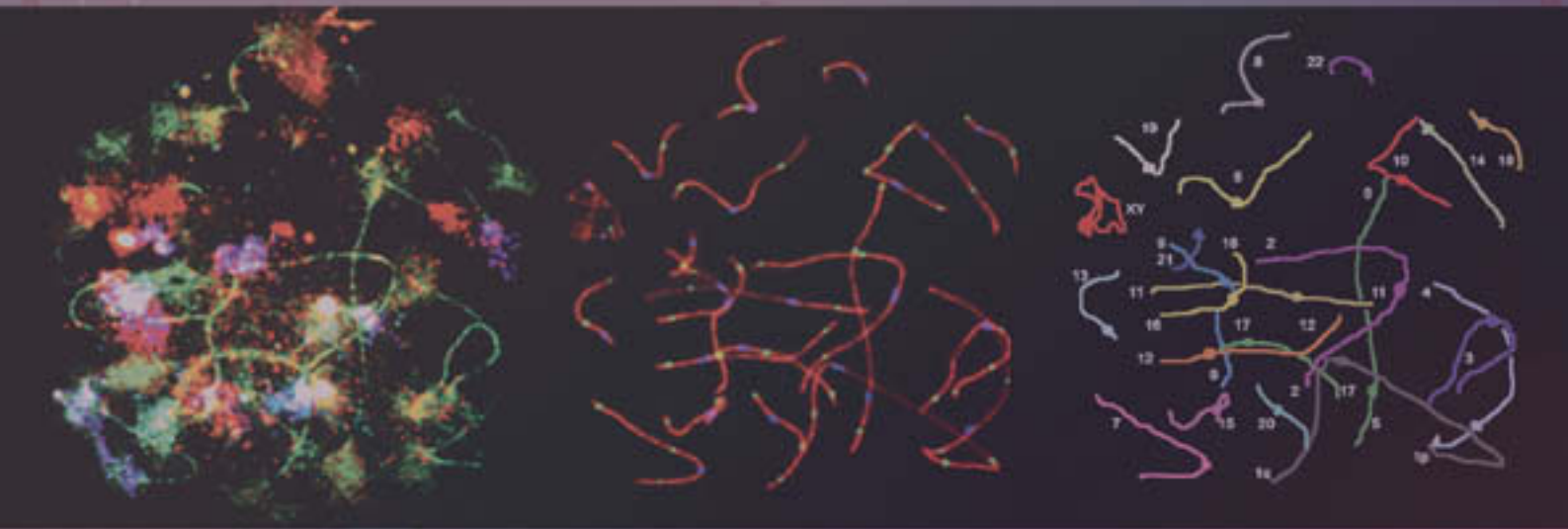


**Estudi de la sinapsi i de la recombinació meiótica  
en espermatòcits humans mitjançant  
immunocitofluorescència i stM-FISH**



**Tesi Doctoral**

**Montserrat Codina Pascual**

**DESEMBRE 2005**

# **Estudi de la sinapsi i de la recombinació meiòtica en espermatòcits humans mitjançant immunocitofluorescència i stM-FISH**

Memòria presentada per Montserrat Codina Pascual per optar al grau de doctor en Biologia Cel·lular per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Montserrat Codina Pascual  
Desembre de 2005

El doctor Jordi Benet, professor titular, i la doctora Joaquina Navarro, professora titular del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

**CERTIFIQUEN**

Que Montserrat Codina Pascual ha fet sota la seva direcció el treball d'investigació titulat **“Estudi de la sinapsi i de la recombinació meiòtica en espermatòcits humans mitjançant immunocitofluorescència i stM-FISH”**, per optar al títol de doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Que aquest treball ha estat fet a la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

I, perquè així consti, firmen el present certificat.

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), desembre de 2005

Dr. Jordi Benet  
Director

Dra Joaquina Navarro  
Directora

**Als meus pares,**

**a l'Albert,**

**al Jordi,**

**a tots vosaltres...**

Aquest treball s'ha realitzat amb el finançament dels projectes:

- Fondo Investigación Sanitaria PI020258
- Generalitat de Catalunya 2001 SGR 00201
- Generalitat de Catalunya 2005 SGR 00495

Aquest estudi també s'ha beneficiat d'una beca de la Generalitat de Catalunya per a la Formació de personal Investigador (2001FI00468) i de dos ajuts d'aquest mateix organisme per a estades a l'estranger.

# ÍNDEX

<b>ÍNDEX</b> .....	III
<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	9
<b>1.1 ESPERMATOGÈNESI</b> .....	11
<b>1.2 MEIOSI</b> .....	14
1.2.1. Primera divisió meiòtica .....	16
1.2.1.1 Visió prèvia.....	16
1.2.1.2 Profase I .....	17
1.2.1.2.1 Preleptotè/Leptotè .....	18
1.2.1.2.1.1 Aparellament .....	18
1.2.1.2.1.2 Recombinació meiòtica .....	18
1.2.1.2.2 Zigotè.....	19
1.2.1.2.2.1 Aparellament i sinapsi.....	20
1.2.1.2.2.2 Recombinació meiòtica .....	20
1.2.1.2.3 Paquitè .....	21
1.2.1.2.3.1 Aparellament i sinapsi.....	21
1.2.1.2.3.2 Recombinació meiòtica .....	21
1.2.1.2.4 Diplotè-diacinesi.....	23
1.2.1.3 Metafase I .....	23
1.2.1.4 Anafase I i citocinesi .....	23
1.2.2 Segona divisió meiòtica .....	23
<b>1.3 PUNTS CONTROL MEIOSI</b> .....	24
1.3.1 Punt de control de paquitè ( <i>Checkpoint</i> de paquitè).....	24
1.3.2 Altres punts de control .....	25
<b>1.4 COMPLEX SINAPTINEMAL</b> .....	26
1.4.1 Estructura.....	26
1.4.1.1 Elements axials/laterals (AE/LE) .....	26
1.4.1.2 Element central (CE) .....	27
1.4.2 Característiques i funcions del SC .....	29
1.4.3 Anàlisi dels SCs .....	29
1.4.3.1 Tècniques emprades per a l'anàlisi .....	29

<b>1.5 LA RECOMBINACIÓ MEIÒTICA</b> .....	31
1.5.1 Anàlisi de la recombinació meiòtica .....	31
1.5.1.1 Mètodes directes .....	31
1.5.1.1.1 Anàlisi de bivalents meiòtics a diacinesi/metafase I .....	31
1.5.1.1.2 Anàlisi de punts de recombinació en gametòcits a paquitè .....	32
1.5.1.2 Mètode indirecte .....	33
1.5.2 Variabilitat de la recombinació meiòtica en humans .....	35
<b>1.6 ANOMALIES DE LA SINAPSI I DE LA RECOMBINACIÓ MEIÒTICA: REDUCCIÓ DE LA FERTILITAT</b> .....	36
1.6.1 Individus amb cariotip anòmal .....	36
1.6.1.2 Sinapsi i recombinació en portadors de reorganitzacions cromosòmiques.....	36
1.6.2 Individus amb cariotip normal.....	37
1.6.2.1 Anomalies del SC i la seva relació amb la infertilitat .....	37
1.6.2.2 Anomalies en la recombinació meiòtica.....	38
<b>2. OBJECTIUS</b> .....	39
2.1 HIPÒTESI.....	41
2.2 OBJECTIUS .....	41
<b>3.MATERIAL I MÈTODES</b> .....	43
3.1 EXTENSIONS DE COMPLEXES SINAPTINEMALS (SCs) .....	45
3.1.1 Obtenció material biològic testicular .....	45
3.1.2 Processat material biològic testicular .....	45
3.1.2.1 Protocol #1 (Barlow and Hultén, 1998).....	45
3.1.2.1.1 Material i reactius .....	45
3.1.2.1.2 Obtenció de la suspensió cel·lular .....	46
3.1.2.1.3 Extensió i fixació de la suspensió cel·lular .....	46
3.1.2.2 Protocol #2.....	48
3.1.2.2.1 Material i reactius .....	48
3.1.2.2.2 Obtenció, extensió i fixació de la suspensió cel·lular .....	50
3.1.3 Immunocitofluorescència .....	50
3.1.3.1 Material i reactius .....	50
3.1.3.2 Immunocitofluorescència .....	51
3.1.4 Observació i captura .....	52



3.1.5 Anàlisi de les cèl·lules en estadi de paquitè .....	52
3.1.6 Anàlisi de les dades obtingudes .....	53
<b>3.2 HIBRIDACIÓ <i>IN SITU</i> FLUORESCENT (FISH) EN EXTENSIONS DE SCs .....</b>	<b>54</b>
3.2.1 Subtelomere multiplex-FISH (stM-FISH).....	54
3.2.1.1 Amplificació de les sondes subtelomèriques .....	55
3.2.1.1.1 Material i reactius .....	55
3.2.1.1.2 Protocol .....	56
3.2.1.2 Electroforesi de comprovació d'amplificació.....	57
3.2.1.2.1 Material i reactius .....	57
3.2.1.2.2 Protocol .....	57
3.2.1.3 Marcatge de les sondes subtelomèriques .....	57
3.2.1.3.1 Material i reactius .....	57
3.2.1.3.2 Protocol .....	59
3.2.1.4 Electroforesi de comprovació de marcatge.....	59
3.2.1.5 Digestió de les sondes subtelomèriques .....	59
3.2.1.5.1 Material i reactius .....	59
3.2.1.5.2 Protocol .....	60
3.2.1.6 Electroforesi de comprovació de digestió.....	60
3.2.1.7 Precipitació i preparació de la solució d'hibridació.....	61
3.2.1.7. 2 Protocol .....	61
3.2.1.7.1 Material i reactius .....	61
3.2.1.8 Preparació dels portes i tractament amb pepsina.....	61
3.2.1.8.1 Material i reactius .....	61
3.2.1.8.2 Protocol .....	62
3.2.1.9 Hibridació <i>in situ</i> fluorescent (FISH).....	62
3.2.1.9.1 Material i reactius .....	62
3.2.1.9.2 Protocol .....	62
3.2.1.10 Rentats posthibridació i detecció.....	63
3.2.1.10.1 Material i reactius.....	63
3.2.1.10.2 Protocol.....	63
3.2.1.11 Observació i captura .....	63
3.2.1.12 Anàlisi de les imatges.....	64
3.2.1.12.1 Identificació dels complexos sinaptinimals (SCs).....	64
<b>3.3 LONGITUD DELS SCs I POSICIÓ RELATIVA DELS PUNTS DE MLH1 .....</b>	<b>65</b>
3.3.1 Mesura dels SCs i posició del centròmer i dels punts de MLH1 .....	65
3.3.2 Anàlisi de les dades .....	67

<b>3.4 CARACTERITZACIÓ CITOGENÈTICA D'UN ISOCROMOSOMA DICÈNTRIC</b>	
<b>Yq (p11.32)</b> .....	69
3.4.1 Característiques de l'individu portador.....	69
3.4.2 Cultiu de limfòcits i obtenció de cromosomes mitòtics .....	69
3.4.2.1 Material i reactius .....	69
3.4.2.2 Protocol .....	70
3.4.3 Bandeig de cromosomes de limfòcit.....	70
3.4.3.1 Material i reactius .....	70
3.4.3.2 Protocol Bandes G .....	70
3.4.3.3 Protocol Bandes C.....	70
3.4.4 Obtenció i fixació de cèl·lules de la mucosa bucal .....	71
3.4.4.1 Material i reactius .....	71
3.4.4.2 Protocol .....	71
3.4.5 Hibridació <i>in situ</i> fluorescent (FISH) en limfòcits i en cèl·lules de la	
mucosa bucal .....	71
3.4.5.1 Sondes utilitzades.....	71
3.4.5.2 FISH en limfòcits .....	71
3.4.5.3 FISH en cèl·lules de la mucosa bucal .....	72
<b>4.RESULTATS</b> .....	73
<b>Article 1</b> .....	75
Characterization of all human synaptonemal complexes by subtelomere	
multiplex-FISH	
<b>Article 2</b> .....	81
Synapsis and meiotic recombination analyses MLH1 focus in the XY pair as an	
indicator	
<b>Article 3</b> .....	93
Behaviour of the human heterochromatic regions during the synapsis of homologous	
chromosomes	
<b>Article 4</b> .....	111
Crossover frequency and synaptonemal complex length: their variability and	
effects on human male meiosis	
Annex.....	137
<b>Article 5</b> .....	145
A human tetraploid pachytene as the possible origin of diploid sperm	
<b>Article 6</b> .....	153
FISH characterization of a dicentric Yq(p11.32) isochromosome in an azoospermic	
male	

<b>5. DISCUSSIÓ</b> .....	161
<b>5.1 VALORACIÓ DE LES TÈCNiques EMPRADES</b> .....	163
5.1.1 Protocol d'extensió-fixació i aplicació de la immunocitofluorescència. ....	163
5.1.2 Aplicació del mètode multiplex-FISH amb sondes subtelomèriques específiques (stM-FISH) .....	164
<b>5.2 ELS SUBESTADIS DE PAQUITÈ: INICIAL I TARDÀ</b> .....	165
<b>5.3 SINAPSI I ANOMALIES SINÀPTIQUES</b> .....	166
5.3.1 Incidència d'anomalies sinàptiques en individus infèrtils vs controls.....	167
5.3.2 Incidència d'anomalies sinàptiques en els 22 SCs autosòmics .....	168
<b>5.4 LOCALITZACIÓ DELS SCs AUTOSÒMICS RESPECTE DEL PARELL XY</b> .....	170
5.4.1 SCs autosòmics propers i associats al parell XY: paper de l'heterocromatina....	170
<b>5.5 RECOMBINACIÓ MEIÒTICA</b> .....	171
5.5.1 Variabilitat individual en la recombinació .....	172
5.5.2 Presència de recombinació en el parell XY.....	173
5.5.3 Freqüència de recombinació en els SCs autosòmics .....	174
5.5.3.1 Diferències observades entre individus.....	176
5.5.4 Distribució de recombinació en els SCs autosòmics.....	177
5.5.4.1 Diferències observades entre individus.....	179
5.5.5 Com pot actuar la interferència entre punts de recombinació? .....	180
5.5.6 Aplicabilitat dels perfils de recombinació: e.g. inv(1)(p22p34.3).....	181
<b>5.6 SINAPSI I RECOMBINACIÓ EN UN ESPERMATÒCIT TETRAPLOIDE</b> .....	182
5.6.1 Aparellament en un espermatòcit tetraploide.....	183
5.6.2 Recombinació en un espermatòcit tetraploide .....	183
<b>5.7 LONGITUD DEL SC</b> .....	184
<b>5.8 DISRUPCIÓ DE L'ESPERMATOGÈNESI EN UN PORTADOR D'UN ISOCROMOSOMA DICÈNTRIC Yq(p11.32)</b> .....	186
5.8.1 Origen i mecanisme de formació del idic(Yq).....	186
5.8.2 Característiques fenotípiques .....	187
<b>6. CONCLUSIONS</b> .....	189
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	197

# **1. INTRODUCCIÓ**

## 1.1 ESPERMATOGÈNESI

L'espermatogènesi és el procés de formació, desenvolupament i maduració de les cèl·lules germinals que té lloc a les gònades masculines. Consisteix en una sèrie d'esdeveniments cel·lulars seqüencials que permeten que les cèl·lules mare germinals diploides es transformin en gàmetes haploides. Durant tot aquest procés trobem diferents tipus cel·lulars: les espermatogònies (tipus A i B), els espermatòcits (primaris i secundaris), les espermatides i finalment els espermatozoides. En humans, l'espermatogènesi dura 74 dies aproximadament. D'aquests, 16 dies corresponen a la fase proliferant, 25 a la divisió meiótica i 33 a l'espermioogènesi. Durant la fase proliferant les espermatogònies es divideixen mitòticament de manera constant originant espermatogònies tipus A i B. Les espermatogònies tipus A continuen proliferant mitòticament per donar lloc a noves espermatogònies, i les tipus B entren en meiosi esdevenint espermatòcits primaris. Aquests pateixen la primera divisió meiótica o reduccional, obtenint així els espermatòcits secundaris, que són ja cèl·lules amb una dotació cromosòmica haploide. Els espermatòcits secundaris entren a la segona divisió meiótica donant lloc a les espermatides, que contenen una dotació cromosòmica haploide tant pel que fa a cromosomes com a cromàtides. Durant la darrera fase de l'espermatogènesi, les espermatides entren en un procés de diferenciació cel·lular, anomenat espermioogènesi, en el que pateixen importants canvis morfològics, citoplasmàtics i nuclears per acabar convertint-se en espermatozoides.

Tot aquest procés, que té lloc als túbuls seminífers de les gònades masculines, s'inicia cíclicament a intervals regulars i de manera sincrònica al llarg de la vida fèrtil de l'individu. Com a conseqüència, s'observen els diferents estadis cel·lulars ordenats concèntricament en diverses capes constituint l'epiteli seminífer dels túbuls (Figura 1.1). Cada una de les capes conté cèl·lules en una mateixa etapa de desenvolupament. A la vegada, en els túbuls seminífers també s'hi troben les cèl·lules de Sertoli que nodreixen i fan de suport de les cèl·lules de la línia germinal. Com a resultat, a nivell histològic s'observa una estratificació de l'epiteli seminífer. Prop de la làmina basal, part més externa del túbul seminífer, hi trobem les espermatogònies i cap a la llum del túbul s'hi col·loquen, en aquest ordre, els espermatòcits primaris, els secundaris, les espermatides i els espermatozoides (Figura 1.2).

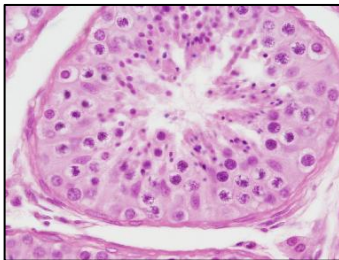
El nombre de divisions cel·lulars necessari per produir un espermatozoide és molt més elevat que el nombre de divisions requerides per produir un oòcit (Strachan and Read, 1999a).

L'oogènesi humana només té lloc durant l'etapa fetal i s'atura en el període perinatal. La població total de cèl·lules germinals en l'embrió femella s'estima d'uns  $6,8 \times 10^6$  durant els primers cinc mesos de gestació. El nombre esperat de divisions cel·lulars requerides per tal de generar totes aquestes cèl·lules seria al voltant de 22. A la maduresa sexual, dues divisions més (meiótiques) són necessàries per tal de produir un oòcit. Amb això, es pot dir que en

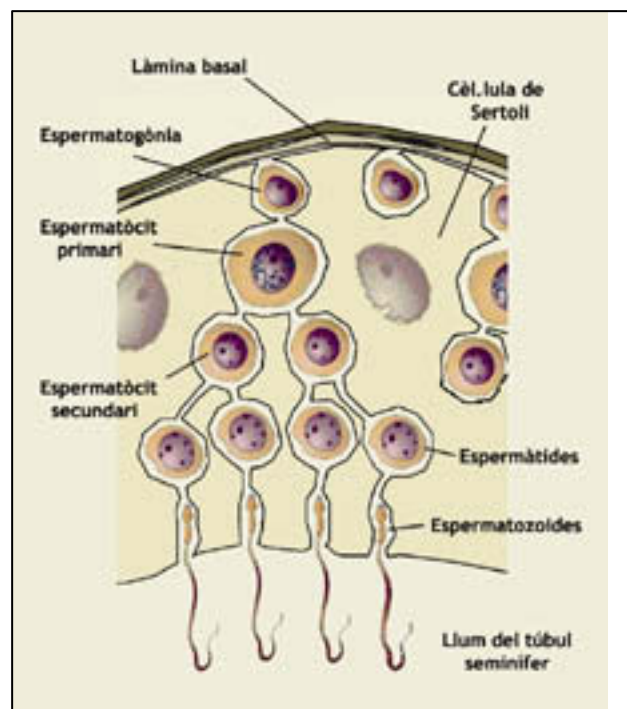
## Introducció

femelles el nombre estimat de divisions cel·lulars des del zigot fins a l'oòcit és de 24 (Figura 1.3 a).

En mascles, el nombre necessari de divisions cel·lulars per obtenir el pool d'espermatogònies mare a la pubertat és de 30. Posteriorment, es requereixen cinc divisions més consecutives, dues d'elles meiòtiques, per tal d'obtenir un espermatozoide. El fet que l'espermatogènesi humana és contínua durant tota l'edat adulta i que cada 16 dies s'inicia un nou cicle (23 cicles per any) fa que el pool d'espermatogònies mare s'hagi d'anar mantenint (Figura 1.3b). Aquest fet implica que el nombre de divisions cel·lulars prèvies a l'entrada a l'espermatogènesi i, per tant, el nombre de divisions per obtenir un espermatozoide vagi augmentant amb l'edat de l'individu.



**Figura 1.1** Tall transversal d'un túbul seminífer humà tenyit amb hematoxilina i eosina.



**Figura 1.2** Esquema de la disposició de les diferents cèl·lules del túbul seminífer.

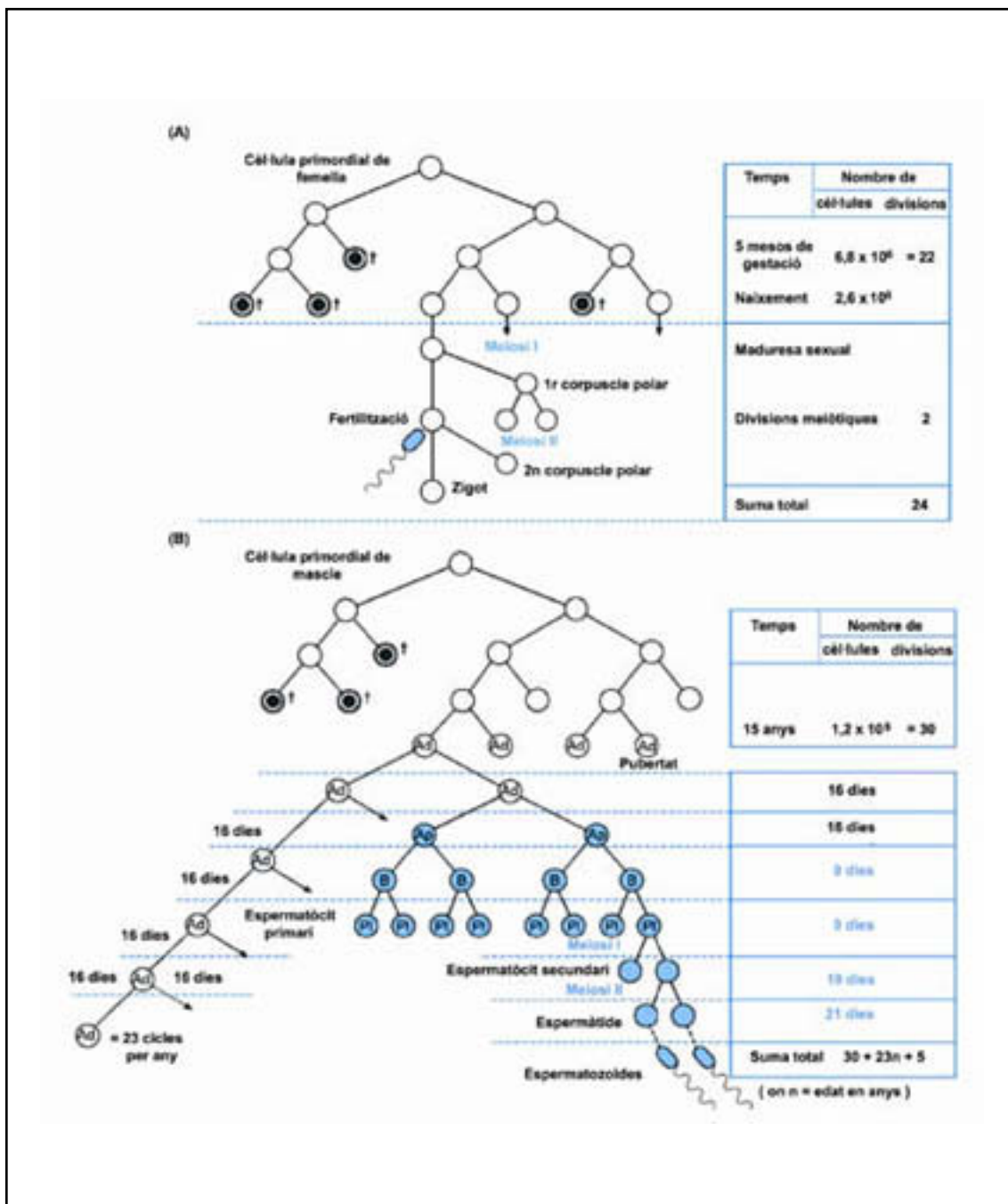


Figura 1.3 a) Esquema del nombre estimat de divisions cel·lulars necessàries per produir un oòcit. b) Esquema del nombre estimat de divisions cel·lulars necessàries per produir un espermatoçit. (Strachan and Read, 1999a)

## 1.2 MEIOSI

La meiosi és una divisió cel·lular especialitzada que té com a finalitat la formació de gàmetes amb un contingut genètic haploide i mitjançant les quals es garanteixi la diploidia i variabilitat genètica de l'espècie en el zigot format per la fecundació d'un oòcit per un espermatozoide. Previ a les dues divisions meiòtiques consecutives es realitza una única replicació del DNA. De les dues divisions meiòtiques cal destacar-ne la primera, anomenada també meiosi I, que consisteix en una divisió reduccional del genoma, en la que cada un dels cromosomes homòlegs segrega cap a pols oposats. Durant la segona divisió o meiosi II, es dona la separació de les dues cromàtides germanes, de manera similar a la divisió mitòtica (Figura 1.4).

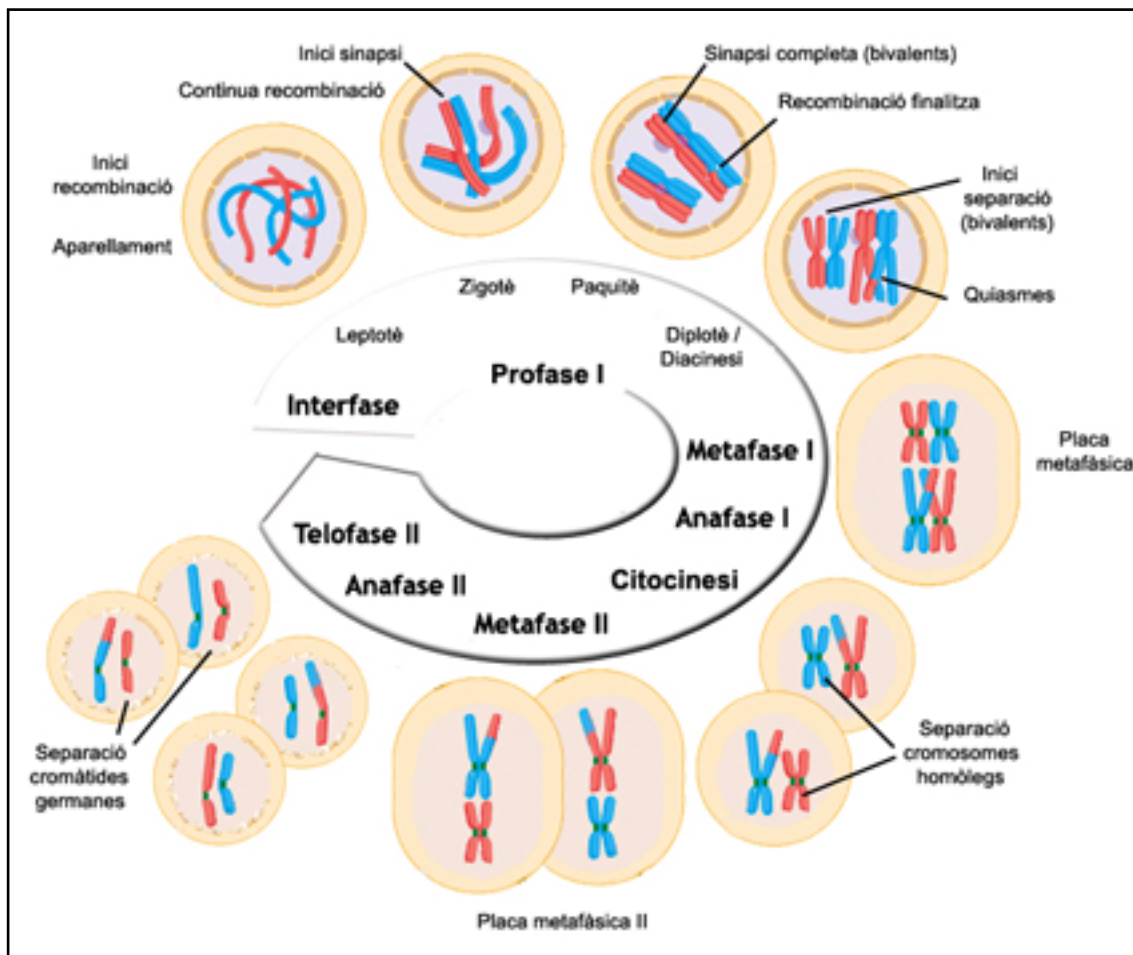


Figura 1.4 Representació gràfica de les diferents fases de la meiosi i dels processos que hi tenen lloc.



La meiosi és un procés molt conservat al llarg de l'evolució ja que es troba en gairebé la totalitat dels éssers eucariotes que es reproduïxen sexualment: llevats (e.g. *Saccharomyces cerevisiae*), plantes (e.g. *Arabidopsis thaliana*), nemàtodes (e.g. *Caenorhabditis elegans*), insectes (e.g. *Drosophila melanogaster*) i mamífers (e.g. *Mus musculus*, *Mesocricetus auratus* i *Homo sapiens sapiens*). Entre individus de la mateixa espècie, d'altres espècies i individus de sexes diferents s'observen algunes diferències en el procés meiòtic, però l'essència bàsica d'aquesta divisió cel·lular, la reducció a la meitat del nombre de cromosomes i la creació de variabilitat, es manté constant en tots els casos. En mamífers, la meiosi en mascles i en femelles presenta grans diferències morfològiques i biològiques (Taula 1.1), fet que fa que es parli d'un dimorfisme sexual de la meiosi.

**Taula 1.1:** Diferències morfològiques i biològiques bàsiques entre la meiosi masculina i la femenina

	Meiosi femenina	Meiosi masculina
Temps	La profase I té lloc durant el desenvolupament embrionari. De la metafase I en endavant té lloc després de la pubertat.	La meiosi s'inicia a la pubertat i avança sense interrupcions.
Sincronia	Tota la població d'oòcits avancen en la meiosi sincrònicament fins a dictiotè on s'aturen. Posteriorment, una selecció d'oòcits són estimulats per completar la meiosi I i II després de la pubertat.	Els espermatòcits avancen en la meiosi en onades contínues al llarg de la tota la vida fèrtil de l'individu. Nous espermatòcits són obtinguts a partir de la proliferació de les espermatogònies per divisions mitòtiques.
Producció gàmetes	Es produeix un oòcit haploide i dos corpuscles polars en cada cicle de meiosi. Generalment, un sol oòcit és ovulat cada vegada.	Es produeixen quatre espermatòcits haploides en cada cicle de la meiosi. S'ejaculen milions d'espermatozoides.
Períodes d'aturada	Dos: 1. Dictiotè: després de la profase I fins a que són estimulats per madurar. 2. Metafase II: dura fins a la fertilització.	Cap
Morfologia	Cada oòcit està aïllat de la resta d'oòcits i està envoltat de les cèl·lules de la granulosa a l'ovari.	Els espermatòcits estan units per unions gap i envoltats per les cèl·lules de Sertoli.
Taxa de gàmetes aneuploïds	Humans, fins 25%	Humans, ~ 2%
Temperatura	Corporal	5-7°C per sota la temperatura corporal
Cromosomes sexuals	Homologia completa entre els cromosomes X.	Homologia entre els cromosomes X i Y a les regions PAR.

Adaptada i modificada de (Morelli and Cohen, 2005).

## 1.2.1. PRIMERA DIVISIÓ MEIÒTICA

### 1.2.1.1 VISIÓ PRÈVIA

La finalitat de la primera divisió meiòtica, tal i com s'ha dit anteriorment, consisteix en reduir a la meitat de la dotació gènica de la gàmeta en formació i en generar variabilitat genètica. Es caracteritza per tenir una primera etapa, profase I, molt llarga seguida d'una metafase I, una anafase I i una citocinesi.

Abans d'entrar en la primera divisió meiòtica, durant la fase S de l'últim cicle cel·lular premeiòtic, en el nucli de l'espermatogònia es produeix una ronda de replicació de DNA. Aquesta cèl·lula comença la primera divisió meiòtica amb 46 cromosomes, cadascun d'ells amb dues cromàtides germanes. Durant la meiosi els cromosomes pateixen una sèrie de canvis estructurals (Zickler and Kleckner, 1998).

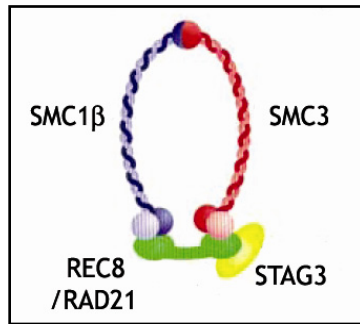
Aquestes dues cromàtides germanes s'han de mantenir unides per tal d'assegurar la seva correcta segregació en les dues divisions cel·lulars que tindran lloc. Una estructura proteica formada per un conjunt de proteïnes anomenades cohesines és l'encarregada de realitzar i mantenir la cohesió entre les cromàtides germanes (SCC). Es produeix un reemplaçament de les cohesines mitòtiques per altres cohesines específiques de la meiosi, capaces de col·laborar en el procés de recombinació meiòtica i actuar en les dues divisions cel·lulars meiòtiques consecutives. El complex de cohesines meiòtiques està format per les següents proteïnes (Figura 1.5).

- **SMC1 $\beta$**  i **SMC3** (Structural Maintenance of Chromosomes). Són les variants meiòtiques de les SMC1 i SMC3 mitòtiques. Ambdues proteïnes formen un heterodímer en forma de llaç que abraça les dues cromàtides germanes mantenint-les juntes.

- **REC8**. És la homòloga a la RAD21 mitòtica. Aquesta proteïna té la funció de "segellar" l'heterodímer evitant que aquest s'obri. El complex RAD21/SCC1 però, també s'ha trobat en els cromosomes meiòtics (Xu *et al.*, 2004).

- **STAG3**. És la variant meiòtica de les STAG1 i STAG2. S'uneixen al complex meiòtic de cohesines a través de la REC8. En *S. Pombe* aquesta proteïna s'anomena REC11.

La proteïna REC8 comença a reemplaçar la cohesina mitòtica homòloga durant l'última fase S pre-meioítica (Eijpe *et al.*, 2003). Les altres cohesines s'aniran incorporant durant la profase I meiòtica (revisat a Page and Hawley, 2004).



**Figura 1.5** Representació esquemàtica de l'estructura del complex de cohesines específiques de meiosi. Adaptació de (Petronczki *et al.*, 2003).

Un altre dels components estructural proteics que forma part dels cromosomes mitòtics és el complex proteic de condensines, molt conservat evolutivament. En llevats, s'ha descrit que aquest complex també és present com a component estructural dels cromosomes meiòtics. Aquest complex està format per dues subunitats SMC (SMC2 i SMC4) i per tres subunitats més (Ycs4p, Ycs5p i Brn1p). S'ha descrit que és necessari per a la compactació dels elements axials (AEs) i dels cromosomes, per a la correcta estructuració del complex sinaptnemal (SC) (veure apartat 1.2.1.2) i per a la resolució del procés de recombinació meiòtica (Yu and Koshland, 2003).

### 1.2.1.2 PROFASE I

És la fase més llarga de la primera divisió meiòtica ja que hi tenen lloc, principalment, dos processos d'una elevada complexitat i que són transcendents pel bon funcionament de la meiosi:

- L'aparellament i sinapsi dels cromosomes homòlegs. Durant la profase I els cromosomes homòlegs (patern i matern) es van apropant i alineant l'un al costat de l'altre fins a entrar en contacte físic, a través de la formació d'una estructura proteica anomenada complex sinaptnemal (SC).
- La recombinació meiòtica. Consisteix en l'intercanvi de material genètic entre cromàtides homòlogues no germanes, incrementant la variabilitat genètica dins de l'espècie. A més a més, en els punts on hi ha hagut recombinació els cromosomes homòlegs queden units físicament per les cromàtides a través dels quiasmes. Aquesta unió física facilita la bona segregació dels cromosomes del bivalent durant la primera divisió meiòtica.

Aquests dos processos s'inicien en la profase I primerenca i es van succeint gradualment al llarg de les següents subdivisions d'aquesta fase.

### 1.2.1.2.1 Preleptotè/Leptotè

L'existència d'un estadi preleptotè és defensada per alguns autors. Aquests descriuen que en aquesta fase hi ha una reestructuració dels dominis cromosòmics respecte del nucli interfàsic. Com a resultat els cromosomes adopten una aparença més allargada, i a la vegada, les seqüències de DNA repetitiu alfa passen de tenir una localització a l'atzar dins el nucli interfàsic a mostrar una polarització cap a la perifèria del nucli (Scherthan *et al.*, 1998).

A leptotè els cromosomes inicien una condensació i s'observen com a filaments prims individualitzats donant al nucli un aspecte de cabdell de llana. En aquest estadi els cromosomes homòlegs estan separats i en iniciar-se l'aparellament dels cromosomes homòlegs es mouen dins el nucli. Una estratègia utilitzada per la cèl·lula per afavorir l'aparellament dels cromosomes homòlegs és dirigir els telòmers a una petita regió de l'embolcall nuclear creant l'anomenat *bouquet* (Scherthan, 2001). Aquesta polarització nuclear s'observa de forma característica durant la transició entre l'estadi de leptotè i zigotè (leptotè tardà-zigotè inicial) (Figura 1.4) .

Al mateix temps que es donen canvis estructurals en els cromosomes durant l'aparellament dels cromosomes homòlegs, en aquest estadi també s'inicien els processos responsables de la recombinació meiótica.

#### 1.2.1.2.1.1 Aparellament

A leptotè la resta de cohesines meiótiques s'associen a la REC8, s'agreguen i es disposen de manera lineal formant una estructura proteica al llarg de l'eix longitudinal del cromosoma (eix de cohesines). Aquesta estructura servirà de base d'unió de dues noves proteïnes que organitzaran els elements axials (AE), la **SCP2** (Synaptonemal Complex Protein 2) també anomenada SYCP2 (Offenberg *et al.*, 1998) i la **SCP3** (Synaptonemal Complex Protein 3) també anomenada SYCP3 (Lammers *et al.*, 1994). Ambdues proteïnes són detectades gairebé al mateix moment que les SMC1B i SMC3, just després de l'aparició de la REC8 (Eijpe *et al.*, 2003). A finals de leptotè podem observar com els AEs inicien una disposició en *bouquet* dins el nucli.

