cèl·lules germinals durant les etapes en que es produeixen importants moviments i canvis estructurals dels cromosomes – és a dir, durant les dues divisions meiotiques. D'aquesta manera, TERRA podria exercir una funció protectora dels telòmers de les cèl·lules germinals durant els nombrosos canvis que pateixen al llarg de la gametogènesi. I a més, existeix la possibilitat que, tal i com s'ha observat en línies cel·lulars tumorals (Arora, *et al.*, 2012), la mateixa transcripció de TERRA impulsés mecànicament els telòmers afavorint els moviments dels cromosomes.,

Com s'ha explicat anteriorment, no només es va observar senyals de TERRA associats als telòmers, sinó que també se'n van detectar en una localització no telomèrica, tal i com ja s'havia descrit anteriorment en cèl·lules somàtiques (Azzalin, *et al.*, 2007; Schoeftner i Blasco, 2008; Porro, *et al.*, 2010; Arnoult, *et al.*, 2012). Quina seria doncs, la funció d'aquestes molècules de TERRA en les cèl·lules germinals? Porro i col·laboradors (2010) van suggerir que les molècules de TERRA no s'associades als telòmers de cèl·lules somàtiques regularien negativament la telomerasa durant les fases G₁ i G₂ del cicle cel·lular. De fet, una de les funcions atribuïdes a TERRA que ha generat un fort debat fins al moment, és la inhibició de l'activitat telomerasa mitjançant el bloqueig de la seva subunitat TR (Schoeftner i Blasco, 2008; Yehezkel, *et al.*, 2008; Marion, *et al.*, 2009; Redon, *et al.*, 2010; Iglesias, *et al.*, 2011; Yehezkel, *et al.*, 2011; Arnoult, *et al.*, 2012; Farnung, *et al.*, 2012; Smirnova, *et al.*, 2013; Van Beneden, *et al.*, 2013). Alhora, les cèl·lules germinals són un dels poques tipus de cel·lulars de l'organisme adult que presenta activitat telomerasa (vegeu a partat 1.3.2.2). Per aquestes raons ens vam plantejar si existiria algun tipus de relació entre les molècules de TERRA lliures i l'enzim telomerasa en les cèl·lules germinals de mamífer. Es van analitzar la co-localització entre TERRA i TERT als diferents tipus de cèl·lules germinals estudiats en el present treball (Fig. 3 de Reig-Viader, *et al.*, 2013; i Fig. 5 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a). D'aquesta manera, no només es va poder observar que una (petita) part dels senyals detectats d'ambdues molècules co-localitzaven sinó que, a més, els percentatges de co-localització eren molt similars independentment del gènere o l'espècie analitzats. El més destacable però, va ser que una elevada proporció dels senyals de co-localització TERRA-TERT es situaven fora de l'estructura telomèrica (Fig. 5 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a). Per tant, seria possible que existís alguna relació entre ambdues

molècules quan aquestes no es troben associades a l'estructura telomèrica, la qual o bé té una funció regulada de forma molt estricta o bé està desregulada en les cèl·lules germinals. Alhora, l'associació entre TERRA i TERT no estaria lligada a característiques específiques ni d'espècie ni de gènere de les cèl·lules germinals.

5.3. La relació de la telomerasa amb els telòmers de les cèl·lules germinals de mamífer

El principal mecanisme utilitzat pels organismes a l'hora de mantenir la longitud dels telòmers de les seves cèl·lules és l'acció de l'enzim telomerasa (vegeu apartat 1.3.2.2). Pel que fa a les cèl·lules germinals de mamífer, en general s'accepta que la longitud telomèrica que requereix el zigot per dur a terme totes les divisions embrionàries subsegüents s'assoleix (almenys en part) durant la gametogènesi, i que l'activitat de la telomerasa n'és la responsable (vegeu apartat 1.3.3). No obstant, cal destacar que els resultats publicats en el moment d'iniciar el nostre estudi sobre la funció de la telomerasa en les cèl·lules germinals de mamífer eren poc convincents (vegeu apartat 1.3.3). A quest treballs, deixant de banda rares excepcions, es basaven en el *telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay* (Fajkus, 2006), un mètode que s'aplica molt freqüentment per estudiar l'activitat telomerasa, que requereix l'aïllament de l'enzim i per tant, la desnaturalització de l'estructura cel·lular. Durant aquest procés es perdren les possibles interaccions de l'enzim amb d'altres elements cel·lulars, fent molt difícil conèixer les condicions de la telomerasa *in vivo*. A més, l'aïllament de la proteïna implica que si a la cèl·lula existeixen tots els components que conformen el complex enzimàtic telomerasa, es detectarà activitat transcriptasa inversa, estigués aquest originalment actiu o inactiu dins la cèl·lula.

Davant d'aquesta limitació, una bona aproximació experimental per quantificar la presència i la localització de la telomerasa – o de qualsevol altra proteïna – dins la cèl·lula, i alhora estudiar la seva relació espacial amb els altres elements cel·lulars és el marcatge per immunofluorescència. Malauradament, els anticossos comercials contra aquesta proteïna presenten en general problemes d'especificitat, i probablement per aquesta raó els estudis en aquest sentit, i més especialment en cèl·lules germinals, són més aviat escassos i mostren resultats no concordants (Tanemura, *et al.*, 2005). En estos casos, va tenir l'oportunitat de disposar d'un anticòs contra la subunitat proteica de la telomerasa (TERT) que va demostrar una alta eficiència i especificitat, i que va permetre establir les bases de l'anàlisi que es va dur a terme amb un segon anticòs comercial contra la mateixa proteïna (vegeu apartat 3.4.3.2). D'aquesta manera es va poder confirmar que la telomerasa es troba al nucli de les cèl·lules germinals (Fig. 5 de Reig-Viader, *et al.*, 2013; i Figs. 3, 4 i S1 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a), tal com apuntaven estudis

previs (Wright, *et al.*, 1996; Eisenhauer, *et al.*, 1997; Ravindranath, *et al.*, 1997; Fujisawa, *et al.*, 1998; Betts i King, 1999; Yamamoto, *et al.*, 1999; Achi, *et al.*, 2000; Xu i Yang, 2000; Wright, *et al.*, 2001; Riou, *et al.*, 2005). A més, en analitzar la seva distribució nuclear, es va observar que no només una gran part de TERT es troava associada als telòmers de les cèl·lules germinals, sinó que aquesta associació es mantenía al llarg de la profase I de la meiosi – tant en mascle com en femella i en les dues espècies estudiades –, així com al llarg de la gametogènesi de ratolí (Fig. 3 de Reig-Viader, *et al.*, 2013; i Figs. 3 i 4 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a). De fet, mitjançant l'anàlisi per microscòpia confocal d'espermatòcits humans i de ratolí, i a partir de reconstruccions 3D de la distribució espacial dels complexos sinaptonemals en relació a la proteïna del complex shelterina TRF2 i a la telomerasa, es va poder determinar que tant TRF2 com TERT es troben a les regions telomèriques dels cromosomes, immediatament després de l'extrem del complex sinaptonemal. Tenint en compte que no existeixen estudis previs en la literatura que relacionin aquestes dues proteïnes ni pel que fa a interacció ni pel que fa a funció, la proximitat observada entre TRF2 i TERT (per sota els 200 nm de distància) (Figs. 4 i S4 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a), suggereix que ambdues proteïnes es trobarien interaccionant amb els elements del complex telomèric – possiblement amb les repeticions telomèriques – i per tant, formarien part de l'estructura del complex (Fig. 5.1). No obstant, la proporció de telòmers on s'observa TERT és molt similar entre cèl·lules germinals masculines i femenines de la mateixa espècie, però és significativament superior als espermatòcits i oòcits de ratolí en comparació amb els d'humà (Fig. 5 de Reig-Viader, *et al.*, 2013; Fig. 3 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a). Aquest fet, juntament amb les diferències observades entre espècies pel que fa a la distribució dels senyals de TERRA i TERT que co-localitzen als espermatòcits, suggereix que la regulació de la distribució nuclear de TERT a les cèl·lules germinals de mamífer de penen dels mecanismes que controlen l'homeòstasi telomèrica específics de cada espècie (Fig. 5.1).

El fet que TERT es trobi interaccionant amb el complex telomèric podria implicar que, efectivament, durant la formació de les cèl·lules germinals, els seus telòmers fossin elongats mitjançant l'acció de la telomerasa. Fa uns anys es va determinar que els telòmers dels espermatozoïdes són més llargs que els de les cèl·lules somàtiques en general (De Lange, *et al.*, 1990; Alissopp, *et al.*, 1992; Tanemura, *et al.*, 2005). Dopototmaneres, no està clar que la longitud telomèrica de l'espermatozoide estàndard sigui la cèl·lula responsable de proporcionar una longitud telomèrica de partida per a les subseqüents divisions embrionàries. De fet, existeixen nombroses evidències en diferents espècies de que l'embrió pateix una important elongació dels telòmers durant els primers estadis del desenvolupament (Wright, *et al.*, 1996; Betts i King, 1999; Xu i Yang, 2000; Wright, *et al.*, 2001; Liu, *et al.*, 2007b; Wang, *et al.*, 2013). En el present treball, es va mesurar la longitud dels telòmers de diferents tipus de cèl·lules germinals masculines de ratolí (obtinguts per FACS) mitjançant la

tècnica de Q-FISH (Fig. 6 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a). D'aquesta manera, es va poder comprovar que no existien diferències significatives entre la longitud dels telòmers de les etapes d'espermatozoi, espermatozit I, espermatozit II i espermàtides rodones, la qual cosa concorda amb resultats previs obtinguts en cèl·lules germinals humans (Jørgensen, *et al.*, 2013). Per tant, els nostres resultats indiquen que, almenys pel que fa a l'espermatozogenesi de ratolí, els telòmers no s'allargarien durant el procés de formació dels gàmetes per part de la telomerasa.

D'altra banda, malgrat que el conjunt de resultats dels treballs nous analitza la longitud telomèrica de les cèl·lules germinals en mamífers és poc concloent (vegeu apartat 1.3.3), en la literatura s'assumeix que la longitud dels telòmers és menor en humà que en ratolí, i que en les cèl·lules germinals masculines seria superior en comparació amb les cèl·lules germinals femenines. En el nostre estudi, la mesura de la longitud de les repeticions telomèriques mitjançant unitats arbitràries de fluorescència va permetre comprovar que la diferència pel que fa a la longitud telomèrica entre les cèl·lules humanes i de ratolí (De Lange, *et al.*, 1990; Starling, *et al.*, 1990; Lansdorp, *et al.*, 1996; Zijlmans, *et al.*, 1997; Hemann i Greider, 2000; Smogorzewska i de Lange, 2002; Gomes, *et al.*, 2011; Vera, *et al.*, 2012) es reproduïa també en les cèl·lules germinals, essent més llargs els telòmers de les cèl·lules de ratolí (Fig. 6 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a). Alhora, a partir de la comparació directa de la longitud dels telòmers d'espermatozits i oòcits de ratolí (Fig. 6 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a) es va poder confirmar que les cèl·lules germinals femenines presentarien una llombra menor de repeticions telomèriques. De fet, tots els tipus de cèl·lules germinals masculines de ratolí analitzades (espermatozoides, espermatozits I i II, i espermàtides rodones) presentaven longituds telomèriques superiors a les observades en els oòcits de la mateixa espècie, fins al punt que fins i tot la longitud telomèrica de les cèl·lules somàtiques humanes utilitzades com a control de referència (cèl·lules HeLa) no era massa més baixa que la dels oòcits de ratolí (Fig. 6 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a). Per tant, els nostres resultats semblen indicar que existirien diferències pel que fa als mecanismes de regulació de la longitud telomèrica entre les cèl·lules germinals masculines i femenines dels mamífers (Fig. 5.1).

Tot i l'elevada proporció de telòmers amb TERT associada als espermatozits i oòcits de ratolí, les importants diferències observades entre la longitud telomèrica d'ambdós tipus cel·lulars, indicarien que la telomerasa no hi actuaria com a transcriptasa inversa. De fet, s'ha vist que la telomerasa s'expressa a les cèl·lules somàtiques del ratolí adult (Greenberg, *et al.*, 1998), la qual cosa explicaria que les cèl·lules d'aquesta espècie presentin uns telòmers tan llargs durant tota la seva vida tot i que els telòmers dels seus oòcits siguin curts. Aleshores, per què és necessari que la telomerasa es localitzi als telòmers al llarg de tota l'espermatozogenesi si no hi duu a terme la funció d'elongació de les repeticions telomèriques? En els darrers anys, diversos estudis han mostrat evidències de que la telomerasa, i més concretament la seva subunitat proteica TERT,

podria tenir altres funcions més enllà de la seva activitat transcriptasa inversa. S'ha vist, per exemple, que l'associació de TERT a les telòmers pot promoure la proliferació cel·lular i/o allargar la vida de la cèl·lula sense necessitat d'incrementar la longitud de les repeticions telomèriques (Zhu, *et al.*, 1999; Kim, *et al.*, 2003; Mukherjee, *et al.*, 2011). També s'ha descrit que TERT estaria involucrada en vies de senyalització d'expressió gènica (Choi, *et al.*, 2008; Park, *et al.*, 2009; Shkreli, *et al.*, 2011). En particular, promouria l'expressió de factors involucrats en la resposta contra dany al DNA, intervenint també en la regulació d'aquesta resposta mitjançant la seva acció sobre l'heterocromatina telomèrica (Sharma, *et al.*, 2003; Masutomi, *et al.*, 2005). Alhora, se li atribueixen funcions de caràcter més estructural dins el telòmer, ja que s'ha vist que l'expressió de TERT influiria la interacció entre els telòmers i la matriu nuclear també sense alterar la longitud de les repeticions telomèriques (Sharma, *et al.*, 2003). De fet, s'ha proposat que TERT interaccionaria amb el DNA genòmic en general, però que la seva interacció amb els telòmers seria dependent de la presència/absència de la subunitat TR (Sharma, *et al.*, 2003). Tenint en compte que l'activitat de la telomerasa depèn també directament de la presència de la subunitat TR, això explicaria per què els estudis esmentats prèviament en què s'utilitzava l'activitat telomerasa (mitjançant el TRAP assay) com a quantificació de la presència i/o transcripció d'aquest enzim, obtenien per a determinades etapes de la gametogènesi valors tan elevats mentre els nostres resultats indiquen que l'associació de TERT als telòmers de les cèl·lules germinals es mantindria invariable. És a dir, un estudi de Yashima i col·laboradors (1998) on s'analitza la presència d'hTR (subunitat TR humana) en diferents poblacions de cèl·lules germinals humanes, observaven expressió d'hTR a les espermatogonies, la qual incrementa significativament als espermatòcits primaris, i disminueix als secundaris fins que no se n'observa a les espermàtides. En oòcits preovulatoris en canvi, l'expressió de hTR és més aviat baixa (que no nul·la), fins i tot més que als espermatogonis (Yashima, *et al.*, 1998). Per tant, seria possible que la fluctuació en l'activitat telomerasa detectada en els estudis per TRAP assay estigués lligada als canvis en l'expressió de TR al llarg de la gametogènesi, la qual cosa no implicaria necessàriament que l'enzim estigui duent a terme l'elongació del DNA telomèric.