#### 1.2.1.2.1.2 Recombinació meiótica

Aquest procés no ha de ser considerat independent de l'aparellament i sinapsi dels homòlegs, ja que s'ha descrit una estreta relació entre ells.

L'inici dels processos responsables de la recombinació meiótica coincideixen amb l'aparellament dels homòlegs. Una proteïna, la **SPO11**, indueix trencaments de doble cadena en el DNA (DSBs) (Keeney *et al.*, 1997). En aquest moment, en aquest punts de trencament,

es posa en marxa el procés de reparació del DNA. Alguns d'aquests punts esdevindran llocs de recombinació meiòtica, mentre que la gran majoria es repararan sense que es produeixi intercanvi de material genètic (conversió gènica). Per tant, el nombre de DSBs sobrepassa de llarg el de punts de recombinació, i a mida que es va avançant en la consolidació de la recombinació, durant la profase I, el nombre de punts de recombinació va disminuint gradualment.

Un cop els DSBs han estat induïts, una sèrie de proteïnes que detecten les lesions en el DNA (e.g. ATM, ATR) fosforilen residus de la histona H2AX, esdevenint  $\gamma$ H2AX, que facilita l'acumulació de proteïnes de reparació de DNA. Aquesta proteïna és detectada de manera uniforme en tot el nucli d'una cèl·lula a leptotè, i a mida que avança la profase aquesta va desapareixent. Però la  $\gamma$ H2AX no només presenta un patró dependent de SPO11, sinó que també està present en el parell XY a paquitè, on intervé en processos de condensació cromosòmica i inactivació transcripcional (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004).

En el procés de reparació dels DSBs, un complex proteic format per RAD50/MRE11/NBS amb activitat exonucleasa elimina els extrems 5' deixant cadenes senzilles de DNA (ssDNA) amb terminacions 3'. Posteriorment, les proteïnes RAD51/DMC1, homòlogues a la RecA d'E. Coli, s'uneixen a les ssDNA i promouen que aquestes interaccionin amb seqüències del cromosoma homòleg creant unes associacions axials primerenques (AAs). Certs estudis suggereixen que en aquest moment, a finals de leptotè i inicis de zigotè, és quan es decideix quins dels DSBs esdevindran punts de recombinació i quins no (Hunter and Kleckner, 2001). Posteriorment, la proteïna RPA (replication protein A) també s'uneix al ssDNA, als llocs on hi ha RAD51/DMC1. En estudis realitzats en espermatòcits humans (Oliver-Bonet *et al.*, 2005b) s'ha descrit que la RPA comença a aparèixer a leptotè, i va incrementant el nombre de punts fins a arribar a un màxim d'uns 200, a finals de zigotè. Aquests valors donen una idea del nombre de DSBs creats i del nombre esperat de punts de RAD50/MRE11/NBS i RAD51/DMC1 observats a leptotè (Figura 1.7). La RPA s'uneix a ssDNA i regula el metabolisme del DNA, participant en els processos de replicació, reparació i recombinació entre cromosomes homòlegs (Binz *et al.*, 2004).

#### 1.2.1.2.2 Zigotè

A zigotè els cromosomes continuen condensant-se, els homòlegs es col·loquen alineats l'un al costat de l'altre (aparellament) i es disposen formant la topologia de *bouquet* mencionada anteriorment. En algunes zones, generalment a les parts més distals dels cromosomes, s'inicia la unió física dels homòlegs (sinapsi) i, en aquestes zones, és on es comença a estructurar l'eix proteic anomenat complex sinaptinomal (SC). A mida que la cèl·lula va avançant en aquesta fase, la sinapsi entre homòlegs es va concretant. A la vegada, la disposició dels

cromosomes en *bouquet* es va perdent, a mida que els telòmers es desplacen per l'embolcall nuclear adoptant una disposició més uniforme en el nucli.

### 1.2.1.2.2.1 Aparellament i sinapsi

Durant el zigotè els AEs dels cromosomes homòlegs es disposen l'un al costat de l'altre alineats i molt a propers adoptant també la forma de *bouquet*. Aquesta proximitat entre AEs és reflex de l'aparellament dels cromosomes homòlegs. A les zones on ja s'inicia la sinapsi dels homòlegs (SICs) s'observa l'aparició de l'estructura madura de SC. En estructurar-se el SC els AEs passen a ser els elements laterals (LEs) i apareix l'element central (CE) format principalment per proteïnes **SCP1** (Sage *et al.*, 1997), entre d'altres (e.g. FKBP6, SYCE1 i CESC1). A mida que es va avançant a zigotè la sinapsi va produint-se al llarg de l'eix d'aparellament dels dos cromosomes homòlegs. Els llocs on s'inicia la sinapsi presenten diferències entre sexes. Mentre que en espermatòcits humans el SC comença a estructurar-se principalment en les zones subtelomèriques, en femelles també s'observen SICs en les zones intersticials. A partir d'aquests SICs s'anirà estructurant progressivament la resta del SC a mida que en els homòlegs es va realitzant la sinapsi.

### 1.2.1.2.2.2 Recombinació meiòtica

Tal i com s'ha dit anteriorment en aquest estadi la proteïna RPA es troba amb valors màxims. Per tal de continuar amb la reparació dels DSBs la proteïna **BLM** s'uneix als llocs on hi ha el complex RAD51/DMC1/RPA. Recentment, s'ha proposat que la BLM en cèl·lules somàtiques podria evitar la recombinació entre cromàtides germanes (SCE) dissolent les dobles unions de *Holliday* (dHJs) formades entre elles en la reparació de DNA (Wu *et al.*, 2005).

En aquest estadi les ssDNA han envaït la doble hèlix del cromosoma homòleg (SEi) (Hunter and Kleckner, 2001). L'expressió citològica d'aquests llocs correspon als nòduls de recombinació primerencs. S'ha descrit, en llevat, una relació entre els llocs de SICs i els de SEis ja que s'ha observat que tots dos colocalitzen en els mateixos llocs (Fung *et al.*, 2004). A final de zigotè inici de paquitè les SEi evolucionen cap a les dHJs que són reconegudes per l'heterodímer proteic **MSH4-MSH5** (*MutS homologs*) (Snowden *et al.*, 2004). Aquest heterodímer és essencial per tal que, en posteriors estadis, el sistema de reparació de *mismatch* (MMR) actui correctament. Els nombre màxim de MSH4, uns 200 punts, s'assoleix a zigotè tardà i és similar als de RPA (Oliver-Bonet *et al.*, 2005b) (Figura 1.7)

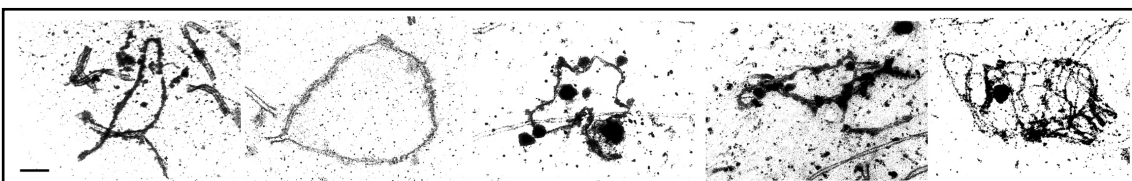
### 1.2.1.2.3 Paquitè

Aquest estadi es caracteritza per que tots els cromosomes homòlegs han completat la sinapsi formant el que s'anomena bivalents. Un bivalent consisteix en els dos cromosomes homòlegs units físicament, i cada cromosoma homòleg té dues cromàtides germanes.

En el cas d'espermatoïcits humans hi ha vint-i-dos bivalents autosòmics, que s'observen com a filaments individualitzats que es poden seguir fàcilment de principi a fi, a més del bivalent sexual, constituït pels cromosomes X i Y, amb una morfologia diferenciada amb aparença de vesícula. Pel que fa als oòcits primaris en estadi de paquitè s'observen vint-i-tres bivalents amb morfologia de filament, els vint-i-dos bivalents autosòmics i el bivalent sexual format pels dos cromosomes X.

#### 1.2.1.2.3.1 Aparellament i sinapsi

Al llarg de l'eix de sinapsi entre els dos cromosomes homòlegs, hi ha el SC totalment format. La proteïna SCP1, entre d'altres proteïnes, forma el CE que uneix els dos LE del bivalent. Els cromosomes sexuals X i Y tenen dues zones d'homologia anomenades regions pseudoautosòmiques (PAR1 i PAR2). La PAR1 es localitza a la regió terminal de Xp i Yp, i la PAR2 als braços Xq i Yq. Aquests dos cromosomes fan sinapsi (mostren el SC madur) precisament en la regió PAR1. La resta d'ambdós cromosomes adopta diverses morfologies que van variant al llarg de tot el paquitè, el que permet identificar el subestadi de paquitè en inicial, mitjà i tardà (Solari, 1980) (Figura 1.6). En femelles humanes els cromosomes X estructuren un SC lineal complet al llarg de tota la longitud d'ambdós homòlegs.



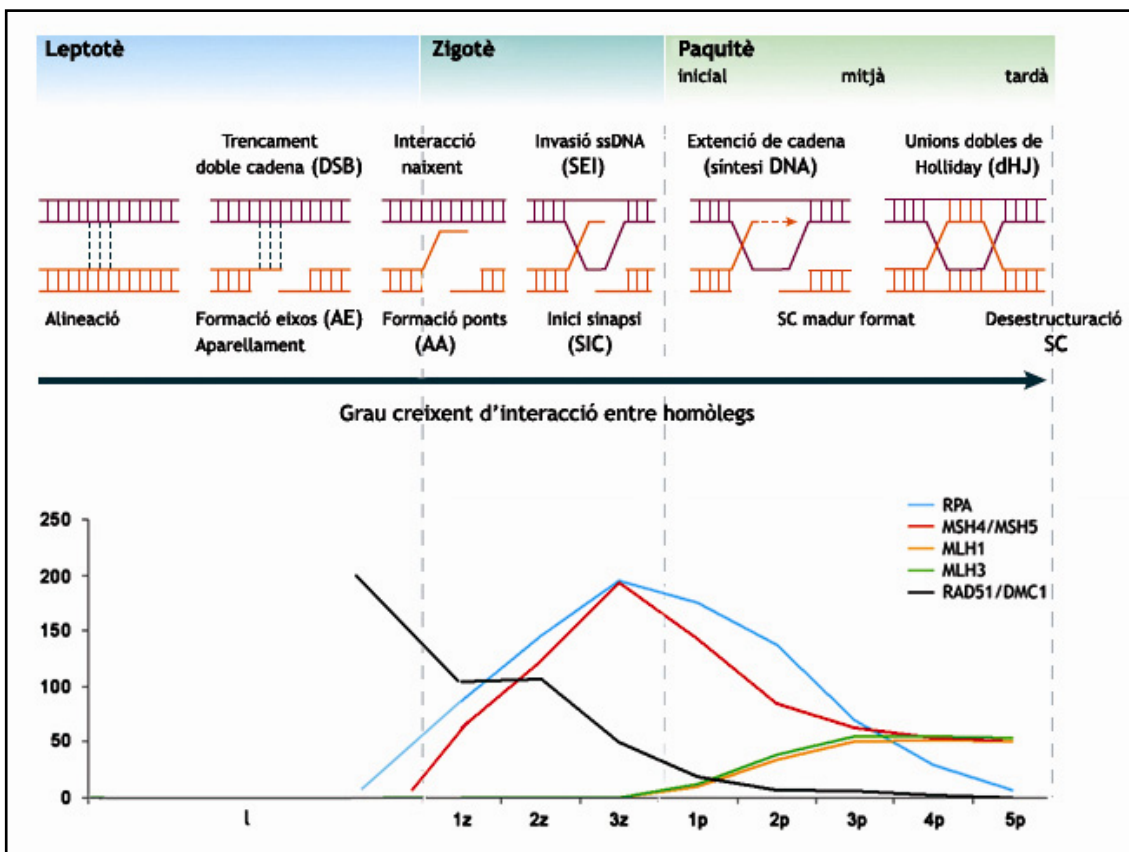
**Figura 1.6** Morfologies que adopta el parell XY des de paquitè inicial fins a paquitè tardà. Per a la seva tinció s'ha utilitzat una solució de  $\text{AgNO}_3$ . Imatges obtingudes a microscopia electrònica de transmissió. Barra =  $1\mu\text{m}$  (Navarro, 1983).

#### 1.2.1.2.3. 2 Recombinació meiótica

En aquest estadi finalitza el procés de reparació de DNA dels punts "designats" com a punts de recombinació. Aquí les dHJs ja s'han resolt i algunes d'aquestes, ja determinades des de leptotè, acaben generant recombinació entre cromàtides homòlogues. Citològicament aquests

punts s'observen com a nòduls de recombinació tardans i corresponen en número i localització als futurs quiasmes observats en fases posteriors (diplotè-diacinesi).

Ja a finals de zigotè i a principis a paquitè la proteïna **MLH3** (MutL homolog) s'uneix a alguns heterodímers de **MSH4/MSH5**. Aquesta proteïna forma un nou heterodímer amb la **MLH1**. Aquestes dues proteïnes, que formen part del sistema de *mismatch repair* (MMR), es van dipositant ràpidament fins arribar a un màxim a paquitè mitjà. El nombre de punts de MLH3-MLH1 és marcadament inferior al de dímers de **MSH4/MSH5**, al voltant de la cinquantena en humans, indicant que només alguns dels llocs on s'ha iniciat el procés de recombinació han estat seleccionats com a tal (Figura 1.7). En aquest sentit, la proteïna **MLH1** s'ha descrit com a marcador dels punts de recombinació meiótica a paquitè ja que s'ha observat que correlaciona en lloc i nombre amb els quiasmes observats a diplotè-diacinesi (Barlow and Hultén, 1998).



**Figura 1.7** Representació esquemàtica dels passos que tenen lloc durant els processos de recombinació (línea superior) i sinapsi i estructuració del SC (línea inferior) entre els cromosomes homòlegs en la profase I meiótica. La gràfica mostra la cinètica d'aparició i desaparició durant la profase I de les proteïnes que intervenen en el procés de recombinació fins ara descrites en espermatòcits humans. Figura adaptada de (Gerton and Hawley, 2005; Oliver-Bonet *et al.*, 2005b).



#### 1.2.1.2.4 Diplotè-diacinesi

En aquest estadi el cromosomes homòlegs se separen quedant només units físicament pels quiasmes, que són l'expressió citològica dels llocs on hi ha hagut recombinació. Depenent del nombre de quiasmes presents el bivalent adopta una morfologia diferent. A mida que els bivalents avancen en aquest estadi la cromatina es van condensant progressivament fins al màxim a metafase I. El SC, durant aquest procés, es desorganitza i les proteïnes que el formen desapareixen.

#### 1.2.1.3 METAFASE I

A metafase I els bivalents presenten una condensació màxima i es disposen a la placa equatorial orientant els centròmers de cada un dels homòlegs a pols oposats. Ara bé, les cromàtides germanes han d'estar orientades cap al mateix pol per tal que hi hagi una cosegregació d'ambdues i que els cromosomes homòlegs se separin adequadament. La membrana nuclear es desorganitza, s'estructura el fus meiótic de microtúbuls que serà l'encarregat de segregar cada un dels homòlegs a pols oposats de la cèl·lula.

En aquesta fase, es detecten restes de proteïna SCP3 i de cohesines a les zones pericentromèriques.

#### 1.2.1.4 ANAFASE I i CITOCINESI

A l'anafase es produeix la migració dels homòlegs cap a pols oposats. Les cromàtides germanes de cada homòleg es mantenen unides per la zona pericentromèrica i segreguen juntes. Finalment, a la telofase hi ha un reagrupament dels cromosomes corresponents a cada pol de la cèl·lula i finalitza el procés amb una divisió del citoplasma de la cèl·lula originant dues cèl·lules filles pel procés conegut com citocinesi.

### 1.2.2 SEGONA DIVISIÓ MEIÒTICA

Aquesta divisió es caracteritza per ser una divisió anàloga a una mitosi en la que se separen les cromàtides germanes, amb la diferència que l'espermatòcit II té 23 cromosomes cada un amb dues cromàtides. Per tant, cada espermàtida tindrà 23 cromosomes amb una cromàtide, és a dir, una dotació totalment haploide.

La cohesió entre cromàtides germanes (SCC), mantinguda fins ara per les cohesines meiótiques, es perd per tal de permetre la seva correcta disjunció.

## 1.3 PUNTS CONTROL MEIOSI

Els punts de control de la meiosi actuen en diferents moments del procés de divisió cel·lular meiótica per tal d'assegurar que tots els processos que hi tenen lloc es facin correctament. En cas de no ser així, el sistema pot resoldre aturar la meiosi i eliminar, per apoptosi, aquelles cèl·lules en les que hi ha hagut errors. (per revisió Roeder and Bailis, 2000)

### 1.3.1 Punt de control de paquitè (*Checkpoint* de paquitè)

Com s'ha dit anteriorment tant la sinapsi com la recombinació meiótica entre cromosomes homòlegs són dos processos essencials crítics pel bon funcionament de la divisió meiótica. En animals *knock-out* per a proteïnes que intervenen en aquests dos processos s'ha observat que la meiosi queda bloquejada a paquitè. Aquest fet indica que hi ha un punt de control per aquests dos processos que assegura que només progressin aquelles cèl·lules en les que s'ha donat la sinapsi i la recombinació meiótica. Aquest punt de control també s'anomena *checkpoint* de paquitè (Roeder and Bailis, 2000).

Les proteïnes implicades en el funcionament o activació del *checkpoint* a paquitè són varies i poden tenir diferents funcions:

- proteïnes implicades en el control de lesions en el DNA (e.g. ATM, ATR). Algunes de les proteïnes que intervenen en el control de lesions en el DNA també intervenen en el *checkpoint* de paquitè. Aquestes proteïnes detecten quan hi ha lesions en el DNA i transmeten la informació a la maquinària de cicle cel·lular per aturar el procés i induir l'expressió de gens de reparació.
- proteïnes que formen part dels eixos cromosòmics proteics o del SC (e.g. cohesines i SCP). Aquestes proteïnes asseguren que el SC s'estructuri bé i per tant que la sinapsi es produeixi correctament.
- proteïnes de recombinació (e.g. DMC1, MSH5, MLH1). Aquestes proteïnes són proteïnes de reparació de DNA i asseguren que els DSB induïts a l'inici de la profase I siguin reparats correctament evolucionant cap a conversió gènica o a recombinació meiótica.
- proteïnes que silencien cromatina (e.g. BRCA1, ATR,  $\gamma$ H2AX). La funció d'aquestes proteïnes és emmascarar aquelles zones que romanen sense fer sinapsi (e.g. gran part de parell XY) per tal que el *checkpoint* no les detecti com a una anomalia de sinapsi i així la cèl·lula pugui progressar (Turner *et al.*, 2005).

- proteïnes de cicle cel·lular (e.g. Cks2, Cdk2). Aquestes proteïnes regulen el cicle cel·lular meiótic, aturant-lo i reiniciant-lo quan cal o dirigint-lo cap a apoptosi.

Per tant, alteracions en aquests processos o en les proteïnes que hi intervenen poden fer que la cèl·lula no sobrepassi el punt de control de paquitè i que s'activi l'aturada de la divisió i la degeneració cel·lular.

### 1.3.2 Altres punts de control

En llevats i mamífers s'han descrit altres punts de control:

- Punt de control de replicació premeiótica (Murakami and Nurse, 1999). Quan la replicació del DNA s'inicia, s'activa aquest punt de control i només si la replicació es dona correctament la cèl·lula podrà entrar a meiosi. Recentment però, s'ha observat que en llevats algunes formes espontànies de lesions en el DNA produïdes a la fase S premeiótica poden ser reparades per recombinació i passar amb èxit el punt de control (Pankratz and Forsburg, 2005).

- Punt de control de metafase I. Aquest punt de control atura la transició entre metafase I i anafase I d'aquelles cèl·lules en les que el fus meiótic no s'ha format correctament (Woods *et al.*, 1999) o en les que un o més cromosomes s'alineen erròniament a la placa metafàsica (Li and Nicklas, 1995; Burke, 2000). Aquest punt de control sembla actuar de manera defectuosa en femelles ja que els oòcits que presenten algun cromosoma sense aparellar progressen en la meiosi, mentre que els espermatòcits, en les mateixes circumstàncies, s'aturen a metafase I (LeMaire-Adkins *et al.*, 1997). Aquest fet explicaria la major freqüència d'aneuploïdies observada en oòcits respecte de l'observada en espermatozoides.

## 1.4 COMPLEX SINAPTINEMAL

### 1.4.1 ESTRUCTURA

El complex sinaptonemal (SC), com s'ha dit anteriorment, és una estructura proteica formada per tres eixos, dos elements laterals (LEs) i un element central (CE) (Figura 1.8).

#### 1.4.1.1 Elements axials/laterals (AE/LE)

Els LEs corresponen als AEs que s'estructuren al llarg de l'eix longitudinal dels cromosomes quan aquests han estat units per l'element central, és a dir, han fet sinapsi. Els AE/LE estan formats per diverses proteïnes: les cohesines meiótiques comentades anteriorment (SMC1 $\beta$ , SMC3, REC8/RAD21-SCC1, STAG3) i les SCP2, SCP3 (revisat a Page and Hawley, 2004). Les proteïnes SCP2 i SCP3 es localitzen per primer cop als AE durant leptotè i es mantenen associades als cromosomes fins a metafase I, on només s'observen en els centròmers.

- La proteïna **SCP3**. També anomenada SYCP3 o COR1 (en hámster) és una proteïna de 30-kDa (Dobson *et al.*, 1994; Lammers *et al.*, 1994). Les molècules de SCP3 interaccionen les unes amb les altres a través de l'extrem C-terminal formant fibres (Yuan *et al.*, 1998). Aquesta proteïna és essencial per la formació dels LEs. Els ratolins mascles *knockout* per SCP3 són infèrtils i presenten una aturada a zigotè en el moment d'estructuració dels AEs/LEs (Yuan *et al.*, 2000). Per contra, en les femelles *knockout* per SCP3 hi ha sinapsi dels homòlegs (i.e. s'observen fibres de SCP1 similars als SCs) i presenten recombinació entre ells (i.e. es detecten punts MLH1) tot i mostrar un patró lleugerament diferent. Els oòcits d'aquestes femelles presenten una taxa d'aneuploidia molt elevada i conseqüentment una elevada mortalitat embrionària (Yuan *et al.*, 2002). En humans s'ha descrit una mutació del gen *Sycp3* en dos individus azoospermics. Aquesta mutació consisteix en una deleció de 1bp responsable d'un codó stop prematur. La proteïna resultant té poca afinitat amb la proteïna normal interferint en la formació de les fibres de SCP3 (Miyamoto *et al.*, 2003). Aquests estudis demostren que és una proteïna essencial per aconseguir una adequada sinapsi i recombinació dels cromosomes homòlegs.

- La proteïna **SCP2**. És una proteïna de 173-kDa que s'uneix als llocs on hi ha la SCP3 als AEs/LEs (Offenberg *et al.*, 1998; Schalk *et al.*, 1998). S'ha vist també que pot localitzar-se als telòmers per una via independent a la SCP3 (Yuan *et al.*, 2002; Liebe *et al.*, 2004).

L'eix de cohesines sí que és necessari per una localització normal de la SCP3 i la SCP2. En absència d'aquestes dues proteïnes l'eix de cohesines s'estructura normalment, indicant que no són indispensables per la correcta estructuració d'aquest eix (Pelttari *et al.*, 2001).

Les principals funcions dels AEs/LEs descrites són: (revisat a Page and Hawley, 2004)

- Promoure compactació cromosòmica

Tot i que aquesta funció és realitzada principalment per les condensines, s'ha vist que en absència d'algunes proteïnes dels LE (e.g. SCP3) els cromosomes de ratolí són fins a dos cops més llargs (Yuan *et al.*, 2002; Liebe *et al.*, 2004).

- Implicació en l'aparellament i sinapsi dels cromosomes homòlegs

Individus *knockout* per algunes cohesines (*C.elegans* i *A.thaliana*) i per SCP3 (ratolí) presenten un aparellament anòmal dels homòlegs o un retard en aquest. Ratolins *knockout* per REC8 presenten una sinapsi anòmala entre cromàtides germanes indicant que aquesta proteïna és responsable de distingir entre cromàtides germanes i cromosomes homòlegs (Xu *et al.*, 2004).

- Intervenir en la reparació de DSB (double strand-breaks)

Estudis en *Drosophila* suggereixen que els AE/LE poden regular la reparació de DSB en el context del SC i promoure la reparació de DSB entre homòlegs prevenint així la recombinació entre cromàtides germanes.

- Actuar en el control de distribució de punts de recombinació meiótica

Aquest control consisteix en fer que dos punts de recombinació meiótica adjacents es localitzin a una certa distància, és a dir, que hi hagi interferència. La formació d'un punt de recombinació implica també el trencament i intercanvi dels AE/LE dels les cromàtides implicades en la recombinació meiótica (Blat *et al.*, 2002).

- Permetre la correcta estructuració del complex sinapteinemal

Recents estudis demostren que l'eix de cohesines és el responsable de l'assemblatge dels filaments transversals (CE del SC) i que les proteïnes SCP2 i SCP3 no són estrictament necessàries per la correcta estructuració del CE.

#### 1.4.1.2 Element central (CE)

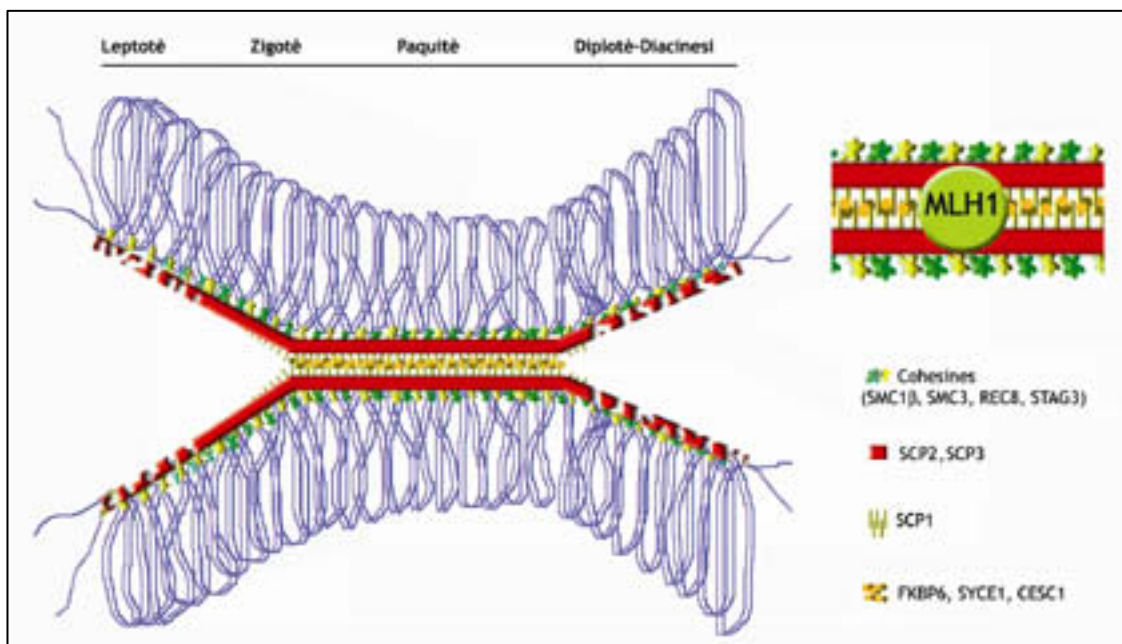
Al CE hi trobem les proteïnes SCP1 (Meuwissen *et al.*, 1992), FKBP6 (Crackower *et al.*, 2003), SYCE1 i CESC1 (Costa *et al.*, 2005).

- La proteïna **SCP1**. És una proteïna dímèrica, homòloga a la Zip1p de *S. cerevisiae*, formada per dues subunitats disposades de forma paral·lela. Per l'extrem C-terminal s'uneixen als AE i pel N-terminal a altres extrems N-terminal d'altres dímers de SCP1 de forma antiparal·lela. D'aquesta manera, actuen com una "cremallera" unint els dos AEs i formant l'estructura de SC madur.

## Introducció

Diversos estudis realitzats en mutants per Zip1p (Börner *et al.*, 2004) i per SCP1 (de Vries *et al.*, 2005), suggereixen que aquesta proteïna tindria una doble funció, la de intervenir en el procés de maduració dels punts de recombinació i la d'assemblatge del SC. La proteïna Zip1p colocalitza amb els SIC (i.e. llocs d'inici de sinapsi) i que aquests, tal i com passa amb els punts de recombinació, presenten interferència (Fung *et al.*, 2004). A la vegada, mutants per SCP1 presenten patrons de proteïnes que intervenen en els processos primaris i entremitjos de recombinació (i.e. RAD51/DMC1, RPA i MSH4) molt similars als normals. Però no presenten cap de les proteïnes implicades en els últims passos (i.e. MLH3 i MLH1) (de Vries *et al.*, 2005). En absència de LE la SCP1 continua localitzant-se en el que semblen ser zones de sinapsi dels homòlegs, tot i presentar una distribució discontinua que es veu molt més alterada en mascles que en femelles.

- La proteïna **FKBP6**. És una proteïna estructural del SC que seria necessària per aconseguir un bon aparellament dels homòlegs en mascles però no en femelles. Els ratolins mascles *knockout* per aquesta proteïna són infèrtils i presenten aturada a paquitè. Per altra banda, en femelles sembla no tenir cap efecte en la seva fertilitat (Crackower *et al.*, 2003). En els casos d'homes infèrtils no són freqüents les mutacions en el gen d'aquesta proteïna (Westerveld *et al.*, 2005).



**Figura 1.8** Representació esquemàtica de l'estructuració del SC al llarg de la profase I i de les proteïnes que en formen part. Detall del SC amb un punt de recombinació que conté la proteïna de reparació MLH1.

- Les proteïnes **SYCE1** i **CESC1**. Interaccionen amb la SCP1 i la seva localització en el CE sembla ser dependent d'aquesta. S'ha proposat que tenen una funció en l'assemblatge del SC, en proporcionar estabilitat i que intervenen en la recombinació (Costa *et al.*, 2005).

## 1.4.2 CARACTERÍSTIQUES I FUNCIONS DEL SC

El fet que el SC s'estructura al llarg de l'eix de sinapsi dels cromosomes homòlegs fa pensar que la llargada d'aquesta estructura proteica ha d'estar relacionada amb la longitud dels cromosomes homòlegs. De fet s'ha descrit una correlació entre la llargada del SC i la longitud mitòtica dels cromosomes. Ara bé, alguns SC presenten longituds més grans del que seria d'esperar. S'ha vist que cromosomes amb una longitud física similar, però amb diferent longitud genètica (e.g. 21q, 39Mb i 54cM; 22q, 43Mb i 70cM) presenten SC de longituds diferents. A la vegada, cromosomes amb longitud genètica similar però diferent longitud física (e.g. cromosoma 16, 98Mb i 106cM; cromosoma 19, 67Mb i 104cM) presenten SCs de mida similar (Lynn *et al.*, 2002). Això suggereix que la longitud dels SC és un reflex de la distància genètica (veure apartat 1.6.1.2). A més, el fet que s'ha trobat una correlació entre longitud del SC i nombre de punts de MLH1 (i.e. punts de recombinació meiòtica) ho confirma (Lynn *et al.*, 2002). A la vegada, s'ha vist que els cromosomes que presenten SC més llargs de l'esperat són aquells més rics en bases GC (Sun *et al.*, 2004b).

La longitud dels SCs però també presenta una variació entre mascles i femelles essent aproximadament dos cops més llargs en oòcits (Tease *et al.*, 2002) que en espermatòcits (Lynn *et al.*, 2002). D'això se'n dedueix que, tot i que tots dos sexes tenen el mateix contingut genòmic, els oòcits tenen major longitud genètica que els espermatòcits humans.

La funció del SC seria la d'estabilitzar el procés d'aparellament dels cromosomes homòlegs i actuar en el procés de maduració de les SEIs cap a dHJs, a paquitè inicial, i d'aquests cap a punts de recombinació meiòtica a paquitè tardà.

## 1.4.3 ANÀLISI DELS SCs

Hem vist doncs que els SCs són un reflex del procés de sinapsi dels cromosomes homòlegs, per tant qualsevol alteració d'aquest procés podrà ser observat i analitzat a través de la visualització d'aquestes estructures proteiques.

### 1.4.3.1 Tècniques emprades per a l'anàlisi

Els primers estudis en els que es va fer un anàlisi dels SCs s'utilitzava una solució de nitrat de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) que proporcionava una tinció inespecífica de totes les proteïnes presents en el SC (Solari, 1980). Posteriorment es va realitzar una observació amb microscopi òptic i amb

## Introducció

microscopi electrònic (Navarro *et al.*, 1981). Emprant aquesta tècnica s'obtenia informació sobre el procés de sinapsi, però només en comptades ocasions s'observaven alguns cinetocors i nòduls de recombinació entre els LEs dels SCs. Quan s'observaven, aquests aportaven informació sobre l'índex centromèric del SC i de la recombinació meiòtica, respectivament, però la qualitat i la quantitat amb la que s'observaven no permetien fer un anàlisi complet.

La caracterització de les proteïnes que formen part del SC madur juntament amb el desenvolupament de tècniques d'immunocitofluorescència, basades en la utilització d'anticossos, han permès marcar específicament proteïnes del SC (Barlow and Hultén, 1996). L'avantatge d'aquesta tècnica és que permet a la vegada estudiar altres proteïnes (e.g. de recombinació meiòtica, de centromèr, cohesines, etc.), i gràcies a que en la fixació del material la cromatina es manté en un grau elevat de preservació es poden aplicar posteriorment tècniques de hibridació *in situ* fluorescent (FISH) que permeten la identificació dels SCs (Figures 1.9 d i e).



## 1.5 LA RECOMBINACIÓ MEIÒTICA

Com s'ha dit anteriorment la recombinació meiòtica és un dels dos processos essencials que han de tenir lloc durant la profase de la primera divisió meiòtica. Es basa en l'intercanvi d'informació genètica entre els cromosomes homòlegs, fet que permet mantenir la variabilitat genètica de l'espècie. A l'apartat 1.3.1.2 de la Introducció s'explica la dinàmica de la recombinació al llarg de la profase I.

### 1.5.1 ANÀLISI DE LA RECOMBINACIÓ MEIÒTICA

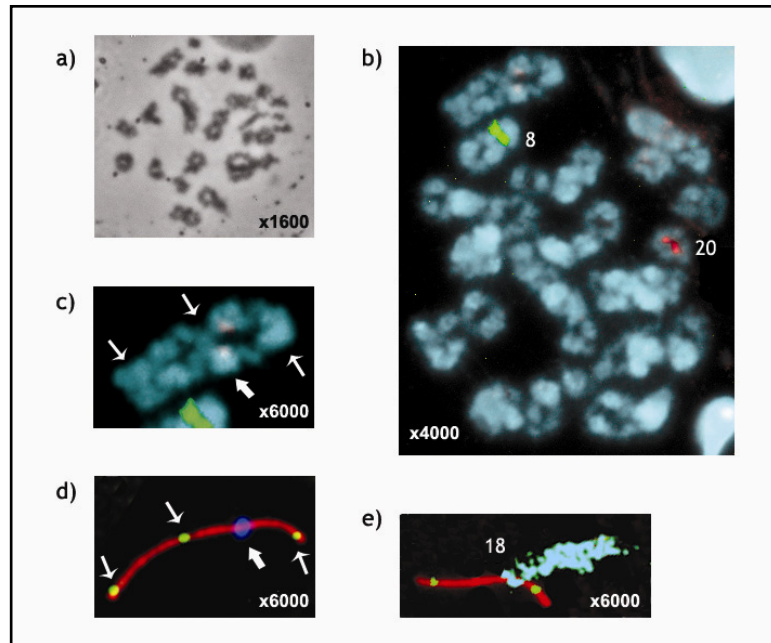
La recombinació meiòtica pot ser analitzada a través de mètodes directes o amb mètodes indirectes (revisat a (Lynn *et al.*, 2004).

#### 1.5.1.1 MÈTODES DIRECTES

##### 1.5.1.1.1 Anàlisi de bivalents meiòtics a diacinesi/metafase I

Durant anys la observació de quiasmes en cromosomes meiòtics d'espermatòcits en estadi de diacinesi/metafase I ha estat l'únic mètode directe d'anàlisi de la recombinació meiòtica (Figures 1.9a i c). A través de l'estudi de quiasmes es pot determinar el nombre i localització dels llocs de recombinació en els bivalents dels espermatòcits (Hultén *et al.*, 1970; Hultén *et al.*, 1974; Templado *et al.*, 1976; Laurie and Hultén, 1985a; Laurie and Hultén, 1985b). Recentment, s'ha incorporat la tècnica d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH) per a la identificació dels bivalents (Oliver-Bonet *et al.*, 2004) (Figura 1.9b). L'aplicació de FISH amb múltiples sondes de DNA (M-FISH) que ha permès la identificació de tots els bivalents de l'espermatòcit (Sarrate *et al.*, 2004).

L'estudi de quiasmes a diacinesi/metafase I és un mètode pràcticament restringit a l'estudi en mascles, ja que en femelles aquest estadi es dona just abans de l'ovulació, fent pràcticament impossible la obtenció de material. L'estadi de diacinesi/metafase I té una durada molt curta, fet que implica que l'estudi d'un nombre adequat de cèl·lules requereix disposar d'una gran quantitat de mostra. La morfologia i condensació dels cromosomes fa que aquest mètode tingui una resolució baixa, que només permet obtenir informació del patró general de recombinació de l'espermatòcit i de cada un dels bivalents, però no localitzar els quiasmes amb precisió.



**Figura 1.9** a) Espermatòcit humà en estadi de diacinesi/metafase I observat a contrast de fase. b) Resultat de FISH amb sondes centromèriques pel cromosoma 8 (verd) i pel cromosoma 20 (vermell) en cromosomes meiótics. c) Bivalent amb tres quiasmes (fletxes petites). El centròmer presenta un lleuger marcatge resultat d'una hibridació inespecífica (fletxa gran). d) Complex sinaptnemal (vermell), punts de MHL1 (verd) i centròmer (blau fosc) marcats amb immunocito-fluorescència. e) Resultat de FISH amb sonda centromèrica del cromosoma 18 (blau cel) en SCs marcats immunofluorescentment.

#### 1.5.1.1.2 Anàlisi de punts de recombinació en gametòcits a paquitè

L'aplicació de tècniques d'immunocitofluorescència per a la detecció de proteïnes que formen part dels nòduls de recombinació tardans (e.g. MLH1) i de proteïnes de SC permet la observació i l'anàlisi dels punts de recombinació en SCs de gametòcits en estadi de paquitè tant en mascles (Barlow and Hultén, 1998) com en femelles (Tease *et al.*, 2002). En femelles l'estadi de paquitè té lloc durant el desenvolupament fetal, per tant és necessari obtenir teixit ovàric fetal per poder realitzar l'anàlisi.

Utilitzant aquest mètode el comptatge de punts de recombinació resulta més fàcil, ja que cada punt de MLH1 correspon a un punt de recombinació (Figures 1.8 i 1.9d) (Figures 3.5 i 3.10). A la vegada, el fet que l'estadi de paquitè tingui una durada més llarga que la diacinesi/metafase I fa que la quantitat de cèl·lules que es poden analitzar sigui més elevada. A més a més, la menor condensació dels bivalents en estadi de paquitè que en

diacinesi/metafase I permet localitzar els punts de recombinació (punts MLH1) en el bivalent amb una resolució molt més elevada, d'unes 10Mb. Això permet realitzar amb més detall l'anàlisi de freqüències de recombinació en individus i fer comparacions entre ells. La possibilitat d'aplicació de tècniques d'hibridació *in situ* fluorescent (Barlow and Hultén, 1996) permet la identificació de cada un dels SCs (Figura 1.9e) i localitzar els punts de MLH1 en determinats llocs d'un cromosoma específic (llocs calents de recombinació) (Lynn *et al.*, 2002).

En relació als estudis indirectes de recombinació meiótica (veure següent apartat 1.5.1.2), cal remarcar que cada punt de MLH1 equival a una distància genètica de 50cM (explicació a Figura 1.10a).

### 1.5.1.2 MÈTODE INDIRECTE

L'anàlisi indirecta de la recombinació es realitza mitjançant l'estudi de dades genotípiques de grups familiars. Consisteix en analitzar la transmissió conjunta o separada dels al·lels de dos o més regions de DNA (*loci*), del mateix cromosoma i properes, que han estat definides com a marcadors. Quan dos al·lels de marcadors propers provenen de dos "avis" diferents i són transmesos conjuntament per un progenitor a la descendència, es pot deduir, que en aquest progenitor hi ha hagut recombinació a la zona entre aquests dos marcadors (Figura 1.10a).

Un mapa genètic, també anomenat mapa de lligament o mapa meiótic, es defineix com la ordenació lineal de *loci* polimòrfics al llarg del cromosoma amb estimacions de les longituds dels intervals entre *loci* (distàncies de mapa). Aquestes distàncies, també anomenades distàncies genètiques, s'expressen en centiMorgans (cM). Dos *loci* estan separats per una distància d'un cM si hi ha una probabilitat d'un 1% de que hi hagi recombinació en la regió situada entre els dos *loci*. Per tant, com més allunyats estan dos *loci* més probabilitat de que hi hagi recombinació en l'espai entremig i major la distància en cM. Els mapes genètics poden ser utilitzats per deduir la localització dels llocs de recombinació en la generació paterna.

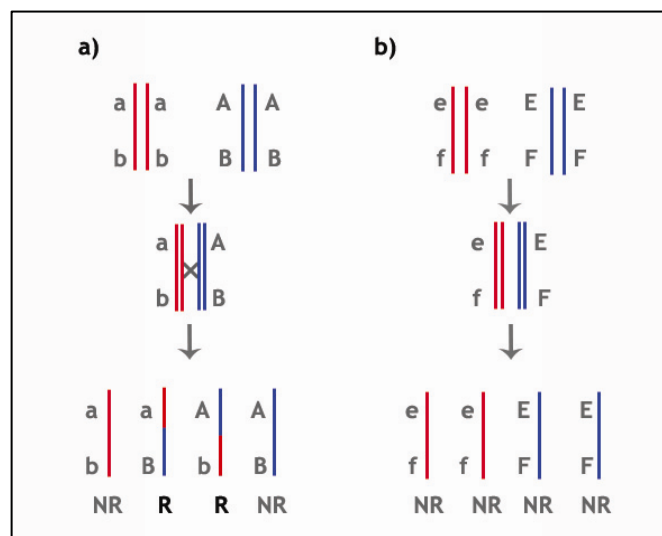
En models animals, el procés de construcció de mapes genètics s'ha realitzat a través de l'anàlisi del fenotip de la descendència d'individus portadors d'una mutació en un gen determinat. Examinant gran nombre de descendents es pot fer una estimació de l'ordre dels gens i la posició relativa dels *loci*. En humans en canvi, s'ha analitzat la transmissió de diversos marcadors polimòrfics (e.g. RFPLs, STRPs i SNPs) en grans grups familiars al llarg de dues (famílies deCODE) o tres generacions (famílies CEPH). Com a resultat d'aquests anàlisis, des dels anys 80, s'han obtingut diversos mapes genètics humans (Donis-Keller *et al.*, 1987; Broman *et al.*, 1998; Kong *et al.*, 2002; Matise *et al.*, 2003)(revisat a Lynn *et al.*, 2004).

## Introducció

Aquest mètode indirecte permet fer l'anàlisi de la recombinació amb una resolució d'unes 10 a 1000 quilobases (kb), unes mil vegades més elevada que en l'anàlisi de punts de MLH1. A la vegada els marcadors polimòrfics poden ser posicionats fàcilment damunt de mapes de seqüència del genoma humà i permet realitzar una correlació entre freqüències de recombinació i diferents seqüències del genoma.

Però, aquest mètode també presenta inconvenients ja que per poder obtenir resultats fiables s'ha d'analitzar grans quantitats de dades d'un gran nombre d'individus i marcadors. A la vegada, només analitza aquella recombinació que es detecta a la descendència. El fet que només dues de les quatre cromàtides estan implicades en el procés de recombinació, i que només una de les quatre és transmesa a la descendència fa que només el 50% dels productes de recombinació siguin detectats a la descendència (Figura 1.10 a).

Un mètode indirecte alternatiu a l'anàlisi de *pedigrees* familiars per a la generació de mapes genètics consisteix en fer un genotipat i anàlisi de lligament en espermatozoides humans (Yu *et al.*, 1996; Lien *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2002)(per revisió Lynn *et al.*, 2004).



**Figura 1.10** Representació esquemàtica de la transmissió a la descendència d'al·lels de dos *loci* propers, que provenen "d'avis" diferents (blau i vermell), en els que en el progenitor hi ha hagut (a) o no (b) recombinació en la regió compresa entre ells. En el cas en que hi recombinació, els productes recombinants (R) només es detecten en el 50% de la descendència (50cM). Aquest fet explica que un punt de recombinació (i.e. MLH1 focus) equival a 50cM.

## 1.5.2 VARIABILITAT DE LA RECOMBINACIÓ MEIÒTICA EN HUMANS

En els primers estudis indirectes de la recombinació els mapes genètics obtinguts pel sexe femení mostraven distàncies majors (cM) entre *loci* que en els obtinguts pel sexe masculí (Donis-Keller *et al.*, 1987; Broman *et al.*, 1998; Kong *et al.*, 2002; Matisse *et al.*, 2003)(revisat a Lynn *et al.*, 2004). Això indicava una major taxa de recombinació al llarg del genoma en els oòcits en comparació amb els espermatòcits.

L'anàlisi directe de punts de MLH1 també ha detectat una diferència considerable en el nombre de punts de recombinació entre els dos sexes. Mentre que en oòcits el nombre mig de punts de MLH1 és de 70.3 (Tease *et al.*, 2002), amb un rang de de 48 a 102 (Lenzi *et al.*, 2005), en espermatòcits aquest valor és de 49.1 punt MLH1, amb un rang d'entre 34 i 66 punts (Lynn *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2005c). La causa d'aquesta variabilitat entre sexes és encara desconeguda, però podria romandre en diferències entre els dos sexes en la formació del SC o en l'empaquetament de la cromatina (veure apartat 1.5.2).

Aquesta diferència entre sexes no només és a nivell de freqüència de recombinació sinó també en la localització d'aquests llocs de recombinació. Mentre que en els homes la recombinació té lloc majoritàriament a la part més distal (o subtelomèrica) dels SCs, en femelles la tendència és a una disposició més intersticial (Tease *et al.*, 2002).

Aquesta variació entre sexe masculí i femení no és exclusiu de l'espècie humana, sinó que també hi és present en d'altres espècies (Taula 1.2 (Lynn *et al.*, 2004)).

**Taula 1.2** Longituds genètiques de mamífers obtingudes per mètodes indirectes

Espècie	Longitud genètica (cM)			Numero de <i>loci</i>	
	Mitjana sexes	Femella	Mascle	analitzats	Nombre haploide
Gos	1510	1820	1290	268	39
Porc	2389	2984	1931	243	19
Vaca/Bou	2990	2879 <sup>a</sup>	2808 <sup>a</sup>	1250	30
Ovella	3588	3385	3935	1062	27
Wallaby	828	<sup>b</sup>		60	8
Mandril	1975			293	21
Ratolí	1659				20
Rata	1789			245	21
Gat	2646			328	19
Cavall			2262	257	32
Cabra			2737	260	30
Cérvol			2532	621	34

<sup>a</sup> Es va observar que les diferències entre gèneres existia entre cromosomes, tot i que les freqüències generals fossin les mateixes en mascles i en femelles

<sup>b</sup> Les longituds genètiques de cada sexe no van ser representades, però en les regions on els dos sexes mostraven diferències les longituds dels mascles eren majors que les de les femelles

Adaptada de (Lynn *et al.*, 2004)

## 1.6 ANOMALIES DE LA SINAPSI I DE LA RECOMBINACIÓ MEIÒTICA: REDUCCIÓ DE LA FERTILITAT

La infertilitat es defineix com la incapacitat de concebre després d'un període d'un any i afecta a un 10-15% de les parelles. Un 40% dels casos d'infertilitat són de causa masculina, majoritàriament deguts a alteracions en l'espermatogènesi. Aquestes alteracions comporten una reducció en la quantitat i/o qualitat de l'esperma. L'etiologia d'una espermatogènesi alterada pot ser molt variada, des de causes físiques, hormonals, immunològiques, fins a anomalies cromosòmiques, però majoritàriament es classifica com a idiopàtica. Tanmateix, la gran majoria de casos d'infertilitat ja sigui idiopàtica com d'etiologia coneguda tenen possiblement, en més o menys grau, un component genètic inherent (de Rooij and de Boer, 2003; Shah *et al.*, 2003).

### 1.6.1 INDIVIDUS AMB CARIOTIP ANÒMAL

La incidència d'anomalies cromosòmiques constitucionals és fins a deu vegades més elevada en individus infèrtils que en la població en general (Van Assche *et al.*, 1996). Aquestes anomalies cromosòmiques constitucionals inclouen anomalies numèriques, tal com aneuploidies de cromosomes sexuals (e.g. XXY o XYY) i de cromosomes autosòmics (trisomies, monosomies i poliploidies), i anomalies estructurals tal com translocacions recíproques, Robertsonianes, inversions pericèntriques i paracèntriques, insercions i algunes delecions. La presència d'aquestes anomalies cromosòmiques constitucionals té efectes en el procés de producció de gàmetes (Egozcue *et al.*, 2000). S'estima que un 50% aproximadament de les falles reproductives humanes són degudes a anomalies cromosòmiques.

#### 1.6.1.2 SINAPSI I RECOMBINACIÓ EN PORTADORS DE REORGANITZACIONS CROMOSÒMIQUES

La presència de reorganitzacions cromosòmiques pot ocasionar una segregació anòmala dels cromosomes durant la meiosi produint espermatozoides desequilibrats i, com a conseqüència, provocar avortaments o descendència afectada (revisat a Egozcue *et al.*, 2000; Egozcue *et al.*, 2003).

En portadors de reorganitzacions cromosòmiques els bivalents adopten una estructura característica a paquet segons la reorganització, per tal que les regions homòlogues dels cromosomes afectats per la reorganització puguin aparellar i fer sinapsi. A les zones on els cromosomes homòlegs, normal i derivatiu, fan sinapsi es forma el SC. Aquesta estructura característica s'observa també a diplotè, diacinesi i metafase I. En el cas de translocacions

Robertsonianes o recíproques trobem, generalment, figures de trivalent i quadrivalent, respectivament. En els casos d'inversions s'espera trobar un llaç d'inversió, però si es produeix un aparellament heteròleg de les zones invertides (ajustament sinàptic) aquest no sempre s'observa (Martínez-Flores *et al.*, 2001).

L'estudi dels SCs en portadors de reorganitzacions aporta informació del comportament a la profase I meiótica dels cromosomes implicats en la reorganització, i permet conèixer en quin grau afecta al procés meiótic. En aquest sentit, diversos estudis s'han dut a terme ja sigui aplicant la tècnica de AgNO<sub>3</sub> (revisat a Solari, 1999) o la immunocitofluorescència (Oliver-Bonet *et al.*, 2005a; Sun *et al.*, 2005b). Amb aquesta última tècnica s'ha obtingut informació sobre la recombinació entre els cromosomes homòlegs implicats en la reorganització. La comparació d'aquests resultats amb els patrons normals ha permès detectar modificacions del lloc i freqüència de recombinació en l'estructura meiótica resultant de la reorganització.

## 1.6.2 INDIVIDUS AMB CARIOTIP NORMAL

S'ha descrit que fins a un 8% de la població infèril masculina general amb cariotip normal mostra anomalies meiótiques (Egozcue *et al.*, 1983; De Braekeleer and Dao, 1991) (revisat a Egozcue *et al.*, 2005), però aquesta incidència es pot veure incrementada en grups d'estudi ben definits. De fet, s'ha observat una correlació positiva entre nombre d'anomalies meiótiques i alteració de seminogrames (Vendrell *et al.*, 1999). Les alteracions meiótiques poden estar ocasionades per mutacions de gens involucrats en el procés meiótic (e.g mlh1 (Edelmann *et al.*, 1996); scp3 (Yuan *et al.*, 2000)) o també per influència d'un ambient testicular anòmal (Rives *et al.*, 1998; Mroz *et al.*, 1999). Una alteració del procés meiótic pot ocasionar aturades parcials o totals de la meiosi, i en els casos en que aquesta continui avançant pot produir espermatozoides amb una dotació cromosòmica anormal. Errors en la sinapsi i recombinació meiótica es consideren com a dues possibles causes d'aturada total o parcial de la meiosi, provocant una alteració del seminograma que afecta directament a la fertilitat de l'individu.

### 1.6.2.1 ANOMALIES DEL SC I LA SEVA RELACIÓ AMB LA INFERTILITAT

Com s'ha dit anteriorment anomalies dels procés sinàptic poden produir alteracions en la disjunció dels cromosomes homòlegs a l'anafase I o una aturada parcial o total de la meiosi.

Aplicant la tècnica de AgNO<sub>3</sub> en espermatòcits I d'individus infèrils es van poder observar i descriure anomalies sinàptiques (Vidal *et al.*, 1982; Navarro *et al.*, 1986a; Navarro *et al.*, 1986b). Les anomalies descrites són: *gaps* de SC, que s'observen com a discontinuïtats al llarg del SC, aparentant una fragmentació d'aquests; desinapsis o *splits*, en els que els AEs no estan units per el CE i s'observen com a bucles; complexes irregulars, a on els AEs/LEs estan

units pel CE de manera irregular al llarg de tota la seva longitud. Aquestes anomalies del SC també poden ser observades amb la tècnica immunocitofluorescent .

### 1.6.2.2 ANOMALIES EN LA RECOMBINACIÓ MEIÒTICA

Tal i com s'ha definit anteriorment, la recombinació meiòtica entre homòlegs és necessària per generar variabilitat i per assegurar la correcta segregació dels cromosomes a la anafase I. En ratolí i a altres models animals, s'ha observat que una reducció de la recombinació provoca una augment de la no disjunció dels cromosomes homòlegs i, en conseqüència, de l'aneuploidia (Roeder, 1997; Yuan *et al.*, 2000). A la vegada, variacions en la localització d'aquests punts de recombinació s'ha relacionat amb diferent habilitat per segregar correctament els homòlegs (Ross *et al.*, 1996). L'elevada incidència d'aneuploidies presents en humans ha dut a pensar que anomalies en la recombinació pot ser una de les principals causes. Ja al 1968 (Henderson and Edwards, 1968) es va suggerir que nivells reduïts de recombinació podrien estar associats amb un efecte de l'edat materna en les trisomies. Estudis indirectes de recombinació van confirmar que en casos de trisomies 21 hi havia una reducció de recombinació (Warren *et al.*, 1987). En trisomies, degudes a una no disjunció a l'anafase I materna (15, 16, 18, 21, XXY i XXX) o paterna (21, XXY), estudiades fins al moment s'ha trobat una reducció significant de la recombinació en els progenitors (revisat a (Lynn *et al.*, 2004). Variacions en la localització dels punts de recombinació també s'han descrit com a causa d'aneuploidies humanes amb origen matern, a primera divisió meiòtica (e.g. cromosoma 21) (Lamb *et al.*, 1997) i a MII (e.g. cromosoma 16) (Lamb *et al.*, 1996). Punts de recombinació localitzats molt propers a centròmer o molt llunyans a aquest serien factors de risc per a la no disjunció dels bivalents 21 (revisat a Lynn *et al.*, 2004).



## **2. OBJECTIUS**

## 2.1 HIPÒTESI

Diferent incidència d'anomalies en el procés sinàptic i de recombinació meiótica resulta en diferents graus d'alteració de l'espermatogènesi.

## 2.2 OBJECTIUS

Estudi de la sinapsi i recombinació meiótica en espermatòcits I humans

1. Posar a punt la tècnica d'immunocitofluorescència per proteïnes de SCs i de recombinació, i aplicar una tècnica per a la identificació de tots els SCs d'un espermatòcit.
2. Anàlisi de la sinapsi en individus control i infèrtils.
3. Anàlisi de la recombinació en individus controls i infèrtils.
4. Comparació dels resultats obtinguts en l'anàlisi de la sinapsi i de la recombinació en individus control i infèrtils per tal de caracteritzar diferents graus d'anomalies en infertilitat idiopàtica.

### **3.MATERIAL I MÈTODES**

### 3.1 EXTENSIONS DE COMPLEXES SINAPTINEMALS (SCs)

Els procediments utilitzats han estat aprovats pels Comitès d'Ètica de la Universitat Autònoma de Barcelona, de l'Hospital del Mar de Barcelona i del Parc Taulí de Sabadell.

#### 3.1.1 OBTENCIÓ MATERIAL BIOLÒGIC TESTICULAR

Previ consentiment informat, les biòpsies testiculars, d'entre 3 i 4mm<sup>3</sup>, s'han obtingut per intervenció quirúrgica sota anestèsia local en pacients infèrtils i individus controls sotmesos a vasectomies o vasectomies reverses. Un cop obtingudes, les biòpsies han estat mantingudes en sèrum fisiològic o en NaCl 0,9% a 4°C fins a un màxim de dos dies.

En un dels pacients infèrtils s'ha utilitzat suspensió cel·lular sobrant del processat de teixit testicular per a obtenció d'espermatozoides per a injecció intracitoplasmàtica (ICSI) que s'havia congelat en Sperm Freezing Medium (MediCult) en palletes de 0,5ml i 0,25ml i mantingudes a -196°C.

#### 3.1.2 PROCESSAT MATERIAL BIOLÒGIC TESTICULAR

En un principi es va utilitzar el protocol descrit per d'altres autors (Barlow and Hultén, 1998), protocol #1) amb petites modificacions. Però més endavant, i per tal d'aconseguir millors extensions s'han anat introduint noves modificacions que han portat a un nou protocol per al processat i fixació de la mostra (protocol #2).

##### 3.1.2.1 PROTOCOL #1 (Barlow and Hultén, 1998)

###### 3.1.2.1.1 Material i reactius

- vidre de rellotge
- tisores de dissecció de punta corbada
- tubs centrífuga de 10ml
- base fosca (cartolina, paper o plàstic)
- cubetes de 50ml
- NaCl 0,9%
- 0,003% PhotoFlo (Kodak) en ddH<sub>2</sub>O
- ddH<sub>2</sub>O
- 2% Formaldehid / 0,02% SDS
- pines
- pipetes plàstic
- pipetes Pasteur
- micropipetes de 100µl i 200µl
- caixes portaobjectes (càmera humida)

Afegir 2,7ml formaldehid lliure d'àcid (Merk), i 0,01g de SDS (sodium dodecil sulfat, Sigma) en 100ml d'aigua destil·lada. Ajustar a pH 8,4-9,2 amb solució de borat sòdic 1M.

### **3.1.2.1.2 Obtenció de la suspensió cel·lular**

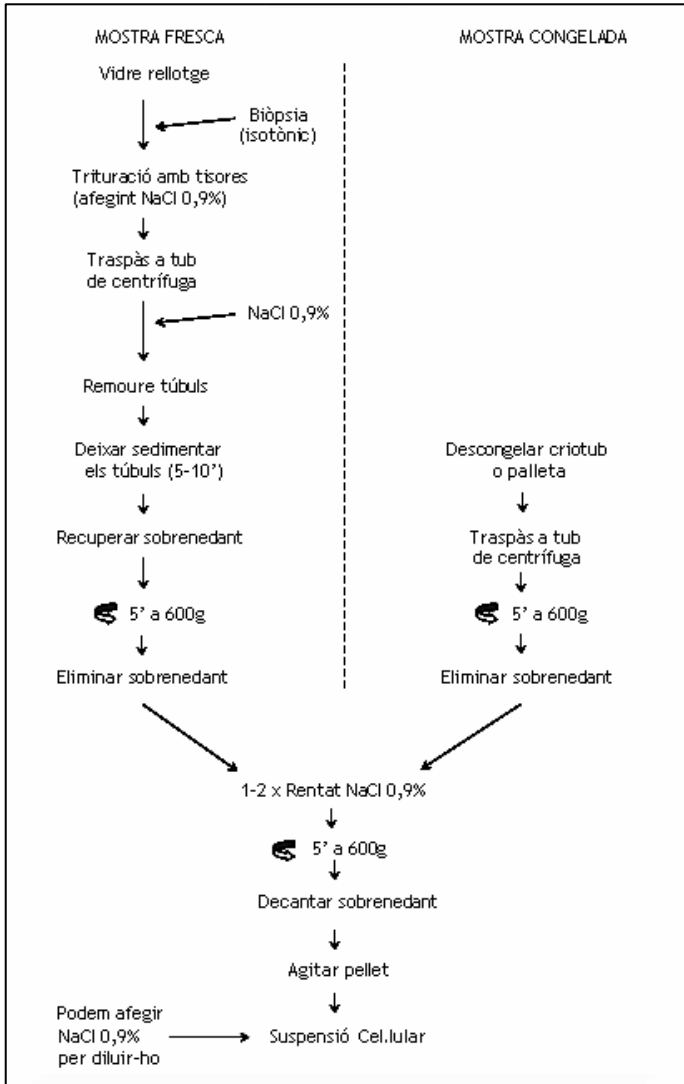
Una porció de teixit testicular es col·loca damunt un vidre de rellotge amb una gota de solució isotònica (NaCl 0,9%) i es trosseja amb les tisores per tal de fragmentar al màxim els túbuls seminífers i alliberar fàcilment les cèl·lules. Amb una pipeta Pasteur es transfereix el producte trossejat obtingut a un tub de centrífuga de 10ml. Es repeteix l'operació fins que el teixit testicular està totalment trossejat. S'afegeix NaCl 0,9% fins a 3/4 del tub, es remou el contingut amb la pipeta Pasteur per tal d'alliberar el màxim de cèl·lules i es deixa reposar la suspensió durant uns deu minuts, per tal que les restes de túbuls sedimentin. Seguidament, es recull el sobrenedant, amb les cèl·lules lliures, i es traspasa a un nou tub de centrífuga. Se centrifuga a 600g durant 5 minuts, es descarta el sobrenedant i es resuspèn el botó cel·lular afegint, poc a poc, de 3 a 5ml de medi isotònic. Es realitza de nou aquest procés, com a màxim dos cops més, per tal de rentar la mostra. Un cop s'ha eliminat l'últim sobrenedant, es resuspèn el botó cel·lular i es fa una dilució 1/3 aproximadament amb medi isotònic.

En el cas de que la suspensió cel·lular estigui congelada, es traspasa el contingut de la palleta o criotub a un tub de centrífuga de 10ml i es fan tres rentats amb NaCl 0,9% i es procedeix tal i com s'ha indicat anteriorment.

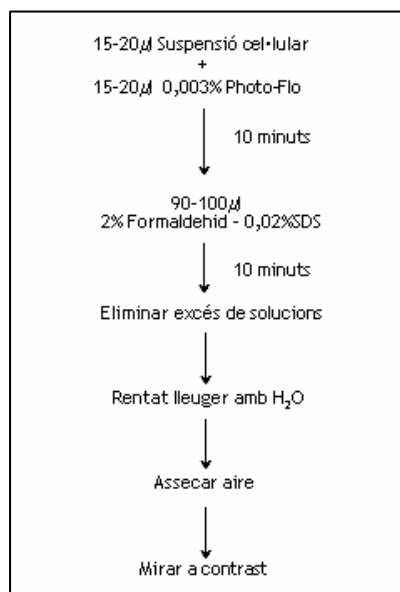
### **3.1.2.1.3 Extensió i fixació de la suspensió cel·lular**

Per a la fixació i extensió de les cèl·lules, es col·loquen 15-20µl de suspensió cel·lular damunt un portaobjectes desengreixat amb metanol 100%. Seguidament, s'afegeixen 15-20µl de 0,003% PhotoFlo i es deixa durant deu minuts. Passat aquest temps, s'afegeixen 90-100 µl de 2% formaldehid-0,02%SDS i es deixa en aquestes condicions durant deu minuts més. S'elimina l'excés de fixador per decantació, es renta el portaobjectes amb aigua destil·lada i es deixa assecar a temperatura ambient.

L'observació de les cèl·lules profàsiques meiòtiques en estadi de paquitè es pot realitzar amb un microscopi de contrast de fase. Si la concentració és la idònia es procedeix a la fixació de tota la mostra. Si la suspensió cel·lular està massa concentrada la diluïm amb unes gotes de NaCl 0.9% fins a aconseguir la concentració desitjada. Si, pel contrari, la suspensió està massa diluïda es centrifuga de nou durant 5 minuts a 600g, es descarta el sobrenedant i es resuspèn el botó amb un volum de NaCl 0.9% inferior a l'afegit la primera vegada. Els portaobjectes es conserven a -20°C fins a la seva utilització.



**Figura 3.1** Representació esquemàtica del protocol #1 utilitzat per a la obtenció de la suspensió cel·lular a partir de biòpsia testicular o de suspensió cel·lular congelada sobrant de cicles de reproducció assistida (basat en el protocol descrit per (Barlow and Hultén, 1998).



**Figura 3.2** Representació esquemàtica del protocol #1 d'extensió i fixació de la suspensió cel·lular (Barlow and Hultén, 1998).

### 3.1.2.2 PROTOCOL #2

#### 3.1.2.2.1 Material i reactius

- plaques de Petri petites
- tissors de dissecció
- pipetes Pasteur
- lupa
- caixes portaobjectes (càmera humida)
- pinces
- agulles estèrils
- cronòmetre
- micropipeta de 100µl
- cubetes de 50ml

#### - Solucions estoc

S'han de preparar les següents solucions estoc, fer alíquotes d'1ml i mantenir-les a 4°C.

- 600 mM Tris pH 8,2 (Sigma):

$$25\text{ml} \times 10^{-3}\text{dm}^3 \times 0,6\text{mol/dm}^3 \times 121,1 \text{ g/mol} = 2,52\text{g en } 25\text{ml ddH}_2\text{O}$$

- 500 mM Sacarosa (Sigma):

$$10\text{ml} \times 10^{-3}\text{dm}^3 \times 0,5\text{mol/dm}^3 \times 342,3 \text{ g/mol} = 1,71\text{g en } 10\text{ml ddH}_2\text{O}$$

- 170 mM Àcid cítric (trisodium citrate dihydrate) (Merck):

$$10\text{ml} \times 10^{-3}\text{dm}^3 \times 0,17\text{mol/dm}^3 \times 294,1 \text{ g/mol} = 0,5\text{g en } 10\text{ml ddH}_2\text{O}$$

- 250 mM EDTA (Sigma):

$$25\text{ml} \times 10^{-3}\text{dm}^3 \times 0,5\text{mol/dm}^3 \times 372,2 \text{ g/mol} = 2,3\text{g en } 25\text{ml ddH}_2\text{O}$$

Ajustar a pH 8 per tal de facilitar la seva dissolució

- 500 mM DTT (Roche):

$$1\text{ml} \times 10^{-3}\text{dm}^3 \times 0,5\text{mol/dm}^3 \times 154,3 \text{ g/mol} = 0,077\text{g en } 1\text{ml ddH}_2\text{O}$$

#### - Solució hipotònica d'extracció

Preparar 20ml tal i com s'indica a la següent taula. Ajustar el pH a 8,2-8,4.

Taula 3. 1 Solució hipotònica d'extracció

Concentració final	Solució estoc	Volum
50 mM	500 mM Sacarosa	2 ml
30 mM	600 mM Tris pH 8,2	1 ml
17 mM	170 mM Àcid cítric	2 ml
5 mM	500 mM EDTA	200 µl
2,5 mM	500 mM DTT	100 µl
	ddH <sub>2</sub> O	fins a 20 ml

#### - Sacarosa 0,1M

A partir de la solució estoc barrejar 1ml de 500mM Sacarosa en 4ml de ddH<sub>2</sub>O

- 1% Paraformaldehyd/Triton-X

Preferiblement en el cas d'aplicar la FISH després de la immunodetecció. Afegir 0,25g de paraformaldehyd en un volum inferior a 25ml ddH<sub>2</sub>O. Escalfar a 65°C per facilitar la seva correcta dissolució. Ajustar a pH 9,2 amb solució de borat sòdic 1M. Afegir 40 µl de Triton-X (Sigma) i agitar fins a la seva total dissolució.

- 1% Formaldehyd /Triton-X

Preferiblement en el cas que després de la immunodetecció no s'apliqui la FISH. Afegir 0,67ml formaldehyd lliure d'àcid (Merk) en un volum inferior a 25ml ddH<sub>2</sub>O. Ajustar a pH 9,2 amb solució de borat sòdic 1M. Afegir 40µl de Triton-X (Sigma) i agitar fins a la seva total dissolució.

- 0,04% Photo-Flo (Kodak)

- ddH<sub>2</sub>O

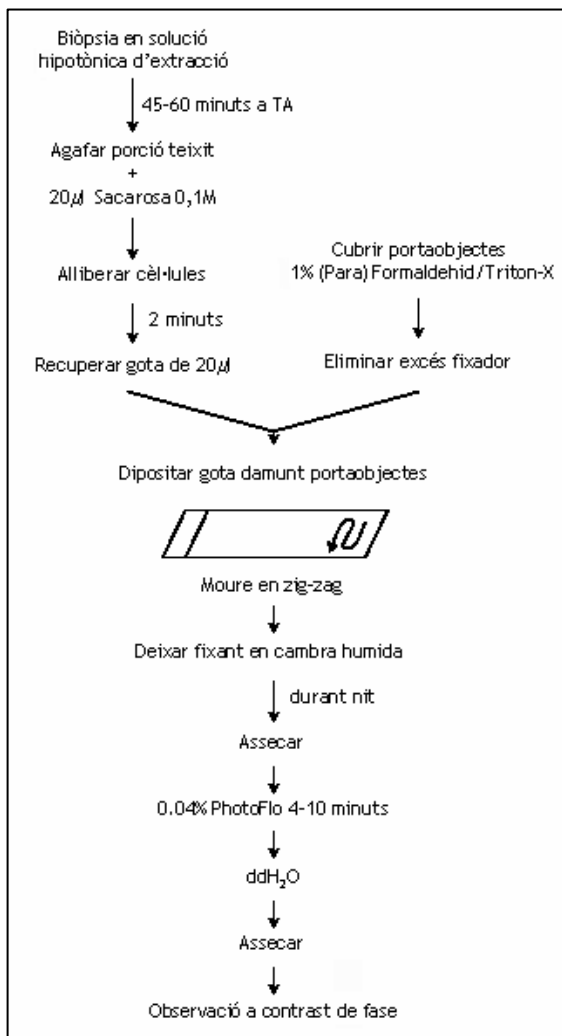


Figura 3.3 Representació esquemàtica del protocol #2 utilitzat per a la obtenció de la suspensió cel·lular a partir de biòpsia testicular per tal de millorar les extensions cel·lulars.



### 3.1.2.2.2 Obtenció, extensió i fixació de la suspensió cel·lular

Es diposita el teixit testicular a la solució hipotònica d'extracció. Utilitzant les pinces i les agulles procurar separar els túbuls per tal que la solució penetri en tot el teixit. Un cop aconseguit es deixa a temperatura ambient durant uns 45-60 minuts. Passat aquest temps es col·loca una gota de 20µl de sacarosa 0,1M a una placa de Petri i s'hi afegeix una porció de teixit testicular d'una mida similar a una punta de llapis. Sota la lupa i amb les agulles estèrils es va fent pressió sobre el teixit per tal d'alliberar les cèl·lules del seu interior. Aquestes es veuen com una boira blanquinosa que surt del teixit i queda a la solució de sacarosa. Abans de 2 minuts cal recuperar la gota de sacarosa, ara amb les cèl·lules, i es diposita damunt de l'extrem no esmerilat d'un portaobjectes, que prèviament s'haurà cobert amb fixador (1% formaldehid o 1% paraformaldehid) i eliminat l'excés. Un cop dipositada la gota es mou el portaobjectes en zig-zag en direcció a la zona esmerilada, per tal que la gota es dispersi per la seva superfície. És recomanable que en dipositar la gota amb la micropipeta es creï una bombolla que servirà de guia del lloc on són les cèl·lules. Finalment, es col·loca el portaobjectes a la caixa de portes, que s'haurà preparat com a cambra humida, es tapa i es deixa reposar durant tota la nit. L'endemà, es destapa la cambra humida i es deixa que el portaobjectes s'acabi d'assecar a temperatura ambient. Es procedeix al rentat del portaobjectes en una cubeta amb 0,04% Photo-Flo (màxim quatre portaobjectes per cubeta) en agitació durant 4-10 minuts.

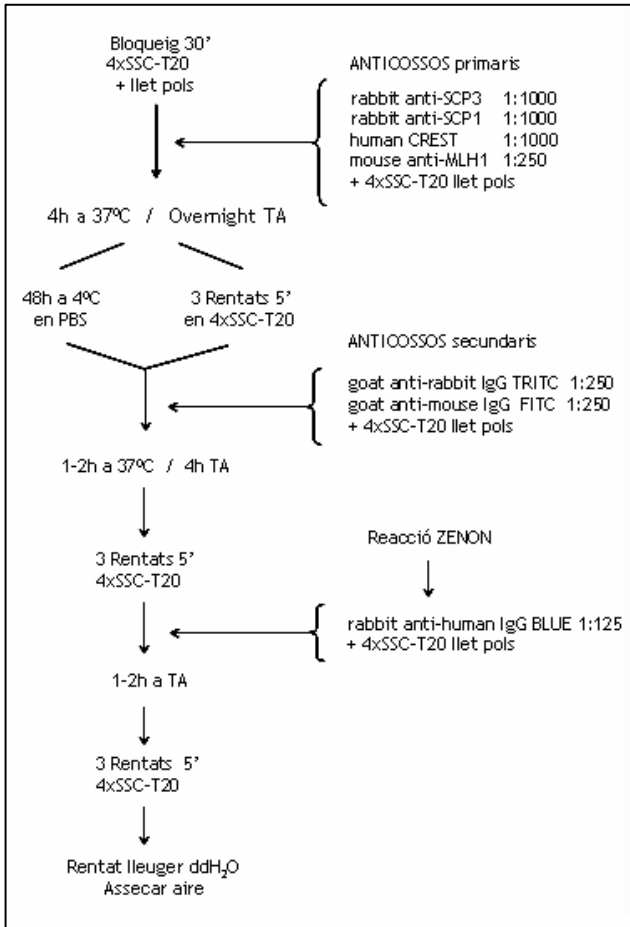
Finalment, es fa un rentat lleuger amb aigua destil·lada i es deixa assecar a temperatura ambient. L'observació de les cèl·lules profàsiques meiòtiques en estadi de paquitè es pot realitzar amb un microscopi de contrast de fase.

## 3.1.3 IMMUNOCITOFUORESCÈNCIA

### 3.1.3.1 Material i reactius

- 4xSSC-0,05% Tween20 (4xSSCT)
- Solució de bloqueig (4xSSCT- 5% llet en pols)
  - 0,05% llet desnatada en pols en 4xSSCT
- Anticossos primaris
  - Rabbit anti-rat SCP3, 1:1000
  - Rabbit anti-rat SCP1, 1:1000
  - Human anti-CREST, 1:1000
  - Mouse anti-MLH1 (Pharmingen), 1:250
- Anticossos secundaris (primera ronda)
  - Goat anti-rabbit IgG conjugat amb TRITC (Sigma), 1:250
  - Goat anti-mouse IgG conjugat amb FITC, 1:250
- Anticossos secundaris (segona ronda)
  - Rabbit anti-human IgG (Sigma), 1:250

Kit de marcatge de rabbit IgG: Pacific Blue Zenon Reaction (Molecular Probes)



**Figura 3.4** Esquema del protocol i anticossos utilitzats pel marcatge immunocitofluorescent de proteïnes del complex sinaptnemals, de punts de recombinació i de centròmers.

### 3.1.3.2 Immunocitofluorescència

En primer lloc es realitza un bloqueig de les proteïnes de la mostra fixada al portaobjectes per tal d'evitar unions inespecífiques dels anticossos. Per això s'afegeixen uns 200µl de solució de bloqueig, es cobreix amb una tira de Parafilm i es deixa durant 30 minuts a temperatura ambient. Es prepara la dilució desitjada d'anticossos primaris en solució de bloqueig. S'apliquen 100µl d'aquesta solució al portaobjectes, es cobreix amb Parafilm i es deixa incubar en cambra humida un mínim de quatre o cinc hores a 37°C, però preferiblement durant tota la nit. A continuació es procedeix diferent segons el protocol de fixació ( o #2) utilitzat. Si s'ha realitzat la fixació del protocol #1 es fan tres rentats en 4xSSCT de cinc minuts cada un, en agitació i a temperatura ambient. Si s'ha realitzat la fixació del protocol #2 es fa un rentat en PBS de 48h a 4°C. A partir d'ara es continua de forma idèntica en ambdós protocols. Es prepara la dilució de la primera ronda d'anticossos secundaris en solució bloquejant, s'aplica damunt el portaobjectes que es cobreix de nou amb Parafilm i s'incuba en cambra humida de dues a quatre hores a 37°C. Passat aquest temps, es realitzen tres

rentats en 4xSSCT de cinc minuts cada un, en agitació i a temperatura ambient. Durant el temps emprat en els rentats, es realitza la reacció de conjugació de l'anticòs Rabbit anti-human IgG amb el fluorocrom Pacífic Blue seguint les indicacions del fabricant. Es dipositen 0,4µl d'anticòs per cada 5ml de solució A de marcatge i es deixa durant cinc minuts a temperatura ambient. Posteriorment, s'afegeix la mateixa quantitat de solució B (solució A-solució B, 1:1) i passats cinc minuts es dilueix la barreja en solució de bloqueig. S'incuba de nou la mostra amb aquest anticòs en cambra humida a temperatura ambient durant una hora. Finalment, es realitzen tres rentats en 4xSSC de cinc minuts cada un, en agitació i a temperatura ambient, seguits d'un breu rentat amb aigua destil·lada. El portaobjectes es deixa assecar a temperatura ambient, s'hi afegeixen 20µl d'*antifade* (Vectashield, Vector Laboratories) i es cobreix amb un cubreobjectes.