En la literatura (Scherthan, 2007; Adelfalk, *et al.*, 2009; Daniel, *et al.*, 2014), s'ha demostrat que els telòmers de les cèl·lules germinals de mamífer requeririen elements addicionals als de les cèl·lules somàtiques per poder dur a terme la seva funció durant la gametogènesi. Per exemple, se sap que per a la unió dels telòmers a l'embolcall nuclear hi intervenen elements del complex shelterina (Scherthan, *et al.*, 2000), com cohesines (Liebe, *et al.*, 2004; Adelfalk, *et al.*, 2009), elements del complex sinaptonemal (Liebe, *et al.*, 2004) i/o d'altres factors telomèrics transitoris (Lombard i Guarente, 2000; Scherthan, *et al.*, 2000; Daniel, *et al.*, 2014). Per tant, en base als nostres resultats pel que fa a l'estructura telomèrica en condicions fisiològiques,

proposem que TERRA i TERT formarien part d'aquests elements addicionals específics de la gametogènesi (Fig. 5.1). D'aquesta manera, TERRA i TERT s'associarien a les repeticions telomèriques, i interaccionant amb les proteïnes del complex shelterina, per tal de reforçar l'estabilitat de l'estructura telomèrica al llarg de la gametogènesi. Donat que ambdues molècules són molècules de mida gran – tant en humà com en ratolí TERRA té d'entre 100 i més de 9000 bases (Azzalin, *et al.*, 2007) i TERT té una massa de 127Da (www.uniprot.org) –, aquest reforç podria venir donat per la seva mateixa interacció amb el DNA telomèric. Per exemple, TERRA podría formar una estructura secundaria de quàdruplex G amb el DNA telomèric, tal com s'ha vist *in vitro* en línies somàtiques (Xu i Komiyama, 2012). A més, més enllà de la interacció amb los telòmers *per se*, tant TERRA com TERT podrían contribuir al mantenimiento de l'estatus heterocromático de los telòmers (Masutomi, *et al.*, 2005; Deng, *et al.*, 2009b).

5.4. L'homeòstasi telomèrica i la infertilitat humana

Un aspecte caracteritzada l'homeòstasi telomèrica de TERRA i TERT a les cèl·lules germinals (humanes i de ratolí) en condicions fisiològiques, es va plantejar si aquesta homeòstasi es veuria alterada a les cèl·lules germinals d'individus amb problemes de fertilitat.

La reproducció humana és un procés molt poc eficient tenint en compte que la seva taxa de fecunditat es troba al voltant de només un 20% (Wilcox, *et al.*, 1995). A Europa, al voltant del 15% de les parelles no aconsegueix embaràs dins el termini d'un any i a caben recurrent a l'ajuda de tractaments mèdics de fertilitat (Jungwirth, *et al.*, 2013). Una de cada vuit parelles té problemes quan intenta concebre el primer fill i una de cada sis quan intenta tenir un segon fill (Jungwirth, *et al.*, 2013). De fet, als pocs d'esenvolupats, la incidència de problemes reproductius en la població ha crescut tan els últims anys que la infertilitat es considera avui dia una epidèmia (Lunenfeld, *et al.*, 2004; Mascarenhas, *et al.*, 2012; Silber i Barbey, 2012). Fins al moment però, l'única causa que s'ha pogut relacionar amb total certesa amb aquest augment de la infertilitat en la població és el creixent increment de l'edat de la dona a l'hora de tenir el primer fill, ja que la viabilitat dels oòцитs va disminuint amb l'edat (Hunt i Hassold, 2008; Nagaoka, *et al.*, 2012). Per aquest motiu, la majoria dels estudis en aquest sentit han anat dirigits principalment a entendre l'origen de la infertilitat femenina. No obstant, els últims anys, el factor masculí de la infertilitat humana ha anat guanyant importància, de manera que molts estudis n'han intentat identificar els possibles origen/s, diagnòstic i tractaments (Cram, *et al.*, 2001; Hann, *et al.*, 2011; Hamada, *et al.*, 2012; Jungwirth, *et al.*, 2013). D'aquesta manera s'ha demostrat que factors internos i externos d'un individu (malalties congènites, reorganitzacions

cromosòmiques, etc.), com extrínsecos (exposició a tòxics, tractaments farmacològics, malalties, etc.) poden comportar errors durant l'espermatogènesi, i en conseqüència la generació d'espermatozoides alterats i/o incapços de fecundar, o fins i tot la interrupció del mateix procés (per a més informació vegeu Egozcue, *et al.*, 2000a; Cram, *et al.*, 2001; Poongothai, *et al.*, 2009; Hann, *et al.*, 2011; Hamada, *et al.*, 2012). Malgrat tot, en almenys un 30-40% dels casos la infertilitat masculina és classificada com idiopàtica, és a dir, amb una reducció de la qualitat del semen d'origen desconegut (Mascarenhas, *et al.*, 2012; Jungwirth, *et al.*, 2013). Aquests pacients no presenten una història prèvia de malalties que afecten la fertilitat i tenen resultats normals en l'exploració física i endocrina (Jungwirth, *et al.*, 2013). Tot i això, poden presentar una reducció en el nombre d'espermatozoides (oligozoospermia), una reducció de la motilitat espermàtica (astenozoospermia), i/o múltiples anomalies en els espermatozoides (teratozoospermia) (Jungwirth, *et al.*, 2013).

A l'hora d'avaluar les causes de la manifestació d'un fenotíp infètil existeixen protocols d'anàlisi del semen com són el seminograma clàssic – el qual n'analitza la qualitat a partir del nombre, la morfologia i la mobilitat dels espermatozoides, entre d'altres paràmetres (Jungwirth, *et al.*, 2013) – o l'estudi d'aneuploidies mitjançant FISH en espermatozoides (Miharu, *et al.*, 1994; Blanco, *et al.*, 1997; Egozcue, *et al.*, 1997; Pang, *et al.*, 1999; Veggetti, *et al.*, 2000; Oliver-Bonet, *et al.*, 2003; Anton, *et al.*, 2004; Oliver-Bonet, *et al.*, 2005; Uroz, *et al.*, 2009). Altrament, un mètode àmpliament utilitzat per aquest fi és l'estudi citogenètic de l'aparellament, la recombinació i la segregació dels homòlegs en espermatòcits I i II a partir de biòpsies de testicle de pacients. L'estudi citogenètic dels espermatòcits es pot dur a terme bé a partir de citogenètica clàssica (Evans, *et al.*, 1964; Lange, *et al.*, 1997; Vendrell, *et al.*, 1999; Egozcue, *et al.*, 2000b; Egozcue, *et al.*, 2005; Uroz, *et al.*, 2011), bé mitjançant marcatge per immunofluorescència de diferents proteïnes implicades en la meiosi – per exemple SYCP1 i 3, MLH1, γH2AX i proteïnes centromèriques, entre d'altres – (Gonsalves, *et al.*, 2004; Codina-Pascual, *et al.*, 2005; Oliver-Bonet, *et al.*, 2005; Sun, *et al.*, 2005; Sun, *et al.*, 2006; Ferguson, *et al.*, 2007; Sun, *et al.*, 2008; De Vries, *et al.*, 2013). Aquests mètodes no només permeten aprofundir en el coneixement de les causes dels problemes de fertilitat, sinó que són molt útils per detectar l'origen d'azoospermia o oligozoospermia (absència o reducció en el nombre d'espermatozoides, respectivament). D'aquesta manera, s'ha vist que els individus diagnosticats amb infertilitat idiopàtica presenten un retard en la formació del complex sinaptonemal, asinapsis entre cromosomes homòlegs, i un elevat nombre de bivalents sense quiassmes, entre d'altres característiques. Des del punt de vista de la recombinació, cal destacar però, que tots els estudis duts a terme fins al moment (Gonsalves, *et al.*, 2004; Codina-Pascual, *et al.*, 2005; Oliver-Bonet, *et al.*, 2005; Sun, *et al.*, 2005; Sun, *et al.*, 2006; Ferguson, *et al.*, 2007; Sun, *et al.*, 2008; De Vries, *et al.*, 2013), han detectat nombre menor de foci d'MLH1 en comparació amb

els controls, i per tant una reducció en els esdeveniments de recombinació entre cromosomes homòlegs.

En el nostre cas, es va estudiar els espermatòcits i de biòpsies testiculars de quatre pacients diagnosticats amb infertilitat idiopàtica d'origen no obstructiu (Reig-Viader, *et al.*, 2014b). Els quatre pacients estudiaven entre els 20 i els 39 anys d'edat, dos dels quals presentaven criptozoospèrmia (absència d'espermatozoides a l'ejaculat), un mostrava azoospèrmia (absència d'espermatozoides) i un altre oligoastenozoospèrmia (reducció en el nombre i la motilitat dels espermatozoides). Els paràmetres estudiats en aquests pacients es van contrastar amb l'estudi dels espermatozoides d'un individu control de 48 anys amb fertilitat provada. El primer аналisis dut a terme en les nostres mostres de biòpsies de testicle humà va ser l'estudi de la recombinació a partir del nombre de senyals de la proteïna MLH1 en espermatòcits en paquet (Fig. 1 de Reig-Viader, *et al.*, 2014b). Els nostres resultats concorden amb la majoria de treballs en els que s'ha dut a terme la mateixa aproximació (Gonsalves, *et al.*, 2004; Codina-Pascual, *et al.*, 2005; Oliver-Bonet, *et al.*, 2005; Sun, *et al.*, 2005; Sun, *et al.*, 2006; Ferguson, *et al.*, 2007; Sun, *et al.*, 2008; De Vries, *et al.*, 2013), ja que observen una reducció en el nombre de COs i un increment en el percentatge de complexos sinaptonemals sense senyal d'MLH1. Donat que (1) els mecanismes causants d'una disminució de la recombinació entre homòlegs són encara desconeguts, i que, (2) segons els nostres resultats en mostres control, TERRA i TERT formarien part de l'estructura telomèrica (Reig-Viader, *et al.*, 2013; Reig-Viader, *et al.*, 2014a), es va voler determinar si existiria alguna relació entre els processos cromosòmics que es donen en els espermatòcits i la seva homeòstasi telomèrica (des del punt de vista de TERRA i TERT).

Pel que fa a TERRA, es va observar una reducció en els nivells de TERRA, així com l'alteració de la seva distribució als telòmers en els espermatòcits dels individus infèrtils (Fig. 2 de Reig-Viader, *et al.*, 2014b). Concretament, es va observar un increment en la proporció de *foci* de TERRA associats als telòmers en dos dels quatre pacients. No obstant, tal i com ja havíem observat en els diferents tipus de cèl·lules germinals estudiats en els individus control (Fig. 2 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a), la proporció de telòmers que presentaven senyals de TERRA es mantenía molt similar entre els dos tipus d'espermatòcits estudiats. L'increment en la proporció de TERRA als telòmers als espermatòcits en algunes mostres d'infèrtils, podria estar relacionat amb el paper de TERRA en el manteniment de l'estructura telomèrica (vegeu apartat 1.3.2.3). És a dir, aquest augment en la tendència de TERRA per unir-se als telòmers podria indicar que els l'estructura telomèrica d'aquestes cèl·lules necessitarien un reforç extra com a conseqüència d'alguna dany o d'alteració de la seva homeòstasi. Si alhora es té en compte les correlacions entre els nivells de TERRA i els paràmetres de co-localització (Fig. 2 de Reig-Viader, *et al.*, 2014b), de nou només es va observar diferències en comparació amb el control en les

correlacions d els nivells d e TERRA *vs.* la localització de TERRA als telòmers. Per tant, possiblement els nivells de TERRA no assolirien el llindar a partir del qual les molècules de TERRA serien alliberades d e l 'estructura telomèrica u n cop si s'etitzades, la qual cosa concordaria amb el que a punten Cusanelli i col·laboradors (2013) pel que fa a un possible llindar de la síntesi de TERRA dependent de l'erosió dels telòmers. En conjunt, aquests resultats suggereixen una desregulació de l'homeòstasi telomèrica en els espermatòcits dels individus infèrtils. D 'una banda, seria possible que l 'estructura del telòmer *per se* estigués alterada en aquestes cèl·lules i això modifiqués el comportament d els mecanismes reguladors de la distribució telomèrica de TERRA per tal de compensar aquesta alteració. D'altra banda, múltiples estudis han demostrat que tant la disminució (Deng, *et al.*, 2009b; Deng, *et al.*, 2012b) com l'augment de la síntesi de TERRA (Azzalin, *et al.*, 2007; Yehezkel, *et al.*, 2008; Deng, *et al.*, 2012a; Peiffer i Lingner, 2012) provoquen una desregulació de l'homeòstasi telomèrica que també inclouria la desregulació de TERRA, la qual contribuiria a l'alteració global de l 'estructura telomèrica en aquests pacients.

Pel que fa a la distribució nuclear de TERT en els espermatòcits I dels individus analitzats, es va observar un canvi significatiu en la seva localització telomèrica, però no en la seva co-localització amb TERRA (Fig. 3 de Reggi-Viader, *et al.*, 2014b). Als espermatòcits dels individus infèrtils, TERT tendría a trobar-se dissociada del telòmer, però aquesta dissociació no implicaria un reclutament d'aquest en zim per part de TERRA o viceversa. El fet que TERT tendeixi a dissociar-se dels telòmers podria ser un indicador de disruptió de l'estructura telomèrica. De fet, un estudi de Sharma i col·laboradors (2003) relaciona la localització telomèrica de TERT amb la modificació de l'associació dels telòmers a l'embolcall nuclear, la qual cosa promou l'expressió de gens de reparació del DNA. Així doncs, l'alteració del patró de localització de TERT als telòmers podria tenir conseqüències perjudicials tan per a l'estructura telomèrica com per a la reparació dels DSBs que es produeixen durant la profase I de la meiosi per tal de donar lloc a COs.

D'altra banda, la co-localització de TERRA i TERT era molt similar entre els pacients i també en els espermatòcits I de l 'individu control (Fig. 3 de Reggi-Viader, *et al.*, 2014b). Per tant, l'alteració de la dinàmica i/o la funció tant de TERT com de TERRA en aquestes cèl·lules es trobaria sobretot a nivell de l'homeòstasi telomèrica, sense afectar la possible relació existent entre aquestes dues molècules fora del complex telomèric. En conseqüència, en el cas que TERRA fos un inhibidor de la telomerasa, no hauriem de trobar diferències massa marcades entre la longitud telomèrica de les diferents mostres analitzades. Cal esmentar però, que l'escurçament telomèric molt sovint s'ha relacionat amb la disruptió dels processos gametogènics (Liu, *et al.*, 2002a; Liu, *et al.*, 2002b; Liu, *et al.*, 2004; Treff, *et al.*, 2011).

Alhora, estudis on mesuren la longitud telomèrica d'espermatozoïdes humans indiquen que la longitud telomèrica estaria reduïda en pacients amb infertilitat idiopàtica (Baird, *et al.*, 2006; Turner i Hartshorne, 2013; Thilagavathi, *et al.*, 2013a; Thilagavathi, *et al.*, 2013b). Cal destacar però, que el fet que tots aquests estudis s'hagin dut a terme en espermatozoïdes fa que els mecanismes referents a la regulació de la longitud telomèrica durant la gametogènesi encara no s'hagin escrit. En mesurar la longitud telomèrica dels espermatòcits I de les mostres dels individus infèrtils es va observar que els telòmers eren significativament més llargs en aquestes cèl·lules i en les cèl·lules SYCP3(-) (les quals inclouen cèl·lules germinals que no són espermatòcits I), en comparació amb les cèl·lules HeLa (Fig. 4 de Reig-Viader, *et al.*, 2014b), la qual cosa concorda amb els nostres resultats previs en les mostres control (Fig. 6 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a) i amb la literatura (De Lange, *et al.*, 1990; Allsopp, *et al.*, 1992; Baird, *et al.*, 2006). Aquests resultats suggerixen que les cèl·lules germinals humanes elongarien els seus telòmers en algun moment de l'process de gametogènesi, probablement durant les replicacions del DNA que tenen lloc en la proliferació mitòtica dels espermatogonis, ja que és durant la fase S del cicle quan la telomerasa és activa (Tomlinson, *et al.*, 2006). No obstant, donats els nous resultats obtinguts de l'anàlisi de la longitud telomèrica al llarg de l'espermatogènesi de ratolí (Fig. 6 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a), existeix la possibilitat que l'elongació dels telòmers es produeixi prèviament a l'inici del procés, per exemple durant la diferenciació i proliferació de les PGCs en l'embrió. Curiosament, no es va trobar un patró diferencial pel que fa a les longituds telomèriques dels espermatòcits I dels pacients infèrtils en comparació amb els de l'individu control (Fig. 4 de Reig-Viader, *et al.*, 2014b). No obstant, sí que es va observar una notable variabilitat entre individus, la qual es manifestava en les espermatòcits com en les cèl·lules SYCP3(-), que a més es troava dins els rangs publicats en estudis anteriors (De Lange, *et al.*, 1990; Allsopp, *et al.*, 1992; Lansdorp, *et al.*, 1996; Baird, *et al.*, 2003; Baird, *et al.*, 2006). Així doncs, sembla factible que ni els canvis en els nivells de TERRA, ni la localització telomèrica tant de TERRA com de TERT promourien cap efecte directe sobre la longitud dels telòmers dels espermatòcits I dels individus analitzats, donant suport a la idea de que ambdues molècules tindrien una funció estructural com a components del complex telomèric a les cèl·lules germinals – tal com s'havia apuntat prèviament en cèl·lules somàtiques (Zhu, *et al.*, 1999; Sharma, *et al.*, 2003; Kim, *et al.*, 2003; Masutomi, *et al.*, 2005; Azzalin, *et al.*, 2007; Deng, *et al.*, 2009b; López de Silanes, *et al.*, 2010; Mukherjee, *et al.*, 2011; Deng, *et al.*, 2012b).