### 3.1.4 OBSERVACIÓ I CAPTURA

Prèviament a la immunodetecció, l'observació de les cèl·lules profàsiques meiótiques en estadi de paquitè es realitza amb un microscopi òptic de contrast de fase (Leitz Dialux 20 EB). L'observació de les extensions de complexes sinaptinimals marcades immunofluorescentment es realitza amb un microscopi d'epifluorescència (Olympus BX60) equipat amb els filtres específics pels fluorocroms utilitzats que s'indiquen a continuació.

Taula 3.2 Filtres

Filtre	Fluorocrom	λ excitació	λ emissió
U-MNIBA	FITC	495	525
Yellow o U-MNG	TRITC	547	572
BLUE	Pacific Blue	410	455

La captura es realitza amb una càmera CCD (*charge-coupled device*) d'alta sensibilitat (Photometrics Sensys/Olympus U-SPT) connectada al microscopi i acoblada a un Power Macintosh G3 amb el programa de captura SmartCapture (Digital Scientific, Cambridge, Regne Unit).

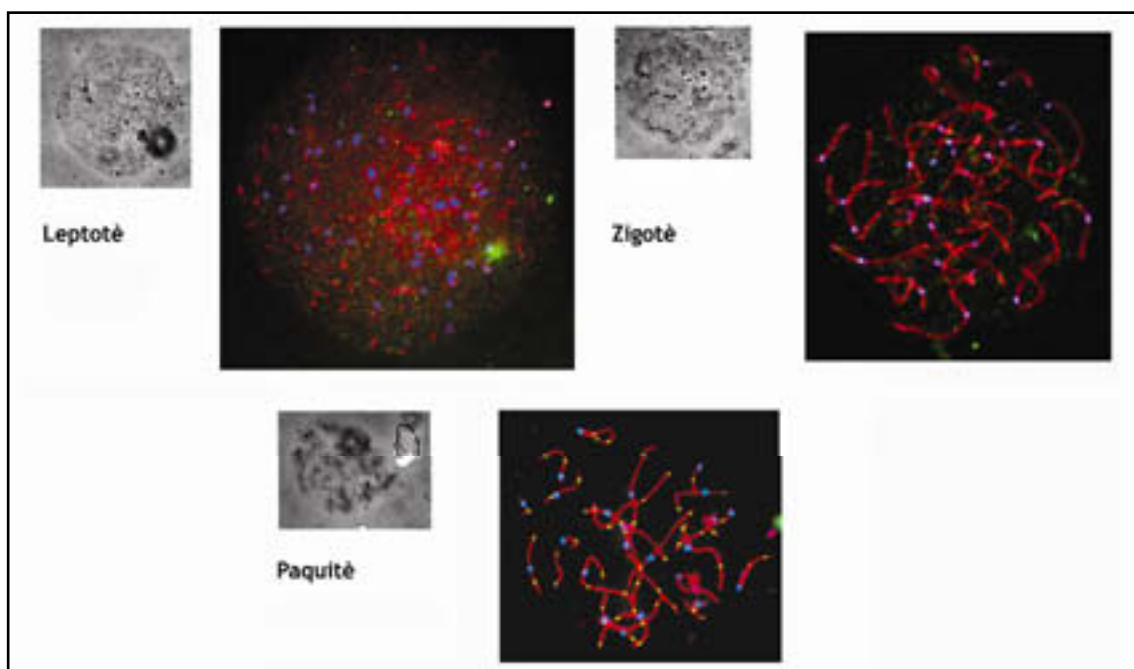
### 3.1.5 ANÀLISI DE LES CÈL·LULES EN ESTADI DE PAQUITÈ

Els espermatòcits en estadi de paquitè han estat analitzades tenint en compte tres variables: el subestadi de paquitè, la recombinació meiótica (punts MLH1) i la sinapsis. D'acord amb els cinc estadis del parell XY els nuclis han estat classificats com a paquitè inicial (estadis 1 i 2) o paquitè tardà (estadis 3, 4 i 5) (Figura 1a de l'Atricle 2, a l'apartat de Resultats).

Per l'anàlisi de la recombinació meiótica s'ha avaluat el nombre de punts de MLH1 presents a la cèl·lula i en cada un dels SC autosòmics, i l'existència d'un *focus* en el parell XY.

En l'anàlisi de la sinapsi, s'ha avaluat l'existència de discontinuïtats en els SCs (i.e. gaps) i de zones amb LE sense presentar sinapsi (i.e. splits o desinapsi). Segons el nombre de gaps presents a la cèl·lula els paquitens ha estat classificats en quatre grups: NA, nuclis no afectats; SA, nuclis moderadament afectats; MA, nuclis moderadament afectats; HA, nuclis molt afectats.

L'anàlisi de les cèl·lules s'ha dut a terme amb el programa Adobe Photoshop 7.0 en un PC i la informació obtinguda de cada cèl·lula incorporada a una base de dades.



**Figura 3.5** Exemples d'estadis cel·lulars de la profase I meiótica: leptotè, zigotè i paquitè. Es mostren les cèl·lules observades a contrast de fase (objectiu 40 augments) sense tinció, i un cop marcades amb immuno-citofluorescència per SCP3 i SCP1 (vermell), MLH1 (verd) i CENP (blau) (objectiu 100 augments).

### 3.1.6 ANÀLISI DE LES DADES OBTINGUES

Per a l'anàlisi de les dades obtingudes s'ha utilitzat el programa estadístic SPSS 12.0 i 13.0. Per a la comparació de percentatges s'han aplicat els tests de Chi-quadrat i de Fischer, en el casos en que era necessari. El tests de T-student i Mann-Whitney s'han aplicat en la comparació de mitjanes entre dos grups. Per a la comparacions de mitjanes per més de dos grups s'ha realitzat anàlisi de la variança (ANOVA). El coeficient de correlació de Pearson s'ha utilitzat per l'anàlisi de correlacions.

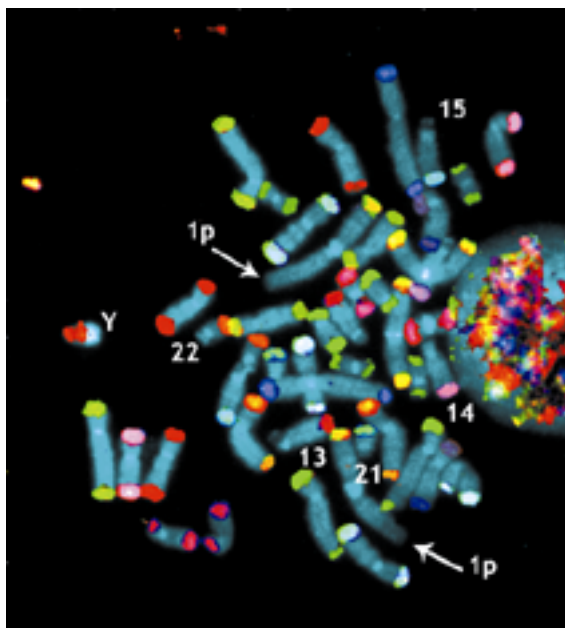
## 3.2 HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT (FISH) EN EXTENSIONS DE SCs

Degut a que els dos protocols emprats per l'extensió i fixació de complexos sinapteinemals conserven la cromatina es poden aplicar tècniques d'hibridació *in situ* fluorescent després del marcatge immunocitofluorescent dels complexos sinapteinemals.

### 3.2.1 SUBTELOMERE MULTIPLEX-FISH (stM-FISH)

La *subtelomere multiplex-FISH* (stM-FISH) és una tècnica que es basa en la hibridació d'un seguit de sondes subtelomèriques específiques per cada cromosoma humà. Les sondes estan marcades amb una combinació, única i exclusiva per cada cromosoma, d'un o dos fluorocroms d'un total de set (Fauth *et al.*, 2001).

La particularitat del stM-FISH és que els 22 parells de cromosomes autosòmics i el parell sexual (X i Y) es poden identificar simultàniament ja que cada cromosoma té els seus extrems p i q marcats amb la mateixa combinació de fluorocroms (Figura 3.6 i Taula 3.9). Únicament pels cromosomes acrocèntrics i el cromosoma 1 s'utilitzen només sondes subtelomèriques del braç q (Figura 3.6).



**Figura 3.6** Exemple d'hibridació del stM-FISH damunt de cromosomes mitòtics. Els colors observats són adjudicats artificialment pel programa d'anàlisi segons la combinació de fluorocroms present a cada cromosoma. Les fletxes indiquen els braços p dels dos cromosomes 1 que no es marquen amb el stM-FISH. Els braços p dels cromosomes acrocèntrics (13, 14, 15, 21 i 22) tampoc presenten senyal d'hibridació.

Tant l'amplificació i marcatge de les sondes subtelomèriques, com la posta a punt de les hibridacions en espermatòcits s'han realitzat en col·laboració amb el Dr. Michael Speicher i el Dr. Jürgen Kraus a l'Institut für Humangenetik de la Technische Universität München a Munich, Alemanya.

### 3.2.1.1 AMPLIFICACIÓ DE LES SONDES SUBTELOMÈRIQUES

#### 3.2.1.1.1 Material i reactius

- 7 tubs eppendorff de 200µl
- 1 tubs eppendorff de 1,5ml
- 7 tubs amb la barreja de sondes estoc a amplificar
  - Sondes estoc 1 (DEAC): 1q, 400ng; 6p, 50ng; 6q, 500ng; 10p, 100ng; 10q, 60ng; 13q, 100ng; 16p, 150ng; 16q, 80ng; Xp, 100ng; Xq, 400ng.
  - Sondes estoc 2 (DNP (DNP-KLH-Alexa488)): 1q, 700ng; 4p, 250ng; 4q, 250ng; 5p, 100ng; 5q, 800ng; 7p, 200ng; 7q, 100ng; 18p, 900ng; 18q, 170ng; 19p, 600ng; 19q, 600ng, 21q, 300ng.
  - Sondes estoc 3 (Cy3): 3p, 250ng; 3q, 100ng; 6p, 50ng; 6q, 450ng; 8p, 100ng; 8q, 450ng; 11p, 1µg; 11q, 100ng; 15q, 70ng; 18p, 50ng; 18q, 100ng; 20p, 200ng; 20q, 70ng.
  - Sondes estoc 4 (TexasRed): 3p, 250ng; 3q, 150ng; 4p, 100ng; 4q, 250ng; 9p, 100ng; 9q, 150ng; 10p, 150ng; 10q, 50ng; 17p 1.1µg; 17q, 50ng; 22q, 200ng; Yp, 100ng; Yq, 100ng.
  - Sondes estoc 5 (Cy5): 2p, 100g; 2q, 900ng; 12p, 200ng; 12q, 650ng; 13q, 100ng; 15q, 100ng; 17p, 1.1µg; 17q, 100ng; 21q, 300ng.
  - Sondes estoc 6 (biotin (avidin-Cy5.5)): 2p, 100ng; 2q, 900ng; 7p, 200ng; 7q, 100ng; 9p, 150ng; 9q, 200ng; 11p, 1µg; 11q, 400ng; 14q, 200ng; 16p, 250ng; 16q, 100ng.
  - Sondes estoc 7 (digoxigenin (anti-digoxigenin-Cy7)): 5p, 100ng; 5q, 1.4µg; 8p, 100ng; 8q, 500ng; 12p, 400ng; 12q, 1.1µg; 14q, 100ng; 22q, 100ng; Xp, 300ng; Xq, 850ng.
- Solucions estoc
  - 10xPCR Buffer
  - 50mM MgCl<sub>2</sub>
    - 2,033g MgCl<sub>2</sub> i ddH<sub>2</sub>O estèril fins als 200 µl.
  - 5mM dNTP, 100µl
    - 20µl dNTP (5µl dATP +5µl dCTP +5µl dGTP +5µl dTTP) en 80µl ddH<sub>2</sub>O estèril.
  - 5mM dAGC, 100 µl
    - 20µl dAGC (5µl dATP +5µl dCTP +5µl dGTP) en 85µl ddH<sub>2</sub>O estèril.
  - 5mM dTTP, 100µl
    - 5 µl dTTP en 95µl ddH<sub>2</sub>O estèril.
  - 100µM 6MW (Roche), encebador de DOP (5'-GACTCGAGNNNNNNATGTGG-3')
  - 5 U/µl Taq-Polimerassa

- Solució d'amplificació per DOP-PCR

Es prepara un volum de solució per un total de vuit tubs, per evitar errors de pipeta (veure Taula 3.3).

Taula 3.3 Solució d'amplificació per DOP-PCR

Concentració final	Solució estoc	Volum	
		1 tub	8 tubs
1 x	10xPCR buffer	2,5	20 µl
2 mM	50 mM MgCl <sub>2</sub>	1	8 µl
0,2 mM	5 mM dNTPs	1	8 µl
2 mM	100 mM 6MW	0,5	4 µl
	ddH <sub>2</sub> O	18,8	150,4 µl
1 U	5 U/µl Taq	0,2	1,6 µl
Volum total del mix			192 µl

3.2.1.1.2 Protocol

L'amplificació de cada una de les barreges de sondes estoc es realitza mitjançant la tècnica d'amplificació total del genoma anomenada DOP-PCR i descrita per (Telenius *et al.*, 1992). Es col·loquen 24µl de solució d'amplificació a cada un dels set tubs Eppendorff de 200µl. Posteriorment, a cada un d'ells hi afegim 1µl de la barreja de sondes a amplificar (Figura 3.7). El programa de PCR utilitzat és el següent: la mostra es desnatura a 94°C durant 3 minuts i es fan 35 cicles de 1 minut a 94°C (desnaturalització), 1 minut a 56°C (*annealing*) i 4 minuts a 72°C (extensió). Finalment, es realitza una extensió final de 20 minuts a 72°C.

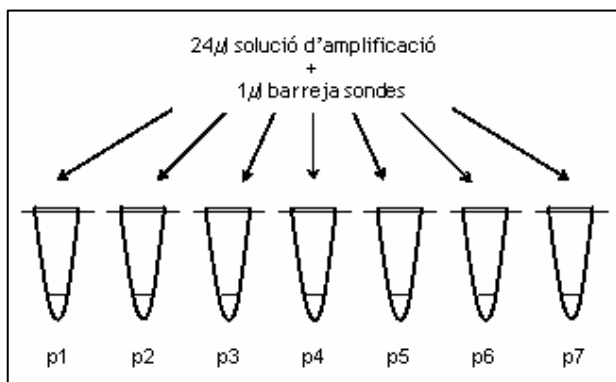


Figura 3.7 Representació esquemàtica dels volums a afegir a cada tub eppendorff per a realitzar l'amplificació per DOP-PCR.

### 3.2.1.2 ELECTROFORESI DE COMPROVACIÓ D'AMPLIFICACIÓ

#### 3.2.1.2.1 Material i reactius

- 50xTAE

100ml d'EDTA 0,5M (Sigma) + 95ml ddH<sub>2</sub>O

Afegim 242g Tris base i 57,1ml d'àcid acètic glacial (pur)

S'enrasa fins a 1000ml amb ddH<sub>2</sub>O

- 1xTAE

20ml 50xTAE en 980ml ddH<sub>2</sub>O

- Gel d'agarosa al 1%

Es pesen 0,5g d'Agarosa i s'hi afegeixen 50ml de 1xTAE. S'escalfa la solució al microones, aturant-t'ho de tant en tant i remenar fins a la total dissolució de l'agarosa (la solució queda transparent). Afegim 1µl de bromur d'etidi i es torna a barrejar. Es traspasa a la cubeta i es deixa polimeritzar.

#### 3.2.1.2.2 Protocol

Com a bany de la cubeta d'electroforesi s'hi afegeix 1xTAE i 3µl de bromur d'etidi. A cada un dels carrils del gel d'agarosa s'hi col·loquen 2,5µl del resultat de l'amplificació juntament amb 1µl de Buffer (Xylenecianol i Blau de bromofenil). Al primer carril hi posarem 3µl d'un marcador de llargada de DNA de 100bp. Fem córrer el gel a 100volts i 135mA de quinze a vint minuts. Un cop passat aquest temps s'observa el gel en un transil·luminador. Els productes de l'amplificació es veuen com una pinzellada corresponent a fragments de DNA de diferent mida. (Figura 3.9)

### 3.2.1.3 MARCATGE DE LES SONDES SUBTELOMÈRIQUES

#### 3.2.1.3.1 Material i reactius

- 7 tubs eppendorff de 25µl

- 1 tubs eppendorff de 1,5ml

- Solucions estoc

- 10xPCR Buffer

- 50mM MgCl<sub>2</sub>

- 5mM dAGC, 100µl

20µl dAGC (5µl dATP +5µl dCTP +5µl dGTP) en 85µl ddH<sub>2</sub>O estèril.

- 5mM dTTP, 100µl

5µl dTTP en 95µl ddH<sub>2</sub>O estèril.

- 100µM 6MW (Roche)

- 5 U/µl Taq-Polimerasa



## Material i Mètodes

### - dUTPs conjugats

- 1mM DEAC dUTP (Perkin Elmer)
- 1mM DNP dUTP (Perkin Elmer)
- 1mM Cy3 dUTP (Amersham Pharmacia Biotech)
- 1mM TexasRed dUTP (Molecular Probes)
- 1mM Cy5 dUTP (Amersham Pharmacia Biotech)
- 1mM Biotin (Roche)
- 1mM Digoxigenin dUTP (Roche)

### - Solució 1 de marcatge per DOP-PCR.

**Taula 3.4** Solució 1 de marcatge per DOP-PCR

Concentració final	Solució estoc	Volum	
		1 tub	6 tubs
1 x	10xPCR buffer	2,5	15 µl
2 mM	50 mM MgCl <sub>2</sub>	1	6 µl
0,2 mM	5 mM dAGC	1	6 µl
0,15 mM	5 mM dTTP	0,75	4,5 µl
2 mM	100 mM 6MW	0,5	3 µl
1 U	Taq-polimerassa	0,2	1,2 µl
	ddH <sub>2</sub> O	16,8	100,8 µl
Volum total solució			136,5 µl

### - Solució 2 de marcatge per DOP-PCR.

**Taula 3.5** Solució 2 de marcatge per DOP-PCR

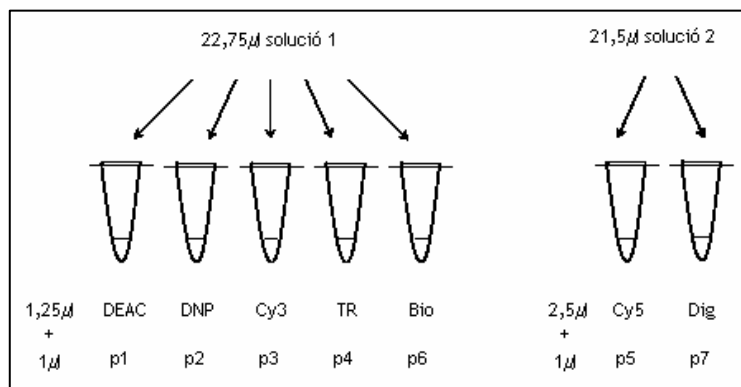
Concentració final	Solució estoc	Volum	
		1 tub	3 tubs
1 x	10xPCR buffer	2,5	7,5 µl
2 mM	50 mM MgCl <sub>2</sub>	1	3 µl
0,2 mM	5 mM dAGC	1	3 µl
0,1 mM	5 mM dTTP	0,5	1,5 µl
2 µM	100 mM 6MW	0,5	1,5 µl
1 U	Taq-polimerassa	0,2	0,6 µl
	ddH <sub>2</sub> O	15,8	47,4 µl
Volum total solució			64,5 µl

### 3.2.1.3.2 Protocol

El marcatge de les sondes es realitza, com l'amplificació, a través de la tècnica de DOP-PCR (Telenius *et al.*, 1992). Depenent del fluorocrom o molècula amb la que volem marcar les sondes de DNA utilitzarem la solució 1 o la 2. Per les barreges de sondes que han de ser marcades amb DEAC, DNP, Cy3, TexasRed i biotina es col·loquen 22,75µl de la solució 1 de marcatge en un tub Eppenforff de 200µl. S'hi afegeixen 1,25µl del corresponent fluorocrom o molècula i 1µl del producte d'amplificació a marcar. Per les barreges de sondes que han de ser marcades amb Cy5 i digoxigenina es col·loquen 21,5µl de la solució 2 de marcatge en un tub Eppenforff de 200µl. S'hi afegeixen 2,5µl del corresponent fluorocrom o molècula i 1µl del producte d'amplificació a marcar (Figura 3.8). El programa de PCR és el mateix que s'ha utilitzat en l'amplificació esmentada a l'apartat 3.2.1.1.2.

### 3.2.1.4 ELECTROFORESI DE COMPROVACIÓ DE MARCATGE

Es realitza tal i com s'ha descrit per l'electroforesi de comprovació d'amplificació esmentada a l'apartat 3.2.1.1.2.



**Figura 3.8** Representació esquemàtica de les solucions i volums a afegir a cada tub eppendorf per tal de realitzar el marcatge per DOP-PCR.

### 3.2.1.5 DIGESTIÓ DE LES SONDES SUBTELOMÈRIQUES

#### 3.2.1.5.1 Material i reactius

- 10x Nick Translation buffer (0,5M Tris-HCl pH8, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5mg/ml BSA)
- DNasa I estoc (3g/L).

La solució estoc es manté a -20°C. Es fa una dilució 1:1000

- Solució de digestió de les sondes de DNA

**Taula 3.6** Solució de digestió de les sondes de DNA

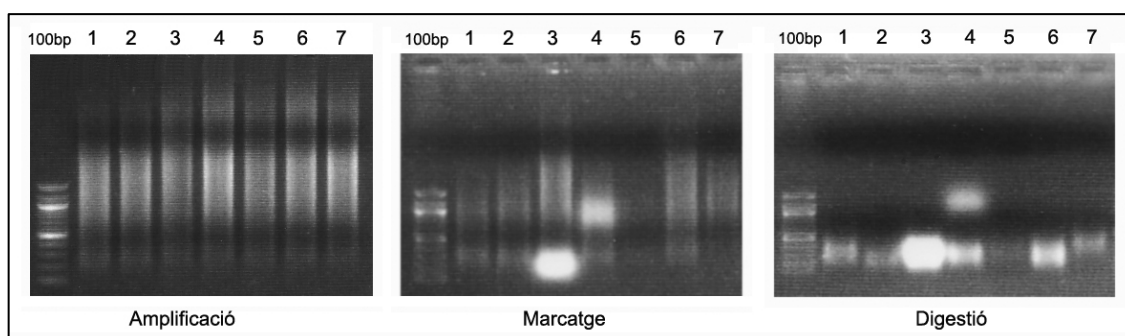
Concentració final	Solució estoc	Volum	
		1 tub	8 tubs
1 x	10xNick Translation buffer	4	32 µl
2 mM	DNasa I (3mg/L)	4	32 µl
	ddH2O	12	96 µl
Volum total solució			160 µl

### 3.2.1.5.2 Protocol

Per cada un dels set productes de marcatge, es col·loquen 20µl de solució de digestió juntament amb 20µl del producte de marcatge en un tub eppendorff de 1,5ml. Es diposita a un bany a 15°C de 30 a 105 minuts, depenent de la mida del DNA marcat. Un cop passat aquest temps s'atura la reacció introduint el tub eppendorff a un bany a 4°C.

### 3.2.1.6 ELECTROFORESI DE COMPROVACIÓ DE DIGESTIÓ

Es realitza tal i com s'ha descrit per l' electroforesi de comprovació d'amplificació, però amb una petita modificació. A cada un dels carrils s'hi col·loca 1µl de Buffer (Xylenecianol i Blau de bromofenil) i 4µl del producte de la digestió (2µl x 2 ja que hem diluït el DNA a la meitat al fer la digestió). Els fragments de DNA han de tenir una mida de 200 a 600bp.



**Figura 3.9** Exemples de gels d'electroforesi de comprovació de l'amplificació, marcatge i digestió de cada un dels set grups de sondes.

### 3.2.1.7 PRECIPITACIÓ I PREPARACIÓ DE LA SOLUCIÓ D'HIBRIDACIÓ

#### 3.2.1.7.1 Material i reactius

- Cot1
- 3M NaOAC
- Formamida desionitzada
- ssDNA
- Etanol 100% i al 70%
- Dextran sulfat 40% en 2xSSC

#### 3.2.1.7. 2 Protocol

Es prepara la solució de precipitació segons mostra la següent taula en un tub eppendorff de 1,5ml.

Taula 3.7 Solució de precipitació

Barreja sondes	Cot 1 DNA	ssDNA	NaOAC
	µl	µl	µl
DEAC	30		
DNP	81		
Cy3	27		
TexasRed	6	45	21
Cy5	21		
Biotina	24		
Digoxigenina	30		

Finalment s'hi afegeixen 600ml d'etanol al 100%, es barreja bé i es deixa precipitar durant tota la nit a -20°C. Si és necessari fer una precipitació més ràpida, es pot fer a -80°C durant 30 minuts. Passat aquest temps centrifuguem la solució a 13000 rpm a 4°C durant 30 minuts. Seguidament eliminem el sobrenedant, afegim 200µl d'etanol al 70%, resuspenem el precipitat i ho centrifuguem de nou a 13000 rpm a 4°C durant 10 minuts. Eliminem el sobrenedant i ho deixem assecar a 37°C mantenint el tub obert. Un cop el botó de DNA està sec s'hi afegeixen 16µl de formamida desionitzada i es manté a 37°C fins a la seva total dissolució. Un cop dissolt el DNA s'hi afegeixen 16µl de dextran sulfat al 40% i a la vegada que es remena amb la punta de la pipeta. La solució d'hibridació es pot utilitzar immediatament o mantenir a -20°C.

### 3.2.1.8 PREPARACIÓ DELS PORTES I TRACTAMENT AMB PEPSINA

#### 3.2.1.8.1 Material i reactius

- 4xSSC-0,05%T20
- Pepsina 10%
- 1x PBS
- tub de 10ml
- Etanols (70%, 85% i 100%)
- HCl 1N
- cubetes

### 3.2.1.8.2 Protocol

Per tal d'eliminar els cubreobjectes que hi ha damunt els portaobjectes com a conseqüència de la immunoanàlisi, dipositem aquests a una cubeta amb 4xSSC-0,05%T20 en agitació. Un cop s'ha tret el cubreobjectes es fan dos rentats en 4xSSC-0,05%T20 en agitació durant 5 minuts, per tal d'eliminar les restes d'*antifade*. Es procedeix amb una deshidratació amb una sèrie d'etanols (dos minuts cada un) i es deixa assecar. Mentrestant, en un tub hi posem 10ml de ddH<sub>2</sub>O i 100µl de HCl 1N i es col·loca dins un bany a 37°C. Quan el contingut del tub ha arribat als 37°C hi afegim 15µl de pepsina al 10%, es remena bé i es col·loca aquesta solució damunt el portaobjectes de 30 segons a 1 minut. Seguidament, es fan dos rentats en PBS de 5 minuts, una deshidratació amb una sèrie d'etanols i es deixa assecar.

Si la barreja de sondes és nova és interessant fer prèviament un test damunt de cromosomes de limfòcits per comprovar que funciona bé. Aquests portes amb extensions de cromosomes mitòtics es tracten també amb pepsina tal i com s'ha descrit anteriorment, però en aquest cas a la solució només hi afegim 3µl pepsina al 10%.

### 3.2.1.9 HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT (FISH)

#### 3.2.1.9.1 Material i reactius

- Formamida 70% en 2xSSC a pH 7
- Etanols freds (70%, 85% i 100%)
- Cubreobjectes
- Càmera humida
- Goma aràbica

#### 3.2.1.9.2 Protocol

Per la FISH en cromosomes mitòtics s'utilitza el mateix protocol que per les extensions de complexes sinapteinemals, l'únic que en aquest cas la temperatura de desnaturalització del porta és 73°C.

Per la FISH damunt de complexes sinapteinemals es desnaturalitza el portaobjectes amb formamida al 70% a 69°C durant 1 minut i 45 segons. Passat aquest temps es fa una deshidratació en una sèrie d'etanols freds de tres minuts cada un i es deixa assecar a l'aire. Mentrestant, es desnaturalitza la barreja d'hibridació a 75°C durant set minuts. Posteriorment es passa a 37°C durant un mínim de 20 minuts (*pre-annealing*). Un cop la barreja de sondes i els portaobjectes estan desnaturalitzats, es procedeix a la hibridació. Es diposita un volum determinat de barreja d'hibridació segons l'àrea a hibridar (6µl per un cubreobjectes de 18x18) damunt la zona d'interès, s'hi col·loca el cubreobjectes, es segella amb goma aràbica i es deixa en càmbra humida durant 48h a 37°C. La barreja de sondes es pot guardar a -20°C per a ser utilitzada posteriorment.

### 3.2.1.10 RENTATS POSTHIBRIDACIÓ I DETECCIÓ

#### 3.2.1.10.1 Material i reactius

- 4xSSC-0,05%T20
- 4xSSC a 37°C
- 1xSSC a 60°C
- 3%BSA en 4xSSC-0,05%T20 (solució de bloqueig)
  - 0,3g de BSA en 10ml de 4xSSC-0,05%T20
- Anticossos
  - Rabbit anti-DNP-KLH-Alexa488 (Molecular Probes), 1:400
  - Rabbit anti-digoxigenin-Cy7 (Amersham Pharmacia Biotech), 1:50
  - Avidin-Cy5.5 (Rockland Inc.), 1:200

#### 3.2.1.10.2 Protocol

Es realitzen tres rentats en 4xSSC en agitació durant cinc minuts cada un a 37°C, seguits de tres rentats en 1xSSC de cinc minuts cada un a 60°C i un rentat ràpid en 4xSSC. Es bloqueja el portaobjectes cobrint-lo amb 3% BSA durant 30 minuts. Passat aquest temps s'elimina l'excés de bloquejant i es passa ràpidament per 4xSSC. Seguidament s'afegeixen 100µl de la solució d'anticossos, es cobreix amb Parafilm i s'incuba el portaobjectes a 37°C durant 45 minuts. Posteriorment es fan tres rentats de cinc minuts amb 4xSSC, un rentat ràpid amb ddH<sub>2</sub>O, es deixa assecar i s'hi afegeix el DAPI amb l'*antifade*.

#### 3.2.1.11 OBSERVACIÓ I CAPTURA

L'observació de les extensions de complexes sinapteinemals s'han realitzat amb un microscopi d'epifluorescència automatitzat (Leica DMRXA-RF8) equipat amb una roda de vuit filtres específics pels fluorocroms utilitzats (Taula 3.8).

Taula 3.8 Longituds d'ona ( $\lambda$ ) dels fluorocroms utilitzats

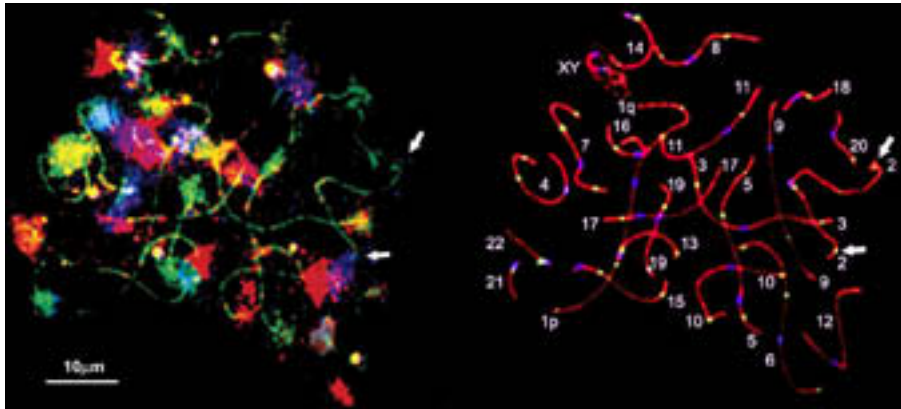
Fluorocrom	$\lambda$ excitació	$\lambda$ emissió
DEAC	426	480
Alexa488	495	520
Cy3	554	568
TexasRed	595	615
Cy5	652	672
Cy5.5	682	703
Cy7	755	778
DAPI	345	455

La captura es realitza amb una càmera CCD (*charge-coupled device*) d'alta sensibilitat (Photometrics Sensys/ Kodak KAF 1400 chip) connectada al microscopi i acoblada a un PC equipat amb el programa de captura Leica QFISH (Leica Microsystems Imaging Solutions, Cambridge, Regne Unit).

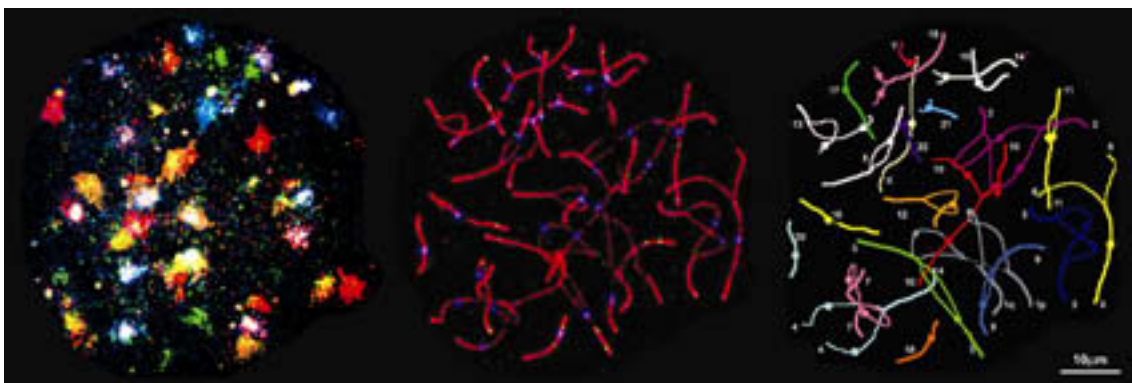
### 3.2.1.12 ANÀLISI DE LES IMATGES

#### 3.2.1.12.1 Identificació dels complexos sinaptinemals

Per a la visualització de les senyals de cada un dels set fluorocroms del stM-FISH s'ha utilitzat el programa IrfanView 3.95. La identificació dels 22 complexos sinaptinemals autosòmics s'ha realitzat damunt les imatges resultants de l'anàlisi immunocitofluorescent utilitzant el programa Adobe Photoshop 7.0 en base a les senyals obtingudes amb stM-FISH i la taula de combinació de colors (Taula 3.9).



**Figura 3.10** Resultat de la hibridació amb stM-FISH (imatge esquerra) d'un espermatòcit en estadi de paquíetè prèviament analitzat amb immunocitofluorescència (imatge dreta). Les senyals de FISH permeten identificar un a un tots els SCs pels seus extrems (fletxes).



**Figura 3.11** Resultat de la hibridació amb stM-FISH (imatge esquerra) d'un espermatòcit en estadi de zigotè tardà prèviament analitzat amb immunocitofluorescència (imatge mig). Representació del zigotè amb tots els bivalents identificats amb un color.

Taula 3.9 Combinació de fluorocroms per cada un dels cromosomes.

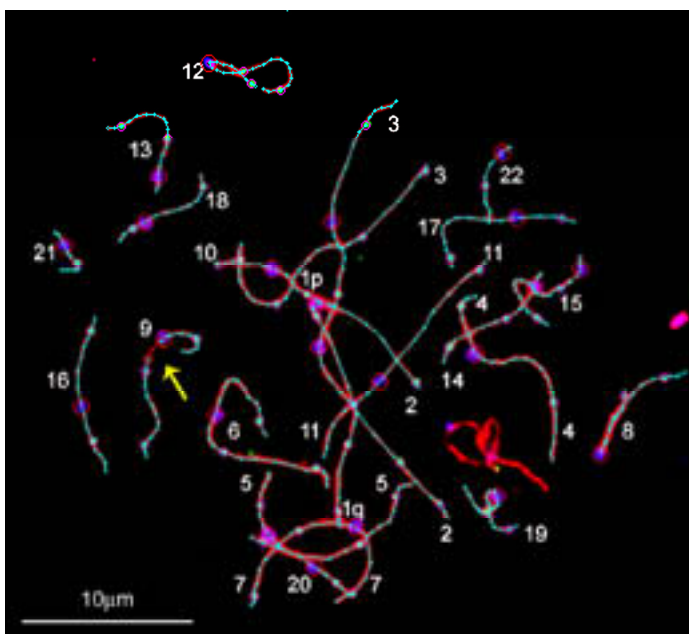
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
DEAC	•					•				•			•			•							•	
A488	•			•	•		•											•	•		•			
Cy3			•			•		•			•				•			•		•				
TR			•	•					•	•								•				•		•
Cy5		•										•	•		•		•					•		
Cy5.5		•					•		•		•			•		•								
Cy7					•			•			•		•		•							•	•	

### 3.3 LONGITUD DELS SCs I POSICIÓ RELATIVA DELS PUNTS DE MLH1

#### 3.3.1 MESURA DELS SCs I POSICIÓ DEL CENTRÒMER I DELS PUNTS DE MLH1

Per realitzar les mesures s'ha utilitzat el programa MicroMeasure 3.3, disponible a la web: <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure>.

Es realitza la mesura de la longitud de cada un dels 22 SCs autosòmics de la cèl·lula, a la vegada que es marca la posició del centròmer i dels punts de MLH1 identificats. En el cas que un SC presenti *gaps* i *splits* també se'n mesura la longitud i la posició dins el SC.



**Figura 3.12** Imatge corresponent a un paquet amb tots els SCs identificats i mesurats. La posició del centròmer i dels punts de MLH1 està marcada en cada SC. Els *gaps* i *splits*, si n'hi ha, es marquen amb un color diferent (fletxa).