Aleshores, com influirien tots aquests canvis detectats de TERRA i TERT als processos cromosòmics que tenen lloc durant la profase I de la meiosi i, en últim terme, en la producció de gàmetes viables? Seria possible que el bloqueig i/o alteració de l'espermatogènesi vinguessin donats per la suma de l'alteració de tots els paràmetres analitzats (nombre de COS, ni vells i

distribució de TERRA, i distribució de TERT) als espermatòcits I dels individus infèrtils. És a dir, d'una banda, és ben sabut que la reducció en el nombre de COs pot donar problemes en el moment de la segregació dels homòlegs a anafase I, per exemple activant el *spindle assembly checkpoint* (vegeu apartat 1.1.1). D'altra banda, la pèrdua de protecció dels telòmers pot influir negativament en l'aparellament i sinapsi dels homòlegs. Alhora, podria activar els mecanismes de *checkpoint* de paquïtè via ATR/ATM, ja que aquests formen part la resposta de reparació del DNA que s'activa quan es produeix dany al complex telomèric i la cèl·lula identifica el DNA telomèric com a DNA-SBs (veure a punts 3 i 4). D'altres, si es produeix l'activació d'aquests mecanismes, es podríen produir cicles de fusió i trencament dels cromosomes degut a la fusió entre telòmers danyats de diferents cromosomes. Una altra possibilitat a tenir en compte és que, com s'ha explicat anteriorment, s'ha vist que l'expressió de TERT tindria influència sobre la interacció entre els telòmers i la matríeu nuclear i, tot i que això només s'ha pogut veure en cèl·lules somàtiques (Sharma, *et al.*, 2003), podria afectar també la dinàmica dels telòmers en els processos d'aparellament i sinapsi via la seva associació a l'embolcall nuclear (veure apunt 1). Pel que fa a TERRA, precisament un estudi recent dut a terme en llevats indica que l'acumulació de TERRA als telòmers de les cèl·lules de llevat és imprescindible per a que es produeixi recombinació entre telòmers per tal de mantenir la longitud de les repeticions telomèriques (Yu i Kao, 2010). Cal destacar també que, com s'ha esmentat prèviament, Arora i col·laboradors (2012) van observar que la transcripció dels telòmers afavoria els seu desplaçament dins el nucli. Així doncs, seria possible que existís una relació directa entre l'estat de l'estructura telomèrica i el procés de recombinació entre homòlegs de la meiosi.

Contràriament al que s'ha vist en humà, el ratolí, en condicions naturals, no presenta infertilitat deguda a aberracions en la formació de les gàmetes (Kalmbach, *et al.*, 2013; Morelli i Cohen, 2005; Keefe, *et al.*, 2007), la qual cosa precisament s'atribueix, en part, a l'elevat nombre de repeticions telomèriques que tenen els extrems dels seus cromosomes (Liu, *et al.*, 2002b; Keefe i Liu, 2009). Els nostres resultats de l'estudi de mostres control de ratolí i d'humà van mostrar una elevada localització de TERT als telòmers de les cèl·lules germinals de ratolí tan femenines com masculines (Figs. 3 i 4 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a), tot i la curta longitud dels telòmers observada als oòcits de ratolí (Fig. 6 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a). Contràriament, TERT quasi no es troava associada als telòmers de les cèl·lules germinals humans, tot i que els espermatòcits I presentaven telòmers més llargs que els oòcits I de ratolí (Figs. 3 i 6 de Reig-Viader, *et al.*, 2014a). En analitzar els espermatòcits I dels pacients infèrtils, hem observat una disminució significativa en la localització telomèrica de TERT (Fig. 3 de Reig-Viader, *et al.*, 2014b). Per tant, sembla plausible que, tal com s'ha descrit en cèl·lules somàtiques (Zhu, *et al.*, 1999; Sharma, *et al.*, 2003; Kim, *et al.*, 2003; Masutomi, *et al.*, 2005), la manca o la insuficient protecció per part del complex telomèric de les cèl·lules germinals

humanes exposaria aquestes cèl·lules a una major probabilitat d'epatir instabilitat cromosòmica, i per tant implocaria la disruptió de la gametogènesi. No obstant, cal tenir en consideració que Liu i col·laboradors (2002a; 2004) van trobar alteracions en el procés de meiosi a la quarta generació de ratolins KO per la telomerasa, els quals presentaven telòmers més curts del normal. Aquests ratolins però, estaven modificats per al gen de TR (Blasco, *et al.*, 1997) i, tot i que l'associació de TERT als telòmers disminueix a les cèl·lules dels ratolins KO per TR, aquesta associació no s'aboleix del tot (Sharma, *et al.*, 2003). A més, donat que calen tres generacions de ratolins KO per TR perquè aparegui el fenotíp infèrtil tot i que, segons els nostres resultats, els oòcits ja tindrien telòmers curts, sembla probable que l'associació de TERT als telòmers *per se* podria contribuir al risc de l'aparició d'instabilitat genòmica en aquests ratolins generada per l'escurçament del DNA telomèric.

En resum, pel que fa a TERRA, els nostres resultats indiquen que la seva regulació requereix unes premisses molt acurades, i que alhora estaria relacionada tant amb les característiques fisiològiques de les cèl·lules (gènere) com amb el seu estatus (individus fertils/infèrtils). Per tant TERRA no només formaria part dels telòmers de les cèl·lules germinals sinó que també estaria directament implicat en la regulació de l'homeòstasi de l'estructura telomèrica. En aquest mateix sentit, la subunitat TERT de la telomerasa seria també un component imprescindible per al manteniment de l'estabilitat de l'estructura telomèrica al llarg del procés d'espermatogènesi, la funció de la qual seria independent de la longitud del DNA telomèric. D'aquesta manera, en condicions normals, no es produiria escurçament dels telòmers durant la formació dels gàmetes, sinó que més aviat seria una conseqüència de la disruptió del desenvolupament de les esdeveniments cromosòmics que tenen lloc durant aquest procés tan llarg i complex. Per últim, les diferències que existeixen entre els telòmers humans i de ratolí semblen ser prou importants com perquè l'homeòstasi telomèrica no es reguli de la mateixa manera en ambdues espècies, tot i que, donat que formen part de la classe dels mamífers, comparteixen els components del complex telomèric. Així doncs, el nostre estudi no fa sinó reafirmar el fet que, coincidint amb el que apunten treballs previs, la funció dels telòmers en les cèl·lules germinals és absolutament essencial per al desenvolupament dels gàmetes. A l'hora, amb TERRA i TERT com a nous components de l'estructura telomèrica o la quantificació de la transcripció dels telòmers a les cèl·lules germinals, assenta les bases per a noves àrees de recerca dins aquest camp que serien interessants d'aprofundir-hi en el futur.

6. CONCLUSIONS

1. L'estudi molecular dels subtelòmers de ratolí ha revelat que la seqüència del promotor de TERRA en aquesta espècie presenta importants diferències pel que fa a les seves característiques en comparació amb el que s'ha descrit per al promotor de TERRA en humà: (1) no conté seqüències riques en dinucleòtids CpG i/o (2) no es localitza a les regions subtelomèriques adjacents a les repeticions telomèriques.
2. TERRA forma *foci* discrets al nucli de les cèl·lules germinals masculines i femenines de mamífer, i es localitza tant als extrems d els cromosomes com fora de l'estructura telomèrica. L'anàlisi dels nivells de TERRA suggereix que la seva distribució nuclear depèn de l'associació telomèrica de TERRA la qual, al seu torn, està subjecta a característiques intrínseqües del gènere de la cèl·lula.
3. Durant l'espermatoxèesi de ratolí, la síntesi de TERRA s'inicia als espermatogonis (o bé a les cèl·lules germinals primordials) i incrementa progressivament fins a l'etapa d'espermatòcits II. A partir d'aquesta etapa, i durant la fase d'espermàrides rodones, la síntesi de TERRA disminueix o s'atura. Alhora, la transcripció de TERRA als espermatòcits I està lligada al telòmer a partir del qual es transcriu.
4. Tot i que les cèl·lules de ratolí presenten un major nombre de repeticions telomèriques, els telòmers són més llargs a les cèl·lules germinals masculines de ratolí i d'humà en comparació amb les femenines i les somàtiques.
5. TERT i TRF2 es localitzen immediatament després del complex sinaptonemal, i la proximitat espacial entre ambdues molècules indica que TERT interacciona probablement amb les repeticions telomèriques i forma part de l'estructura del complex telomèric. Alhora, la localització de TERT als telòmers de les cèl·lules germinals varia en funció de les característiques telomèriques pròpies de cadascuna de les espècies estudiades.
6. Donat que la longitud dels telòmers es manté constant al llarg de l'espermatoxèesi de ratolí, la presència de TERT als telòmers dels mamífers no està relacionada amb la seva elongació, sinó més aviat amb el manteniment de la seva estructura.
7. La relació entre TERRA i TERT no està lligada ni al gènere ni a l'espècie. L'associació entre ambdues molècules es produeix fora del complex telomèric, i sembla dependre de mecanismes intrínsecos de cadascuna de les espècies estudiades.

8. La localització telomèrica de TERRA i TERT en tots els tipus de cèl·lules germinals estudiats, i les seves característiques específiques d'espècie i de gènere pel que fa a distribució no clear indiquen que TERRA i TERT interactuen amb els telòmers formant part del complex telomèric per tal de contribuir al manteniment de l'estabilitat telomèrica durant el procés de gametogènesi.
9. El procés de recombinació en els espermatòcits primaris humans d'individus diagnosticats amb infertilitat idiopàtica es veu compromès. Això es tradueix en un nombre menor de *foci* d'MLH1 per cèl·lula i en un increment de bivalents sense senyal d'MLH1 en comparació amb l'individu control.
10. El patró de nivells i localització de TERRA als telòmers es veu alterat als espermatòcits I humans d'individus diagnosticats amb infertilitat idiopàtica: els nivells de TERRA disminueixen, alhora que tendeix a localitzar-se als telòmers. La regulació de TERRA als telòmers dels espermatòcits és un indici de dany telomèric, tot i que en aquest punt no podem distingir entre si es tractaria d'una causa o d'una conseqüència.
11. TERT tendeix a robar-se d'associada de l'estructura telomèrica als espermatòcits I humans d'individus amb infertilitat idiopàtica, ja que la localització telomèrica de TERT es veu marcadament reduïda en comparació amb els espermatòcits de l'individu control. No obstant, aquesta alteració en el patró de distribució de TERT no implica canvis en l'associació de TERT amb TERRA, i tampoc no afecta la longitud telomèrica dels espermatòcits I humans dels individus fertils. Aquest canvi en la localització telomèrica de TERT fa d'aquesta proteïna un bon candidat com a marcador de disruptió de l'homeostasi telomèrica en els espermatòcits I.

7. BIBLIOGRAFIA

- A**breu, E., Aritonovska, E., Reichenbach, P., Cristofari, G., Culp, B., Terns, R. M., *et al.* (2010). TIN2-tethered PP1 recruits human telomerase to telomeres in vivo. *Mol Cell Biol*, 30, 2971-82.
- Achi, M. V., Ravindranath, N., i Dym, M. (2000). Telomere length in male germ cells is inversely correlated with telomerase activity. *Biol Reprod*, 63, 591-8.
- Adams, I. R., i McLaren, A. (2002). Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development*, 129, 1155-64.
- Adelfalk, C., Janschek, J., Revenkova, E., Blei, C., Liebe, B., Göb, E., *et al.* (2009). Cohesin SMC1beta protects telomere in meiocytes. *J Cell Biol*, 187, 185-99.
- Ahmed, S., Passos, J. F., Birket, M., Beckmann, T., Brings, S., Peters, H., *et al.* (2008). Telomerase does not co-interact with telomeres but protects mitochondrial function under oxidative stress. *J Cell Sci*, 121, 1046-53.
- Allsopp, R. C., Chang, E., Kashefi-Aazam, M., Rogaev, E. I., Piatyszek, M. A., Shay, J. W., *et al.* (1995). Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Exp Cell Res*, 220, 194-200.
- Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., Futcher, A. B., *et al.* (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 10114-8.
- Anderson, R., Copeland, T. K., Schöler, H., Heasman, J., i Wyllie, C. (2000). The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mech Dev*, 91, 61-8.
- Anderson, E. L., Blatt, A. E., Roepers-Gajadien, H. L., Hassold, T. J., de Rooij, D. G., van Pelt, A. M., *et al.* (2008). S tra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 14976-80.
- Anton, E., Blanchard, J., Egizcue, J., i Vidal, F. (2004). Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum Reprod*, 19, 1345-51.
- Armanios, M. Y., Chen, J. J., Cogan, J. D., Alder, J. K., Ingersoll, R. G., Markin, C., *et al.* (2007). Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 356, 1317-26.
- Armanios, M. (2013). Telomeres and age-related disease: how telomere biology informs clinical paradigms. *J Clin Invest*, 123, 996-1002.
- Arnoult, N., Van Beneden, A., i Decottignies, A. (2012). Telomere length regulates TERRA levels through increased trimethylation of telomeric H3K9 and HP1α. *Nat Struct Mol Biol*, doi: 10.1038/nsmb.2364.
- Arora, R., Brun, C. M., i Azzalin, C. M. (2012). Transcription regulates telomere dynamics in human cancer cells. *RNA*, 18, 684-93.
- Artandi, S. E., i Depinho, R. A. (2000). A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis. *Curr Opin Genet Dev*, 10, 39-46.
- Azzalin, C. M., Reichenbach, P., Khoriauli, L., Giulotto, E., i Lingner, J. (2007). Telomeric repeat-containing RNA and RNA surveillance

factors at mammalian chromosome ends. *Science*, 31, 798-801.

Bah, A., Włodarski, H., Shchepachev, V., i Azzalin, C. M. (2012). The telomeric transcriptome of Schizosaccharomyces pombe. *Nucleic Acids Res*, 40, 2995-3005.

Baird, D. M., Rowson, J., Wynford-Thomas, D., i Kipling, D. (2003). Extensive allelic variation and ultrastructural telomeres in senescent human cells. *Nat Genet*, 33, 203-7.

Baird, D. M., Bratt-Compton, B., Rowson, J., Amso, N. N., Gregory, L., i Kipling, D. (2006). Telomere instability in the male germline. *Hum Mol Genet*, 15, 45-51.

Bajic, V. B., Tan, S. L., Chistoffels, A., Schönbach, C., Lipovich, L., Yang, L., et al. (2006). Mice and men: their promoter properties. *PLoS Genet*, 2, e54.

Baker, T. G. (1963). A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 22, 417-33.