Un cop acabades les mesures, el programa automàticament exporta les dades corresponents a distàncies a una fulla d'Excel per al seu posterior anàlisi. Les següents taules (Taulas 3.10 i 3.11) són un exemple de la informació proporcionada pel programa de mesura MicroMeasure 3.3

**Taula 3.10** Exemple de taula de mesures dels 22 SCs autosòmics per a una cèl.lula

SC	Length SC µm	Rel. length %	q arm µm	p arm µm	C. Index	# MLH1	# Gap	Length µm	Rel.Length %
1	27,6	9,4	12,9	14,7	0,53	4			
2	26,3	9,0	17,2	9,1	0,35	4			
3	19,4	6,6	9,8	9,6	0,49	3			
4	15,7	5,3	11,1	4,6	0,29	2			
5	16,8	5,7	12,4	4,4	0,26	3			
6	18,2	6,2	10,9	7,3	0,40	3			
7	16,4	5,6	10,1	6,4	0,39	3			
8	13,1	4,5	8,5	4,6	0,35	2			
9	12,8	4,4	8,7	4,1	0,32	3	1	1,47	0,11
10	13,1	4,4	9,2	3,9	0,30	3			
11	17,1	5,8	10,7	6,5	0,38	2			
12	12,6	4,3	9,0	3,6	0,29	3			
13	9,0	3,0	8,0	1,0	0,11	2			
14	9,2	3,1	8,3	0,9	0,09	2			
15	10,1	3,5	9,4	0,8	0,08	2			
16	10,7	3,6	6,1	4,6	0,43	2			
17	11,7	4,0	7,8	3,9	0,33	2			
18	7,7	2,6	5,5	2,2	0,28	2			
19	8,7	3,0	4,7	4,0	0,46	2			
20	7,7	2,6	4,6	3,0	0,40	2			
21	4,1	1,4	3,0	1,1	0,26	1			
22	5,7	2,0	5,1	0,7	0,12	1			
Totals	293,6					53	1	1,47	0,01

A la Taula 3.10 veiem per a cada un dels 22 SCs, la seva longitud absoluta en µm, la longitud relativa, la longitud del braç p i la del braç q, l'índex centromèric, el número de punts de MLH1 presents en el SC, el número de *gaps* i la seva longitud absoluta i relativa. En els cas que s'hi obervin *gaps* i *splits* hi haurien tres columnes més corresponents al nombre de *gaps* i/o *splits*, la longitud absoluta i la relativa.

**Taula 3.11** Exemple de posició de punts de MLH1 en els SC13 i SC16

Chromosome # 13			Chromosome # 16		
Arm	Dist. from cent. µm	Rel. dist. %	Arm	Dist. from cent. µm	Rel. dist. %
q	2,59	32,4	p	2,5	53,7
q	7,08	88,7	q	5,2	84,8

A la Taula 3.11 s'observa el nombre de punts de MLH1 per SC, equivalent al nombre de files (en aquest l'exemple, dos per al cromosoma 13 i dos per al cromosoma 16). S'indica per cada focus, el braç on es localitza el punt de MLH1 i la seva distància física i relativa des del centròmer.

### 3.3.2 ANÀLISI DE LES DADES

Les dades obtingudes per cada un dels SCs mesurats han estat exportades, tractades i analitzades amb el programa estadístic SPSS 13.0. Per cada cèl·lula s'han obtingut 9 variables, i per cada SC s'han obtingut de l'ordre de fins a 43 variables segons el número de punts de MLH1 i la presència o no de *gaps* i *splits* (veure Taules 3.12 i 3.13). La organització de les dades, en aquestes variables, permet realitzar l'anàlisi de cada una d'elles per individu, per grup de fertilitat, per subestadi de paquitè i per SC. Per a la comparació de percentatges s'han aplicat els tests de Chi-quadrat i de Fischer, en el cas en que era necessari. El tests de T-student i Mann-Whitney s'han aplicat en la comparació de mitjanes entre dos grups. Per a la comparació de mitjanes per més de dos grups s'ha realitzat anàlisi de la variança (ANOVA). El coeficient de correlació de Pearson s'ha utilitzat per l'anàlisi de correlacions.

**Taula 3.12** Variables de la cèl·lula

Variable	Descripció
Indiv	codificació de l'individu
Grup	grup control o grups d'infertilitat
CoordCel	identificació de la cèl·lula en paquitè
Paqui	subestadi de paquitè (inicial, mitjà, tardà)
MLH1autos	número de punts MLH1 en tots els SC autosòmics
MLH1XY	presència o no de focus de MLH1 al parell XY
LongTotalSet_micro	longitud total dels SCs ( $\mu\text{m}$ )
LongTotalGapSet_micro	longitud total dels gaps ( $\mu\text{m}$ )
LongTotalDesSet_micro	longitud total de les desinapsis ( $\mu\text{m}$ )

Per tal de realitzar una distribució dels punts de MLH1 proporcional a la longitud de cada un dels SC, es divideix cada SC en parts iguals de  $0,7\mu\text{m}$  de longitud. En el total de SCs d'un paquitè es realitzen 434 divisions que equivalen aproximadament a regions de 10Mb. La distribució dels punts de MLH1 s'obté del nombre de vegades que en cada una d'aquestes porcions de SC s'hi posiciona un focus de MLH1.

La interferència entre punts de MLH1 adjacents correspon a la distància, en  $\mu\text{m}$  o en % de longitud del SC, entre els dos punts. La interferència entre punts de MLH1 es realitza per cada SC i pel nombre total de punts de MLH1 presents en aquests SC.

**Taula 3.13** Variables de cada SC

Variable	Descripció
SC	número del SC identificat
Rank	posició que ocupa segons la longitud
LongCS_micro	longitud absoluta del SC ( $\mu\text{m}$ )
LongCSPerc	longitud relativa del SC respecte la longitud total de SCs (%)
LongLarm_micro	longitud absoluta del braç llarg ( $\mu\text{m}$ )
LongSarm_micro	longitud absoluta del braç curt ( $\mu\text{m}$ )
ArmRatio	relació braços (llarg/curt)
CentInd	índex centromèric (braç curt/(llarg+curt))
NumMLH1	número de punts MLH1 en el SC
MLH1Sarm	número de punts MLH1 en el braç curt
SMLH1aDist_micro	posició respecte del centròmer del focus de MLH1 més proximal ( $\mu\text{m}$ )
SMLH1aRelDist	igual al anterior (% de la longitud del braç curt)
SMLH1bDist_micro	igual al SMLH1aDist_micro (en el cas d'un 2n focus de MLH1 més distal en el braç curt )
SMLH1bRelDist	igual al anterior (% de la longitud del braç curt)
SMLH1cDist_micro	igual al SMLH1aDist_micro (en el cas d'un 3r focus de MLH1 més distal en el braç curt )
SMLH1cRelDi	igual al anterior (% de la longitud del braç curt)
MLH1Larm	número de punts MLH1 en el braç llarg
LMLH1aDist_micro	posició respecte del centròmer del focus de MLH1 més proximal ( $\mu\text{m}$ )
LMLH1aRelDi	igual al anterior (% de la longitud del braç llarg)
LMLH1bDist_micro	igual al LMLH1aDist_micro (en el cas d'un 2n focus de MLH1 més distal en el braç llarg )
LMLH1bRelDi	igual al anterior (% de la longitud del braç llarg)
LMLH1cDist_micro	igual al LMLH1aDist_micro (en el cas d'un 3r focus de MLH1 més distal en el braç llarg )
LMLH1cRelDi	igual al anterior (% de la longitud del braç llarg)
LMLH1dDist_micro	igual al LMLH1aDist_micro (en el cas d'un 4t focus de MLH1 més distal en el braç llarg )
LMLH1dRelDi	igual al anterior (% de la longitud del braç llarg)
GapSLa	presència de gap en el braç curt (S) o en el llarg (L)
Gap_a_LongCS_micro	longitud del gap ( $\mu\text{m}$ )
GapaRelLong	longitud del gap (en % de longitud del SC)
Gap_a_DistPos_micro	distància respecte del centròmer de l'extrem més distal del gap ( $\mu\text{m}$ )
GapaRelDisPos	igual al anterior (% de la longitud del SC)
Gap_a_ProxPos_micro	distància respecte del centròmer de l'extrem més proximal del gap ( $\mu\text{m}$ )
GapaRelProxPo	igual al anterior (% de la longitud del SC)
DesSL	presència de desinapsis en el braç curt (S) o en el llarg (L)
Des_LongCS_micro	longitud de la desinapsis ( $\mu\text{m}$ )
DesRelLong	longitud de la desinapsis (en % de longitud del SC)
Des_DisPos_micro	distància respecte del centròmer de l'extrem més distal de la desinapsis ( $\mu\text{m}$ )
DesRelDistPo	igual al anterior (% de la longitud del SC)
Des_ProxPos_micro	distància respecte del centròmer de l'extrem més proximal de la desinapsis ( $\mu\text{m}$ )
DesRelProxP	igual al anterior (% de la longitud del SC)
L1q_micro	longitud absoluta del braç q del SC 1 ( $\mu\text{m}$ )
SarmLarm	$1p > 1q$ ; $1p < 1q$ ; $1p = 1q$
MapUnits	unitats de longitud genètica del SC (cM)

## 3.4 CARACTERITZACIÓ CITOGENÈTICA D'UN ISOCROMOSOMA DICÈNTRIC Yq (p11.32)

### 3.4.1 CARACTERÍSTIQUES DE L'INDIVIDU PORTADOR

L'individu analitzat presentava, azoospermia i era fenotípicament normal amb 37 anys d'edat. Els testicles dret i esquerra presentaven varicocele, tenien una textura tova i un volum de 5ml cada un. Els caràcters masculins secundaris eren completament normals. L'anàlisi d'hormones mostrà que el nivell d'hormona estimulant dels fol·licles (FSH) era molt elevada, de 35,2 mIU/ml respecte d'un valor normal de <12 mIU/ml.

La mare d'aquest individu va tenir dos avortaments previs dels que no se'n va determinar el sexe, i posteriorment als avortaments, va tenir dos fills sans i una filla. El germà de l'individu estudiat té tres filles sanes i la germana no ha tingut descendència (Figura 3.13).

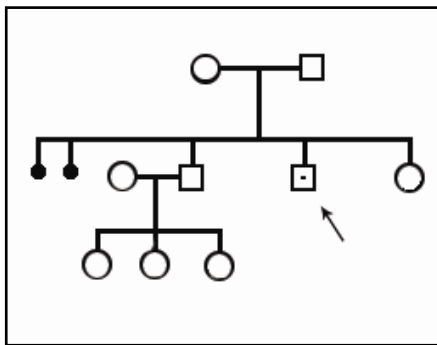


Figura 3.13 Arbre geneològic de la família de l'individu portador del idicYq(p11.32) (fletxa).

### 3.4.2 CULTIU DE LIMFÒCITS I OBTENCIÓ DE CROMOSOMES MITÒTICS

#### 3.4.2.1 Material i reactius

- Medi de cultiu
- Phytohemaglutinina (PHA)
- L-glutamina
- Colcemid
- tubs de centrífuga
- solució de KCl 0,075M
- Fixador Carnoy
- Colorant Leishmann (4 buffer : 1 colorant)
- pipetes Pasteur

### 3.4.2.2 Protocol

S'obté la sang, se'n sembren 250ml en 5ml de medi de cultiu, amb 100µl de PHA i 50µl de L-glutamina i s'incuba en una estufa a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub> durant 96 hores. Trenta minuts abans de les 96 hores s'hi afegeix el Colcemid. Aquest és un agent antimitòtic que evita que, en les cèl·lules en metafase, els microtúbuls polimeritzin i formin el fus mitòtic. A les 96 hores s'atura el cultiu fent una centrifugació a 600g durant 6 minuts. Posteriorment, s'elimina el sobrenedant i es resuspèn el botó que queda amb una solució de KCl 0,075M. Es deixa reposar d'una 15 a 18 minuts. Passat aquest temps s'hi afegeixen tres gotes de fixador Carnoy, es tapa i s'agita al vòrtex. Seguidament, es centrifuga a 600g durant 6 minuts. El sobrenedant queda molt negrós degut a l'hemòlisi i als productes de degradació de la hemoglobina. S'elimina aquest sobrenedant i es resuspèn el botó de cèl·lules. Es realitzen dos rentats més amb Carnoy fins que el botó de cèl·lules queda blanquinós. Finalment, es resuspèn el botó de cèl·lules en Carnoy fins a aconseguir la concentració desitjada i es fa l'extensió damunt dels portaobjectes desengreixats. Per tal d'observar les metafases exteses, es fa una tinció amb colorant Leishmann durant 6 minuts, s'esbandeix amb H<sub>2</sub>O i es pot observar al microscopi

### 3.4.3 BANDEIG DE CROMOSOMES DE LIMFÒCIT

#### 3.4.3.1 Material i reactius

- solució HCl 0,2M
- solució Ba(OH)<sub>2</sub> saturat
- solució 2xSSC
- colorant Wright (eosina i tiacina)
- colorant Leishman

#### 3.4.3.2 Protocol Bandes G

Els portes, que han estat envellits uns 5 o 6 dies a temperatura ambient o una nit a 65°C, s'introdueixen en una solució de 2xSSC a 65°C de 1 a 3 minuts. Seguidament, es renten els portaobjectes amb aigua i es deixen assecar. Es cobreixen les preparacions amb una solució de colorant Wright de 1 a 3 minuts. Passat aquest temps s'esbandeixen amb aigua i s'assequen a l'aire.

#### 3.4.3.3 Protocol Bandes C

Els portes, que han estat envellits uns 5 o 6 dies a temperatura ambient, es dipositen en una solució de HCl 0,2M a temperatura ambient durant 30 minuts. Posteriorment en fan dos rentats dels portes amb H<sub>2</sub>O bidestil·lada i es dipositen en una cubeta amb una solució de Ba(OH)<sub>2</sub> a 37°C durant uns 20 minuts. Aquest temps pot variar segons el tipus de material i les condicions d'envelliment. Un cop passat aquest temps es realitzen ràpidament tres rentats amb H<sub>2</sub>O bidestil·lada, evitant que el Ba(OH)<sub>2</sub> s'assequi en el portaobjectes. Posterior al

rentats, es dipositen els portaobjectes en una solució de 2xSSC a 65°C durant 2 hores. Finalment, es fa un rentat amb H<sub>2</sub>O bidestil·lada, s'asseca i es tenyeix amb tinció uniforme utilitzant el colorant Leishman.

### 3.4.4 OBTENCIÓ I FIXACIÓ DE CÈL·LULES DE LA MUCOSA BUCAL

#### 3.4.4.1 Material i reactius

-tubs de centrífuga de 10ml	-solució d'àcid acètic al 60% en H <sub>2</sub> O destil·lada
-solució de PBS 1x	-fixador Carnoy (3 metanol: 1 acètic)
-vòrtex	-portaobjectes

#### 3.4.4.2 Protocol

Previ a l'obtenció de les cèl·lules de la mucosa bucal es fa glopejar aigua destil·lada durant una bona estona, per tal de fer un rentat de la boca. Les cèl·lules epitelials bucals s'obtenen fent un raspat de la paret bucal que es diposita en un tub amb PBS 1x.

Es procedeix a realitzar tres rentats de la mostra amb PBS 1x. Es fa una centrifugació de 5 minuts a 600g, s'elimina el sobrenedant, es resuspèn el botó cel·lular i s'hi afegeix PBS 1x de nou. Després de l'última centrifugació, en comptes d'afegir-hi PBS 1x, es fa el rentat amb àcid acètic al 60% per tal de fer les cèl·lules permeables. Es repeteix aquest procés dues vegades. Finalment, es centrifuga de nou durant 5 minuts a 600g, s'elimina el sobrenedant i s'hi afegeix Carnoy gota a gota i en agitació. Es repeteix aquesta última operació dos cops més. Per a fer l'extensió, s'agafa una gota de la suspensió cel·lular, es deixa caure directament damunt un portaobjectes.

### 3.4.5 HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT (FISH) EN LIMFÒCITS I EN CÈL·LULES DE LA MUCOSA BUCAL

#### 3.4.5.1 Sondes utilitzades

S'han utilitzat set sondes diferents específiques del cromosoma Y. S'han realitzat cinc hibridacions combinant una, dues i tres sondes (Taula 3.14).

#### 3.4.5.2 FISH en limfòcits

Si les preparacions s'han fet al moment cal envellir-les en 2xSSC a 37°C durant 30 minuts. Abans de la hibridació cal realitzar un tractament amb pepsina per tal d'eliminar restes de citoplasma. El protocol de tractament amb pepsina ha estat descrit a l'apartat 3.2.1.8.2.

Igualment, el protocol d'hibridació també ha estat ja descrit a l'apartat 3.2.1.9.2. L'única diferència roman en el temps de desnaturalització de les sondes i en el temps d'hibridació. Les sondes s'han desnaturalitzat a 72°C durant 5 minuts i el temps d'hibridació ha estat durant tota la nit.

### 3.4.5.3 FISH en cèl·lules de la mucosa bucal

Per aquestes cèl·lules també es fa tractament amb pepsina. La desnaturalització d'aquestes cèl·lules és realitza igual que la dels limfòcits però la temperatura és més suau, pel fet que són cèl·lules interfàsiques i no tenen la cromatina tant condensada. La desnaturalització es fa en una solució de formamida al 70% a una temperatura de 69-70°C entre 1 o 2 minuts.

Taula 3.14 Sondes utilitzades

Sonda	Especificitat	Banda	Fluorocrom	Procedència	Hibridació
CEPY $\alpha$ -satellite	centròmer Y	-	SpectrumOrange	Vysis	1 i 5
LSI-SRY	gen SRY	Yp11.3	SpectrumOrange	Vysis	1 i 2
bA489H20	-	Yq11.2	SpectrumGreen	Dr Rocchi (Italia)	2
CEPY $\alpha$ -satellite III	heterocromatina Y	Yq21	SpectrumAqua	Vysis	1 i 2
PNA-pantelomeric	telòmers	-	FITC	Dra Genescà(UAB)	4
TelVysion Xq/Yq	locus Cdy16c07	subtelòmer Xq Yq	SpectrumOrange	Vysis	3
TelVysion Xp/Yp	locus DXYS129	subtelòmer Xp Yp	SpectrumGreen	Vysis	3

## **4.RESULTATS**



## **Article 1**

**Characterization of all human synaptonemal  
complexes by subtelomere multiplex-FISH**

**Cytogenetic and Genome Research 107, 18-21 (2004)**

Índex impacte 2004: 1.341

# Characterization of all human male synaptonemal complexes by subtelomere multiplex-FISH

M. Codina-Pascual,<sup>a</sup> J. Kraus,<sup>b</sup> M.R. Speicher,<sup>b</sup> M. Oliver-Bonet,<sup>a</sup> V. Murcia,<sup>a</sup> J. Sarquella,<sup>c</sup> J. Egozcue,<sup>a</sup> J. Navarro<sup>a</sup> and J. Benet<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unitat Biologia, Facultat Medicina, Dept. Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, UAB, Bellaterra (Spain);

<sup>b</sup>Institut für Humangenetik, Technische Universität, München and GSF-Gesellschaft für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg (Germany);

<sup>c</sup>Unitat de Reproducció Humana i Diagnòstic Genètic, Clínica Girona, Girona (Spain)

**Abstract.** During meiotic prophase I, homologous chromosomes synapse and recombine. Both events are of vital importance for the success of meiosis. When homologous chromosomes synapse, a proteinaceous structure called synaptonemal complex (SC) appears along the pairing axis and meiotic recombination takes place. The existence of immunolabeling techniques for SC proteins (SCP1, SCP2 and SCP3) and for DNA mismatch repair proteins present in late recombination nodules (MLH1) allow analyses of both synapsis and meiotic recombination in the gametocyte I. In situ hybridization methods can be applied afterwards because chromatin is preserved during cell fixation for immunoanalysis. The combination of both methodologies allows the analysis of synapsis and the

creation of recombination maps for each bivalent. In this work we apply the seven-fluorochrome subtelomere-specific multiplex FISH assay (stM-FISH) to human male meiotic cells previously labeled by immunofluorescence (SCP1, SCP3, MLH1, CENP) to assess its utility for human SC karyotyping. This FISH method consists of microdissected subtelomeric probes labeled combinatorially with seven different fluorochromes. Results prove its usefulness for the identification of all human SCs. Furthermore, by labeling subtelomeric regions this one-single-step method enables the characterization of interstitial and terminal SC fragments and SC delineation even if superposition is present in pachytene spreads.

Copyright © 2004 S. Karger AG, Basel

During meiotic prophase I, when homologous chromosomes pair, synapse and recombine, a proteinaceous structure called synaptonemal complex (SC) forms along the pairing axis. Synapsis and meiotic recombination are of vital importance for the success of meiosis. Synapsis failure or meiotic recombination rate decrease were reported to cause partial or total meiotic arrest (Hultén et al., 1970; Egozcue et al., 2000). Several studies

were carried out using silver nitrate or phosphotungstic acid to stain SC for its analysis by light and electron microscopy. These methods were applied indistinctly to gametocytes I of males (Hultén et al., 1974; Navarro et al., 1991) and of females (García et al., 1987). In the last few years the appearance of immunolabeling techniques has renewed the interest for SC. Detection of SC proteins (SCP1, SCP2 and SCP3) and of proteins present in late recombination nodules (MLH1) allow simultaneous analyses of synapsis and meiotic recombination. Due to chromatin preservation during cell fixation, it is possible to combine the immunoassay with FISH techniques allowing the identification of single bivalents (Barlow and Hultén, 1996). Then, synapsis and meiotic recombination patterns can be evaluated for each specific pair of chromosomes (Barlow and Hultén, 1996; Lynn et al., 2002; Tease et al., 2002).

Since 24-color karyotyping techniques were first described (Schröck et al., 1996; Speicher et al., 1996), a great number of different FISH-based multicolor technologies have been devel-

Supported by the Fondo Investigación Sanitaria (Madrid) (project: PI020258), the Generalitat de Catalunya (project: 2001 SGR 00201) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SP 460/4-1). MCP is recipient of a grant of the Generalitat de Catalunya (2001FI00468).

Received 29 April 2004; revision accepted 26 May 2004.

Request reprints from Montserrat Codina or Jordi Benet, Unitat Biologia Facultat Medicina, Dept. Biologia Cel·lular Fisiologia i Immunologia, UAB, Bellaterra (Spain)  
telephone: +34 93 581 1175; fax: +34 93 581 1025  
e-mail: Montserrat.Codina@uab.es, Jordi.Benet@uab.es

oped for their application in clinical and cancer cytogenetics (Langer et al., 2004; Liehr et al., 2004). Efforts have been mainly directed to improve the analysis of metaphase chromosomes by increasing both the sensitivity and the number of probes, which can be simultaneously hybridized. Applications of multi-color-FISH approaches to mouse and human SCs were reported. Different DNA probes (chromosome-, locus- or centromere-specific) were used to identify up to four SCs at the same time (Lynn et al., 2002; Tease et al., 2002). The first identification of all SCs was achieved in mouse. For this purpose two rounds of multicolor FISH of chromosome-specific libraries were used (Froenicke et al., 2002). Recently, a multiplex-FISH method using specific centromeric probes (cenM-FISH) was applied to male spermatocytes for the identification of human SCs (Oliver-Bonet et al., 2003) and used for the characterization of human male recombination maps (Sun et al., 2004). The seven-fluorochrome subtelomere-specific FISH assay is another FISH-based strategy developed to improve the detection of subtelomeric rearrangements (Fauth et al., 2001).

In this work, we apply the set of microdissected subtelomeric probes labeled combinatorially with seven different fluorochromes (stM-FISH) to human male meiotic cells previously labeled by immunofluorescence (SCP1, SCP3, MLH1 and centromere proteins) to assess its utility for human SC karyotyping. We demonstrate the feasibility exemplarily on one sample.

## Materials and methods

A testicular sample was obtained from a patient undergoing vasectomy under a local anesthetic. Written consent was obtained, and the study was approved by the Institutional Ethics Committee. The testicular tissue was macerated in a hypotonic solution (sodium citrate 1%) and placed in a centrifuge tube to let the seminiferous tubules deposit. The supernatant containing the testicular cells was recovered and centrifuged for 5 min at 600 g. Finally, the pellet was resuspended in 1% sodium citrate and diluted to about 3 times. Cell spreading and fixation were performed following a protocol described elsewhere (Barlow and Hultén, 1996) with minor modifications: 10 µl of cell suspension were mixed with 20 µl of 0.003 Photo-Flo solution (Kodak) on a clean microscope slide and allowed to stand for 10 min. Then, 90 µl of 2% formaldehyde-0.02% SDS pH 8.4 were added to the mix. After 10 min, the slides were rinsed in distilled water and allowed to dry at room temperature.

### Immunocytofluorescence analysis

Immunolabeling of spermatocytes was performed with slight modifications of the Barlow and Hultén (1998) protocol. Slides were blocked with 0.05 g milk powder in 1 ml 4× SSC-0.05% Tween-20 (4× SSCT) for 30 min. The primary antibodies used were rabbit anti-SCP3 (Lammers et al., 1994) and rabbit anti-SCP1 (Meuwissen et al., 1992) (both gifts from Dr. Christa Heyting; University of Wageningen, The Netherlands), anti-CENP (CREST serum given by Dr. William Earnshaw, University of Edinburgh, UK) and mouse anti-MLH1 (Pharmingen, San Diego, Calif., USA). They were applied at 1:1000, 1:1000, 1:1000 and 1:250, respectively, in blocking mix overnight at room temperature. After three 5-min washes in 4× SSCT, the secondary antibodies, TRITC-conjugated goat anti-rabbit IgG and FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (both from Sigma, Madrid, Spain) were applied at 1:250 for 4 h at room temperature. After 3× 5-min washes in 4× SSCT the rabbit anti-human IgG antibody (Sigma, Madrid, Spain) labeled in Pacific Blue with Zenon Reaction (Molecular Probes, Spain) was applied at 1:250 for 1 h at room temperature. Finally, after washes and a brief rinse in distilled water, slides were air-dried and counterstained with antifade solution (Vector Laboratories Inc., Burlingame, Calif., USA). Evaluation was performed with a fluorescence photomicroscope (Olympus BX60) equipped with a Sensys

CCD camera (Photometrics). All observed pachytene nuclei with anti-MLH1 antibody foci were captured and processed using a Power Macintosh G3 with Smartcapture software (Digital Scientific; Cambridge, UK). Slides were stored at -20°C until hybridization.

### stM-FISH

For the stM-FISH assay DNA probes were prepared as described (Fauth et al., 2001) with minor modifications. Microdissected subtelomeric probes, sized between 5 and 10 Mb, were amplified and labeled by DOP-PCR according to a combinatorial labeling scheme based on 7 different fluorochromes (Fig. 1, top). For direct labeling DEAC (Perkin Elmer), Cy3 and Cy5 (both from Amersham Pharmacia Biotech), TexasRed (Molecular Probes) dUTP-conjugates were used. DNP (Perkin Elmer), biotin and digoxigenin (both Roche Diagnostics) dUTP-conjugates were used for indirect labeling. After DNA precipitation the probe set was resuspended in the hybridization mix (50% formamide, 20% dextran sulfate and 2× SSC). For the hybridization, antifade solution was removed from SC spreads using 4× SSCT (3 × 5 min at 37°C). After dehydration in 70, 90, 100% ethanol, slides were air dried. Cells were denatured in 70% formamide/2× SSC for 2 min at 69°C, dehydrated by a cold ethanol series (70, 90, 100%) and air dried. Probe solution was denatured for 7 min at 75°C and pre-annealed for 20 min at 37°C. Hybridization was for 48 h at 37°C. After post-hybridization washes, anti-DNP-KLH-Alexa488 (1:400; Molecular Probes), avidin-Cy5.5 (1:200; Rockland Inc.) and anti-digoxigenin-Cy7 (1:50; Cy7 from Amersham Pharmacia Biotech) were used for detection of hapten-labeled probes. Finally, slides were counterstained with DAPI and mounted in p-phenylenediamine dihydrochloride antifade solution (Merck). Visualization was performed using a motorized epifluorescence microscope with an eight-position filter wheel (Leica DMRXA-RF8), a Sensys CCD camera (Photometrics; Kodak KAF 1400 chip) and the Leica QFISH software (Leica Microsystems Imaging Solutions, Cambridge, UK).

The identification of all SCs was performed by projection of the stM-FISH image results into the image of the immunolabeled pachytene cell previously captured.

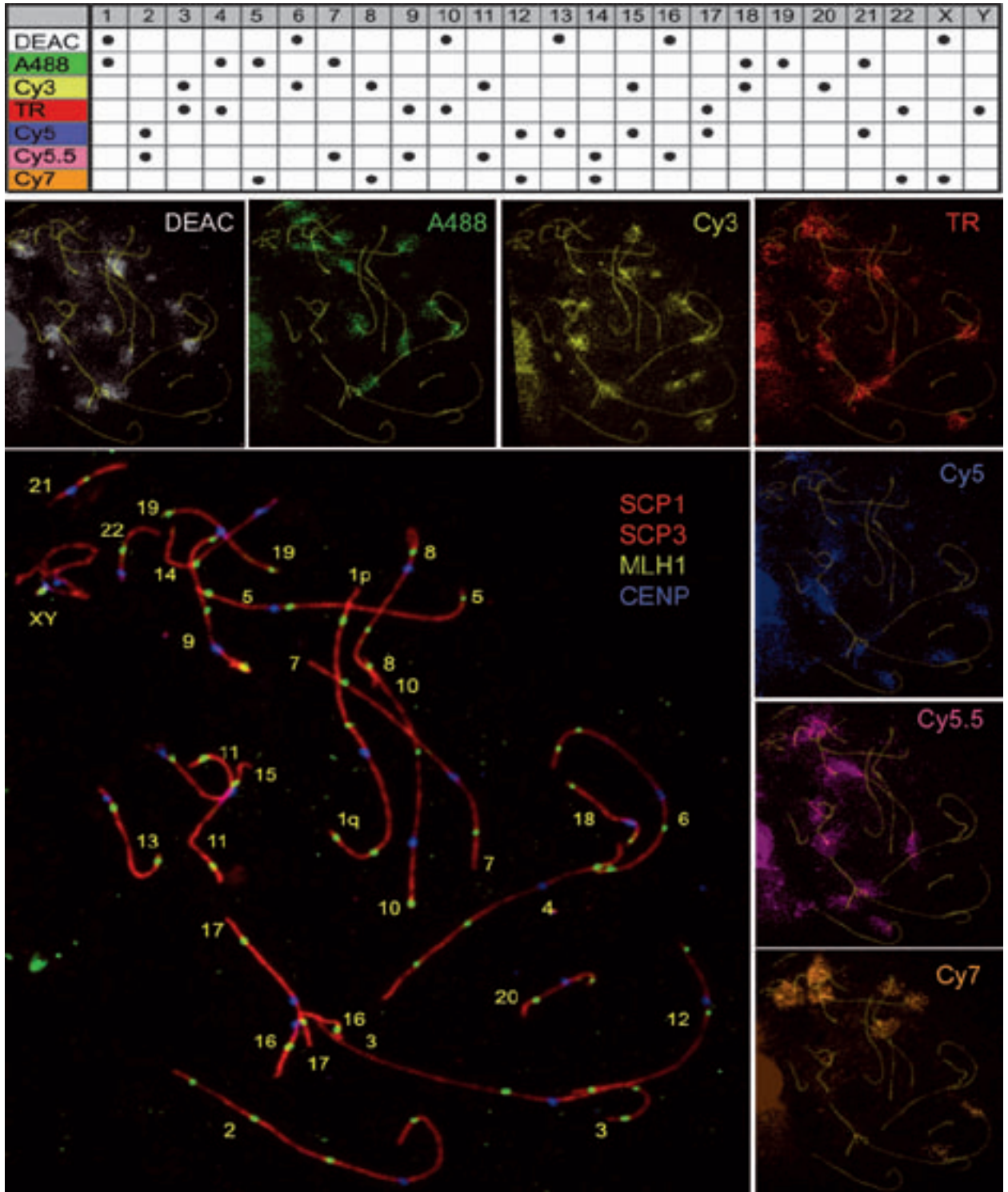
## Results

Pachytene cells of a normal, healthy donor, previously analyzed by immunocytogenetic techniques, were successfully hybridized with stM-FISH. In this approach subtelomere p and q probes of each chromosome are labeled with the same combinatorial fluorochrome pattern. For acrocentrics and chromosome 1 only the q arm is detected. This allowed the characterization of all human male SCs simultaneously with the immunolabeling of SCP1, SCP3, MLH1 and CENP (Fig. 1).

## Discussion

The SCP3 protein is part of the SC lateral elements (Schalk et al., 1998). Lateral elements are fully joined at pachytene stage by the central element, where SCP1 is present (Eijpe et al., 2000). On the other hand, the DNA mismatch repair protein MLH1 marks sites where crossing-over has taken place (Barlow and Hultén, 1998). Thus, the combined immunolabeling of SCP1, SCP3, MLH1 and CENP does not only provide information about synapsis of each pair of homologous chromosomes, but also shows the distribution of recombination events and the centromere position in the SC.

As compared to two-color FISH methods applied on SC spreads (Lynn et al., 2002; Tease et al., 2002), multi-color FISH assays allow the identification of the complete SC set of a cell in two (Froenicke et al., 2002) or one single hybridization round



**Fig. 1.** The table displays the combinatorial labeling scheme for the stM-FISH assay. Small images show stM-FISH results for each fluorochrome superimposed to the corresponding SCP1 and SCP3 cell image. Center image represents an immunolabeled pachytene cell with all synaptonemal complexes identified by stM-FISH (indicated with the corresponding number). SCs are in red (SCP1 and SCP3), MLH1 in green and centromere in blue.

(Oliver-Bonet et al., 2003). As a result, meiotic recombination frequencies and localization, and synapsis can be simultaneously analyzed for each and all SCs of the set. Therefore, abnormal processes in any of the 22 autosomal SCs can be characterized.

The use of a seven-fluorochrome stM-FISH assay has some distinct advantages. For example, pachytene cells sometimes present fragmented or overlapped SCs. In this case, subtelomere probes are even more helpful, because one can follow SCs from one end to the other. The use of seven different fluorochromes allows a two-fluorochrome combination for each chromosome (except chromosome 19, 20 and Y which are labeled with one fluorochrome). This increases both sensitivity and unequivocal classification as has been previously discussed in detail (Azofeifa et al., 2000; Fauth et al., 2001) and facilitates SC identification.

In addition to the quality of hybridization, the correct classification of FISH signals depends on the quality of immunolabeling and spreading. Furthermore, due to the morphology and condensation of chromatin after formaldehyde fixation the hybridization signals appear usually diffuse, which may further hamper the classification. However, the use of seven different fluorochromes results in a reduction of the number of signals

per channel, reducing the probability of overlapping signals, thus facilitating a correct signal classification.

In this work, we show for the first time that the complete characterization of all human male SCs by hybridization is feasible using the one-single-step stM-FISH assay (Fig. 1). By using stM-FISH even bivalents with interstitial and terminal fragments in their SC could be identified. At the same time, delineation of superposed SCs has been possible. Moreover, if applied to the meiotic analysis of carriers of balanced chromosome rearrangements, the stM-FISH would exactly determine the position inside the synaptic figure of the chromosomes involved in the reorganization.

In conclusion, results prove that stM-FISH is a reliable method for the identification of all human SC. Furthermore, this one-single-step method enables the characterization of interstitial and terminal SC fragments and SC delineation even if superposition is present in pachytene spreads.

### Acknowledgements

We thank Dr. C. Heyting and Dr. W. Earnshaw for SCP1, SCP3 antibodies and CREST serum respectively and Dr. C. Fauth for providing stM-FISH DNA pools.

### References

- Azofeifa J, Fauth C, Kraus J, Maierhofer C, Langer S, Bolzer A, Reichman J, Schuffenhauer S, Speicher MR: An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by use of 24-color FISH. *Am J Hum Genet* 66:1684–1688 (2000).
- Barlow AL, Hultén MA: Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I human spermatocytes. *Chromosome Res* 4:562–573 (1996).
- Barlow AL, Hultén MA: Crossing over analysis at pachytene in man. *Eur J Hum Genet* 6:350–358 (1998).
- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J: Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 6:93–105 (2000).
- Eijpe M, Heyting C, Gross B, Jessberger R: Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes. *J Cell Sci* 113:673–682 (2000).
- Fauth C, Zhang H, Harabacz S, Brown J, Saracoglu K, Lederer G, Rittinger O, Rost I, Eils R, Kearney L, Speicher MR: A new strategy for the detection of subtelomeric rearrangements. *Hum Genet* 109:576–583 (2001).
- Froenicke L, Anderson LK, Wienberg J, Ashley T: Male mouse recombination maps for each autosome identified by chromosome painting. *Am J Hum Genet* 71:1353–1368 (2002).
- García M, Dietrich AJJ, Freixa L, Vink ACG, Ponsà M, Egozcue J: Development of the first meiotic prophase stages in human fetal oocytes observed by light and electron microscopy. *Hum Genet* 77:223–232 (1987).
- Hultén MA, Eliasson R, Tillinger KG: Low chiasma count and other meiotic irregularities in two infertile 46,XY men with spermatogenic arrest. *Hereditas* 65:285–290 (1970).
- Hultén MA, Solari AJ, Skakkebaek NE: Abnormal synaptonemal complex in an oligo-chiasmatic man with spermatogenic arrest. *Hereditas* 78:105–116 (1974).
- Lammers JHM, Offenberg HH, van Aalderen M, Vink ACG, Dietrich AJJ, Heyting C: The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol* 14:1137–1146 (1994).
- Langer S, Kraus J, Jentsch I, Speicher MR: Multicolor chromosome painting in diagnostic and research applications. *Chromosome Res* 12:15–23 (2004).
- Liehr T, Starke H, Weise A, Lehrer H, Claussen U: Multicolor FISH probe sets and their applications. *Histol Histopathol* 19:229–237 (2004).
- Lynn A, Koehler KE, Judis L, Chan ER, Cherry JP, Schwartz S, Seftel A, Hunt PA, Hassold TJ: Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates. *Science* 296:2222–2225 (2002).
- Meuwissen RL, Offenberg HH, Dietrich AJ, Riesewijk A, van Iersel M, Heyting C: A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J* 11:5091–5100 (1992).
- Navarro J, Vidal F, Benet J, Templado C, Marina S, Egozcue J: XY-trivalent association and synaptic anomalies in a male carrier of a Robertsonian t(13;14) translocation. *Hum Reprod* 6:376–381 (1991).
- Oliver-Bonet M, Liehr T, Nietzel A, Heller A, Starke H, Claussen U, Codina-Pascual M, Pujol A, Abad C, Egozcue J, Navarro J, Benet J: Karyotyping of human synaptonemal complexes by cenM-FISH. *Eur J Hum Genet* 11:879–883 (2003).
- Schalk JAC, Dietrich AJJ, Vink ACG, Offenberg HH, van Aalderen M, Heyting C: Localization of SCP2 and SCP3 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Chromosoma* 107:540–548 (1998).
- Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am J, Soenksen D, Garini Y, Ried T: Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273:494–497 (1996).
- Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC: Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12:368–375 (1996).
- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Ko E, Rademaker AW, Navarro J, Benet J, Martin RH: Human male recombination maps for individual chromosomes. *Am J Hum Genet* 74:521–531 (2004).
- Tease C, Hartshorne GM, Hultén MA: Patterns of meiotic recombination in human fetal oocytes. *Am J Hum Genet* 70:1469–1479 (2002).