Baker, T. G., Challoner, S., i Burgoine, P. S. (1980). The number of oocytes and the rate of atresia in unilaterally ovariectomized mice up to 8 months after surgery. *J Reprod Fertil*, 60, 449-56.

Baker, S. M., Plug, A. W., Prolla, T. A., Bronner, C. E., Harris, A. C., Yao, X., et al. (1996). Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat Genet*, 13, 336-42.

Balk, B., Maicher, A., Dees, M., Klermund, J., Luke-Glaser, S., Brender, K., et al. (2013). Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-

length dynamics and senescence. *Nat Struct Mol Biol*, 20, 1199-205.

Baltus, A. E., Menke, D. B., Hu, Y. C., Goodheart, M. L., Carpenter, A. E., de Rooij, D. G., et al. (2006). In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat Genet*, 38, 1430-4.

Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., et al. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the H1c chromo domain. *Nature*, 410, 120-4.

Bannister, L. A., Reinholdt, L. G., Munroe, R. J., i Schimenti, J. C. (2004). Positional cloning and characterization of mouse mei8, a disrupted allele of the meiotic cohesin Rec8. *Genesis*, 40, 184-94.

Barlow, A. L., i Holt, M. A. (1996). Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I human spermatocytes. *Chromosome Res*, 4, 562-73.

Barlow, C., Liyanage, M., Moens, P. B., Tarsounas, M., Nagashima, K., Brown, K., et al. (1998). Atm deficiency results in severe meiotic disruption as early as leptotene of prophase I. *Development*, 125, 4007-17.

Bastos, H., Lassalle, B., Chicheportiche, A., Riou, L., Testart, J., Allemand, I., et al. (2005). Flow cytometric characterization of viable meiotic and postmeiotic cells by Hoechst 33342 in mouse spermatogenesis. *Cytometry A*, 65, 40-9.

Baur, J. A., Zou, Y., Shay, J. W., i Wright, W. E. (2001). Telomere position effect in human cells. *Science*, 292, 2075-7.

- Bayne, R. A., Brucoli, D., Taggart, M. H., Thomson, E. J., Farr, C. J., & Cooke, H. J. (1994). Sandwiching of a gene within 12 kb of a functional telomere and alpha satellite does not result in silencing. *Hum Mol Genet*, 3, 539-46.
- Bellv  , A. R., Cavicchia, J. C., Millette, C. F., O'Brien, D. A., Bhattacharjee, Y. M., & Dym, M. (1977). Semipermeable cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol*, 74, 68-85.
- Bendsen, E., Byskov, A. G., Laursen, S. B., Larsen, H. P., Andersen, C. Y., & Westergaard, L. G. (2003). Number of germ cells and somatic cells in human fetal testes during the first weeks after sex differentiation. *Hum Reprod*, 18, 13-8.
- Bendsen, E., Byskov, A. G., Andersen, C. Y., & Westergaard, L. G. (2006). Number of germ cells and somatic cells in human fetal ovaries during the first weeks after sex differentiation. *Hum Reprod*, 21, 30-5.
- Benetti, R., García-Cao, M., & Blasco, M. A. (2007a). Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres. *Nat Genet*, 39, 243-50.
- Benetti, R., Gonzalo, S., Jaco, I. S., Katt, P., Jenuwein, T., & Blasco, M. A. (2007b). SUV4-20H deficiency results in telomere elongation and derepression of telomere recombination. *J Cell Biol*, 178, 925-36.
- Berchowitz, L. E., Hanlon, S. E., Lieb, J. D., & Copenhaver, G. P. (2009). A positive but complex association between meiotic double-strand break hotspots and open chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Res*, 19, 2245-57.
- Bettegowda, A., & Wilkinson, M. F. (2010). Transcription and post-transcriptional regulation of spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365, 1637-51.
- Betts, D. H., & King, W. A. (1999). Telomerase activity and telomere detection during early bovine development. *Dev Genet*, 25, 397-403.
- Bhalla, N., & Dernburg, A. F. (2008). Prelude to division. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 24, 397-424.
- Biffi, G., Tannahill, D., & Balasubramanian, S. (2012). A trimolecular G-quadruplex structure is required for binding of telomeric repeat-containing RNA to the telomeric protein TRF2. *J Am Chem Soc*, 134, 11974-6.
- Biffi, G., Tannahill, D., McCafferty, J., & Balasubramanian, S. (2013). Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. *Nat Chem*, 5, 182-6.
- Blackburn, E. H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell*, 106, 661-73.
- Blanco, J., Rubio, C., Simon, C., Egizcue, J., & Vidal, F. (1997). Increased incidence of disomic sperm nuclei in a 47,XYY male assessed by fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *Hum Genet*, 99, 413-6.
- Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: aging, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*, 6, 611-22.
- Blasco, M. A. (2007). The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat Rev Genet*, 8, 299-309.
- Blasco, M. A., Funk, W., Villegas-Pons, B., & Greider, C. W. (1995). Functional characterization and developmental regulation

Bibliografia

- of mouse telomerase RNA. *Science*, 269, 1267-70.
- Blasco, M. A., Lee, H. W., Hande, M. P., Samper, E., Lansdorp, P. M., DePinho, R. A., *et al.* (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*, 91, 25-34.
- Boateng, K. A., Bellani, M. A., Gregoretti, I. V., Pratto, F., Camerini-Otero, R. D. (2013). Homologous pairing preceding SPO11-mediated double-strand breaks in mice. *Dev Cell*, 24, 196-205.
- Bochman, M. L., Paeschke, K., Zakian, V. A. (2012). DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nat Rev Genet*, 13, 770-80.
- Brieño-Enríquez, M. A., Reguera-Viader, R., Cabero, L., Toran, N., Martínez, F., Roig, I., *et al.* (2012). Gene expression is altered after bisphenol A exposure in human fetal oocytes in vitro. *Mol Hum Reprod*, 18, 171-83.
- Brieño-Enríquez, M. A., Robles, P., Camats-Tarruella, N., García-Cruz, R., Roig, I., Cabero, L., *et al.* (2011). Human meiotic progression and recombination are affected by Bisphenol A exposure during in vitro human oocyte development. *Hum Reprod*, 26, 2807-18.
- Brieño-Enríquez, M. A., Robles, P., García-Cruz, R., Roig, I., Cabero, L., Martínez, F., *et al.* (2010). A new culture technique that allows in vitro meiotic prophase development of fetal human oocytes. *Hum Reprod*, 25, 74-84.
- Brock, G. J., Charlton, J., Bird, A. (1999). Densely methylated sequences that are preferentially localized at telomere-proximal regions of human chromosomes. *Gene*, 240, 269-77.
- Brown, B. A., Li, Y., Brown, J. C., Hardin, C. C., Roberts, J. F., Pelsue, S. C., *et al.* (1998). Isolation and characterization of a monoclonal anti-quadruplex DNA antibody from autoimmune "viable motheaten" mice. *Biochemistry*, 37, 16325-37.
- Buard, J., i de Massy, B. (2007). Playing hide and seek with mammalian meiotic crossover hotspots. *Trends Genet*, 23, 301-9.
- Buard, J., Barthès, P., Grey, C., i de Massy, B. (2009). Distinct histone modifications define initiation and repair of meiotic recombination in the mouse. *EMBO J*, 28, 2616-24.
- Bukovsky, A., Caudle, M. R., Svetlikova, M., Upadhyaya, N. B. (2004). Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*, 2, 20.
- Bukovsky, A., Svetlikova, M., i Caudle, M. R. (2005). Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*, 3, 17.
- Buonomo, S. B., Clyne, R. K., Fuchs, J., Loidl, J., Uhlmann, F., i Nasmyth, K. (2000). Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin RecQL by separin. *Cell*, 103, 387-98.
- Byskov, A. G., Hoyer, P. E., Yding Andersen, C., Kristensen, S. G., Jespersen, A., i Møllgård, K. (2011). No evidence for the presence of oogonia in the human ovary after their final clearance during the first two years of life. *Hum Reprod*, 26, 2129-39.

- C**anelas, A., Vera, E., Klatt, P., i Blasco, M. A . (2007). High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 5300-5.
- Caslini, C., Connelly, J. A., Serna, A., Broccoli, D., i Hess, J. L. (2009). MLL associates with telomere and regulates telomeric repeats-containing RNA transcription. *Mol Cell Biol*, 29, 4519-26.
- Celeste, A., Petersen, S ., Romanienko, P . J ., Fernandez-Capetillo, O ., Chen, H . T ., Sedelnikova, O. A., et al. (2002). Genomic instability in mice lacking histone H 2AX. *Science*, 296, 922-7.
- Cesare, A. J., i Reddel, R. R. (2010). Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet*, 11, 319-30.
- Chadeneau, C., Siegel, P., Harley, C. B., Muller, W. J., i Bacchetti, S . (1995). Telomerase activity in normal and malignant murine tissues. *Oncogene*, 11, 893-8.
- Chalfie, M . (1995). Green fluorescent protein. *Photochem Photobiol*, 62, 651-6.
- Chen, T ., Tsujimoto, N ., i Li, E. (2004). The PWWP domain of DNMT3a and DNMT3b is required for directing DNA methylation to the major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Mol Cell Biol*, 24, 9048-58.
- Chiodi, I ., i Mondello, C. (2012). Telomere-independent functions of telomerase in nuclei, cytoplasm, and mitochondria. *Front Oncol*, 2, doi: 10.3389/fonc.2012.00133.
- Choi, J ., Southworth, L. K., Sharin, K . Y ., Venteicher, A. S ., Ma, W ., Chang, W ., et al. (2008). TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental program. *PLoS Genet*, 4, e10.
- Chuma, S., i Nakatsuji, N. (2001). Autonomous transition into meiosis of mouse fetal germ cells in vitro and its inhibition by gp130-mediated signaling. *Dev Biol*, 229, 468-79.
- Cioce, M., i Lamond, A. I. (2005). Cajal bodies: a long history of discovery. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, 105-31.
- Clark, J . M., i Eddy, E. M. (1975). Fine structural observations on the origin and associations of primordial germ cells of the mouse. *Dev Biol*, 47, 136-55.
- Codina-Pascual, M., Oliver-Bonet, M., Navarro, J., Campillo, M., García, F., Egózcue, S., et al. (2005). Synapsis and meiotic recombination analyses: MLH1 focus in the XY pair as an indicator. *Hum Reprod*, 20, 2133-9.
- Cram, D. S., O'Bryan, M. K., i Kretser, D. M. (2001). Male infertility genetics - The future. *J Androl*, 22, 738-46.
- Cristofari, G ., i Lingner, J . (2006). Telomere length homeostasis requires that telomerase levels are limiting. *EMBO J*, 25, 565-74.
- Culty, M. (2009). Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 87, 1-26.
- Cusanelli, E., Romero, C. A ., i Chartrand, P . (2013). Telomeric noncoding RNA TERRA is induced by telomere shortening to nucleate telomerase molecules at short telomeres. *Mol Cell*, 51, 780-91.

- D**'Adda di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., *et al.* (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, *426*, 194-8.
- Daniel, K., Tränkner, D., Wojtasz, L., Shibuya, H., Watanabe, Y., Alsheimer, M., *et al.* (2014). Mouse CCDC79 (TERB1) is a meiosis-specific telomere associated protein. *BMC Cell Biol*, *15*, 17.
- Davoli, T., and de Lange, T. (2012). Telomere-driven teloploidization occurs in human cells undergoing crisis and promotes transformation of mouse cells. *Cancer Cell*, *21*, 765-76.
- De Lange, T., Shiue, L., Myers, R. M., Cox, D. R., Naylor, S. L., Killery, A. M., *et al.* (1990). Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol*, *10*, 518-27.
- De Lange, T. (2004). T-loops and the origin of telomeres. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *5*, 323-9.
- De Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*, *19*, 2100-10.
- De Lange, T. (2009). How telomeres solve the end-protection problem. *Science*, *326*, 948-52.
- De Vries, F. A., de Boer, E., van den Bosch, M., Baarends, W. M., Ooms, M., Yuan, L., *et al.* (2005). Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev*, *19*, 1376-89.
- De Vries, M., Ramos, L., and De Boer, P. (2013). Immunofluorescent characterization of meiotic recombination in human males with variable spermatogenesis. *Andrology*, *1*, 262-73.
- Deng, Y., Guo, X., Ferguson, D. O., Chang, S. (2009a). Multiple roles for MRE11 at uncapped telomeres. *Nature*, *460*, 914-8.
- Deng, Z., Norseen, J., Wiedmer, A., Riethman, H., Lieberman, P. M. (2009b). TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres. *Mol Cell*, *35*, 403-13.
- Deng, Z., Campbell, A. E., Lieberman, P. M. (2010). TERRA, CpG methylation and telomere heterochromatin: lessons from ICF syndrome cells. *Cell Cycle*, *9*, 69-74.
- Deng, Z., Wang, Z., Stong, N., Plasschaert, R., Moczan, A., Chen, H. S., *et al.* (2012a). A role for CTCF and cohesin in subtelomere chromatin organization, TERRA transcription, and telomere end protection. *EMBO J*, *31*, 4165-78.
- Deng, Z., Wang, Z., Xiang, C., Moczan, A., Baubet, V., Conejo-Garcia, J., *et al.* (2012b). Formation of telomeric repeat-containing RNA (TERRA) foci in highly proliferating mouse cerebellar neuronal progenitors and medulloblastoma. *J Cell Sci*, *125*, 4383-94.
- Domínguez-Bendala, J., and McWhir, J. (2004). Enhanced gene targeting frequency in ES cells with low genomic methylation levels. *Transgenic Res*, *13*, 69-74.
- Duan, W., Rangan, A., Vankayalapati, H., Kim, M. Y., Zeng, Q., Sun, D., *et al.* (2001). Design and synthesis of fluoroquinophenoazines that interact with human telomeric G-quadruplexes and their biological effects. *Mol Cancer Ther*, *1*, 103-20.
- E**delmann, W., Cohen, P. E., Kane, M., Lau, K., Morrow, B., Bennett, S., *et al.* (1996). Meiotic pachytene arrest in

- MLH1-deficient mice. *Cell*, 85, 1125-34.
- Egozcue, J., Blanco, J., i Vidal, F. (1997). Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update*, 3, 441-52.
- Egozcue, S., Blanco, J., Vendrell, J. M., García, F., Veiga, A., Aran, B., et al. (2000a). Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update*, 6, 93-105.
- Egozcue, S., Vendrell, J. M., Garcia, F., Veiga, A., Aran, B., Barrari, P. N., et al. (2000b). Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenozoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet*, 17, 307-9.
- Egozcue, J., Sarrate, Z., Codina-Pascual, M., Egozcue, S., Oliver-Bonet, M., Blanco, J., et al. (2005). Meiotic abnormalities in infertile males. *Cytogenet Genome Res*, 111, 337-42.
- Eisenberg, D. T., Hayes, M. G., i Kuzawa, C. W. (2012). Delayed paternal age often reproduction in humans is associated with longer telomeres across two generations of descendants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 10251-6.
- Eisenhauer, K. M., Gerstein, R. M., Chiu, C. P., Conti, M., i Hsueh, A. J. (1997). Telomerase activity in female and male rat germ cells undergoing meiosis and in early embryos. *Biol Reprod*, 56, 1120-5.
- Ernst, J., Kheradpour, P., Mikkelsen, T. S., Shores, N., Ward, L. D., Epstein, C. B., et al. (2011). Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature*, 473, 43-9.
- Evans, E. P., Breckon, G., i Ford, C. E. (1964). An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics*, 3, 289-94.
- Fajkus, J. . (2006). Detection of telomerase activity by the TRAP assay and its variants and alternatives. *Clin Chim Acta*, 371, 25-31.
- Farnung, B. O., Brun, C. M., Arora, R., Lorenzi, L. E., i Azzalin, C. M. (2012). Telomerase efficiently elongates highly transcribing telomeres in human cancer cells. *PLoS One*, 7, e35714.
- Farnung, B. O., Giulotto, E., i Azzalin, C. M. (2010). Promoting transcription of chromosome ends. *Transcr.*, 1, 140-3.
- Ferguson, K. A., Wong, E. C., Chow, V., Nigro, M., i Ma, S. . (2007). Abnormal meiotic recombination in infertile men and its association with sperm aneuploidy. *Hum Mol Genet*, 16, 2870-9.
- Ferlin, A., Rampazzo, E., Rocca, M. S., Keppel, S., Frigo, A. C., De Rossi, A., et al. (2013). In young men sperm telomere length is related to sperm number and parental age. *Hum Reprod*, doi: 10.1093/humrep/det392.
- Feuerhahn, S., Iglesias, N., Panza, A., Porro, A., i Lingner, J. . (2010). TERRA biogenesis, turnover and implications for function. *FEBS Lett*, 584, 3812-8.
- Fledel-Alon, A., Wilson, D. J., Roman, K., Wen, X., Ober, C., Coop, G., et al. (2009). Broad-scale recombination patterns underlying proper disjunction in humans. *PLoS Genet*, 5, e1000658.

Bibliografía

- Flynn, R. L., Centore, R. C., O'Sullivan, R. J., Rai, R., Tse, A., Songyang, Z., et al. (2011). TERRA and hnRNP A1 orchestrate an RPA-to-POT1 switch on telomeric single-stranded DNA. *Nature*, 471, 532-6.
- Ford, C. E., Evans, E. P., Burtneshaw, M. D., Clegg, H. M., Tuffrey, M., Barnes, R. D. (1975). A functional 'sex-reversed' oocyte in the mouse. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 190, 187-97.
- Franco, S., Alsheimer, M., Herrera, E., Benavente, R., Blasco, M. A. (2002). Mammalian meiotic telomeres: composition and ultrastructure in telomerase-deficient mice. *Eur J Cell Biol*, 81, 335-40.
- Fraune, J., Schramm, S., Alsheimer, M., Benavente, R. (2012). The mammalian synaptonemal complex: protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Exp Cell Res*, 318, 1340-6.
- Frohnert, C., Schweizer, S., Hoyer-Fender, S. (2011). SPAG4L/SPAG4L-2 are testis-specific SUN domain proteins restricted to the apical nuclear envelope of round spermatids facing the acrosome. *Mol Hum Reprod*, 17, 207-18.
- Fujimoto, T., Miyayama, Y., Fujiyuta, M. (1977). The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. *Anat Rec*, 188, 315-30.
- Fujisawa, M., Tanaka, H., Tatsumi, N., Okada, H., Arakawa, S., Kameidono, S. (1998). Telomerase activity in the testis of infertile patients with selected causes. *Hum Reprod*, 13, 1476-9.
- Fulton, N., Martins da Silva, S. J., Bayne, R. A., Anderson, R. A. (2005). Germ cell proliferation and apoptosis in the developing human ovary. *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 4664-70.
- Galati, A., Micheli, E., Cacchione, S. (2013). Chromatin structure in telomere dynamics. *Front Oncol*, 3, doi: 10.3389/fonc.2013.00046.
- Garcia, M., Ponsa, I. (2003). Introducción a las bases celulares y genéticas de la gametogénesis femenina. En A. L. Cabero, E. C. Abrillo (Eds.), *Tratado de ginecología, obstetricia y medicina de la reproducción* (págs. 50-7). Editorial Médica Panamedicana.
- Garcia, M., Dietrich, A. J., Freixa, L., Vink, A. C., Ponsà, M., Egozcue, J. (1987). Development of the first meiotic prophase stages in human fetal oocytes observed by light and electron microscopy. *Hum Genet*, 77, 223-32.
- García-Cao, M., O'Sullivan, R., Peters, A. H., Jenuwein, T., Blasco, M. A. (2004). Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat Genet*, 36, 94-9.
- Garcia-Cruz, R., Roig, I., Caldés, M. G. (2009). Maternal origin of the human aneuploidies. Are homolog synapsis and recombination to blame? Notes (learned) from the underbelly. *Genome Dyn*, 5, 128-36.
- Garcia-Cruz, R., Brieño, M. A., Roig, I., Grossmann, M., Vililla, E., Puigol, A., et al. (2010a). Dynamics of cohesin proteins RECQL, STAG3, SMC1beta and SMC3 are consistent with a role in sister chromatid cohesion during meiosis in human oocytes. *Hum Reprod*, 25, 2316-27.

- Garcia-Cruz, R., Casanovas, A., Brieño-Enríquez, M., Robles, P., Roig, I., Pujol, A., *et al.* (2010b). Cytogenetic analyses of human oocytes provide new data on non-disjunction mechanisms and the origin of trisomy 16. *Hum Reprod*, 25, 179-91.
- Ginsburg, M., S now, M . H ., i McLaren, A . (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*, 110, 521-8.
- Goetz, P ., C handley, A. C ., i Speed, R . M. (1984). Morphological and temporal sequence of meiotic prophase development at puberty in the male mouse. *J Cell Sci*, 65, 249-63.
- Gomes, N . M ., Ryder, O . A ., Houck, M . L ., Charter, S. J ., Walker, W ., Forsyth, N. R ., *et al.* (2011). Comparative biology of mammalian telomeres: hypotheses on ancestral states and the roles of telomeres in longevity determination. *Aging Cell*, 10, 761-8.
- Gondos, B. (1973). Germ cell degeneration and intercellular bridges in the human fetal ovary. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 138, 23-30.
- Gonsalves, J., Sun, F., Schlegel, P. N., Turek, P. J., H opps, C . V ., G reene, C ., *et al.* (2004). Defective recombination in infertile men. *Hum Mol Genet*, 13, 2875-83.
- Gonzalo, S., Jaco, I., Fraga, M. F., Chen, T., Li, E., Esteller, M., *et al.* (2006). DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, 8, 416-24.
- Gowan, S . M ., H eald, R ., Stevens, M. F., i Kelland, L. R . (2001). Potent inhibition of telomerase by small-molecule pentacyclic acridines capable of interacting with G - quadruplexes. *Mol Pharmacol*, 60, 981-8.
- Greenberg, R . A ., Allsopp, R . C ., Chin, L., Morin, G . B ., i DePinho, R . A . (1998). Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene*, 16, 1723-30.
- Greider, C. W., i Blackburn, E. H . (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*, 43, 405-13.
- Griffith, J . D ., Comeau, L., Rosenfield, S ., Stansel, R. M., Bianchi, A ., Moss, H ., *et al.* (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, 97, 503-14.
- Grimes, S . . R. (2004). Testis-specific transcriptional control. *Gene*, 343, 11-22.
- Günes, C., i Rudolph, K. L. (2013). The role of telomeres in stem cells and cancer. *Cell*, 152, 390-3.
- H**aendeler, J., Dröse, S., Büchner, N., Jakob, S., Altschmied, J., Goy, C., *et al.* (2009). Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29, 929-35.
- Hamada, A., Esteves, S . C ., Nizza, M., i Agarwal, A. (2012). Unexplained male infertility: Diagnosis and management. *Int Braz J Urol*, 38, 576-94.
- Handel, M . A ., i Schimenti, J . C . (2010). Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet*, 11, 124-36.

Bibliografia

- Hann, M. C., Lau, P. E., i Tempest, H. G. (2011). Meiotic recombination and male infertility: from basic science to clinical reality? *Asian J Androl*, 13, 212-8.
- Hanna, C. W., Betherick, K. L., Gair, J. L., Flucker, M. R., Stephenson, M. D., i Robinson, W. P. (2009). Telomere length and reproductive aging. *Hum Reprod*, 24, 1206-11.
- Hartshorne, G. M., Lyrakou, S., Hamoda, H., Oloto, E., i Ghafari, F. (2009). Oogenesis and cell death in human prenatally varies: what are the criteria for oocyte selection? *Mol Hum Reprod*, 15, 805-19.
- Hassold, T., Sherman, S., i Hunt, P. (2000). Counting crossovers: characterizing meiotic recombination in mammals. *Hum Mol Genet*, 9, 2409-19.
- Hassold, T., i Hunt, P. (2001). To err (meiotically) is human: The genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet*, 2, 280-91.
- Hassold, T., Hall, H., i Hunt, P. (2007). The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet*, 16, R203-8.
- Hassold, T., i Hunt, P. (2009). Maternal age and chromosomally abnormal pregnancies: what we know and what we wish we knew. *Curr Opin Pediatr*, 21, 703-8.
- Hawley, R. S. (1988). Exchange and chromosomal segregation in eukaryotes. En R. Kucherlapati, i G. R. Smith (Edits.), *Genetic Recombination* (págs. 497 -527). Washington DC: American Society of Microbiology.
- He, Z., Henricksen, L. A., Wold, M. S., i Ingles, C. J. (1995). RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair. *Nature*, 374, 566-9.
- Helal, M. A., Mehmet, H., Thomas, N. S., Cox, P. M., Ralph, D. J., Bajaria, R., et al. (2002). Ontogeny of human fetal testicular apoptosis during first, second, and third trimesters of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 1189-93.
- Heller, C. G., i Clermont, Y. (1963). Spermatogenesis in man: an estimate of its duration. *Science*, 140, 184-6.
- Hemann, M. T., i Greider, C. W. (2000). Wild-derived inbred mouse strains have short telomeres. *Nucleic Acids Res*, 28, 4474-8.
- Hemann, M. T., Rudolph, K. L., Strong, M. A., DePinho, R. A., Chin, L., i Greider, C. W. (2001a). Telomere dysfunction triggers developmentally regulated germ cell apoptosis. *Mol Biol Cell*, 12, 2023-30.
- Hemann, M. T., Strong, M. A., Hao, L. Y., i Greider, C. W. (2001b). The shortest telomere, not a average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell*, 107, 67-77.
- Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P., Chen, D. J., i Sedivy, J. M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell*, 14, 501-13.
- Hilscher, B., Hilscher, W., Bültmann-Ohnholz, B., Krämer, U., Birke, A., Pelzer, H., et al. (1974). Kinetics of gametogenesis. I. Comparative histological and autoradiographic studies of oocytes and transitional prospermatozoa

- during oogenesis and spermatogenesis. *Cell Tissue Res.*, 154, 443-70.
- Hug, N., i Lingner, J. (2006). Telomere length homeostasis. *Chromosoma*, 115, 413-25.
- Hunt, P. A. (1987). Ethanol-induced aneuploidy in male germ cells of the mouse. *Cytogenet Cell Genet*, 44, 7-10.
- Hunt, P. A., i Hassold, T. J. (2008). Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends Genet.*, 24, 86-93.
- Hunter, N., i Kleckner, N. (2001). The single-end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-holliday junction transition of meiotic recombination. *Cell*, 106, 59-70.
- Hutt, K. J., i Albertini, D. F. (2007). An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reprod Biomed Online*, 14, 758-64.
- I**chikawa, Y., M orohashi, N., N ishimura, Y., Kurumizaka, H., i Shimizu, M. (2014). Telomeric repeats act as nucleosome-disfavouring sequences *in vivo*. *Nucleic Acids Res.*, 42, 1541-52.
- Iglesias, N., Redon, S., Peiffer, V., Dees, M., Lingner, J., i Luke, B. (2011). Subtelomeric repetitive elements determine TERRA regulation by Rap1/Rif and Rap1/Sir complexes in yeast. *EMBO Rep.*, 12, 587-93.
- J**acob, N. K., Kirk, K. E., i Price, C. M. (2003). Generation of telomeric G strand overhangs involves both G and C strand cleavage. *Mol Cell*, 11, 1021-32.
- Jády, B. E., Richard, P., Bertrand, E., i Kiss, T. (2006). Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres. *Mol Biol Cell*, 17, 944-54.
- Jahnukainen, K., Chrysostomou, M., Parvinen, M., Ekström, S., i Söder, O. (2004). Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage-specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in the rat testis. *Biol Reprod.*, 70, 290-6.
- Jan, S. Z., Hamer, G., Repping, S., De Rooij, D. G., Van Pelt, A. M., i Vermeer, T. L. (2012). Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1822, 1838-50.
- Jegou, T., Chhungu, I., Heuvelman, G., Wachsmuth, M., Görisch, S. M., Greulich-Bode, K. M., et al. (2009). Dynamics of telomeres and promyelocytic leukemia nuclear bodies in a telomerase-negative human cell line. *Mol Biol Cell*, 20, 2070-82.
- Jones, K. T. (2008). Meiosis in oocytes: predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age. *Hum Reprod Update*, 14, 143-58.
- Jørgensen, P. B., Fedder, J., Koelvraa, S., i Graakjaer, J. (2013). Age-dependence of relative telomere length profiles during spermatogenesis in man. *Maturitas*, 75, 380-5.
- Jungwirth, A., Diemer, T., Dohle, G., R., Giwercman, A., Kopa, Z., Torunay, H., et al. (2013). Guidelines on male infertility. *Male Infertility - European Association of Urology*.
- K**almbach, K. H., Fontes-Antunes, D. M., Draxler, R. C., Knier, T. W., Seth-Smith, M. L., Wang, F., et al. (2013). Telomeres and human reproduction. *Fertil Steril*, 99, 23-9.

Bibliografia

- Karlseder, J., Smogorzewska, A., i de Lange, T. (2002). Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science*, 295, 2446-9.
- Kaufman, M. H., i Bain, I. M. (1984). Influence of ethanol on chromosome segregation during the first and second meiotic divisions in the mouse egg. *J Exp Zool*, 230, 315-20.
- Kauppi, L., Jasin, M., i Keeney, S. (2012). The tricky path to recombining X and Y chromosomes in meiosis. *Ann N Y Acad Sci*, 1267, 18-23.
- Keefe, D. L., Ma rquad, K., i Li u, L. (2006). The telomere theory of reproductive senescence in women. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 18, 280-5.
- Keefe, D. L., L iu, L., i Ma rquad, K. (2007). Telomeres and aging-related meiotic dysfunction in women. *Cell Mol Life Sci*, 64, 139-43.
- Keefe, D. L., i L iu, L. (2009). Telomeres and reproductive aging. *Reprod Fertil Dev*, 21, 10-4.
- Keegan, K. S., Holtzman, D. A., Plug, A. W., Christenson, E. R., Brainerd, E. E., Flaggs, G., et al. (1996). The Atr and Atm protein kinases associate with different sites along meiotically pairing chromosomes. *Genes Dev*, 10, 2423-37.
- Keeney, S., G ioux, C . N ., i K leckner, N . (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell*, 88, 375-84.
- Kent, W . J . (2002). BLAT- the BLAST-like alignment tool. *Genome Res*, 12, 656-64.
- Kim, N. W ., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C . B ., West, M . D ., Ho, P. L ., et al. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 266, 2011-5.
- Kim, M ., Xu, L., i Blackburn, E. H . (2003). Catalytically active human telomerase mutants with a allele-specific biological properties. *Exp Cell Res*, 288, 277-87.
- Kimmins, S., Kotaja, N ., Davidson, I ., i Sassone-Corsi, P . (2004). Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ-cell differentiation. *Reproduction*, 128, 5-12.
- Kipling, D ., i Cooke, H . J . (1990). Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature*, 347, 400-2.
- Kitajima, T. S., Miyazaki, Y ., Yamamoto, M., i Watanabe, Y . (2003). Rec8 cleavage by separase is required for meiotic nuclear divisions in fission yeast. *EMBO J*, 22, 5643-53.
- Kneitz, B., Cohen, P. E., Avdievich, E., Zhu, L., Kane, M. F ., Hou, H . J ., et al. (2000). MutS homolog 4 localization to meiotic chromosomes is required for chromosome pairing during meiosis in male and female mice. *Genes Dev*, 14, 1085-97.
- Ko, E., i Martin, R ., H . (2009). Immunofluorescence analysis of human spermatocytes. *Methods Mol Biol*, 558, 401-18.
- Koering, C. E., Pollice, A., Zibella, M. P., Bauwens, S ., Puisieux, A., Brunori, M., et al. (2002). Human telomeric position effect is determined by chromosomal context and telomeric chromatid integrity. *EMBO Rep*, 3, 1055-61.