## **Article 2**

**Synapsis and meiotic recombination analyses: MLH1  
focus in the XY pair as an indicator**

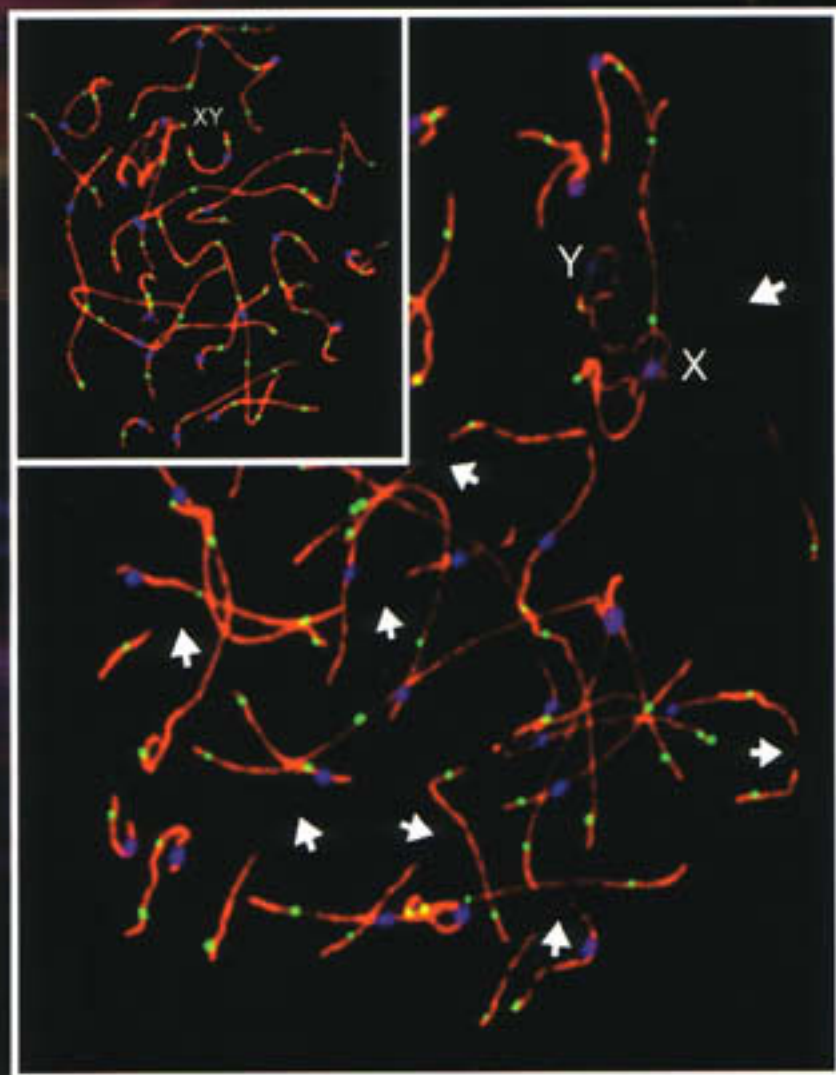
**Human Reproduction 20(8), 2133-2139 (2005)**

**Índex impacte 2004: 3.365**

# Human Reproduction

Volume 20, Number 8 August 2005

[www.humrep.oxfordjournals.org](http://www.humrep.oxfordjournals.org)



European Society of Human Reproduction and Embryology



OXFORD JOURNALS  
OXFORD UNIVERSITY PRESS

### **About the cover**

The front cover shows synapsis and meiotic recombination patterns in an infertile man and normal control (insert). Pachytene cells were immunolabelled for synaptonemal complexes (red) MLH1 - late recombination nodule protein (green) and centromeric proteins (blue) see Codina-Pascual et al., pp 2133-2139.



# Synapsis and meiotic recombination analyses: MLH1 focus in the XY pair as an indicator

Montserrat Codina-Pascual<sup>1,5</sup>, Maria Oliver-Bonet<sup>1</sup>, Joaquina Navarro<sup>1</sup>, Mercè Campillo<sup>2</sup>, Ferran García<sup>3</sup>, Susana Egozcue<sup>3</sup>, Carlos Abad<sup>4</sup>, Josep Egozcue<sup>1</sup> and Jordi Benet<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Unitat de Biologia i Genètica Mèdica, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, <sup>2</sup>Laboratori de Medicina Computacional, Unitat de Bioestadística, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, <sup>3</sup>Unitat Andrologia, Institut Marquès, 08024 Barcelona and <sup>4</sup>Servei d'Urologia, Consorci Hospitalari Parc Taulí, 08208 Sabadell, Spain

<sup>5</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: jordi.benet@uab.es or montserrat.codina@uab.es

**BACKGROUND:** Anomalies in meiotic prophase I have been related to partial or total meiotic arrest. These anomalies include an abnormal synaptic process, resulting in disorders in meiotic recombination. **METHODS:** In the present study, we analyse primary spermatocytes from 12 infertile men (four with non-obstructive azoospermia, six with oligoasthenoteratozoospermia, one with astenoteratozoospermia and one normozoospermic) and five control fertile donors using immunocytological techniques for synaptonemal complex, meiotic recombination and centromeric proteins. **RESULTS:** Mean numbers of MLH1 foci per cell, frequencies of cells presenting an MLH1 focus in the XY pair and percentages of cells affected by abnormal synaptic patterns (gaps and splits) are reported for each of the infertile patients and control men. A positive correlation between the frequency of cells showing a recombination focus in the XY pair and the number of autosomal recombination foci per cell is found. **CONCLUSIONS:** Reduced recombination in the XY pair and an increased number of cells affected by gaps may explain some idiopathic male infertility cases. The results suggest that recombination in the XY pair could be an indicator for general recombination frequency and for a successful meiotic process.

*Key words:* male infertility/meiotic recombination/pachytene/synaptonemal complexes/XY pair

## Introduction

Meiosis is the process by which the whole genome of a cell is reduced to half to produce genetically different haploid cells for sexual reproduction. During meiotic prophase I, homologous chromosomes pair, synapse and recombine. These three events are essential for a successful meiotic process; any alteration of the meiotic process results in a reduction of the quality and quantity of gametes and, in the most severe cases, it can cause a complete meiotic arrest. Several meiotic checkpoints have been proposed to control this process (Roeder and Bailis, 2000). When any of the meiotic sequential events does not occur properly, the checkpoint switches on and prevents the cell from proceeding.

The incidence of infertility in human males is ~10%. Synaptic anomalies in meiotic chromosomes have been described and associated with male infertility. Indeed, up to 8% of the general infertile population show meiotic defects, and 74% of them correspond to an abnormal synapsis (revised in Egozcue *et al.*, 2005). A correlation between a higher number of meiotic abnormalities and more severely affected semenograms has also been reported (Vendrell *et al.*, 1999).

When chromosomes synapse, a tri-axial proteinaceous core, the synaptonemal complex (SC), is built along the pairing

axis. At pachytene, homologous chromosomes are fully synapsed. Some structural meiosis-specific proteins of the SC, SCP1, SCP2 and SCP3, have been identified in the last few years (Meuwissen *et al.*, 1992; Lammers *et al.*, 1994; Schalk *et al.*, 1998). Mutations of the *Scp3* gene in mice (Yuan *et al.*, 2000) and in human males (Miyamoto *et al.*, 2003) demonstrated that defects in synapsis of homologous chromosomes at pachytene arrests the meiotic process and leads to infertility. In the past, studies of the SC were performed using unspecific protein staining (AgNO<sub>3</sub>). In a series of infertile men, abnormal synaptic processes were reported (Navarro *et al.*, 1986). Since the development of immunolabelling methods, the interest in SC analysis has been renewed. Recently, abnormal synaptic processes have been reported in two azoospermic men by immunocytogenetic analysis of their spermatocytes (Judis *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2004a).

Disorders in meiotic recombination have also been described as a possible cause of meiotic arrest (revised in Egozcue *et al.*, 2005). A DNA mismatch repair protein MLH1 (Baker *et al.*, 1996; Barlow and Hultén, 1998; Anderson *et al.*, 1999) and a cyclin-dependent kinase Cdk2 (Ashley *et al.*, 2001) co-localize in late recombination nodules. Both of them have been shown to be involved in reciprocal recombination. A reduction in the MLH1 foci

number per cell has also been reported in some azoospermic men (Gonsalves *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2004a).

The aim of this study was to analyse synapsis and meiotic recombination patterns in infertile and control men. Spermatoocyte spreads were immunolabelled by using antibodies against synaptonemal complex proteins (SCP3 and SCP1), a late recombination nodule protein (MLH1) and centromeric proteins (CENP).

## Materials and methods

Testicular biopsies from 12 infertile patients and from five control donors, of proven fertility, were obtained under local anaesthesia. Infertility patients were diagnosed after 2 years of pregnancy failure. Written consent was given by all patients, and the study was approved by the Institutional Ethics Committee.

Four infertile patients were azoospermic (AZO 1–4), six oligoasteneratozoospermic (OTA 1–6), one asteneratozoospermic (AST) and another normozoospermic (NOR). Semenograms were classified according to the WHO parameters (World Health Organization, 1999). In the control group, the testicular biopsies of patients C1, C2 and C3 were obtained while they were undergoing vasectomy. Testicular biopsies of patients C4 and C5 were obtained while they were undergoing a vasectomy reversal.

## Sample treatment

The testicular tissue was processed for meiotic chromosome analysis (Evans *et al.*, 1964) and for SC immunocytogenetic analysis (Codina-Pascual *et al.*, 2004). For the immunocytology of spermatoocytes, the primary antibodies used were rabbit anti-SCP3 (Lammers *et al.*, 1994) and rabbit anti-SCP1 (Meuwissen *et al.*, 1992) (both gifts from Dr Christa Heyting, University of Wageningen, The Netherlands), anti-CENP (CREST serum given by Dr William Earnshaw, University of Edinburgh, UK) and mouse anti-MLH1 (Pharmingen, San Diego, CA). The secondary antibodies applied were tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (both from Sigma; Madrid, Spain). The Pacific Blue-conjugated rabbit anti-human IgG (from Sigma; Madrid, Spain) labelled with Zenon Reaction (Molecular Probes, Spain) was applied in a third round. Finally, slides were counterstained with antifade (Vector lab Inc., Burlingame, CA). A fluorescent photomicroscope (Olympus B × 60) and Power Macintosh G3 with Smartcapture software (Digital Scientific, Cambridge, UK) were used for cell evaluation and image capture.

## Cell analysis

Pachytene cells immunolabelled for SCP3, SCP1, MLH1 and CENP were captured and analysed. We considered as pachytene only the cells in which the XY pair was identifiable. Only pachytene nuclei with clear MLH1 labelling were included in the study. Cells were analysed according to three main variables: pachytene stage, meiotic recombination and synapsis.

According to the XY pair stages (Solari, 1980), nuclei were classified as early pachytene (stages 1 and 2) or late pachytene (stages 3, 4 and 5) (Figure 1a).

For meiotic recombination analysis, the number of MLH1 foci per cell and the presence of an MLH1 focus in the XY pair were evaluated.

To analyse synapsis, the existence of discontinuities in the SCs (gaps) and of splits in bivalents (unpaired lateral elements) was analysed. Based on the number of gaps present in the cell, nuclei were

initially classified into four groups: NA, nuclei not affected by gaps; SA, nuclei slightly affected having from one to two SCs with gaps; MA, nuclei moderately affected with three or more SCs with gaps; and HA, nuclei highly affected with gaps in all the SCs. However, for data analysis the NA+SA and MA+HA groups were joined, respectively, into normal and gap-affected nuclei groups.

## Data analysis

The  $\chi^2$  test and Fisher test were applied when needed for qualitative data analysis. The Student test and Mann–Whitney test were applied to quantitative data comparisons between two groups. For other quantitative comparisons, analysis of variance (ANOVA) was used. Pearson's correlation coefficient was calculated for correlation analysis.

## Results

Classic meiotic chromosome analysis results are displayed in Table I.

For immunocytogenetic analysis, a total of 846 pachytene nuclei, 224 for the control group and 622 for the infertile men, were studied. Table I shows the number of cells analysed and the frequency of early pachytenes (complementary to that of late pachytenes) for the infertile cases, for each semenogram group and for controls. In the control group, 35.5% of pachytene cells were classified as early pachytene and the rest (64.5%) as late (Figure 1a). Similar results were found for the infertile group in which 34.4% were early and 65.6% were late pachytenes. Interindividual differences in the early and late pachytene percentages are detected in both control and infertile groups ( $P < 0.0005$ ). Early pachytene ranged from 18.8 to 52.8% for the control group and from 17.9 to 61.7% for the infertile group.

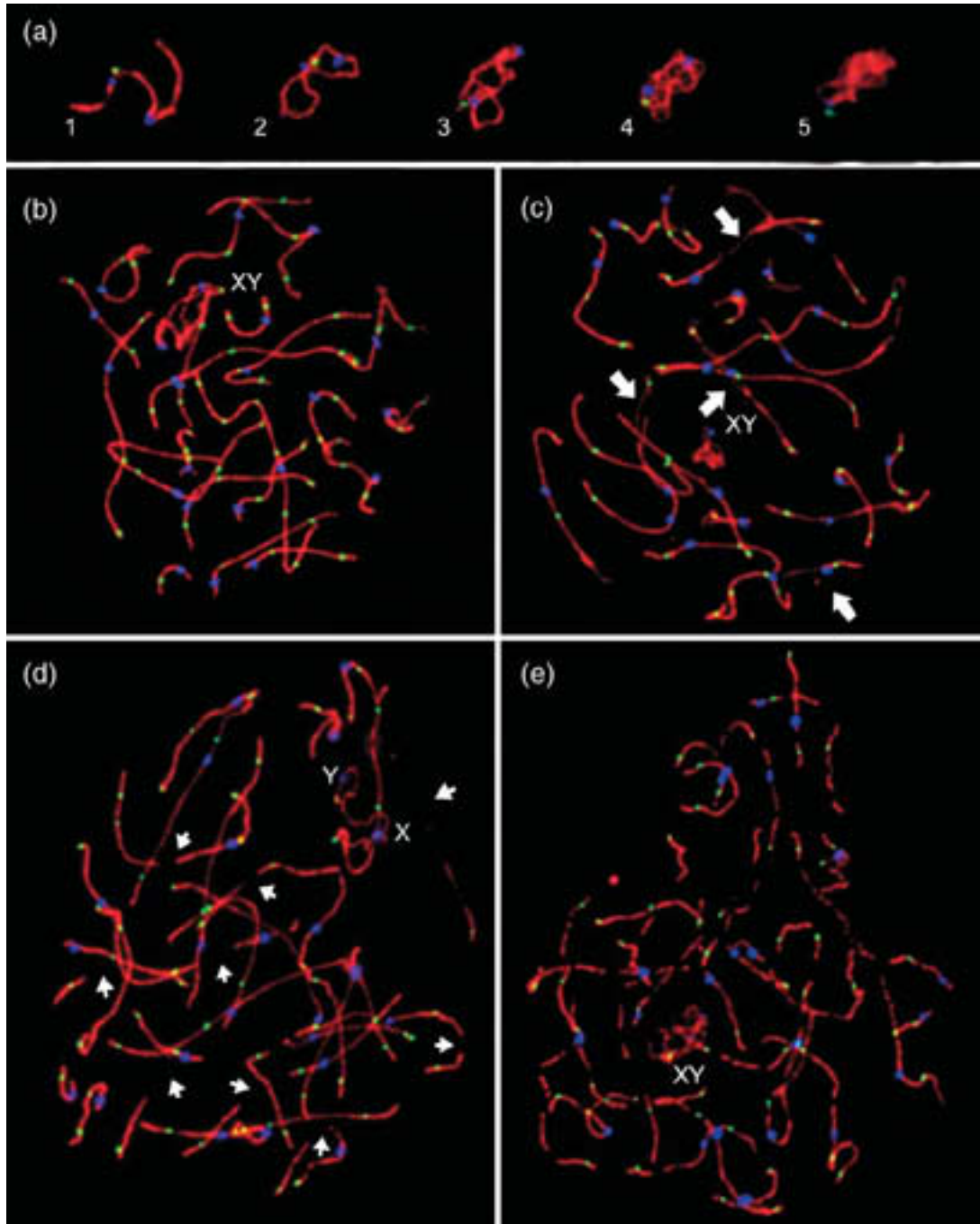
## MLH1 foci analysis

The number of MLH1 foci was scored per each cell. Table I also displays the mean number of MLH1 foci per pachytene and the frequency of cells presenting an MLH1 focus in the XY pair for the analysed cases. The mean number of MLH1 foci per cell observed in controls is  $48.8 \pm 2.3$  and ranges from 36 to 63 foci per cell. In the infertile group, a mean of  $47.3 \pm 3.3$  foci per cell is found, ranging from 34 to 66, which is not different from the control results. A significant interindividual variation in the average number of MLH1 foci per cell in all cases is detected ( $P < 0.0005$ ), ranging from  $42.9 \pm 2.1$  to  $52.3 \pm 4.2$  MLH1 foci (Figure 2). However, two infertile cases showing univalents in metaphase I chromosome spreads (OTA3 and OTA4) and the NOR patient present a significant reduction in the number of MLH1 foci per cell when compared with the mean ( $P < 0.0001$ ) and minimum ( $P < 0.003$ ) control values (Table I). Pachytene nuclei were also classified regarding the presence or absence of an MLH1 focus in the XY pair. In the infertile group, the mean average of pachytene cells having an MLH1 focus in the XY pair (59.2%, range 40–76.2%) is not significantly lower than that seen in the control group (69.9%, range 59.7–80.5%). In both control and infertile groups, the average frequencies of cells showing an MLH1 focus in the XY pair in early pachytene cells (72.7

and 61.7%, respectively) are not significantly different from the average frequencies observed in late pachytenes (67.9 and 58.2%, respectively). Two cases, OTA6 and AZO4, displayed a significantly lower number of cells presenting an MLH1 focus in the XY pair (40 and 45%, respectively) when compared with the control mean value (69.9%) ( $P < 0.006$ ). However, when individually comparing the above results

with the lower control value (59.7%), the difference is not significant (Table I).

The mean number of autosomal MLH1 foci per cell was compared between the nuclei with an MLH1 focus in the XY pair and the nuclei without an MLH1 focus. Interestingly, the number of autosomal MLH1 foci per cell displayed a relationship with the presence or absence of the MLH1 focus



**Figure 1.** Immunolabelled pachytene cells with synaptonemal complexes (SCs) in red, MLH1 in green and the centromere in blue. XY is identified in each cell. (a) XY pair morphologies observed during pachytene. XY pair stages 1 and 2 correspond to early pachytene (EP) and stages 3, 4 and 5 to late pachytene (LP). (b) Normal pachytene cell of a control donor. (c) Pachytene cell of an infertile patient showing multiple splits (large arrows). (d) Pachytene cell of an infertile patient showing multiple gaps (small arrows). (e) Pachytene cell of an infertile patient showing a generalized fragmentation of the SCs.

**Table I.** MLH1 immunocytogenetic results in spermatocytes of infertile and control men

	Age (years)	Meiotic chromosome analysis	Immunocytogenetic analysis				
			<i>n</i>	Early pachytene (% cells)	MLH1 foci/cell Mean      SD	MLH1 in XY (% cells)	
Infertile men ( $\Sigma n = 622$ cells)							
AZO1	31	Ma	47	61.7	49.5	4.2	57.4
AZO2	26	Ma	103	39.8	52.3	4.2	68
AZO3	41	NA	84	17.9	48.3	6.2	76.2
AZO4	30	Ma	40	30	49.3	5.2	45 <sup>Dd</sup>
Mean				37.4	49.9	1.7	61.7
OTA1	35	Ach	59	37.3	50.7	5.1	72.9
OTA2	33	Ma	45	35.6	49.9	5.3	64.4
OTA3	33	Ach	38	34.2	43.3 <sup>Aa</sup>	3.5	55.3
OTA4	39	Ach	39	33.3	42.9 <sup>Bb</sup>	2.1	53.8
OTA5	35	NPI, Ma	41	29.3	46.8	5	48.8
OTA6	36	Ma	25	32	44.2	4.1	40 <sup>Ec</sup>
Mean				33.6	46.3	3.4	55.9
AST	31	Ma	45	40	47.4	3.8	73.3
NOR	35	NM	56	21.4	43.1 <sup>Cc</sup>	4	55.4
Total mean				34.4	47.3	3.3	59.2
Control men ( $\Sigma n = 224$ cells)							
C1	34	NM	48	18.8	45.8 <sup>abc</sup>	4.1	64.6
C2	35	NM	41	34.1	51.2	4.6	80.5
C3	37	NM	72	52.8	47	4.4	59.7 <sup>dc</sup>
C4	43	NM	37	48.6	49.3	4.4	67.6
C5	38	NM	26	23.1	50.6	3.9	76.9
Mean				35.5	48.8 <sup>ABC</sup>	2.3	69.9 <sup>DE</sup>

Frequencies of early pachytene, means of MLH1 foci per cell and frequencies of XY pair with an MLH1 focus are indicated. Upper case superscripts indicate comparisons with mean control values. Lower case superscripts indicate comparisons with the minimum control value. <sup>abc</sup> $P < 0.003$ ; <sup>ABC</sup> $P < 0.0001$ ; <sup>deNS</sup>; <sup>DE</sup> $P < 0.006$ . Ma = partial or total meiotic arrest; Ach = achiasmatic bivalents; NPI = normal prophase I; NM = normal meiosis; NA = not available.

in the XY pair ( $P = 0.001$ ). The mean value of autosomal MLH1 foci per cell was significantly higher in nuclei with an MLH1 focus in the XY pair. This increase was found for both control ( $P = 0.022$ ) and infertile ( $P = 0.004$ ) groups. A significant correlation between the frequency of cells with an MLH1 focus in the XY pair and the mean number of autosomal MLH1 foci per nuclei was observed for the 17 cases ( $P = 0.013$ ,  $r^2 = 0.34$ ) (Figure 3).

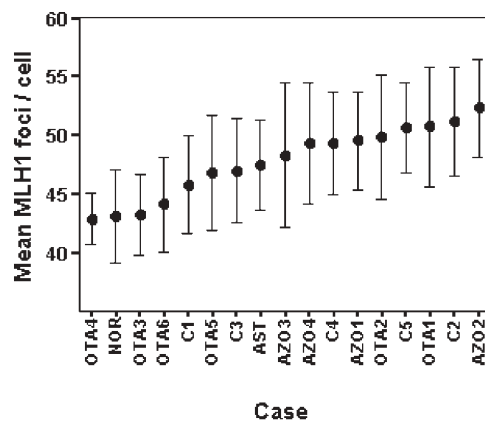
**Synopsis analysis**

Unsynapsed bivalent regions (splits) were seen in both control (11.7%) and infertile (11.2%) groups (Figure 1c). Table II shows the frequencies of pachytene nuclei showing a single split and multiple splits in SC regions in infertile patients and in control men. High interindividual variation in the presence of splits is detected in the control ( $P = 0.002$ ) and in the infertile groups ( $P < 0.0005$ ). Observed ranges are from 2.4 to 29.2% in control donors and from 0 to 26.2% in infertile patients. In general, the presence of a single small split is much more frequent in pachytene nuclei (80.4% of splits) than two or more splits. For almost all cases analysed, splits were seen more frequently in early nuclei than in late ones. No variation in the number of MLH1 foci per cell or in the frequency of MLH1 foci in the XY pair was detected in cells with splits.

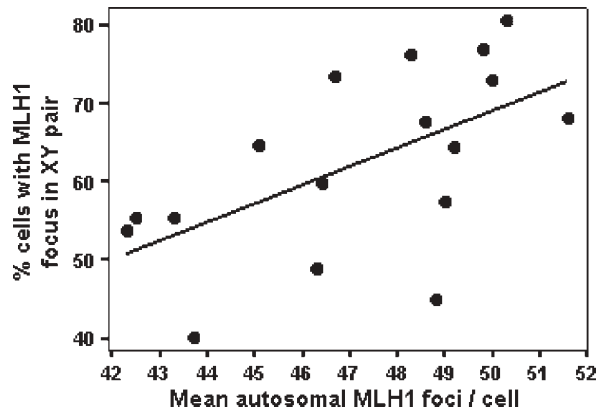
Some pachytene cells had discontinuities (gaps) in their SCs. Table III shows frequencies of pachytene nuclei

showing SCP3 and SCP1 gaps in infertile and control men. The results are indicated according to the degree to which the bivalent set is affected. A significantly higher frequency of nuclei affected by gaps is observed in infertile cases (31.3%) when compared with control donors (20.2%) ( $P = 0.046$ ) (Figure 1d and e). Patients AST and AZO1 have more gap-affected cells (60 and 55.3%, respectively) than control donors ( $P < 0.0001$ ).

About 3% of cells presented a general fragmentation of their SCs (Figure 1e). MLH1 foci have always been seen in



**Figure 2.** Mean ( $\pm$ SD) number of MLH1 foci per cell is drawn for the 17 individuals.



**Figure 3.** Relationship between the frequency of cells with an MLH1 focus in the XY pair and the mean number of MLH1 foci per cell in autosomal SCs ( $y = 2.37 \times - 49.5$ ;  $P = 0.013$ ,  $r^2 = 0.34$ ).

**Table II.** Frequencies of pachytene nuclei showing single (1S) and multiple splits ( $\geq 2S$ ) in infertile patients and in control men

	1S (% cells)	$\geq 2S$ (% cells)	Total S (% cells)
<b>Infertile men</b>			
AZO1	10.6	8.5	19.1
AZO2	20.4	5.8	26.2
AZO3	8.3	4.8	13.1
AZO4	10	2.5	12.5
Mean	12.3	5.4	17.7
OTA1	3.4	1.7	5.1
OTA2	13.3	0	13.3
OTA3	0	0	0
OTA4	0	0	0
OTA5	0	2.4	2.4
OTA6	0	0	0
Mean	2.8	0.7	3.5
AST	24.4	0	24.4
NOR	17.9	0	17.9
Total mean	9	2.1	11.2
<b>Control men</b>			
C1	22.9	6.3	29.2
C2	2.4	0	2.4
C3	9.7	0	9.7
C4	8.1	5.4	13.5
C5	3.8	0	3.8
Mean	9.4	2.3	11.7

regions where the SC is structured. The number of MLH1 foci in the cell and the presence of MLH1 in the XY pair do not vary significantly whatever the degree to which cells were affected by gaps.

**Discussion**

This work reports the results of synapsis and meiotic recombination analysis by the immunocytogetic labelling technique of pachytene spermatocytes of infertile and control men. In control donors, 35.5% of the pachytenes cells correspond to the early pachytene stage. In the infertile group, a close average frequency is found (34.4%). A previous study showed similar frequencies of early (37%) and late (63%) nuclei in 46 pachytene cells of a control donor (Barlow and Hultén, 1998).

**Table III.** Frequencies of pachytene nuclei having SCP3 and SCP1 gaps in infertile and control men

	Non-affected cells (NA) (% cells)	Normal cells (NA + SA)	Affected cells (MA + HA)
<b>Infertile men</b>			
AZO1	25.5	44.7	55.3 <sup>Bb</sup>
AZO2	48.5	87.4	12.6
AZO3	36.9	78.6	21.4
AZO4	47.5	67.5	32.5
Mean	39.6	69.5	30.5
OTA1	52.5	81.4	18.6
OTA2	51.1	62.2	37.7
OTA3	26.3	65.8	34.2
OTA4	35.9	74.4	25.6
OTA5	39	70.7	29.3
OTA6	48	64	36
Mean	42.1	69.8	30.2
AST	13.3	40	60 <sup>Cc</sup>
NOR	69.6	87.5	12.5
Total mean	41.2	68.7	31.3 <sup>A</sup>
<b>Control men</b>			
C1	47.9	66.7	33.3
C2	29.3	65.9	34.1 <sup>bc</sup>
C3	52.8	94.4	5.6
C4	45.9	83.8	16.2
C5	73.1	88.5	11.5
Mean	49.8	79.8	20.2 <sup>ABC</sup>

Results are indicated according to the degree to which the bivalent set is affected.

Upper case superscripts indicate comparisons with mean control values. Lower case superscripts indicate comparisons with the minimum control value. <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; <sup>bc</sup> $P < 0.05$ ; <sup>BC</sup> $P < 0.0001$ .

NA = nuclei not affected by gaps; SA = nuclei slightly affected having from one to two SCs with gaps; MA = nuclei moderately affected with three or more SCs with gaps; HA = nuclei highly affected with gaps in all the SCs.

**Recombination levels in spermatocytes**

In this study, no significant difference in the number of MLH1 foci at early or at late pachytene has been detected, corroborating previous observations in which no relationship between MLH1 foci count and early-late pachytene stage was found (Barlow and Hultén, 1998; Lynn *et al.*, 2002). These results indicate that, once the cell has acquired the full MLH1 complement by early pachytene, the mean number of MLH1 foci per cell remains the same throughout the pachytene stages.

Significant interindividual variation in the mean number of MLH1 foci per cell was encountered, which ranged from  $42.9 \pm 2.1$  to  $52.3 \pm 4.2$  MLH1 foci. All reported studies of MLH1 foci count in men with normal spermatogenesis showed interindividual variations in the range described here (Barlow and Hultén, 1998; Lynn *et al.*, 2002; Gonsalves *et al.*, 2004; Hassold *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2004b,c). The presence of an interindividual variation in the MLH1 foci frequency suggests the idea that the number of MLH1 foci would be more related to an individual behaviour than to a specific fertility group.

A significant reduction in MLH1 foci number has been found in three patients when compared with our controls. However, this reduction would not be significant if compared with control donors of other reported studies (Gonsalves *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2004c). This discordance between

the results could be due to the interindividual variation in the number of MLH1 foci per cell. In cases presenting a strong reduction in the MLH1 foci counts, as reported in some azoospermic males (Gonsalves *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2004a), no discordances in the results could be found when compared with any control series.

In this study, we have obtained ranges of MLH1 foci per cell from 36 to 63 for the control group, and from 34 to 66 for the infertile group. Similar ranges are also observed in previous studies (Barlow and Hultén, 1998; Lynn *et al.*, 2002; Gonsalves *et al.*, 2004; Hassold *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2004b,c). It has been proposed recently that the minimum number of expected MLH1 foci is 39, one for each of the 39 autosomal arms (excluding the short arms of acrocentric chromosomes) (Lynn *et al.*, 2002). Recently, the MLH1 foci pattern of each single bivalent has been analysed (Sun *et al.*, 2004b). Taking into account ranges of MLH1 foci per bivalent, the theoretically expected range of recombination events in a single nucleus would be from 33 to 74. In this study, minimum values of meiotic recombination ranges in a cell are similar to the theoretical ones, but maximum values differ by ~10 units. This indicates the existence of a positive interference in the number of MLH1 foci in the cell. This interference would ensure a minimum of crossing-overs, but would reduce the maximum potential of recombination events in human males. Sexual differences in this interference may exist. This interference would be stronger in human males, as spermatocytes show fewer recombination events than oocytes (Tease *et al.*, 2002). Differences between individuals and between sexes in epigenetic factors controlling this interference might explain interindividual and intersex variation in interference intensity.

Frequencies of cells with an MLH1 focus in the XY pair observed in the present study are similar to the 56.5 and 73% previously reported (Barlow and Hultén, 1998; Sun *et al.*, 2004b). Nevertheless, patients AZO4 and OTA6 have a frequency of cells with an MLH1 focus in the XY pair lower than 45%, indicating a low recombination frequency between sex chromosomes. A reduction in the recombination in the PAR1 region of the XY pair can lead to an abnormal disjunction of the sex chromosomes. Consequently, it may increase the sex chromosome aneuploidy (Shi *et al.*, 2001) or even cause a meiotic arrest (Hale, 1994). In patients AZO4 and OTA6, partial meiotic arrest and meiotic arrest, respectively, were detected by meiotic chromosomes analysis, which is in agreement with the XY recombination results.

The present study describes for the first time a correlation between the percentage of XY pairs showing an MLH1 focus and the mean number of autosomal MLH1 foci per cell. The presence of an MLH1 focus at the XY pair was strongly correlated with a higher autosomal recombination frequency. Similarly, levels of XY and autosomal pairing were described to correlate positively (Mittwoch and Mahadevaiah, 1992). Also, the rate of XY bivalents has been reported as an indicator for successful spermatogenesis in azoospermic men (Yogev *et al.*, 2002).

The results obtained in our study suggest that the frequency of an MLH1 focus in the XY pair could be a marker

for general recombination frequency and for the meiotic process to proceed.

#### *Synaptic behaviour: split and gap incidence*

Pachytene cells of infertile men presented splits in a mean of 11.2% cells, not different from those observed in control patients. However, considerable differences among cases have been seen in both infertile and control groups. The fact that 80.4% of the splits seen are small and unique in the pachytene nuclei suggests that these splits correspond to the heterochromatic regions of bivalents 1 and 9. These splits have been observed more frequently in early than in late pachytene nuclei, indicating that they may result from a delay of the heterochromatin to synapse. Polymorphisms in these heterochromatic regions may explain the high interindividual variation observed in the frequency of splits. Discontinuities (gaps) in the SCs of a cell are seen in ~50% of pachytene nuclei in control patients. According to a study of a fertile man in which SCs of chromosomes 1 and 9 frequently (>50%) showed gaps in their heterochromatic regions (Barlow and Hultén, 1996), pachytene nuclei presenting a gap in one or two SCs have been considered as normal nuclei.

The observed pachytene cells showing a general fragmentation of their SCs (Figure 1e) could correspond to nuclei of degenerative cells in apoptosis.

The AST and AZO1 infertile cases show a significant increase of nuclei (>55%) affected by gaps. If more nuclei are affected, more cells may fail to go through meiotic checkpoints, leading to a reduction in cell counts or to cells with an abnormal morphology and motility.

AZO1 has the highest frequency of early pachytene nuclei (61.7%), some of them with general SC fragmentation, and also shows <45% of normal pachytene cells. These results suggest an early pachytene partial arrest caused by synaptic defects, in agreement with the few post-pachytene meiotic stages observed in meiotic chromosome analysis.

In summary, we report the results of an immunocyto-genetic analysis of synapsis and meiotic recombination in a series of infertile and control men. We have demonstrated that reduced recombination in the XY pair and increased number of cells affected by gaps may explain male infertility in certain cases. Therefore, this cytological analysis is a useful tool to better understand some idiopathic male infertility. However, the great interindividual variability in meiotic recombination and in the synaptic process, seen in this and in other studies, makes comparisons between groups and individuals still complicated. To better understand the effects of meiotic recombination and synaptic abnormalities on fertility and to mark out limits between pathological and normal incidence values, further analysis in infertile patients will be required. Also, the application of centromere or subtelomere multiplex-fluorescence *in situ* hybridization (FISH) methodologies for the identification of all SCs (Oliver-Bonet *et al.*, 2003; Codina-Pascual *et al.*, 2004) should provide information about the bivalents most affected by synaptic and recombination disorders. Finally, the relationship between frequency of MLH1 foci in the XY pair and the average number of MLH1 foci per cell found in the present study

suggests that the meiotic recombination frequency in the XY pair could be an indicator for general recombination frequency and for a successful meiotic process.

### Acknowledgements

We thank Dr C. Heyting and Professor W. Earnshaw for SCP1, SCP3 antibodies and CREST serum, respectively. M.C.P. is the recipient of a grant of the Generalitat de Catalunya (2001FI00468). This study was supported by Fondo Investigacion Sanitaria (Madrid) (project PI020258) and the Generalitat de Catalunya (project 2001 SGR 00201).

### References

- Anderson LK, Reeves A, Webb LM and Ashley T (1999) Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics* 151,1569–1579.
- Ashley T, Walpita D and de Rooij DG (2001) Localization of two mammalian cyclin dependent kinases during mammalian meiosis. *J Cell Sci* 114,685–693.
- Baker SM, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC, Yao X, Christie D-M, Monell C, Arnheim N, Bradley A, Ashley T and Liksay RM (1996) Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nature Genet* 13,336–342.
- Barlow AL and Hultén MA (1996) Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I human spermatocytes. *Chromosome Res* 4,562–573.
- Barlow AL and Hultén MA (1998) Crossing over analysis at pachytene in man. *Eur J Hum Genet* 6,350–358.
- Codina-Pascual M, Kraus J, Speicher M, Oliver-Bonet M, Murcia V, Sarquella J, Egozcue J, Navarro J and Benet J (2004) Characterization of all human male synaptonemal complexes by subtelomere multiplex-FISH. *Cytogenet Genome Res* 107,18–21.
- Egozcue J, Sarrate Z, Codina-Pascual M, Egozcue S, Oliver-Bonet M, Blanco J, Navarro J, Benet J and Vidal F (2005) Meiotic abnormalities in infertile males. *Cytogenet Genome Res*, (in press).
- Evans EP, Breckon G and Ford CE (1964) An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics* 3,289–294.
- Gonsalves J, Sun F, Schlegel PN, Turek PJ, Hopps CV, Greene C, Martin RH and Reijo Pera RA (2004) Defective recombination in infertile men. *Hum Mol Genet* 13,2875–2883.
- Hale DW (1994) Is X–Y recombination necessary for spermatocyte survival during mammalian spermatogenesis? *Cytogenet Cell Genet* 65,278–282.
- Hassold TJ, Judis L, Chan ER, Schwartz S, Seftel A and Lynn A (2004) Cytological studies of meiotic recombination in human males. *Cytogenet Cell Genet* 107,249–255.
- Judis L, Chan ER, Schwartz S, Seftel A and Hassold TJ (2004) Meiosis I arrest and azoospermia in an infertile male explained by failure of formation of a component of the synaptonemal complex. *Fertil Steril* 81,205–209.
- Lammers JHM, Offenbergh HH, van Aalderen M, Vink ACG, Dietrich AJJ and Heyting C (1994) The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol* 14,1137–1146.
- Lynn A, Koehler KE, Judis L, Chan ER, Cherry JP, Schwartz S, Seftel A, Hunt PA and Hassold TJ (2002) Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates. *Science* 296,2222–2225.
- Meuwissen RL, Offenbergh HH, Dietrich AJ, Riesewijk A, van Iersel M and Heyting C (1992) A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J* 11,5091–5100.
- Mittwoch U and Mahadevaiah SK (1992) Unpaired chromosomes at meiosis: cause or effect of gametogenic insufficiency? *Cytogenet Cell Genet* 59, 274–279.
- Miyamoto T, Hasuike S, Yogev L, Maduro MR, Ishikawa M, Westphal H and Lamb DJ (2003) Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *Lancet* 362,1714–1719.
- Navarro J, Vidal F, Templado C, Benet J, Marina S, Pomerol JM and Egozcue J (1986) Meiotic chromosome studies and synaptonemal complex analysis by light and electron microscopy in 47 infertile or sterile males. *Hum Reprod* 1,523–527.
- Oliver-Bonet M, Liehr T, Nietzel A, Heller A, Starke H, Claussen U, Codina-Pascual M, Pujol A, Abad C, Egozcue J, Navarro J and Benet J (2003) Karyotyping of human synaptonemal complexes by cenM-FISH. *Eur J Hum Genet* 11,879–883.
- Roeder GS and Bailis JM (2000) The pachytene checkpoint. *Trends Genet* 16,395–403.
- Schalk JAC, Dietrich AJJ, Vink ACG, Offenbergh HH, van Aalderen M and Heyting C (1998) Localization of SCP2 and SCP3 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Chromosoma* 107,540–548.
- Shi Q, Spriggs E, Field L, Ko E, Barclay L and Martin RH (2001) Single sperm typing demonstrates that reduced recombination is associated with the production of aneuploid 24,XY human sperm. *Am J Med Genet* 99,34–38.
- Solari AJ (1980) Synaptonemal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. *Chromosoma* 81,315–337.
- Sun F, Kozak G, Scott S, Trpkov K, Ko E, Mikhaail-Philips M, Bestor TH, Moens PB and Martin RH (2004a) Meiotic defects in a man with non-obstructive azoospermia: case report. *Hum Reprod* 19,1770–1773.
- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Ko E, Rademaker AW, Navarro J, Benet J and Martin RH (2004b) Human male recombination maps for individual chromosomes. *Am J Hum Genet* 74,521–531.
- Sun F, Trpkov K, Rademaker AW, Ko E and Martin RH (2004c) Variation in meiotic recombination frequencies among human males. *Hum Genet* 116,172–178.
- Tease C, Hartshorne GM and Hultén MA (2002) Patterns of meiotic recombination in human fetal oocytes. *Am J Hum Genet* 70,1469–1479.
- Vendrell JM, García F, Veiga A, Calderon G, Egozcue S, Egozcue J and Barri PN (1999) Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia. *Hum Reprod* 14,375–378.
- World Health Organization (1999) WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm–Cervical Mucus Interaction, 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- Yogev L, Gamzu R, Paz G, Kleiman S, Botchan A, Hauser R and Yavetz H (2002) Rate of homologous chromosome bivalents in spermatocytes may predict completion of spermatogenesis in azoospermic men. *Hum Genet* 110,30–35.
- Yuan L, Liu J-G, Zhao J, Brundell E, Daneholt B and Höög C (2000) The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell* 5,73–83.

Submitted on September 16, 2004; resubmitted on February 14, 2005; accepted on March 14, 2005

## **Article 3**

**Behaviour of the human heterochromatic regions  
during the synapsis of homologous chromosomes**

**Human Reproduction (en prensa)**

**Índex impacte 2004: 3.365**



**TITLE:** Behaviour of human heterochromatic regions during the synapsis of homologous chromosomes.

**AUTHORS:** Codina-Pascual M<sup>1</sup>, Navarro J<sup>1</sup>, Oliver-Bonet M<sup>1</sup>, Kraus J<sup>2</sup>, Speicher MR<sup>2</sup>, Arango O<sup>3</sup>, Egozcue J<sup>1</sup>, Benet J<sup>1</sup>

**RUNNING TITLE:** Heterochromatin regions during synapsis

**ADDRESSES:**

<sup>1</sup>Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

<sup>2</sup>Institut für Humangenetik, Technische Universität, München and GSF - Gesellschaft für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg, Germany

<sup>3</sup>Departament d'Urologia, Hospital del Mar, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

**To whom correspondence should be addressed:** J Benet and M Codina-Pascual, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193, Spain; Tel: +34 935811773; Fax: +34 935811025; Email: [jordi.benet@uab.es](mailto:jordi.benet@uab.es), [montserrat.codina@uab.es](mailto:montserrat.codina@uab.es).

**ABSTRACT**

**BACKGROUND:** Alterations of synapsis can disturb or arrest meiosis and result in infertility. Synaptic abnormalities are frequently observed in infertile patients, but also in fertile men. **METHODS:** The subtelomere multiplex-FISH has been applied in combination with immunofluorescence to identify all synaptonemal complexes (SCs) and to analyse those presenting synaptic anomalies in fertile and infertile men. **RESULTS:** SCs with non-centromeric heterochromatic regions presented a higher frequency of gaps (SC discontinuities) and splits (unsynapsed SC regions) at pachytene, the incidences for 9qh, 1qh, 15p and 21p being the highest ones. Interindividual variability in the incidence of synaptic anomalies in these regions has been observed. In addition, synaptic anomalies in other SC regions are more frequent in infertile cases than in controls. Clear association of the SC15 and SC21 to the XY pair has been seen. **CONCLUSIONS:** Non-centromeric heterochromatic regions are the last to synapse. The interindividual variation observed in the incidence of gaps and splits in these regions may be explained by the heteromorphism of these regions in the general population. The presence of synaptic anomalies in other SC regions may indicate nuclei with a severely affected synapsis. Non-centromeric heterochromatic regions might play a role in the association of autosomal SC15 and SC21 with the XY pair.

**KEY WORDS:** heterochromatin, meiosis, pachytene, synapsis, synaptonemal complex, subtelomere-specific multiplex-FISH.

## INTRODUCTION

Meiosis is a specialised cell division whose aim is to form haploid, genetically different cells for sexual reproduction. During meiotic prophase I, homologous chromosomes pair, synapse and recombine. These three processes are essential for the viability of the cell. Pairing of homologous chromosomes is the process by which homologs recognise each other and localise in close proximity. Synapsis is the intimate association between the two homologs and, when it occurs, a tri-axial proteinaceous structure called synaptonemal complex (SC) is built along the pairing axis. Several structural proteins have been described that contribute to the formation of the SC. The detection of these proteins with specific antibodies allows for the analysis of synapsis (Barlow and Hultén, 1996).

Alterations of the synapsis process such as SC gaps (discontinuities), splits (unsynapsed SC regions) and complete asynapsis can disturb or arrest meiosis and result in reduced fertility (Judis *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2004a; Codina-Pascual *et al.*, 2005; Guichaoua *et al.*, 2005). Although synaptic abnormalities are frequent in infertile patients, some of these alterations have also been observed in fertile men (Codina-Pascual *et al.*, 2005; Guichaoua *et al.*, 2005), some of them affecting the heterochromatic regions of chromosomes 1 and 9 (Barlow and Hultén, 1996; Sun *et al.*, 2005a). Heterochromatin has been proposed as playing an important role in meiotic pairing in *Drosophila melanogaster* females, where achiasmatic disjunction takes place (Renauld and Gasser, 1997), and in the meiotic association of acrocentric chromosomes with the XY pair at the pachytene stage (Metzler-Guillemain *et al.*, 1999).

Recent advances in the application of multiplex-FISH assays in combination with immunofluorescent methodologies have allowed for the identification of every SC in a cell (Oliver-Bonet *et al.*, 2003; Codina-Pascual *et al.*, 2004). In the present study this strategy has been used to identify SCs with higher frequencies of synaptic anomalies in fertile and in infertile men. Regarding the important role described for the heterochromatin during meiosis, the behaviour of SCs with heterochromatic blocks during synapsis and its localisation, with respect to the XY pair, have also been evaluated.

## MATERIAL AND METHODS

Individuals included in the study were two men (C6, C7) of proven fertility and three infertile men, one oligoasthenoteratozoospermic (OTA7) and two azoospermics (AZO2, AZO3). The AZO2 and AZO3 cases were included in a previous study in which synapsis and meiotic recombination were analysed without SC identification (Codina-Pascual *et al.*, 2005). AZO2 presents a heterochromatic polymorphism in chromosome 1 (46,XY,1qh+).

Testicular biopsies were obtained under local anaesthesia. For the controls, biopsies were obtained while undergoing vasectomy (C6) or vasectomy reversal (C7). Written consent was given by patients, and the study was approved by our Institutional Ethics Committee.

### Sample treatment

Testicular tissue was processed for the immunocytogetic analysis of synaptonemal complexes using a previously described protocol, with some modifications (Codina-Pascual *et al.*, 2004). A piece of the biopsy was shredded in 20  $\mu$ l of 0.1M sucrose. Free pachytene cells were spread on a slide covered with 1% paraformaldehyde/Triton-X solution, pH=9.2, and fixed overnight at room temperature in a humid chamber. Afterwards, slides were left to dry, washed in 0.04% Photo-Flo (Kodak) for 4 to 10 min, rinsed in distilled water and air-dried. Slides were blocked with 0.05% milk powder solution in 4 $\times$ SSC-0.05% Tween-20 (4 $\times$ SSCT) for 30 min. Four primary antibodies were used: rabbit anti-SCP3 (Lammers *et al.*, 1994) and rabbit anti-SCP1 (Meuwissen *et al.*, 1992) (both gifts from Dr Christa Heyting), anti-CENP (CREST serum kindly provided by Dr William Earnshaw) and mouse anti-MLH1 (Pharmingen; San Diego, CA, USA). They were applied at 1:1000, 1:1000, 1:1000 and 1:250, respectively, overnight at 37°C. Slides were washed in (1x) PBS for 48h at 4°C. Afterwards, the secondary antibodies, TRITC-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody and FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (both from Sigma; Madrid, Spain), were diluted at 1:250 in blocking solution and applied for 3h at 37°C. In a third round, the Pacific Blue-conjugated rabbit anti-human IgG (from Sigma; Madrid, Spain) labelled with Zenon Reaction (Molecular Probes; Spain) was applied at 1:250 for 1h. Finally, slides were washed, briefly rinsed in distilled water, air-dried and counterstained with antifade (Vector lab Inc.; Burlingame, CA, USA). An epifluorescence microscope (Olympus Bx60) and Power Macintosh G3 with Smartcapture software (Digital Scientific; Cambridge, UK) were used for cell evaluation and image capturing.

### St-MFISH

DNA probes for the stM-FISH assay (Fauth *et al.*, 2001) were prepared and applied as previously described (Codina-Pascual *et al.*, 2004). Microdissected subtelomeric probes, with sizes of between 5 and 10 Mb, were amplified and labelled by DOP-PCR according to a combinatorial labelling scheme based on 7 different fluorochromes (Fauth *et al.*, 2001). For direct labelling, DEAC (Perkin Elmer), Cy3 and Cy5 (both from Amersham Pharmacia Biotech) and TexasRed (Molecular Probes) dUTP-conjugates were used. DNP (Perkin Elmer), biotin and digoxigenin (both Roche Diagnostics) dUTP-conjugates were used for indirect labelling. After 48-h hybridisation and post-hybridisation washes, anti-DNP-KLH-Alexa488 (1:400; Molecular Probes), avidin-Cy5.5 (1:200; Rockland Inc.) and anti-digoxigenin-Cy7 (1:50; Cy7 from Amersham Pharmacia Biotech) were used for detection of hapten-labelled probes. Finally, slides were counterstained with DAPI and mounted in p-phenylenediamine dihydrochloride antifade solution (Merck). Visualisation was performed using a motorised epifluorescence microscope with an eight-position filter wheel (Leica DMRXA-RF8), a Sensys CCD camera (Photometrics; Kodak KAF 1400 chip) and the Leica QFISH software (Leica Microsystems Imaging Solutions; Cambridge, UK).

The identification of all SCs was performed by projection of the stM-FISH results into the image of the immunolabelled pachytene cell.

## Statistics

Statistical analysis was performed using the SPSS 13.0 programme (SPSS Inc.; Chicago, IL). The  $\chi^2$  test and Fisher exact test, when necessary, were applied to percentage comparisons.

## RESULTS

In the present study, a total of 310 pachytene nuclei of two control cases (C6 and C7) and of three infertile men (OTA7, AZO2 and the AZO3) were immunolabelled and hybridised with the stM-FISH (Codina-Pascual *et al.*, 2004) for the identification and analysis of all of their SCs (Table I, Figs. 1A and 1B). Identification of all SCs was achieved in 298 spermatocytes. The other 12 spermatocytes, in which at least two SCs could not be identified, were excluded from the analysis of synapsis but included in the analysis of autosomal SC localisation in relation to the XY pair. Pachytene nuclei were classified into early and late pachytene cells according to the XY pair morphology (Solari, 1980; Codina-Pascual *et al.*, 2005) (Table I).

### Synapsis analysis

The presence of SC gaps and splits has been analysed for all autosomal SCs in 298 pachytene nuclei. Table I summarises the early and late pachytenes, from the five cases, in which SCs with gaps, splits or both anomalies were observed. In addition, the table specifies which SCs and SC regions are affected in each nucleus. Table II shows the number and percentage of nuclei with SCs affected only by gaps, only by splits or by both anomalies for the five cases analysed, and the data is classified according to the number of SCs affected in each cell.

A total of 140 (47%) spermatocytes presented SCs with synaptic anomalies; 59 (19.8%) with gaps, 60 with splits (20.1%) and 21 (7.1%) with both anomalies. The cases with the highest incidence of spermatocytes with SCs with gaps were AZO3 and OTA7 (46.9% and 32.1%, respectively), followed by AZO2, C7 and C6 (24%, 18.5% and 8.6%, respectively) (Table II). Regarding spermatocytes with SCs affected by splits, C7 presented the highest incidence (38.9%) followed by AZO2, OTA7, AZO3 and C6 (20%, 14.3%, 9.4% and 5.7%, respectively). The coexistence of gaps and splits in different SCs of the same spermatocyte was only observed in AZO2, in C7 and in AZO3 (24%, 12% and 6.2%, respectively).

Gaps and splits generally affected one single SC in the cell; however, some spermatocytes presented two or more SCs with gaps and/or splits. C6 and OTA7 had 14.3% and 46.4% of nuclei with SCs affected by gaps, splits or both anomalies, respectively, none of which had more than two SCs affected. C7, AZO2 and AZO3 had 69.4%, 68% and 62.5% of their pachytene nuclei with SCs affected by one or both anomalies, respectively. In these three cases, 7.3%, 12% and 28.1% of the nuclei had more than two SCs affected, respectively. SCs affected by gaps, by splits or by both anomalies were more frequently observed in early pachytene than in late (Tables I and II).

The analysis of all SCs in 298 pachytene nuclei (i.e., 6556 SCs) showed that 200 SCs had gaps (105) or splits (95) (Table I). SCs with non-centromeric heterochromatin presented gaps and

## Resultats

splits more often than other SCs (Tables I and III). Whereas splits were almost exclusively seen in the non-centromeric heterochromatic regions of SCs, gaps were also frequently observed in other SC regions (Tables II and III). The AZO3 infertile case presented a higher percentage of gaps and splits in non-heterochromatic regions than the other cases ( $P < 0.05$ ).

Among all autosomal SCs, SC9 and SC1 were the ones that presented gaps and splits more often (Table III). These synaptic anomalies were located in the region proximal to the centromere of 1q and 9q arms where non-centromeric heterochromatin localises (i.e., 1qh and 9qh) (Fig. 1C). Case AZO2, which has a polymorphism on the 1qh region (i.e., 1qh+), presents the highest incidence of gaps and splits in the 1qh region of the five cases analysed ( $P < 0.05$ ) (Table I). In general, the number of gaps and splits observed in these two heterochromatic regions mentioned was highly variable among the five cases analysed.

Splits were also frequently observed in the p arms of SC15 and SC21. For SC21, about 50% of these splits also affected the centromere region and the proximal part of the q arm. In the 298 nuclei analysed, only one SC14, one SC22 and one SC16 had a split in their heterochromatic region.

### Autosomal SC localisation in relation to the XY pair

The autosomal SCs located close to, or associated with the XY pair were evaluated for each pachytene cell. All autosomal SCs were observed close to the XY pair at least once. Nevertheless, in the C6, C7, and OTA7 cases, SC15 and SC21 were more often observed close to the sex chromosomes, as compared to the rest of the SCs ( $P < 0.0001$ ) (Table IV and Fig. 1E). Other SCs frequently observed close to the sex chromosomes were SC1 in C6 and OTA7, SC7 in C6 and AZO3, SC13 in OTA7 and SC14 in C6 ( $P < 0.0001$ ).

Autosomal SC associations to the XY pair were observed in about 17% of the pachytene nuclei. The incidence of association to the XY pair for each of the 22 autosomal SCs was  $< 1\%$ , except for SC15 and SC21, with a mean incidence of 5% and 3%, respectively ( $P < 0.0001$ ) (Table IV, Figs. 1D and 1E).

From the total of SC15 and SC21 with terminal splits in the p arms, about 80% were located close, or associated to the XY pair (Figs. 1D and 1E). No other SCs with gaps or splits, not even SC9, were observed to predominantly locate around the XY pair.

## DISCUSSION

### Synaptic anomalies

In the present study, immunocytogenetic labelling and the stM-FISH assay have been applied in two fertile and three infertile men. The analysis of synapsis for all SCs has been performed. For years, gaps and splits in pachytene nuclei have been considered synaptic abnormalities when present at the pachytene stage in infertile men (Hultén *et al.*, 1974; Vidal *et al.*, 1982b; Navarro *et al.*, 1986a). It is known that fertile men also present them in some pachytene nuclei (Codina-Pascual *et al.*, 2005; Guichaoua *et al.*, 2005).

In the present work, gaps and splits have been found more frequently in SCs with non-centromeric heterochromatic regions (chromosomes 1, 9, 16 and acrocentrics). These abnormalities are more frequent in early pachytene nuclei, indicating that gaps and splits may express a delayed synapsis. Whereas splits have been observed almost exclusively in secondary heterochromatin, gaps have also been observed in other SC regions. The presence of gaps and splits in regions outside of the non-centromeric heterochromatin may be indicative of a real synapsis anomaly instead of a delayed synapsis.

In the present work a single SC with a gap or split per spermatocyte has been widely observed; however, some spermatocytes presented two or more than two SCs with gaps and/or splits (Tables I and II). AZO3 presented the highest incidences of synaptic anomalies in regions other than the non-centromeric heterochromatic SC regions. In this patient, gaps and splits were more frequently seen in late pachytene nuclei, in which several SCs were affected (Tables I and II). These results could be consistent with infertility related to a severely affected synaptic process.

The 9qh region, where secondary heterochromatin localises, presented gaps and splits more frequently than any other region in metacentric and sub-metacentric SCs, followed by the 1qh and the 16qh regions (Table III). The presence of gaps and splits in the 9qh region has already been pointed out in previous studies (Solari *et al.*, 1991; Barlow and Hultén, 1996; Sun *et al.*, 2005a). Among acrocentric SCs, splits were frequently observed in the p arms of SC15 and SC21, and occasionally in SC14 and SC22.

The incidences of gaps and splits differed among all of these secondary heterochromatic regions, suggesting a different timing of synapsis for each region. A possible explanation for these differences in timing among heterochromatin regions could be variations in size, in composition and in molecular organisation of the heterochromatic region (Tagarro *et al.*, 1994; Strachan and Read, 1999b)

Human chromosome 9 presents a variety of morphological variations that affect its pericentromeric region. The estimated incidence of enlarged pericentromeric heterochromatin (9qh+) is 6%-8%. Pericentromeric inversions are found in about 1% of the general population (Madan and Bobrow, 1974). When two homologous chromosomes, such as 1 or 9, present morphological differences in their heterochromatic regions, it may make the synapsis in that specific region difficult and, as a consequence, delay or prevent it (Solari *et al.*, 1991).

The variability observed in the incidence of the unsynapsed 9qh region among the five individuals and the high incidence of gaps and splits in 1qh in AZO2 could be explained by the presence of a high frequency of heteromorphism in heterochromatic regions in humans, and the fact that the AZO2 case showed a 1qh+, could support this idea.

Chromosome 9, apart from showing a high incidence of gaps and splits at pachytene stage in SC preparations, has been described as being especially prone to breaks that produce asymmetric bivalents in meiotic metaphase I spreads (Sarrate *et al.*, 2004) and structural

## Resultats

chromosome aberrations in sperm studies (Brandriff *et al.*, 1988; Estop *et al.*, 1995) (Templado *et al.*, 2005).

Finally, the results in the present study suggest that not all expressions of unsynapsed regions should be equally considered as synaptic abnormalities. Gaps and splits involving non-centromeric heterochromatin could be considered as less severe synaptic abnormalities than those involving any other SC region.

### **Autosomal SC localisation in relation to the XY pair**

The localisation of autosomal SCs in relation to the XY pair has been analysed. All SCs have been seen located close to the XY pair at least once; nonetheless, SC15 and SC21 were the ones that were most frequently close to the XY pair. SC13 and SC14 presented high rates of close localisation to the XY pair only in two cases. Association between the XY pair and autosomal SCs was not so frequent, but SC15 and SC21 were the ones with the highest incidence. Association between the bivalent 15 and the XY pair has already been observed by FISH in meiotic chromosome preparations (Metzler-Guillemain *et al.*, 1999). In this former study and in the present one, analysis of bivalent association has implied the spreading of a tri-dimensional cell onto a bi-dimensional plane. Extremely close localisation of autosomal bivalents to the XY pair could, then, be an artifact instead of a true association. But, in the present study, associations are analysed at a protein level (i.e., SC) and are visualised as continuous proteinaceous filaments (Figs. 1D and 1E). Metzler-Guillemain *et al.*, 1999, reported that 30%-40% of bivalent 15 associated to the XY pair. Our results indicate that about 40% of the SC15s are located close to the XY pair, and that only 5% are actually associated. For the SC21, this observation is similar: about 30% are close to the XY pair and only 3% associated with it.

Heterochromatin of chromosome 15 presents high homology with chromosome Y heterochromatin (Burk *et al.*, 1985) and a partial sequence homology with Xq/Yq subtelomeric regions (Brown *et al.*, 1990; Ciccodicola *et al.*, 2000). In addition, material from the short arm of chromosome 15 has been detected in satellited Y chromosomes (Yqs) (Kühl *et al.*, 2001) and, as an inherited polymorphism, in short arms of chromosomes 13, 14 and 21 (Smeets *et al.*, 1991b; Stergianou *et al.*, 1992; Wilkinson and Crolla, 1993). These observations together may explain the high degree of close localisation or association observed between SC15, SC21 and the XY pair, detected in the present work.

### **CONCLUSIONS**

From the present study we propose that heterochromatin has a specific role and behaviour in the synapsis of human homologous chromosomes. It is herein shown that non-centromeric heterochromatic regions are the last regions to synapse and, when unsynapsed, gaps and splits are observed as in the SC. Moreover, these regions show different timing during synapsis, 9qh being the last one to synapse. In addition, an interindividual variation in the incidence of gaps and splits in non-centromeric heterochromatic regions has been



demonstrated and may be explained as a consequence of the heteromorphism of these regions in the general population. The presence of gaps and splits in SCs without non-centromeric heterochromatic regions may indicate nuclei with synapsis more severely affected, which may result in infertility. The association of acrocentric SCs, 15 and 21, to the XY pair may be explained by sequence homology between short arms of these chromosomes and the Yq arm.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Abad, S. Egozcue, F. García and J. Sarquella for providing samples. We also, thank Drs. C. Heyting and W. Earnshaw for SCP1, SCP3 antibodies and CREST serum, respectively, and Dr. C. Fauth for providing stM-FISH DNA pools. MCP was a recipient of a grant of the Generalitat de Catalunya (2001FI00468). This study was supported by the Fondo Investigación Sanitaria (Madrid) (Project PI020258), the Generalitat de Catalunya (Project 2005 SGR 00495) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SP 460/4-1). The English of this manuscript has been revised and corrected by a native English speaking instructor of this University.

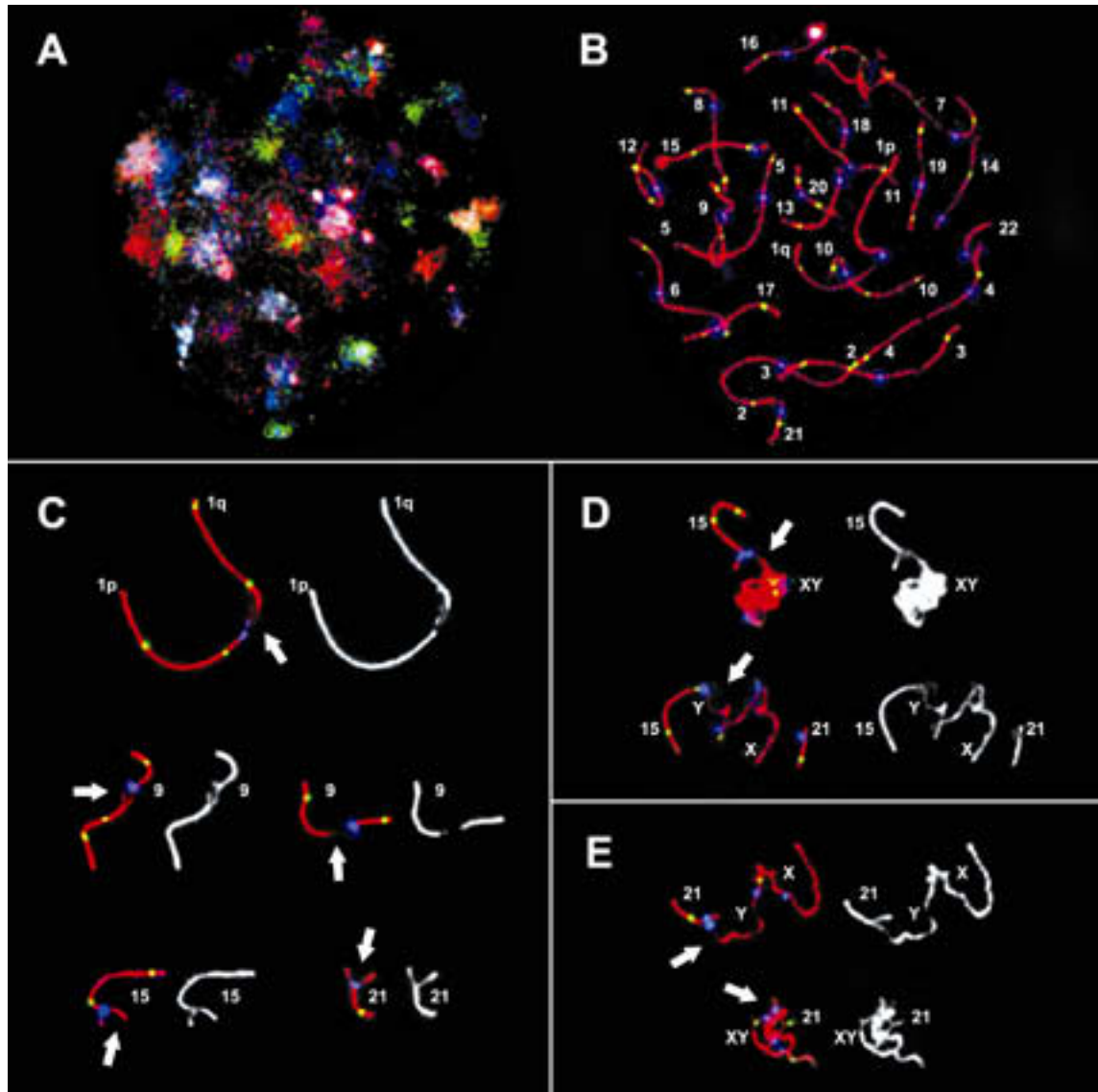
#### REFERENCES

- Barlow AL and Hultén MA (1996) Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I human spermatocytes. *Chromosome Res* 4,562-573
- Brandriff BF, Gordon LA, Moore II D and Carrano AV (1988) An analysis of structural aberrations in human sperm chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 47,29-36
- Brown WRA, MacKinnon PJ, Villasanté, Spurr N, Buckle W and Dobson MJ (1990) Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA. *Cell* 63,119-132
- Burk RD, Szabo P, O'Brien S, Nash WG, Yu L and Smith KD (1985) Organization and chromosomal specificity of autosomal homologs of human Y chromosome repeated DNA. *Chromosoma* 92,225-233
- Ciccodicola A, D'Esposito M, Esposito T, Gianfrancesco F, Migliaccio C, Miano MG, Matarazzo MR, Vacca M, Franze A, Cuccurese M, Cocchia M, Curci A, Terracciano A, Torino A, Cocchia S, Mercadante G, Pannone E, Archidiacono N, Rocchi M, Schlessinger D and D'Urso M (2000) Differentially regulated and evolved genes in the fully sequenced Xq/Yq pseudoautosomal region. *Hum. Mol. Genet.* 9,395-401
- Codina-Pascual M, Kraus J, Speicher M, Oliver-Bonet M, Murcia V, Sarquella J, Egozcue J, Navarro J and Benet J (2004) Characterization of all human male synaptonemal complexes by subtelomere multiplex-FISH. *Cytogenet Genome Res* 107,18-21

## Resultats

- Codina-Pascual M, Oliver-Bonet M, Navarro J, Campillo M, Garcia F, Egozcue S, Abad C, Egozcue J and Benet J (2005) Synapsis and meiotic recombination analyses: MLH1 focus in the XY pair as an indicator. *Hum. Reprod.* 20,2133-2139
- Estop AM, Márquez C, Munne S, Navarro J, Cieply K, Van Kirk V, Martorell MR, Benet J and Templado C (1995) An analysis of human sperm chromosome break-points. *Am J Hum Genet* 56,452-460
- Fauth C, Zhang H, Harabacz S, Brown J, Saracoglu K, Lederer G, Rittinger O, Rost I, Eils R, Kearney L and Speicher MR (2001) A new strategy for the detection of subtelomeric rearrangements. *Hum Genet* 109,576-583
- Guichaoua MR, Perrin J, Metzler-Guillemain C, Saias-Magnan J, Giorgi R and Grillo JM (2005) Meiotic anomalies in infertile men with severe spermatogenic defects. *Hum. Reprod.* 20,1897-1902
- Hultén MA, Solari AJ and Skakkebaek NE (1974) Abnormal synaptonemal complex in an oligo-chiasmatic man with spermatogenic arrest. *Hereditas* 78,105-116
- Judis L, Chan ER, Schwartz S, Seftel A and Hassold TJ (2004) Meiosis I arrest and azoospermia in an infertile male explained by failure of formation of a component of the synaptonemal complex. *Fertil Steril* 81,205-209
- Kühl H, Röttger S, Heilbronner H, Enders H and Schempp W (2001) Loss of the Y chromosomal PAR2-region in four familial cases of satellited Y chromosomes (Yqs). *Chromosome Research* 9,215-222
- Lammers JHM, Offenbergh HH, van Aalderen M, Vink ACG, Dietrich AJJ and Heyting C (1994) The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol* 14,1137-1146
- Madan K and Bobrow M (1974) Structural variation in chromosome No.9. *Annl's Génét* 17,81-86
- Metzler-Guillemain C, Mignon C, Depetris D, Guichaoua MR and Mattei MG (1999) Bivalent 15 Regularly Associates With the Sex Vesicle in Normal Male Meiosis. *Chromosome Research* 7,369-378
- Meuwissen RL, Offenbergh HH, Dietrich AJ, Riesewijk A, van Iersel M and Heyting C (1992) A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J* 11,5091-5100
- Navarro J, Vidal F, Templado C, Benet J, Marina S, Pomerol JM and Egozcue J (1986) Meiotic chromosome studies and synaptonemal complex analysis by light and electron microscopy in 47 infertile or sterile males. *Hum Reprod* 1,523-527
- Oliver-Bonet M, Liehr T, Nietzel A, Heller A, Starke H, Claussen U, Codina-Pascual M, Pujol A, Abad C, Egozcue J, Navarro J and Benet J (2003) Karyotyping of human synaptonemal complexes by cenM-FISH. *Eur J Hum Genet* 11,879-883
- Renauld H and Gasser S (1997) Heterochromatin: a meiotic matchmaker. *Trends in Cell Biology* 7,201-205

- Sarrate Z, Blanco J, Egozcue S, Vidal F and Egozcue J (2004) Identification of meiotic anomalies with multiplex fluorescence in situ hybridization: Preliminary results. *Fertility and Sterility* 82,712-717
- Smeets DFCM, Merks GFM and Hopman AHM (1991) Frequent occurrence of translocation of the short arm of chromosome 15 to other D-group chromosomes. *Hum Genet* 87,44-48
- Solari AJ (1980) Synaptonemal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. *Chromosoma* 81,315-337
- Solari AJ, Ponzio R and Rey Valzacchi G (1991) Synaptonemal complex karyotyping in an oligospermic patient with heterochromatin duplication in chromosome n. 9. *Medicina (B Aires)* 51,217-221
- Stergianou K, Gould CP, Waters JJ and Hultén M (1992) High population incidence of the 15p marker D15Z1 mapping to the short arm of one homologue 14. *Hum Genet* 88,364
- Strachan, T. and A. P. Read (1999). *Organization of the human genome. Human Molecular Genetics* 2. F. Kingston. Oxford, UK, BIOS Scientific Publishers, Ltd. 1.
- Sun F, Kozak G, Scott S, Trpkov K, Ko E, Mikhaail-Philips M, Bestor TH, Moens PB and Martin RH (2004) Meiotic defects in a man with non-obstructive azoospermia: Case report. *Hum Reprod* 19,1770-1773
- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Trpkov K, Ko E, Rademaker A and Martin RH (2005) Discontinuities and unsynapsed regions in meiotic chromosomes have a *cis* effect on meiotic recombination patterns in normal human males. *Hum. Mol. Genet.* 14,3013-3018
- Tagarro I, Fernandez-Peralta AM and Gonzalez-Aguilera JJ (1994) Chromosomal localization of human satellites 2 and 3 by a FISH method using oligonucleotides as probes. *Hum Genet* 93,383-388
- Templado C, Bosch M and Benet J (2005) Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 111,199-205
- Vidal F, Templado C, Navarro J, Brusadin S, Marina S and Egozcue J (1982b) Meiotic and synaptonemal complex studies in 45 subfertile males. *Hum Genet* 60,301-304
- Wilkinson TA and Crolla JA (1993) Molecular cytogenetic characterization of three familial cases of satellited Y chromosomes.



**Fig. 1** A) Composed stM-FISH image of a pachytene nucleus. B) Corresponding immunolabelled pachytene nucleus with all SCs identified. Synaptonemal complex lateral elements are in red (anti-SCP3), centromeres in blue (anti-CENP) and crossover foci are present in green (anti-MLH1). C) SC1, SC9, SC15 and SC21 having gaps or splits in their heterochromatic region. D) SC15 associations with the XY pair. The first image shows a clear association between SC15 and chromosome Y. Note that SC21 is close to the XY pair in three images. E) SC21 association with the XY pair. Both images show an SC21 with a split, one of them clearly associated to the Y chromosome.

Table 1: Detailed data obtained from the analysis of SCs affected by gaps and splits in early and late pachytene nuclei

Case (Age)		Gaps		Splits		Gaps + Splits	
		Early	Late	Early	Late	Early	Late
<b>C6</b> (36)	Cells aff.	3E (10.7%)	6L (7.8%)	4E (14.3%)	2L (2.6%)		
n=105	Anomaly	3x <b>9q</b>	1x <b>1q</b>	2x <b>9q</b>	1x <b>21q</b>		
nE=28			1x 1p	2x <b>15p</b>	1x <b>15q</b>		
nL=77			2x <b>9q</b>				
			1x 10q				
			1x 11p				
<b>C7</b> (42)	Cells aff.	14E (23.3%)	6L (12.5%)	29E (48.3%)	13L (19.4%)	9E (15%)	4L (8.3%)
n=108	Anomaly	1x <b>1q</b>	3x <b>9q</b>	18x <b>9q</b>	12x <b>9q</b>	1x <b>1q</b> + <b>9q</b>	1x 2q + <b>9q</b>
nE=60		3x 7q	1x 9p	1x <b>21p</b> + <b>"q"</b>	1x <b>9q 22p</b>	1x 7q + <b>9q</b>	1x <b>9q</b> + <b>21p</b> + <b>"q"</b>
nL=48		7x <b>9q</b>	1x 1p 9p	2x <b>1q 9q</b>		2x <b>9q</b> + <b>1q</b>	1x 12q + <b>9q</b>
		1x <b>9q</b> 19q	1x 4q	1x 1p <b>9q</b>		1x <b>9q</b> + <b>21p</b>	1x <b>1q 9q</b> + <b>15p</b>
		1x 1p 6q 7q		2x <b>9q 15p</b>		1x <b>9q</b> + <b>21p</b> + <b>"q"</b>	
		1x <b>1q 2q 9q</b>		2x <b>9q 21p</b>		1x 6p + <b>9q 15p</b>	
				1x <b>9q 21p</b> + <b>"q"</b>		1x 11q + <b>9q 15p</b>	
				1x <b>9q 14p 15p</b>		1x <b>1q 9q</b> + <b>21p</b>	
				1x <b>9q 15p</b>			
				<b>21p</b> + <b>"q"</b>			
<b>OTA7</b> (35)	Cells aff.	5E (71.4%)	4L (19%)	2E (28.6%)	2L (9.5%)		
n=28	Anomaly	5x <b>9q</b>	4x <b>9q</b>	1x <b>9q</b>	1x <b>21p</b> +q		
nE=7				1x <b>9q 15q</b>	1x <b>15p</b>		
nL=21							
<b>AZ02</b> (26)	Cells aff.		6L (35.3%)	2E (25%)	3L (17.6%)	5E (62.5%)	1L (5.9%)
n=25	Anomaly		1x <b>1q</b>	1x <b>9q</b>	1x <b>1q</b>	1x <b>1q</b> + <b>9q</b>	1x <b>9q</b> + <b>16q</b>
nE=8			2x 3q	1x <b>1q 9q 15p</b>	2x <b>9q</b>	1x 2p + <b>9q</b>	
nL=17			1x <b>9q</b>			1x 7q + <b>1q</b>	
			1x <b>1q 9q</b>			1x <b>1q 2q</b> + <b>9q</b>	
			1x 14q <b>9q</b>			1x 4q 15q + <b>9q</b>	
<b>AZ03</b> (41)	Cells aff.	3E (4.3%)	12L (48%)	1E (14.3%)	2L (8%)		2L (8%)
n=32	Anomaly	2x <b>9q</b>	1x 1p	1x <b>9q</b>	2x <b>9q</b>		1x 7q <b>9q</b> + 5p 12p 15q
nE=7		1x 7q 12q	2x <b>9q</b>				1x 1p 19q + 3q
nL=25		19q	1x <b>1q 4q</b>				
			1x 1p <b>9q</b>				
			1x 1p 11q				
			2x 2p 5p 17q				
			1x 3p 5q <b>9q</b>				
			1x 3p 9p 17p				
			1x 2p <b>9q</b> 10q 19q				
			1x 4q 5q 14q 21q				
			22q				
Total cells affected		25 E (22.7%)	34 L (18.1%)	38 E (34.5%)	22 L (11.7%)	14 E (12.7%)	7 L (3.7%)
N=298							
NE=110			59 P (19.8%)	60 P (20.1%)		21 P (7.1%)	
NL=188							
Total SCs with anomalies			78 SC with gaps	70 SC with splits		27 SC with gaps + 25 SC with splits	

nE, nL = total number of Early or Late pachytenes analyzed. E= number of Early pachytenes affected; L= number of Late pachytenes affected. P= number of pachytenes affected. "1x", "2x" = number of cells in which the anomaly has been found. Non-centromeric heterochromatic regions affected are in bold.