- Kot, M. C., i H andel, M . A. (1990). Spermatogenesis in XO,Sxr mice: role of the Y chromosome. *J Exp Zool*, 256, 92-105.
- Kurilo, L . F . (1981). Oogenesis in a ntenatal development in man. *Hum Genet*, 57, 86-92.
- L**abosky, P. A., Barlow, D. P., i Hogan, B. L. (1994). Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. *Development*, 120, 3197-204.
- Lachner, M ., O'Carroll, D ., Rea, S ., M echtl er, K., i J enuwein, T . (2001). Methylation o f histone H 3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, 410, 116-20.
- Lamb, N . E., Feingold, E., Savage, A., Avramopoulos, D ., Freeman, S ., Gu, Y ., et al. (1997). Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction o f c hromosome 21. *Hum Mol Genet*, 6, 1391-9.
- Lange, R ., Krause, W ., i Engel, W . (1997). Analyses o f meiotic chromosomes in testicular biopsies o f infertile patients. *Hum Reprod*, 12, 2154-8.
- Lansdorp, P. M., Verwoerd, N. P ., Ven de Rijke, F . M ., D ragowska, V., Little, M . T ., Dirks, R. W ., et al. (1996). Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet*, 5, 685-91.
- Le, P . N ., Maranon, D . G ., Altina, N . H ., Battaglia, C. L., i Bailey, S. M. (2013). TERRA, hnRNP A 1, and DNA-PKcs interactions at human telomeres. *Front Oncol*, 3, doi : 10.3389/fonc.2013.00091.
- LeMaire-Adkins, R ., Radke, K ., i Hunt, P . A . (1997). Lack of checkpoint control at the metaphase/anaphase transition: a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females. *J Cell Biol*, 139, 1611-9.
- Li, E., B estor, T . H ., i Jaenisch, R . (1992). Targeted mutation o f the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69, 915-26.
- Li, L., Lejnine, S., Makarov, V., i Langmore, J. P. (1998). In vitro and in vivo reconstitution and stability of vertebrate chromosome ends. *Nucleic Acids Res*, 26, 2908-16.
- Li, R ., i Albertini, D . F . (2013). The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 141-52.
- Liebe, B ., Alsheimer, M ., Höög, C ., Benavente, R ., i Scherthan, H . (2004). Telomere attachment, meiotic chromosome condensation, pairing, and bouquet stage duration are modified in spermatocytes lacking axial elements. *Mol Biol Cell*, 15, 827-837.
- Linger, B . R ., i Price, C . M . (2009). Conservation of telomere protein complexes: shuffling through evolution. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 44, 434-46.
- Link, J., Jahn, D ., Schmitt, J ., Göb, E ., Baar, J ., Ortega, S ., et al. (2013). The meiotic nuclear lamina regulates chromosome dynamics and promotes efficient homologous recombination in the mouse. *PLoS Genet*, 9, e1003261.
- Lipkin, S . M ., Moens, P. B ., Wang, V ., Lenzi, M ., Shanmugarajah, D ., Gilgeous, A ., et al. (2002). Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nat Genet*, 31, 385-90.

Bibliografia

- Liu, L., Keeffe, D. L. (2002). A aging-associated aberration in meiosis of oocytes from senescence-accelerated mice. *Hum Reprod*, 17, 2678-85.
- Liu, L., Blasco, M. A., Keeffe, D. L. (2002a). Requirement of functional telomeres for metaphase chromosome alignments and integrity of meiotic spindles. *EMBO Rep*, 3, 230-4.
- Liu, L., Blasco, M. A., Trimarchi, J., Keeffe, D. (2002b). A essential role for functional telomeres in mouse germ cells during fertilization and early development. *Dev Biol*, 249, 74-84.
- Liu, L., Franco, S., Spyropoulos, B., Moens, P. B., Blasco, M. A., Keeffe, D. L. (2004). Irregular telomeres impair meiotic synapsis and recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 6496-501.
- Liu, L., Keeffe, D. L. (2004). Nuclear origin of aging-associated meiotic defects in senescence-accelerated mice. *Biol Reprod*, 71, 1724-9.
- Liu, Y., Wu, C., Lyu, Q., Yang, D., Albertini, D. F., Keeffe, D. L., et al. (2007a). Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. *Dev Biol*, 306, 112-20.
- Liu, L., Bailey, S. M., Okuka, M., Muñoz, P., Li, C., Zhou, L., et al. (2007b). Telomere lengthening early in development. *Nat Cell Biol*, 9, 1436-41.
- Lombard, D. B., Gaurante, L. (2000). Nijmegen breakage syndrome disease protein and MRE11 at PML nuclear bodies and meiotic telomeres. *Cancer Res*, 60, 2331-4.
- López de Silanes, I., Stagno d'Alcontres, M., Blasco, M. A. (2010). TERRA transcripts are bound by a complex array of RNA-binding proteins. *Nat Commun*, doi: 10.1038/ncomms1032.
- Ludérus, M. E., van Steensel, B., Chong, L., Sibon, O. C., Cremers, F. F., de Lange, T. (1996). Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex. *J Cell Biol*, 135, 867-81.
- Luke, B., Panza, A., Redon, S., Iglesias, N., Li, Z., Lingner, J. (2008). The Ratafia 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeats containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*, 21, 465-77.
- Lunenfeld, B., Van Steirteghem, A., Bertarelli Foundation. (2004). Infertility in the third millennium: implications for the individual, family and society: condensed meeting report from the Bertarelli Foundation's second global conference. *Hum Reprod Update*, 10, 317-26.
- M**acQueen, A. J., Hochwagen, A. (2011). Checkpoint mechanisms: the puppet masters of meiotic prophase. *Trends Cell Biol*, 21, 393-400.
- Mahadevaiah, S. K., Bourc'his, D., de Rooij, D. G., Bestor, T. H., Turner, J. M., Burgoyne, P. S. (2008). Extensive meiotic asynapsis in mice antagonises meiotic silencing of unsynapsed chromatin and consequently disrupts meiotic sex chromosome inactivation. *J Cell Biol*, 182, 263-76.
- Maicher, A., Kastner, L., Luke, B. (2012). Telomeres and disease: enter TERRA. *RNA Biol*, 9, 843-9.

- Majerská, J., Sýkorová, E., i Fajkus, J. (2011). Non-telomeric activities of telomerase. *Mol Biosyst*, 7, 1013-23.
- Makarov, V. L., Lejnine, S., Bedoyan, J., i Langmore, J. P. (1993). Nucleosomal organization of telomere-specific chromatin in rat. *Cell*, 73, 775-87.
- Makarov, V. L., Hirose, Y., i Langmore, J. P. (1997). Long tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell*, 88, 657-66.
- Maloisel, L., i Rossignol, J. L. (1998). Suppression of crossing-over by DNA methylation in Ascobolus. *Genes Dev*, 12, 1381-9.
- Mamsen, L. S., Lutterodt, M. C., Andersen, E. W., Byskov, A. G., i Andersen, C. Y. (2011). Germ cell numbers in human embryonic and fetal gonads during the first two trimesters of pregnancy: a analysis of six published studies. *Hum Reprod*, 26, 2140-5.
- Mamsen, L. S., Brøchner, C. B., Byskov, A. G., i Møllgard, K. (2012). The migration and loss of human primordial germ stem cells from the hind gut epithelium towards the gonadal ridge. *Int J Dev Biol*, 56, 771-8.
- Manterola, M., Page, J., Vasco, C., Berrios, S., Parra, M. T., Viera, A., et al. (2009). A high incidence of meiotic silencing of unsynapsed chromatin is not associated with substantial pachytene loss in heterozygous male mice carrying multiple simple robertsonian translocations. *PLoS Genet*, 5, e1000625.
- Marchal, R., Chicheportiche, A., Dutrillaux, B., i Bernardino-Sgherri, J. (2004). DNA methylation in mouse gametogenesis. *Cytogenet Genome Res*, 105, 316-24.
- Marion, R. M., Strati, K., Li, H., Tejera, A., Schoeftner, S., Ortega, S., et al. (2009). Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 4, 141-54.
- Martin, R. H. (2008). Cytogenetic determinants of male fertility. *Hum Reprod Update*, 14, 379-90.
- Martínez, P., i Blasco, M. A. (2011). Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nat Rev Cancer*, 11, 161-76.
- Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Bierema, T., Vanderpoel, S., i Stevens, G. A. (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med*, 9, e1001356.
- Masutomi, K., Possemato, R., Wong, J. M., Currier, J. L., Tothova, Z., Manola, J. B., et al. (2005). The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 102, 8223-27.
- Matzuk, M. M., i Lamb, D. J. (2008). The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med*, 14, 1197-213.
- McClellan, K. A., i Gosden, R. T. (2003). Continuous loss of oocytes throughout meiotic prophase in the normal mouse ovary. *Dev Biol*, 258, 334-48.
- McElligott, R., i Ellinger, R. J. (1997). The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J*, 16, 3705-14.

Bibliografia

- McLaren, A. (2003). Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol*, 262, 1-15.
- McLaren, A., & Southgate, D. (1997). Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Dev Biol*, 187, 107-13.
- McLean, D. J., Friel, P. J., Johnston, D. S., & Griswold, M. D. (2003). Characterization of spermatogonial stem cell maturation and differentiation in neonatal mice. *Biol Reprod*, 69, 2085-91.
- McMurray, C. T. (2010). Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development. *Nat Rev Genet*, 11, 786-99.
- Melchionna, R., Chen, X. B., Blasina, A., & McGowan, C. H. (2000). Threonine 68 is required for radiation-induced phosphorylation and activation of Cds1. *Nat Cell Biol*, 2, 762-5.
- Messerschmidt, D. M. (2012). Should I stay or should I go: protection and maintenance of DNA methylation at imprinted genes. *Epigenetics*, 7, 969-75.
- Mézard, C. (2006). Meiotic recombination hotspots in plants. *Biochem Soc Trans*, 34, 531-4.
- Miharu, N., Best, R. G., & Young, S. R. (1994). Numerical chromosome abnormalities in spermatozoa of fertile and infertile men detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Genet*, 93, 502-6.
- Mitchell, J. R., Wood, E., & Collins, K. (1999). A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*, 402, 551-5.
- Moens, P. B., Tarsounas, M., Morita, T., Habu, T., Rottinghaus, S. T., Freire, R., et al. (1999). The association of ATR protein with mouse meiotic chromosome cores. *Chromosoma*, 108, 95-102.
- Molenaar, C., Wiesmeijer, K., Verwoerd, N. P., Khazen, S., Eils, R., Tanke, H. J., et al. (2003). Visualizing telomere dynamics in living mammalian cells using PNA probes. *EMBO J*, 22, 6631-41.
- Molyneaux, K. A., Salalock, J., Schaible, K., & Wylie, C. (2001). Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev Biol*, 240, 488-98.
- Molyneaux, K. A., Wang, Y., Schaible, K., & Wylie, C. (2004). Transcriptional profiling identifies genes differentially expressed during and after migration in murine primordial germ cells. *Gene Expr Patterns*, 4, 167-81.
- Morales, C. P., Holt, S. E., Ouellette, M., Kaur, K. J., Yan, Y., Wilson, K. S., et al. (1999). Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet*, 21, 115-8.
- Morcillo, G., Barrantino, D., Carmona, M. J., Carretero, M. T., & Díez, J. L. (1988). Telomeric DNA sequences differentially activated by heat shock in two *Chironomus* subspecies. *Chromosoma*, 96, 139-44.
- Morelli, M. A., & Cohen, P. E. (2005). Not all germ cells are created equal: Aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction*, 130, 761-81.
- Moskovtsev, S. I., Willis, J., White, J., & Mullen, J. B. (2010). Disruption of telomere-telomere interactions associated with DNA damage in human spermatozoa. *Syst Biol Reprod Med*, 56, 407-12.

- Motta, P. M., Nottola, S. A., i Makabe, S. (1997). Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 75, 5-10.
- Moynis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., et al. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 6622-6.
- Mukherjee, S., Firpo, E. J., Wang, Y., i Roberts, J. M. (2011). Separation of telomerase functions by reverse genetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 108, E1363-71.
- Myers, S., Bottolo, L., Freeman, C., McVean, G., i Donnelly, P. (2005). A fine-scale map of recombination rates and hotspots across the human genome. *Science*, 310, 321-4.
- Myers, S., Freeman, C., Auton, A., Donnelly, P., i McVean, G. (2008). A common sequence motif associated with recombination hotspots and genome instability in humans. *Nat Genet*, 40, 1124-9.
- N**agaoka, S. I., Hassold, T. J., i Hunt, P. A. (2012). Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet*, 13, 493-504.
- Nandakumar, J., i Cech, T. R. (2013). Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 69-82.
- Naumova, A. K., Fayer, S., Leung, J., Boateng, K. A., Camerini-Otero, R. D., i Taketo, T. (2013). Dynamics of response to asynapsis and meiotic silencing in spermatocytes from Robertsonian translocation carriers. *PLoS One*, 8, e75970.
- Nergadze, S. G., Farnung, B. O., Wischnewski, H., Khoriauli, L., Vitelli, V., Chawla, R., et al. (2009). CpG-island promoters drive transcription of human telomeres. *RNA*, 15, 2186-94.
- Niida, H., i Nakanishi, M. (2006). DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis*, 21, 3-9.
- O**akberg, E. F. (1956). Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat*, 99, 507-16.
- Ofir, R., Wong, A. C., McDermid, H. E., Skorecki, K. L., i Seelig, S. (1999). Position effect of human telomeric repeats on replication timing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11434-9.
- Oganessian, L., Graham, M. E., Robinson, P. J., i Bryan, T. M. (2007). Telomerase recognizes G-quadruplex and linear DNA and distinct substrates. *Biochemistry*, 46, 11279-90.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., i Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99, 247-57.
- Oliver-Bonet, M., Liehr, T., Nietzel, A., Heller, A., Starke, H., Calusson, U., et al. (2003). Karyotyping of human synaptonemal complexes by cenM-FISH. *Eur J Hum Genet*, 11, 879-83.
- Oliver-Bonet, M., Benet, J., Sun, F., Navarro, J., Abad, C., Liehr, T., et al. (2005). Meiotic studies in two human reciprocal translocations and their association with spermatogenic failure. *Hum Reprod*, 20, 683-8.

Bibliografia

- Ooi, S. K., O'Donnell, A. H., i B estor, T. H. (2009). Mammalian cytosine methylation at a glance. *J Cell Sci*, 122, 2787-91.
- O'Sullivan, R. J., i Karlseder, J. (2010). Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 171-81.
- O'Sullivan, R. J., Kubicek, S., Schreiber, S. L., i Karlseder, J . (2010). Reduced histone biosynthesis and chromatin changes arises from a damage signal at telomeres. *Nat Struct Mol Biol*, 17, 1218-25.
- Ottaviani, A., Gilson, E., i Magdinier, F. (2008). Telomeric position effect: from the yeast paradigm to human pathologies? *Biochimie*, 90, 93-107.
- Oud, J. L., d e Jong, J. H., i d e R ooij, D . G . (1979). A sequential analysis of meiosis in the male mouse using a restricted spermatocyte population obtained by hydroxyurea/triaziquone treatment. *Chromosoma*, 71, 237-48.
- P**aeschke, K., Simonsen, T., P ostberg, J., R hodes, D ., i L ips, H . J. (2005). Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures in vivo. *Nat Struct Mol Biol*, 12, 847-54.
- Paigen, K ., i P etkov, P . (2010). Mammalian recombination hot spots: properties, control and evolution. *Nat Rev Genet*, 11, 221-33.
- Palm, W., i de Lange, T. (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet*, 42, 301-34.
- Palmer, S. J., i Burgoyne, P. S. (1991). In situ analysis of fetal, prepuberal and adult XX----XY chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, X Y. *Development*, 112, 265-8.
- Pandita, T . K . (2001). The role of ATH in telomere structure and function. *Radiat Res*, 156, 642-47.
- Pandita, T. K ., W estphal, C . H ., A nger, M ., Sawant, S. G., Geard, C. R., Pandita, R. K., et al. (1999). ATM inactivation results in aberrant telomere clustering during meiotic prophase. *Mol Cell Biol*, 19, 5096-105.
- Pandita, T . K ., H unt, C . R ., S harma, G. G ., i Yang, Q . (2007). Regulation of telomere movement by telomere chromatin structure. *Cell Mol Life Sci*, 64, 131-8.
- Pang, M. G., Hoegerman, S. F., Cuticchia, A. J., Moon, S. Y., Doncel, G. F., Acosta, A. A., et al. (1999). Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 14, 1266-73.
- Park, J. I., Venteicher, A. S., Hong, J. Y., Choi, J., Jun, S., Shkreli, M., et al. (2009). Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature*, 460, 66-72.
- Pedram, M., Sprung, C. N., Gao, Q., Lo, A. W., Reynolds, G . E ., i M urnane, J . P . (2006). Telomere position effect and silencing of transgenes near telomeres in the mouse. *Mol Cell Biol*, 26, 1865-78.
- Pepling, M . E ., i S pradling, A. C . (1998). Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development*, 125, 3323-8.

- Pepling, M. E., i S pradling, A. C. (2001). Mouse o varian germ cel l c ysts undergo programmed br eakdown t o f orm pr imordial follicles. *Dev Biol*, 234, 339-51.
- Peters, A . H ., O 'Carroll, D ., S cherthan, H ., Mechtler, K ., S auer, S ., S chöfer, C ., et al. (2001). L oss o ft he Suv39h histone methyltransferases i mpairs mammalian heterochromatin a nd genome s tability. *Cell*, 107, 323-37.
- Peters, A . H ., K ubicek, S., M echtler, K ., O'Sullivan, R. J., Derijck, A. A., Perez-Burgos, L., et al. (2003). Partitioning a nd p lasticity o f repressive histone methylation s tates i n mammalian chromatin. *Mol Cell*, 12, 1577-89.
- Pfeifer, C ., T homsen, P . D ., i S cherthan, H . (2001). Centromere and telomere redistribution precedes h omologue p airing an d t erminal synapsis i nitiation d uring p rophase I o f c attle spermatogenesis. *Cytogenet Cell Genet*, 93, 304-14.
- Pfeifer, C ., S cherthan, H ., i T homsen, P . D . (2003). Sex-specific telomere redistribution and synapsis initiation in cattle oogenesis. *Dev Biol*, 255, 206-15.
- Pfeiffer, V ., i L ingner, J . (2 012). TERRA promotes t elomere s hortening through exonuclease 1 -mediated r esection of chromosome ends. *PLoS Genet*, 8, e1002747.
- Pfeiffer, V., Crittin, J., Grolimund, L., i Lingner, J. (2013). The THO complex component Thp2 counteracts t elomeric R -loops a nd t elomere shortening. *EMBO J*, 32, 2861-71.
- Pisano, S., Marchioni, E., Galati, A., Mechelli, R., S avino, M ., i C acchione, S . (2007). Telomeric nucleosomes are intrinsically mobile. *J Mol Biol*, 369, 1153-62.
- Pittman, D . L., Cobb, J ., Schimenti, K . J ., Wilson, L. A., Cooper, D. M., Brignull, E., et al. (1998). Meiotic p rophase ar rest with failure o f chromosome s ynapsis i n mice d eficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell*, 1, 697-705.
- Platner, G. (1885). U eber di e E ntstehung de s Nebenkerns uns s eine B eziehung z ur Kerntheilung. *Archiv Mikrosk Anat*, 26, 343-69.
- Poon, S . S., i Lansdorp, P. M. (2001). Measurements of telomere length on individual chromosomes b y i mage c ytometry. E n Z. Darzynkiewicz, H. A . C rissman, i J. P. Robinson (Edits.), *Methods in Cell Biology: Flow Cytometry* (Vol. 64, págs. 69 -96). San Diego: Academic Press.
- Poongothai, J., Gopenath, T. S., i Manonayaki, S. (2009). G enetics o f h uman male i nfertility. *Singapore Med J*, 50, 336-47.
- Porro, A ., F euerhahn, S., R eichenbach, P ., i Lingner, J . (2010). M olecular d issection o f telomeric r epeat-containing R NA b iogenesis unveils t he p resence o f d istinct a nd multiple regulatory p athways. *Mol Cell Biol*, 30, 4808-17.
- Porro, A ., F euerhahn, S ., i Lingner, J . (2014). TERRA-Reinforced A ssociation of L SD1 with MRE11 P romotes P rocessing of Uncapped Telomeres. *Cell Rep*, 6, 765-76.
- Print, C. G., i Loveland, K. L. (2000). Germ cell suicide: new i nsights i nto a poptosis d uring spermatogenesis. *Bioessays*, 22, 423-30.
- Prowse, K . R., i G reider, C . W . (1995). Developmental and tissue-specific regulation of

mouse telomerase and telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 4818-22.

Pryce, D. W., i Mc Farlane, R. J. (2009). The meiotic recombination hotspots of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome Dyn*, 5, 1-13.

Ravindranath, N., Dalal, R., Solomon, B., Jakiewicz, D., i Dym, M. (1997). Loss of telomerase activity during male germ cell differentiation. *Endocrinology*, 138, 4026-9.

Redon, S., Reichenbach, P., i Lingner, J. (2010). The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic Acids Res*, 38, 5797-806.

Redon, S., Zemp, I., i Lingner, J. (2013). A three-state model for the regulation of telomerase by TERRA and hnRNPA1. *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gkt695.

Reese, M. G., i Eckman, F. H. (1995). Novel neural network algorithms for improved eukaryotic promoter site recognition. *The Seventh International Genome Sequencing and Analysis Conference, Hilton Head Island, South Carolina*.

Reig-Viader, R., Brieño-Enríquez, M. A., Khouriauli, L., Toran, N., Cabero, L., Giulotto, E., et al. (2013). Telomeric repeat-containing RNA and telomerase in human fetal oocytes. *Hum Reprod*, 28, 414-22.

Reig-Viader, R., Vilà-Cejudo, M., Vitelli, V., Fecunmed, Giulotto, E., García Caldes, M., et al. (2014a). Telomeric repeat-containing RNA (TERRA) and telomerase are components of telomeres during mammalian gametogenesis. *Biol Reprod*, 90, 103-113.

Reig-Viader, R., Capilla, L., Vilà-Cejudo, M., García, F., Anguita, B., García-Caldés, M., et al. (2014b). Telomere homeostasis is compromised in spermatocytes from patients with idiopathic infertility. *Fertil Steril*.

Reizel, Y., Itzkovitz, S., Adar, R., Elbaz, J., Jinich, A., Chapal-Ilani, N., et al. (2012). Cell lineage analysis of the mammalian female germline. *PLoS Genet*, 8, e1002477.

Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Hodges, C. A., Hunt, P. A., Liebe, B., et al. (2004). Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat Cell Biol*, 6, 555-62.

Riou, L., Bastos, H., Lassalle, B., Coureuil, M., Testart, J., Boussin, F. D., et al. (2005). The telomerase activity of adult mouse testis resides in the spermatogonial alpha1beta1 integrin-positive side population enriched in germinal stem cells. *Endocrinology*, 146, 3926-32.

Robbins, W. A., Vine, M. F., Truong, K. Y., i Everson, R. B. (1997). Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) to assess effects of smoking, caffeine, and alcohol on aneuploidy load in sperm of healthy men. *Environ Mol Mutagen*, 30, 175-83.

Rodríguez, I., Ody, C., Araki, K., García, I., i Vassalli, P. (1997). An early massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of the functional spermatogenesis. *EMBO J*, 16, 2262-70.

Rodríguez, S., Goyanes, V., Segrelles, E., Blasco, M. G., i Fernández, J. L. (2005). Critically short telomeres are associated with sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril*, 84, 843-5.

- Roeder, G. S., i Bailis, J. M. (2000). The pachytene checkpoint. *Trends Genet.*, 16, 395-403.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., i Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.*, 273, 5858-68.
- Rogakou, E. P., Nieves-Neira, W., Boon, C., Pommier, Y., i Bonner, W. M. (2000). Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem.*, 275, 9390-5.
- Roig, I., Liebe, B., Egoscue, J., Cabero, L., Garcia, M., i Scherthan, H. (2004). Female-specific features of recombinational double-stranded DNA repair in relation to synapsis and telomere dynamics in human oocytes. *Chromosoma*, 113, 22-33.
- Roig, I., Robles, P., Garcia, R., Martin, M., Egoscue, J., Cabero, L., et al. (2005). Evolution of the meiotic prophase and of the chromosome pairing process during human fetal ovarian development. *Hum Reprod.*, 20, 2463-9.
- Romanienko, P. J., i Camerini-Otero, R. D. (2000). The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell*, 6, 975-87.
- Rudenko, G., i Van der Poel, L. H. (1989). Transcription of telomere repeats in protozoa. *EMBO J.*, 8, 2633-8.
- Ruiz-Herrera, A., Garcia, F., i Garcia-Caldés, M. (2012). Radiobiology and reproduction - What can we learn from mammalian females? *Genes*, 3, 521-44.
- S**ales-Pardo, I., Avedaño, A., Martínez-Muñoz, V., García-Escarp, M., Ceballos, R., Whittle, P., et al. (2006). Flow cytometry of the Side Population: tips & tricks. *Cell Oncol.*, 28, 37-53.
- Sampl, S., Pramhas, S., Stern, C., Preusser, M., Marosi, C., i Holzmann, K. (2012). Expression of telomeres in astrocytoma WHO grade 2 to 4: TERRA level correlates with telomere length, telomerase activity, and advanced clinical grade. *Transl Oncol.*, 5, 56-65.
- Sánchez, F., i Smitz, J. (2012). Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1822, 1896-912.
- Sandelin, A., Cerni, P., Lenhard, B., Ponjavic, J., Hayashizaki, Y., i Hume, D. A. (2007). Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet.*, 8, 424-36.
- Santiso, R., Tamayo, M., Gómez-Sálvez, J., Meseguer, M., Garrido, N., i Fernández, J. L. (2010). Swim-up procedure selects spermatozoa with longer telomere length. *Mutat Res.*, 688, 88-90.
- Santos, J. H., Meyer, J. N., i Van Houten, B. (2006). Mitochondrial localization of telomerase as a determinant for hydrogen peroxide-induced mitochondrial DNA damage and apoptosis. *Hum Mol Genet.*, 15, 1757-68.
- Santucci-Darmanin, S., Walpita, D., Lespinasse, F., Desnuelle, C., Ashley, T., i Paukis-Flucklinger, V. (2000). MSH4 acts in conjunction with MLH1 during mammalian meiosis. *FASEB J.*, 14, 1539-47.
- Sarraj, M. A., i Drummond, A. E. (2012). Mammalian foetal ovarian development:

Bibliografia

- consequences for health and disease. *Reproduction*, 143, 151-63.
- Schaetzlein, S., Lucas-Hahn, A., Lemme, E., Kues, W. A., Dorsch, M., Manns, M. P., et al. (2004). Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 8034-8.
- Scheibe, M., Arnoult, N., Kappei, D., Buchholz, F., Decottignies, A., Bütter, F., et al. (2013). Quantitative interactions screen off telomeric repeat-containing RNA reveals novel TERRA regulators. *Genome Res*, doi:10.1101/gr.151878.112.
- Scherthan, H., Weich, S., Schwegler, H., Heyting, C., Härtle, M., Cremer, T. (1996). Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J Cell Biol*, 134, 1109-25.
- Scherthan, H., Jerratsch, M., Li, B., Smith, S., Hultén, M., Lock, T., et al. (2000). Mammalian meiotic telomeres: protein composition and redistribution in relation to nuclear pores. *Mol Biol Cell*, 11, 4189-203.
- Scherthan, H. (2007). Telomere attachment and clustering during meiosis. *Cel Mol Life Sci*, 64, 117-24.
- Schmekel, K., Meuwissen, R. L., Dietrich, A. J., Vink, A. C., van Marle, J., van Veen, H., et al. (1996). Organization of SCP1 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Exp Cell Res*, 226, 20-30.
- Schoeftner, S., Blasco, M. A. (2008). Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nature*, 450, 228-36.
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., et al. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev*, 18, 1251-62.
- Schrader, M., Müller, M., Heicappell, R., Krause, H., Schulze, W., Müller, K. (2000). Telomerase activity and expression of telomerase subunits in the testicular tissue of infertile patients. *Fertil Steril*, 73, 706-11.
- Schwacha, A., Kleckner, N. (1995). Identification of double Holliday junctions as intermediates in meiotic recombination. *Cell*, 83, 783-91.
- Schwacha, A., Kleckner, N. (1997). Interhomolog bias during meiotic recombination: meiotic functions promote a highly differentiated interhomolog-only pathway. *Cell*, 90, 1123-35.
- Segura, J., Ferreiro, L., Ramos-Onsins, S., Capilla, L., Farré, M., Reis, F., et al. (2013). Evolution of recombination in eutherian mammals: insights into mechanisms that affect recombination rates and crossover interference. *Proc Biol Sci*, 280, 20131945.
- Seki, Y., Yamaji, M., Yabuta, Y., Sano, M., Shigeta, M., Matsui, Y., et al. (2007). Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development*, 134, 2627-38.
- Sen, D., Gilbert, W. (1988). Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature*, 334, 364-6.

- Sfeir, A., de Lange, T. (2012). Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem. *Science*, 593-7.
- Sharma, G. G., Gupta, A., Wang, H., Scherthan, H., Dhar, S., Gandhi, V., et al. (2003). hTERT associates with human telomeres and enhances genomic stability and DNA repair. *Oncogene*, 22, 131-46.
- Sharpe, R. M., Firth, S. (2002). Environment, lifestyle and infertility - an inter-generational issue. *Nat Cell Biol*, 4, s33-40.
- Shkreli, M., Sarin, K. Y., Pech, M. F., Papeta, N., Chang, W., Brockman, S. A., et al. (2011). Reversible cell-cycle entry in adult kidney podocytes through regulated control of telomerase and Wnt signaling. *Nat Med*, 18, 111-9.
- Siderakis, M., Tarsounas, M. (2007). Telomere regulation and function during meiosis. *Chromosome Res*, 15, 667-79.
- Sigurdsson, M. I., Smith, A. V., Bjornsson, H. T., Jonsson, J. J. (2009). HapMap methylation-associated SNPs, markers of germline DNA methylation, positively correlate with regional levels of human meiotic recombination. *Genome Res*, 19, 581-9.
- Silber, S. J., Barbey, N. (2012). Scientific molecular basis for treatment of reproductive failure in the human: an insight into the future. *Biochim Biophys Acta*, 1822, 1981-96.
- Smirnova, A., Gamba, R., Khoriauli, L., Vitelli, V., Nergadze, S. G., Giulotto, E. (2013). TERRA expression levels do not correlate with telomere length and radiation sensitivity in human cancer cell lines. *Fron Oncol*, 3, doi: 10.3389/fonc.2013.00115.
- Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M. R., Schnapp, G., et al. (2000). Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol*, 20, 1659-68.
- Smogorzewska, A., de Lange, T. (2002). Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J*, 21, 4338-48.
- Snowden, T., Acharya, S., Butz, C., Berardini, M., Fisher, R. (2004). hMSH4-hMSH5 recognizes Holliday Junctions and forms a meiosis-specific sliding clamp that embraces homologous chromosomes. *Mol Cell*, 15, 437-51.
- Soldateschi, D., Bravaccini, S., Berti, B., Brogi, A., Benicchi, T., Soldatini, C., et al. (2005). Development and characterization of a monoclonal antibody directed against human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *J Biotechnol*, 118, 370-8.
- Solovei, I., Gaginskaya, E. R., Macgregor, H. C. (1994). The arrangement and transcription of telomere DNA sequences at the ends of lampbrush chromosomes of birds. *Chromosome Res*, 2, 460-70.
- Speed, R. M. (1982). Meiosis in the foetal mouse ovary. I. An analysis at the light microscope level using surface-spreading. *Chromosoma*, 85, 427-37.
- Starling, J. A., Mawle, J., Hastie, N. D., Allshire, R. C. (1990). Extensive telomere repeat arrays in mouse are hypervariable. *Nucleic Acids Res*, 18, 6881-8.
- Steinert, S., Shay, J. W., Wright, W. E. (2004). Modification of subtelomeric DNA. *Mol Cell Biol*, 24, 4571-80.

Bibliografia

- Subramanian, R., i Kapoor, T . M . (2013). Slipping past the spindle assembly checkpoint. *Nat Cell Biol*, 15, 1261-3.
- Sun, F ., G reene, C., T urek, P . J ., K o, E ., Rademaker, A., i Ma rtin, R . H . (2005). Immunofluorescent s ynaptosomal c omplex analysis in azoospermic men. *Cytogenet Genome Res*, 111, 368-70.
- Sun, F ., Mikhaail-Philips, M., Oliver-Bonet, M., Ko, E ., Rademaker, A., Turek, P ., et al. (2008). Reduced meiotic recombination on the X Y bivalent is co rrelated with an increased incidence of sex chromosome aneuploidy in men w ith no n-obstructive a zoospermia. *Mol Hum Reprod*, 14, 399-404.
- Sun, F ., Turek, P ., Greene, C., Ko, E ., Rademaker, A., i Ma rtin, R . H . (2006). Abnormal progression through meiosis in men with nonobstructive a zoospermia. *Fertil Steril*, 87, 565-71.
- Surani, M . A. (2001). R eprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature*, 414, 122-8.
- Sutcliffe, M. J., Darling, S. M., i Burgoyne, P. S. (1991). Spermatogenesis in XY, XYSxra and XOSxra mice: a quantitative a nalysis o f spermatogenesis t hroughout p uberty. *Mol Reprod Dev*, 30, 81-9.
- T**ada, T ., Tada, M., Hilton, K., Barton, S. C., Sado, T., Takagi, N., et al. (1998). E pigenotype s witching o f imprinted loci in embryonic germ cells. *Dev Genes Evol*, 207, 551-61.
- Takai, H ., Smogorzewska, A ., i de Lange, T . (2003). DNA damage f oci a t dy sfunctional telomeres. *Curr Biol*, 13, 1549-56.
- Tam, P. P., i Snow, M. H. (1981). Proliferation and migration o f primordial germ c ells d uring compensatory growth i n mouse e mbryos. *J Embryol Exp Morphol*, 64, 133-47.
- Tanemura, K ., O gura, A., Cheong, C ., G otob, H ., M atsumoto, K ., S ato, E ., et al. (2005). Dynamic rearrangement o f telomeres d uring spermatogenesis i n mice. *Dev Biol*, 281, 196-207.
- Tease, C ., i Jones, G . H . (1978). A nalysis o f exchanges in d ifferentially stained meiotic chromosomes of Locusta migratoria after BrdU-substitution and F PG staining. *Chromosoma*, 69, 163-178.
- Ten Hagen, K . G ., Gilbert, D . M., Willard, H . F., i Cohen, S. N. (1990). Replication timing of DNA s equences as sociated with human centromeres a nd telomeres. *Mol Cell Biol*, 10, 6348-55.
- Thijssen, P . E ., Tobi, E . W ., Bla log, J ., Schouten, S. G ., Kremer, D., El Bouazzaoui, F ., et al. (2013). Chromatin remodeling of human subtelomeres and TERRA promoters upon cellular senescence: co mmonalities a nd differences between chromosomes. *Epigenetics*, 8, 512-21.
- Thilagavathi, J ., Venkatesh, S ., i D ada, R . (2012). Telomere l ength i n r eproduction. *Andrologia*, doi: 10.1111/and.12008.
- Thilagavathi, J ., Kumar, M ., Mishra, S . S ., Vemprala, K ., Kumar, R ., i Dada, R . (2013a). Analysis o f sperm telomere length in men with idiopathic infertility. *Arch Gynecol Obstet*, 287, 803-7.
- Thilagavathi, J ., Mishra, S . S ., Kumar, M ., Vemprala, K ., Deka, D ., Dhadwal, V ., et al.

- (2013b). Analysis of telomere length in couples experiencing idiopathic recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet*, 30, 793-8.
- Tomlinson, R. L., Ziegler, T. D., Supakorndej, T., Terns, R. M., & Terns, M. P. (2006). Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Mol Biol Cell*, 17, 955-65.
- Tommerup, H., Dousmanis, A., & de Lange, T. (1994). Unusual chromatin in human telomeres. *Mol Cell Biol*, 14, 5777-85.
- Treff, N. R., Su, J., Taylor, D., & Scott, R. T. (2011). Telomere DNA deficiency is associated with development of human embryonic aneuploidy. *PLoS Genet*, 7, e1002161.
- Tsakiri, K. D., Cronkhite, J. T., Kuan, P. J., Xing, C., Raghunathan, G., Weissler, J. C., et al. (2007). A adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 7552-7.
- Turner, S., & Hartshorne, G. M. (2013). Telomere lengths in human pronuclei, oocytes and spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 19, 510-8.
- Tycowski, K. T., Shu, M. D., Kukoyi, A., & Steitz, J. A. (2009). A conserved WD40 protein binds to the Cajal body localization signal of scaRNP particles. *Mol Cell*, 34, 47-57.
- U**roz, L., Liehr, T., Mrásek, K., & Templado, C. (2009). Centromere-specific multicolour fluorescence in situ hybridization on human spermatocyte I and II metaphases. *Hum Reprod*, 24, 2029-33.
- Uroz, L., Rajmil, O., & Templado, C. (2011). Meiotic chromosome abnormalities in fertile men: are they increasing? *Fertil Steril*, 95, 141-6.
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., & Shiloh, Y. (2003). Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J*, 22, 5612-21.
- V**akoc, C. R., Mandat, S. A., Olenchock, B. A., & Blobel, G. A. (2005). Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell*, 19, 381-91.
- Van Bovenen, A., Arnoult, N., & Decottignies, A. (2013). Telomeric RNA expression: Length matters. *Front Oncol*, 3, 178.
- Vegetti, W., Van Assche, E., Farias, A., Verheyen, G., Bianchi, M. M., Bonduelle, M., et al. (2000). Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod*, 15, 351-65.
- Vendrell, J. M., García, F., Veiga, A., Calderón, G., Egózcue, S., Egózcue, J., et al. (1999). Meiotic abnormalities and spermatic parameters in severe oligoasthenozoospermia. *Hum Reprod*, 14, 375-8.
- Venteicher, A. S., Abreu, E. B., Meng, Z., McCann, K. E., Terns, R. M., Veenstra, T. D., et al. (2009). A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science*, 323, 644-8.
- Vera, E., Bernardes de Jesus, B., Foronda, M., Flores, J. M., & Blasco, M. A. (2012). The rate of increase of short telomeres predicts longevity in mammals. *Cell Rep*, 2, 732-7.

Bibliografia

- Verdun, R. E., i Karlseder, J. (2006). The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres. *Cell*, 127, 709-20.
- Viera, A., Gómez, R., Parra, M. T., Schmiesing, J. A., Yokomori, K., Rufas, J. S., et al. (2007). Condensin I reveals new insights on mouse meiotic chromosome structure and dynamics. *PLoS One*, 2, e783.
- Virant-Klun, I., Zech, N., Rozman, P., Vogler, A., Cvjeticanin, B., Klemenc, P., et al. (2008). Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with naturally present follicles and oocytes. *Differentiation*, 76, 843-56.
- Vitelli, V., Falvo, P., Khoriauli, L., Smirnova, A., Gamba, R., Santagostino, M., et al. (2013). More on the lack of correlation between TERRA expression and telomere length. *Front Oncol*, 3, 245.
- Voet, T., Liebe, B., Labaere, C., Marynen, P., i Scherthan, H. (2003). Telomere-independent homologue pairing and checkpoint escape of accessory ring chromosomes in male mouse meiosis. *J Cell Biol*, 162, 795-807.
- Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Ladhoff, J., d'Adda di Fagagna, F., i Jackson, S. P. (2005). Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev*, 126, 111-7.
- Vrbsky, J., Akimcheva, S., Watson, J. M., Turner, T. L., Daxinger, L., Vyskot, B., et al. (2010). siRNA-mediated methylation of Arabidopsis telomeres. *PLoS Genet*, 6, e1000986.
- Vulliamy, T., Marrone, A., Goldman, F., Dearlove, A., Bessler, M., Mason, P. J., et al. (2001). The RNA component of telomerase is mutated in a autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature*, 413, 432-5.
- Waclawska, A., i Karpisz, M. (2012). Key functional genes of spermatogenesis identified by microarray analysis. *Syst Biol Reprod Med*, 58, 229-35.
- Wallace, W. H., i Kelsey, T. W. (2010). Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PLoS One*, 5, e8772.
- Watson, J. V., Nakayama, A., Chambers, S. H., i Smith, P. J. (1985). Flow cytometric fluorescence emission spectrum analysis of Hoechst-33342-stained DNA in chicken thymocytes. *Cytometry*, 6, 310-5.
- Webb, C. J., Wu, Y., i Zakian, V. A. (2013). DNA repair at telomeres: keeping ends intact. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, pii: a012666.
- Wellinger, R. J., Etier, K., Labrecque, P., i Zakian, V. A. (1996). Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell*, 85, 423-33.
- Wilcox, A. J., Weinberg, C. R., i Baird, D. D. (1995). Timing of sexual intercourse in relation to ovulation. Effects on the probability of conception, survival of the pregnancy, and sex of the baby. *N Engl J Med*, 333, 1517-21.
- Winkel, K., Alzheimer, M., Ollinger, R., i Benavente, R. (2009). Protein SYCP2 provides a link between transverse filaments and lateral elements of mammalian synaptonemal complexes. *Chromosoma*, 118, 259-67.

- Wolstenholme, J., i Angell, R. R. (2000). Maternal age and trisomy - a unifying mechanism of formation. *Chromosoma*, 109, 435-8.
- Woods, L. M., Hedges, C. A., Baart, E., Baker, S. M., Liskay, M., i Hunt, P. A. (1999). Chromosomal influence on meiotic spindle assembly: abnormal meiosis I in female Mlh1 mutant mice. *J Cell Biol*, 145, 1395-406.
- Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W., i Shay, J. W. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet*, 18, 173-9.
- Wright, W. E., Tesmer, V. M., Liao, M. L., i Shay, J. W. (1999). Normal human telomeres are not late replicating. *Exp Cell Res*, 251, 492-9.
- Wright, D. L., Jones, E. L., Mayer, J. F., Oehninger, S., Gibbons, W. E., i Lanzendorf, S. E. (2001). Characterization of telomerase activity in the human oocyte and preimplantation embryo. *Mol Hum Reprod*, 7, 947-55.
- Wu, L., i Hickson, I. D. (2003). The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature*, 426, 870-4.
- X**in, H., Liu, D., Wan, M., Safari, A., Kim, H., Sun, W., et al. (2007). TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature*, 445, 559-62.
- Xu, J., i Yang, X. (2000). Telomerase activity in bovine embryos during early development. *Biol Reprod*, 63, 1124-8.
- Xu, Y., i Komiyama, M. (2012). Structure, function and targeting of human telomere RNA. *Methods*, 57, 100-5.
- Xu, Y., Komiyama, M. (2008). Human telomere RNA and DNA form an intermolecular G-quadruplex. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 169-70.
- Y**amada-Fukunaga, T., Yamada, M., Hamatani, T., Chikazawa, N., Ogawa, S., Akutsu, H., et al. (2013). Age-associated telomere shortening in mouse oocytes. *Reprod Biol Endocrinol*, 11, 108.
- Yamamoto, Y., Sofikitis, N., Ono, K., Kaki, T., Isovama, T., Suzuki, N., et al. (1999). Postmeiotic modifications of spermatogenic cells are accompanied by inhibition of telomerase activity. *Urol Res*, 27, 336-45.
- Yang, F., Dela Fuente, R., Leu, N. A., Baumann, C., McLaughlin, K. J., i Wang, P. J. (2006). Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis. *J Cell Biol*, 173, 497-507.
- Yashima, K., Maitra, A., Rogers, B. B., Timmons, C. F., Rathi, A., Pinar, H., et al. (1998). Expression of the RNA component of telomerase during human development and differentiation. *Cell Growth Differ*, 9, 805-13.
- Yehezkel, S., Rebibo-Sabbah, A., Segev, Y., Zukerman, M., Shaked, R., Huber, I., et al. (2011). Reprogramming of telomeric regions during the generation of human induced pluripotent stem cells and subsequent differentiation into fibroblast-like derivatives. *Epigenetics*, 6, 63-75.

Bibliografia

- Yehezkel, S., Segev, Y., Viegas-Péquignot, E., Skorecki, K., & S. S. (2008). Hypomethylation of subtelomeric regions in CF syndrome is associated with abnormally short telomeres and enhanced transcription from telomeric regions. *Hum Mol Genet*, 17, 2776-89.
- Yoshida, K., Kondoh, G., Matsuda, Y., Habu, T., Nishimune, Y., & Morita, T. (1998). The mouse ReCA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol Cell*, 1, 707-18.
- Yoshida, M., Katayama, S., Tateho, K., Nakamura, H., Miyoshi, J., Ohba, T., et al. (2013). Microtubule-organizing center formation at telomeres induces meiotic telomere clustering. *J Cell Biol*, 200, 385-95.
- Yu, T. Y., & Kao, Y. W. (2010). Telomeric transcripts stimulate telomere recombination to suppress senescence in cells lacking telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Yuan, L., Liu, J. G., Hoja, M. R., Wilbertz, J., Nordqvist, K., & Höög, C. (2002). Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science*, 296, 1115-8.
- Yuan, L., Liu, J. G., Zhao, J., Brundell, E., & Daneholt, B. H. (2000). The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell*, 5, 73-83.
- Z**ahler, A. M., Williamson, J. R., Cech, T. R., & Prescott, D. M. (1991). Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature*, 350, 718-20.
- Zenzenes, M. T., Wang, P., & Casper, R. F. (1995). Cigarette smoking may affect meiotic maturation of human oocytes. *Hum Reprod*, 10, 3213-17.
- Zhang, L. F., Ogawa, Y., Ahn, J., Y., Namekawa, S. H., Silva, S. S., & Lee, J. T. (2009). Telomeric RNAs mark Sex Chromosomes in Stem Cells. *Genetics*, 182, 685-98.
- Zhao, H., & Pawlak, H. (2001). A TR-mediated checkpoint pathway regulates phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol*, 21, 4129-39.
- Zhu, J., Wang, H., Bishop, J. M., & Blackburn, E. H. (1999). Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 3723-8.
- Zhu, X. D., Küster, B., Mann, M., Petrini, J. H., & de Lange, T. (2000). Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet*, 25, 347-52.
- Zickler, D., & Kleckner, N. (1998). The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu Rev Genet*, 32, 619-97.
- Zijlmans, J. M., Martens, U. M., Poon, S. S., Raap, A. K., Tanke, H. J., Ward, R. K., et al. (1997). Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 7423-8.
- Zimmermann, M., & de Lange, T. (2013). 53BP1: pro choice in DNA repair. *Trends Cell Biol*, doi: 10.1016/j.tcb.2013.09.003.
- Zou, L., & Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-DNA complexes. *Science*, 300, 1542-8.

Zou, K., Yuan, Z., Yang, Z., Luo, H., Sun, K., Zhou, L., *et al.* (2009). Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol*, 11, 631-6.