Table 2: Number and percentage of spermatocytes with SCs affected by only gaps, only splits or both.

Case	SCs affected per cell	Only Gaps										Only Splits										Gaps + Splits											
		# of cells affected according to pachytene stage					# of gaps in non-centromeric heterochromatic regions					# of cells affected according to pachytene stage					% of splits in non-centromeric heterochromatic regions					# of cells affected according to pachytene stage					% of gaps and splits in non-centromeric heterochromatic regions						
		n	% of P	Early	Late	% in L	n	% in E	Early	Late	% in L	n	% of P	Early	Late	% of L	n	% in E	Early	Late	% in L	n	% of P	Early	Late	% of L	n	% in E	Early	Late	% in L		
<b>C6</b>	1SC	9	8.6%	3	10.7%	6	7.8%	3	100%	3	50%	6	5.7%	4	14.3%	2	2.6%	4	100%	4	100%	2	2.6%	2	2.6%	2	2.6%	2	2.6%	2	2.6%	2	100%
	n=105																																
	E:L=28:77																																
<b>C7</b>	1SC	16	14.8%	11	18.3%	5	10.4%	8	72.7%	3	60%	31	28.7%	19	31.7%	12	25%	19	100%	12	100%	12	100%	12	100%	12	100%	12	100%	12	100%		
	n=108	2	1.8%	1	1.7%	1	2.1%	1	50%	0	0%	9	8.3%	8	13.3%	1	2.1%	15	93.7%	2	100%	2	100%	2	100%	2	100%	2	100%	2	100%		
	E:L=60:48	2	1.8%	2	3.3%	2	3.3%	2	33.3%	2	33.3%	2	1.8%	2	3.3%	2	3.3%	6	100%	6	100%	6	100%	6	100%	6	100%	6	100%	6	100%		
	Subtotal	20	18.5%	14	23.3%	6	12.5%	11	57.9%	3	42.9%	42	38.9%	29	48.3%	13	27.1%	41	97.6%	14	100%	14	100%	14	100%	14	100%	14	100%	14	100%		
<b>OTA7</b>	1SC	9	32.1%	5	71.4%	4	19%	5	100%	4	100%	3	10.7%	1	14.3%	2	9.5%	1	100%	2	100%	2	100%	2	100%	2	100%	2	100%	2	100%		
	n=28																																
	E:L=7:21																																
	Subtotal	9	32.1%	5	71.4%	4	19%	5	100%	4	100%	4	14.3%	2	28.6%	2	9.5%	3	100%	2	100%	2	100%	2	100%	2	100%	2	100%	2	100%		
<b>AZO2</b>	1SC	4	16%			4	23.5%			2	50%	4	16%	1	12.5%	3	17.6%	1	100%	3	100%	3	100%	3	100%	3	100%	3	100%	3	100%		
	n=25	2	8%			2	11.8%			3	75%	1	4%	1	12.5%			3	100%														
	E:L=8:17	6	24%			6	35.3%			5	62.5%	5	20%	2	25%	3	17.6%	4	100%	3	100%	3	100%	3	100%	3	100%	3	100%	3	100%		
	Subtotal	6	24%			6	35.3%			5	62.5%	5	20%	2	25%	3	17.6%	4	100%	3	100%	3	100%	3	100%	3	100%	3	100%	3	100%		
<b>AZO3</b>	1SC	5	15.6%	2	28.6%	3	12%	2	100%	2	66.7%	3	9.4%	1	14.3%	2	8%	1	100%	2	100%	2	100%	2	100%	2	100%	2	100%	2	100%		
	n=32	3	9.4%			3	12%			2	33.3%	3	9.4%	3	12%			3	100%														
	E:L=7:25	5	15.6%	1	14.3%	4	16%	0	0%	1	9%	1	4%	1	4%			4	100%	1	25%	1	25%	1	25%	1	25%	1	25%	1	25%		
	4SC	1	3.1%			1	4%			1	25%	1	3.1%					1	25%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%		
	5SC	1	3.1%			1	4%			1	25%	1	3.1%					1	25%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%		
	Subtotal	15	46.9%	3	42.9%	12	48%	2	40%	6	20%	3	9.4%	1	14.3%	2	8%	1	100%	2	100%	2	100%	2	100%	2	100%	2	100%	2	100%		
	Total	59	19.8%			60	20.1%			60	20.1%	60	20.1%			60	20.1%			60	20.1%	60	20.1%	60	20.1%	60	20.1%	60	20.1%	60	20.1%		

% of P, % of E, % of L= percentage of total pachytene, of early pachytene and of late pachytene affected, respectively. % in E, % in L= percentage in early and in late pachytene nuclei, respectively. E:L= number of early and late pachytene nuclei analyzed.

Table 3: Incidence of autosomal SCs with non-centromeric heterochromatic regions with gaps and splits in pachytene nuclei

Case	1q		9q				14p		15p		16q		21*		22p		Other SCs				
	gap		split		gap		split		split		split		split		split		gap	split			
	n	%1q	n	%1q	n	%9q	n	%9q	n	%14p	n	%15p	n	%16q	n	%21	n	%22p	n	n	
C6	1	0.9%			5	4.8%	2	1.9%			3	2.9%			1	0.9%				3	
C7	5	4.6%	4	3.7%	19	17.6%	47	43.5%	1	0.9%	7	6.5%			9	8.3%	1	0.9%	15	1	
OTA7					9	32.1%	2	7.1%			2	7.1%			1	3.6%					
AZO2	4	16% <sup>A</sup>	3	12% <sup>A</sup>	4	16%	8	32%			1	4%	1	4%						8	
AZO3	1	3.1%			8	25%	3	9.4%												30	4

\*50% of splits in SC21 affected also centromere and part of the q arm

SC8, SC13, SC18 and SC20 were never affected.

<sup>A</sup>P<0.05

Table 4: Incidence of SC15 and SC21 associate or close to the XY pair

	N cells	Associate to the XY pair		Close to the XY pair	
		15	21	15	21
		%	%	%	%
C11	111	5,4*	-	46,9*	25,2*
CVR2	112	5,4*	5,4*	42,9*	35,7*
49-iUAB	28	3,6	7,1	46,4*	32,1*
02-TAU	26	-	3,8	19,2	23,1
03-Gi	33	6,1*	-	24,2	18,2
Total	310	4,8*	2,9*	40,6*	28,7*

\* Different from the expected by the Chi-square test (P<0.0001)

## **Article 4**

**Crossover frequency and synaptonemal complex length:  
their variability and effects on human male meiosis**

**Molecular Human Reproduction (en prensa)**

Índex impacte 2004: 3.072



**TITLE:** Crossover frequency and synaptonemal complex length: their variability and effects on human male meiosis

**AUTHORS:** M Codina-Pascual<sup>1</sup>, M Campillo<sup>2</sup>, J Kraus<sup>3,4</sup>, MR Speicher<sup>3,4</sup>, J Egozcue<sup>1</sup>, J Navarro<sup>1</sup> and J Benet<sup>1</sup>

**RUNNING TITLE:** Crossover frequency and SC length

**ADRESSES:** <sup>1</sup>Unitat de Biologia Cel.lular i Genètica Mèdica, Departament de Biologia Cel.lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, Spain.

<sup>2</sup>Laboratori de Medicina Computacional, Unitat de Bioestadística, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, Spain.

<sup>3</sup>Institut für Humangenetik, Technische Universität, München, D-81365, Germany

<sup>4</sup>GSF-Gesellschaft für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg, Germany

**To whom correspondence should be addressed:** J Benet and M Codina-Pascual, Departament de Biologia Cel.lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193, Spain; Tel: +34 935811773; Fax: +34 935811025; Email: [jordi.benet@uab.es](mailto:jordi.benet@uab.es), [montserrat.codina@uab.es](mailto:montserrat.codina@uab.es).

**ABSTRACT**

In this study, immunocytogenetics has been used in combination with the subtelomere-specific multiplex-FISH (stM-FISH) assay to identify 4681 autosomal synaptonemal complexes (SC) of two fertile men. Comparisons of crossover maps for each individual SC between two men with extremely different meiotic crossover frequencies show that a low crossover frequency results in: 1) a higher frequency of XY pairs and of small SCs without MLH1 foci, and 2) lower frequency of crossovers in the proximity of centromeres. In both cases, the bivalents which most frequently lacked MLH1 foci were the XY pair and the SC21. Analysis of SC length showed that SC arms can be longer or shorter than the corresponding mitotic one. Moreover, for a given SC, the variation in length found in one arm was independent of the variation observed in the other one (e.g., SC1p arms are longer than SC1q arms). The results confirm that reduction in the crossover frequency may increase the risk of achiasmate small bivalents, and that interindividual differences in crossover frequency could explain the variability in the frequencies of aneuploidy in human sperm. How MLH1 foci are positioned within the SC is discussed based on detailed MLH1 foci distributions and interfoci distances. Finally, evidence that the variation of the SC arm length may reflect the abundance of open and of compact chromatin fibers in the arm is shown.

**KEY WORDS:** human crossover maps / meiosis / synaptonemal complex / aneuploidy / stM-FISH.

## INTRODUCTION

Meiotic recombination contributes to genetic variability and to the proper completion of the meiotic process. In mammals, meiotic recombination starts early in meiotic prophase I prior to the synapsis of homologous chromosomes. In mammals, as in yeast, meiotic recombination is initiated by Spo11-dependent DNA double-strand breaks (DSB) at leptotene stage (Baudat *et al.*, 2000; Romanienko and Camerini-Otero, 2000; Mahadevaiah *et al.*, 2001). DSBs activate the DNA repair process in which several proteins are involved (reviewed in (Svetlanov and Cohen, 2004)). During the DNA repair process only a few of these DSBs will be designated as crossovers by the onset of single end invasions (SEIs) formation (Hunter and Kleckner, 2001; Börner *et al.*, 2004). Afterwards, dHJs are formed, resolved and cytologically seen as late recombination nodules. Several homologs of yeast proteins involved in the initiation, consolidation and resolution of the recombination events have been described in mammals and humans (reviewed in (Svetlanov and Cohen, 2004)) (Roig *et al.*, 2004; Oliver-Bonet *et al.*, 2005b). Some of these proteins specially localize to recombination foci that will result in crossovers (e.g. MLH1 (Baker *et al.*, 1996; Barlow and Hultén, 1998)).

Direct and indirect methods have been used for the study of human male meiotic recombination. Analyses of genotype data in CEPH and deCODE families have indirectly allowed the generation of human male and female genetic maps (Broman and Weber, 2000; Kong *et al.*, 2002; Matise *et al.*, 2003). These linkage maps can be used to deduce the location of crossover events. For years, the observation of chiasmata in meiotic chromosomes has been the only direct method of analysis of crossovers. This method resulted in the first physical description of frequency and distribution of crossovers in human males (Hultén, 1974; Laurie and Hultén, 1985a; Laurie and Hultén, 1985b). Of late, the characterization of proteins that recognize the sites of crossing over (e.g., MLH1) and of proteins present in the synaptonemal complex (SC) (e.g., SCP1 and SCP3) has allowed for the study of meiotic recombination between homologous chromosomes using direct immunocytogenetic detection. This new methodology has enabled the first visualization of human male and female recombination foci at pachytene on SC spreads (Barlow and Hultén, 1998; Tease *et al.*, 2002). Several studies have applied the immunocytogenetic method for meiotic analysis in human males and described a high interindividual variation in crossover frequencies (Hassold *et al.*, 2004; Codina-Pascual *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2005c). This variation in the frequency of crossing over could be the reason for the high variability in the frequency of aneuploidy in human sperm (reviewed in (Hassold and Hunt, 2001; Templado *et al.*, 2005)). Moreover, this immunocytogenetic labeling can be followed by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) methods for SC identification. Recently, the development of several multiplex-FISH strategies has allowed the simultaneous identification of every SC in a given spermatocyte (Oliver-Bonet *et al.*, 2003; Codina-Pascual *et al.*, 2004). The successive application of immunocytogenetics and multiplex-FISH has been used to describe the distribution of meiotic recombination events for each SC in a human male (Sun *et al.*, 2004b).

## Resultats

In the present work, the distribution of meiotic crossover events in two selected men has been analyzed and compared by combining immunocytogenetics (SCP1, SCP3, MLH1 and CREST) and seven-fluorochrome subtelomere-specific multiplex-FISH (stM-FISH) methodologies. These two fertile men with high and low frequencies of crossing over, respectively, were studied to evaluate which SCs are more sensitive to the interindividual variability in crossover frequencies.

## MATERIAL AND METHODS

Individuals included in the study were two men (C6, C7) of proven fertility. Testicular biopsies were obtained while undergoing vasectomy (C6) or vasectomy reversal (C7) under local anesthesia. Written consent was given by patients, and the study was approved by our Institutional Ethics Committee.

### Sample treatment

Testicular tissue was processed for the immunocytogenetic analysis of synaptonemal complexes using a slight modification of the protocol previously described (Codina-Pascual *et al.*, 2004). A piece of the biopsy was shredded in a 20 µl drop of 0.1M sucrose. The drop containing free pachytene cells was spread on a slide covered with 1% paraformaldehyde/Triton-X solution, pH=9.2. Slides were stored overnight at room temperature in a humid chamber. Afterwards, slides were allowed to dry and were then washed in 0.04% Photo-Flo (Kodak) for 4 to 10 min. Finally, after a short rinse in distilled water, they were air dried. The presence of cells was confirmed by microscopic evaluation. Slides were blocked with 0.05% milk powder solution in 4× SSC-0.05% Tween-20 (4× SSCT) for 30 min. Four primary antibodies were used: rabbit anti-SCP3 (Lammers *et al.*, 1994) and rabbit anti-SCP1 (Meuwissen *et al.*, 1992) (both gifts from Dr Christa Heyting), anti-CENP (CREST serum kindly provided by Dr William Earnshaw) and mouse anti-MLH1 (PharMingen; San Diego, CA, USA). They were applied at 1:1000, 1:1000, 1:1000 and 1:250, respectively, in the blocking solution mentioned above, overnight, at 37°C. Slides were washed in (1x) PBS for 48h at 4°C. Afterwards, the secondary antibodies, TRITC-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody and FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (both from Sigma; Madrid, Spain), were diluted 1:250 in blocking solution and applied for 3h at 37°C. In a third round, the Pacific Blue-conjugated rabbit anti-human IgG (from Sigma; Madrid, Spain) labeled with Zenon Reaction (Molecular Probes; Spain) was applied at 1:250 for 1h. Finally, slides were washed, briefly rinsed in distilled water, air dried and counterstained with antifade (Vector lab Inc.; Burlingame, CA, USA). An epifluorescence microscope (Olympus Bx60) and Power Macintosh G3 with Smartcapture software (Digital Scientific; Cambridge, UK) were used for cell evaluation and image capturing.

### St-MFISH

DNA probes for the st-MFISH assay (Fauth *et al.*, 2001) were prepared and applied as previously described (Codina-Pascual *et al.*, 2004). Microdissected subtelomeric probes, with sizes between 5 and 10 Mb, were amplified and labeled by DOP-PCR according to a combinatorial labeling scheme based on 7 different fluorochromes (Fauth *et al.*, 2001). For direct labeling, DEAC (Perkin Elmer), Cy3 and Cy5 (both from Amersham Pharmacia Biotech), TexasRed (Molecular Probes) dUTP-conjugates were used. DNP (Perkin Elmer), biotin and digoxigenin (both Roche Diagnostics) dUTP-conjugates were used for indirect labeling. After 48h hybridization and post-hybridization washes, anti-DNP-KLH-Alexa488 (1:400; Molecular Probes), avidin-Cy5.5 (1:200; Rockland Inc.) and anti-digoxigenin-Cy7 (1:50; Cy7 from Amersham Pharmacia Biotech) were used for detection of hapten-labeled probes. Finally, slides were counterstained with DAPI and mounted in p-phenylenediamine dihydrochloride antifade solution (Merck). Visualization was performed using a motorized epifluorescence microscope with an eight-position filter wheel (Leica DMRXA-RF8), a Sensys CCD camera (Photometrics; Kodak KAF 1400 chip) and the Leica QFISH software (Leica Microsystems Imaging Solutions; Cambridge, UK).

### Cell Analysis

Immunolabeled pachytene cells were captured. The identification of all SCs was performed by projection of the stM-FISH hybridization results into the image of the immunolabeled pachytene cell. Measurements of SC lengths and determination of centromere and recombination foci positions were made using the version 3.3 MicroMeasure program (available at <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure>). The number of MLH1 foci per autosomal SC and the presence of an MLH1 focus in the XY pair were evaluated.

### Statistics

Statistical analysis was performed using the SPSS 13.0 program (SPSS Inc. Chicago, IL). The  $\chi^2$  test and Fisher exact test, when necessary, were applied to percentage comparisons. The Student's T test was applied to mean comparisons between both cases. Pearson's correlation coefficient was calculated to evaluate the strength of the relationship.

## RESULTS AND DISCUSSION

A total of 213 pachytene cells from two fertile men were immunolabeled and consecutively hybridized with the subtelomere multiplex-FISH assay (stM-FISH) for SC identification. The subtelomere probe set labeled in a combinational way with seven different fluorochromes allowed for a high level of confidence and efficiency in autosomal SC identification (4681/4686, 99.9%), even in cases of overlapping SCs (Codina-Pascual *et al.*, 2004) (Figure 1). Table I shows the number of cells analyzed and the MLH1 values for the two cases studied.

### SC lengths

The length of each identified SC was measured, including heterochromatic blocks, and expressed as a mean of absolute ( $\mu\text{m}$ ) and relative (%) lengths (Table II). The case showing the longest SCs (C7) is the individual with the highest meiotic recombination frequency (Table I). This is in agreement with the covariation described between SC length and number of crossover events (Lynn *et al.*, 2002). Relative SC lengths showed no differences between the two individuals, therefore the analysis was done using the mean from C6 and C7. Relative SC lengths correlated with relative lengths of mitotic chromosomes (International System for Human Cytogenetic Nomenclature, 1985) ( $P < 0.0001$ ,  $r^2 = 0.96$ ). However, the relative length of some SCs was statistically longer (e.g., SC19, SC17, SC16 and SC15;  $P < 0.001$ ) or shorter (e.g., SC4, SC8, SC13, SC14, SC18 and SC21;  $P < 0.001$ ) than the relative length of the corresponding mitotic chromosome (Table II and Figure 2a).

When the p and q arms were analyzed separately, they usually showed variation of their relative length. For a given SC, the variation in length found in one arm was independent of the variation found in the other one (Figures 2b and 2c). This resulted in some SCs with centromere index different from the corresponding mitotic one (Table II). A clear example of this was SC1. Because stM-FISH only hybridizes to the subtelomeric region of the chromosome 1 q arm (Fauth *et al.*, 2001; Codina-Pascual *et al.*, 2004), SC1p and SC1q arms were unequivocally distinguished by the hybridization result. The measurement of the SC1 length ( $\mu\text{m}$ ) showed that the SC1p arm was longer than the SC1q ( $P < 0.0001$ ). The SC1p increased (13%) and the SC1q reduced (11%) their relative length in comparison with their mitotic counterparts (Figures 2b and 2c), and resulted in a centromere index of 0.54 for the SC1, versus 0.48 for the mitotic chromosome 1 (International System for Human Cytogenetic Nomenclature, 1985) (Table II). Nevertheless, the relative length of the whole SC1 did not differ from the mitotic one.

The human genome sequence shows that chromosomes have differences in the percentage of GC content and in gene density (Venter *et al.*, 2001). R-bands are regions with a high GC content and gene density, whereas G-bands are poor in GC and in genes. Among R-bands, T-bands have the highest gene density, the longest genetic distance (Holmquist, 1992) and are regions of abundant open chromatin fibers (Gilbert *et al.*, 2004). It is herein shown that those SCs with a relative length longer than the mitotic relative length are those having regions with high GC content and gene density (R-bands). Conversely, those SCs with a shorter

relative length have abundant regions with low GC content and gene density (G-bands). Similar to the whole SC, the SC arms that showed a higher increase of their relative lengths are rich in GC content and in gene density (Figure 2b and 2c; e.g., SC1p arm, both arms of SC19 and SC17, and the SC22q arm). In general, the variation in the SC relative length, expressed as the percentage of difference between SC and mitotic chromosome relative lengths, positively correlated with the gene density of the chromosome ( $P < 0.0001$ ,  $r^2 = 0.8$ ) (Figure 3). It is interesting to note that the scatterplot graphic shown in Fig. 3 has a great similarity to that published by Gilbert *et al.* (2004), in which a correlation between the abundance of open chromatin fibers and gene density is shown. It has been reported that heterochromatin represents a shorter region in the pachytene chromosome than in the mitotic chromosome, and that SC in heterochromatic regions is under-represented and densely sheathed in highly compact chromatin (Stack, 1984). Taking all these data together, it is possible that the variation in the SC relative length may reflect the amount of open and of compact chromatin fibers present in the chromosome. Regions of open chromatin fibers are cytologically decondensed in human lymphoblasts (Gilbert *et al.*, 2004). Therefore, the chromatin present in R-bands and in T-bands is in a more decondensed state and has a larger volume than the chromatin in G-bands (Yokota *et al.*, 1997; Gilbert *et al.*, 2004). Conversely, heterochromatin is in a more condensed state and has a smaller volume in pachytene nuclei (Stack, 1984). Close packing of these regions with different chromatin volume along meiotic prophase chromosomes could result in chromatid axis with different extension (Blat *et al.*, 2002) and, consequently, in SC regions with different length (Figure 3 and Figure 4). The fact that the distribution of open and of compact chromatin fibers is not uniform along the entire chromosome may explain the independent variation of relative length observed between SC arms.

#### MLH1 count

The mean number of MLH1 foci observed per autosomal SC set was  $42 \pm 3.8$  for C6 and  $52.2 \pm 5.6$  for C7. The two values are significantly different between them ( $P < 0.0001$ ) and close to the lowest and the highest values in the recombination range described for human males, respectively (Table I). If these two fertile cases are included in our control series previously reported (Codina-Pascual *et al.*, 2005), the mean frequency of recombination foci per autosomal SC in our control series is  $47.8 \pm 3.5$ . This value increases to  $48.5 \pm 3.6$  if the MLH1 focus in the XY pair is included. Considering that each MLH1 occurs in a 50cM interval (50% probability of a recombinant product), the mean genetic lengths are 2,100 cM and 2,610 cM for C6 and C7, respectively. Despite the differences in the frequency of MLH1 foci between both individuals, their recombination focus density was very similar: 1.5 MLH1/10 $\mu$ m (Table I). This similar density is explained by the differences between absolute SC lengths of both cases, which covaries with the crossover frequency (Lynn *et al.*, 2002).

MLH1 foci for each identified autosomal SC were also scored. Table III shows the average number of MLH1 foci in each SC obtained from the two cases. In general, autosomal SCs had

## Resultats

at least one MLH1 focus. However, a few SCs displayed no MLH1 foci (Table IV) and, among these, the SC21 was by far the one that most frequently lacked it. The incidence of SC21 without MLH1 focus was similar in both donors. But, in general, the incidence of SCs without MLH1 focus was higher for the C6 case ( $P < 0.05$ ).

Evaluation of the localization of MLH1 foci within the 44 autosomal p and q arms was carried out. The presence of an MLH1 focus in the p arm of acrocentric bivalents was seldom seen, and only in the case of high crossover frequency (C7): 3% for the large acrocentric chromosomes (D group) and 2.3% for the small acrocentric chromosomes (G group). The absence of an MLH1 focus in one of the SC arms was more frequently observed in the small non-acrocentric SCs (i.e., SC17, SC18, SC19, SC20) ( $P < 0.05$ ) and generally affected the p arm. The C6 individual, with a low crossover frequency, showed a higher incidence of these SCs with no MLH1 focus in one of their arms than the C7 ( $P < 0.0001$  for SC18 and SC20;  $P < 0.05$  for SC17 and SC19).

The presence of an MLH1 focus in the XY pair was also analyzed and was observed in 62.9% and in 74.1% of the XY pairs for C6 and C7, respectively (Table I). The lowest value corresponds to the case with the lowest MLH1 foci count in autosomal SCs. This result corroborates our previous observation of a correlation between the frequency of cells with an MLH1 focus in the XY pair and the total number of autosomal crossover foci per cell (Codina-Pascual *et al.*, 2005).

It is known that at least one crossover event must occur in each SC to ensure its proper meiotic segregation, and that reduced crossing over frequency may increase the risk of univalents at metaphase I (reviewed in (Egozcue *et al.*, 2000) and of chromosome aneuploidy (reviewed in (Hassold and Hunt, 2001)). According to the results, the XY pair and bivalent 21 would be the most prone to become achiasmate, followed by bivalents 22, 19 and 18, in decreasing order (Table IV). This observation is consistent with the most frequently observed chromosome aneuploidies in sperm nuclei of normal men, i.e., disomies of sex chromosomes and of chromosomes 21 and 22 (reviewed in (Templado *et al.*, 2005)). Chromosomes 19 and 18 have been described to be involved in univalency in a study in which multiplex-FISH was applied on male meiotic divisions (Sarrate *et al.*, 2004). Increased chromosome 19 aneuploidy has also been described in female meiosis (Clyde *et al.*, 2003; Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2004). This is consistent with studies in which reduced recombination is found in disomic 24,XY sperm heads (Shi *et al.*, 2001) and in cases of paternally derived trisomy 21 (Savage *et al.*, 1998) and 47,XXY (Hassold *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 2000). However, it is worth noting that the frequencies of aneuploidy in human sperm observed for sex chromosomes and chromosomes 21, 22, 19 and 18 are lower than the frequencies of these SCs with no MLH1 focus. Bivalents without a crossover event may induce a meiotic arrest before first meiotic division and do not proceed as univalents. However, a reduced number of them may avoid the meiotic checkpoints and result in aneuploidy.



Finally, the fact that the C6 case, with a low crossover frequency, displays a higher incidence of small SCs without an MLH1 focus in one or both arms than the C7 suggests that the C6 may have a higher risk of missegregation of small bivalents than the C7.

### **MLH1 foci distribution**

The distribution of foci on each autosomal SC has been analyzed (Figure 5a). MLH1 foci have been seen at all locations along the 22 autosomal SCs except at centromeres. This indicates that, at the resolution obtained using MLH1 immunocytogenetics (aprox. 10Mb) (Lynn *et al.*, 2004), almost any region of the genome is a possible target for crossing over. However, MLH1 foci are preferentially located at the subtelomere regions of all SCs, which seem to be the hottest recombination areas in the genome.

The two cases analyzed display similar distributions of hot and cold recombination regions in the SC set, in spite of the difference in the mean number of MLH1 foci per cell. Similar distributions have also been observed in three infertile cases (data not shown). However, particular differences have been detected between the C6 and the C7. A higher number of MLH1 foci in a specific SC arm (C7) makes the distal MLH1 focus be closer to the telomere, while the proximal or medial parts become a little more prone to present an MLH1 focus. As an example, the SC8 in C6 generally shows two MLH1 foci (a mean of 1.90 MLH1 foci), whereas in C7 it can have two or three MLH1 foci (a mean of 2.35 MLH1 foci). Therefore, MLH1 distribution for SC8 in C7 resembles a tri-modal profile and in C6 a bimodal one (Figure 6a). However, the distribution of MLH1 foci in SC8s with the same number of foci is similar in both cases (Figure 6b). This is also true for other SCs. Therefore, despite the variability observed in the localization of MLH1 foci along the SC length, the MLH1 foci distribute in each SC following a similar pattern in different individuals.

### **MLH1 interfoci distances**

The non-random localization of MLH1 foci in the SC set corroborates the existence of positive interference between foci observed in previous studies in humans (Barlow and Hultén, 1998; Lynn *et al.*, 2002; Tease *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2004b). MLH1 interfoci distance is expressed as the distance between two adjacent MLH1 foci in percentage of SC length. Mean interfoci distances for each SC with different numbers of MLH1 foci are shown (Figure 5b). Briefly: a) When two MLH1 foci are present in different arms within the SC (trans-centromere interfoci distance), these foci appear separated by a mean distance equivalent to about 70% of the SC length. In acrocentric SCs this is not a frequent situation, but when it occurs the trans-centromere interfoci distance is about 87%. b) When two MLH1 foci are located in the same arm (intra-arm interfoci distance), which is usually the q arm, the mean distance between foci is 38% (a range from about 25% to 50%). For acrocentric SCs this intra-arm interfoci distance increases to 57%. c) When three MLH1 foci are placed in an SC, the mean trans-centromere interfoci distance between two foci decreases to around 50%, and the intra-arm interfoci distance to about 33% of the SC length. When it occurs in acrocentric SCs, the mean

trans-centromere interfoci distance reduces to about 38% and the intra-arm interfoci distance to about 42% of the SC length. d) When four MLH1 foci are present in an SC (groups A, B and C, except SC8 and SC10), the trans-centromere interfoci distance is reduced to about 33% of the SC length, and the intra-arm interfoci distance to about 25%. Thus, MLH1 interfoci distance has been observed to be dependent on the number of MLH1 foci and on their localization within the SC, as previously described (Sun *et al.*, 2004b). However, it is herein shown that acrocentric SCs display different interfoci distances compared to the non-acrocentric SCs.

The mean MLH1 interfoci distance comparison between SC1 and SC22 indicates that in terms of physical distance long chromosomes display more MLH1 interference than the short ones (10 $\mu$ m and 3 $\mu$ m, respectively), in agreement with previous observations in yeast (Kaback *et al.*, 1999). However, our results demonstrate that when interfoci distance is expressed in terms of distance relative to the SC length, this relationship is inverted (37.3% and 59%, respectively). This effect is also observed when comparing between individuals with long (C7) and short (C6) SCs. For a given SC with the specific number of MLH1 foci, the C7 displays higher MLH1 interfoci distance in terms of physical length than the C6, but lower interfoci distance when considered as a percentage of the SC length. This could indicate that the intensity of interference between crossovers may be expressed as physical distance ( $\mu$ m) between foci but it might be modulated by the total length of the SC.

### **How may MLH1 foci distribute along the SC?**

In the present study, the results from MLH1 distribution confirm that subtelomeric SC regions are hot regions for crossovers. As mentioned before, it is known that adjacent crossovers (i.e. MLH1 foci) are evenly spaced and that they display positive interference (Barlow and Hultén, 1998; Lynn *et al.*, 2002; Tease *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2004b). A general idea for how interference works is that a crossover generates some crossover-discouraging signal or substance which is spread for some distance along the chromosome. Several models have been proposed to explain how crossover interference acts. The counting model (Foss *et al.*, 1993) proposes that each crossover is separated by a fixed number of non-crossover events, suggesting that cells may be able to “count” recombination events. Recently, a new model based on mechanical forces has been proposed (Börner *et al.*, 2004; Kleckner *et al.*, 2004). This model suggests that meiotic chromosomes are under stress and that this stress is relieved at the crossover sites. Each crossover nucleation site spreads the stress release preventing the formation of a new crossover nearby (i.e. creating positive interference). A new crossover will occur only in places where the stress relief does not arrive and stress is accumulated.

In yeast, sites of crossing over have been reported to coincide with places of synaptonemal complex initiation (SIC) (Fung *et al.*, 2004) suggesting that crossovers may directly promote the nucleation and spreading of the SC (Börner *et al.*, 2004). Recently, it has been reported that in human males synapsis initiates at a limited number of subtelomeric SC sites and that it proceeds towards the centromere (Brown *et al.*, 2005). All this data together with that

presented in the present study suggest that in humans the first crossovers to be designated in the crossover / non-crossover decision would be those in the subtelomeric regions where SC nucleation initiates. These first established crossovers would display interference. In direction towards the centromere, a new crossover would be positioned in the arm if it was long enough. This new crossover would consequently display interference, allowing the designation of an additional crossover in the same arm, but only if there was enough length. This might occur independently in both arms in metacentric and submetacentric SCs, as does the initiation of synapsis (Brown *et al.*, 2005). If the arm length is not sufficient to place another crossover interference would reach the centromere region. At the centromere, the interference coming from both sides of the SC would coincide, preventing the appearance of a new crossover in between. Therefore, trans-centromere interference would result from the sum of interference distances between the proximal crossovers in each arm and the centromere. Indeed, the interfoci distances in the present study and in previous ones (Laurie and Hultén, 1985b; Sun *et al.*, 2004b) show that trans-centromere interference is higher than intra-arm interference.

However, the centromere itself may not directly interfere with crossing over, because sometimes MLH1 foci have been observed close to the centromere (e.g., large acrocentric SCs). It has been recently reported that the synapsis of acrocentric SCs starts at the q arms, but not at the p arms (Brown *et al.*, 2005). According to this observation MLH1 foci interference in acrocentric SCs would only proceed from one side of the SC (i.e the q arm) towards the centromere. At the centromere region, interference would not coincide with any other one coming from the short arm and would allow the appearance of a new crossover close to the centromere in the q arm or in the p arm, if the distance of interference overpasses the centromere region, (Figure 5a acrocentric SCs).

In summary, the stM-FISH assay allowed for the individual identification of all SCs and the unequivocal characterization of SC1p and SC1q arms. It is herein demonstrated that SC1p arms are longer than SC1q and that p and q arms may independently vary their relative length according to their GC and gene content. In addition, we suggest that the variation in the SC length might be an expression of the amount of open and of compact chromatin fibers present in the region.

MLH1 interfoci distances are similar for all SCs with a specific number of MLH1 foci when expressed as a means of percentage of their SC length. However, large SCs tend to show a higher mean MLH1 interfoci distance than the small ones only in terms of physical length, but not in distance relative to the SC. This indicates that interference would modulate its intensity according to the SC length.

Hot recombination regions are mainly located in distal parts of the SCs, with no differences between metacentric or submetacentric SCs. In acrocentric SCs subcentromere regions are also highly recombinant, indicating that, although MLH1 transcentromere interfoci distances

## Resultats

are greater, the centromere does not create a direct negative effect on the localization of MLH1 foci.

The main differences observed between the individual with a low crossover frequency and the one with a high one are: shorter SCs, total absence of MLH1 focus in the p arm of acrocentric SCs, reduced frequency of XY pairs with an MLH1 focus, more SC19, SC22 and p arms of short SCs without MLH1 foci, and, finally, proximal-medial SC arm regions less prone to crossover.

The XY pair and SC21 are the bivalents that most frequently lack an MLH1 focus, consistent with the highest incidences of aneuploidy found in sperm nuclei for these chromosomes. Finally, reduction in the general crossover frequency may increase the incidence of other achiasmate bivalents. Therefore, interindividual variation in the crossover frequency could explain the variability described for chromosome aneuploidies in human sperm.

## Acknowledgments

We thank C. Abad, O. Arango, S. Egozcue, F. García and J. Sarquella for providing samples, Drs. C. Heyting and W. Earnshaw for SCP1, SCP3 antibodies and CREST serum, respectively, and Dr. C. Fauth for providing stM-FISH DNA pools. We also thank M. Oliver-Bonet for her critical reading of the manuscript. MCP was a recipient of a grant of the Generalitat de Catalunya (2001FI00468). This study was supported by the Fondo Investigación Sanitaria (Madrid) (Project PI020258), the Generalitat de Catalunya (Project 2005 SGR 00495) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SP 460/4-1).

## REFERENCES

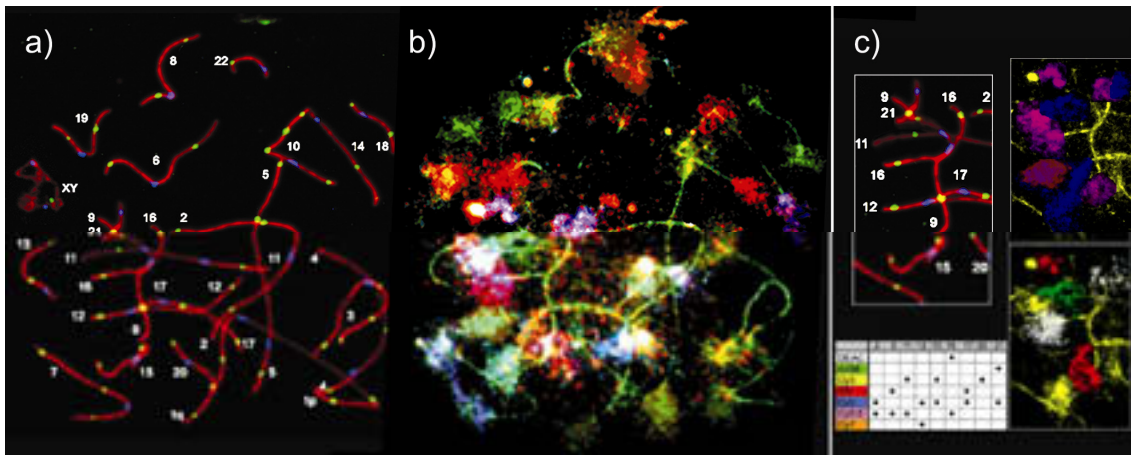
- Baker SM, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC, Yao X, Christie D-M, Monell C, Arnheim N, Bradley A, Ashley T and Liksay RM (1996) Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nature Genetics* 13,336-342
- Barlow AL and Hultén MA (1998) Crossing over analysis at pachytene in man. *Eur J Hum Genet* 6,350-358
- Baudat F, Manova K, Yuen JP, Jasin M and Keeney S (2000) Chromosome Synapsis Defects and Sexually Dimorphic Meiotic Progression in Mice Lacking Spo11. *Molecular Cell* 6,989-998
- Blat Y, Protacio RU, Hunter N and Kleckner N (2002) Physical and functional interactions among basic chromosome organizational features govern early steps of meiotic chiasma formation. *Cell* 111,791-802
- Börner GV, Kleckner N and Hunter N (2004) Crossover/Noncrossover Differentiation, Synaptonemal Complex Formation, and Regulatory Surveillance at the Leptotene/Zygotene Transition of Meiosis. *Cell* 117,29-45
- Broman KW and Weber JL (2000) Characterization of human crossover interference. *Am J Hum Genet* 66,1911-1926

- Brown PW, Judis L, Chan ER, Schwartz S, Seftel A, Thomas A and Hassold TJ (2005) Meiotic Synapsis Proceeds from a Limited Number of Subtelomeric Sites in the Human Male. *Am J Hum Genet* 77,556-566
- Clyde JM, Hogg JE, Rutherford AJ and Picton HM (2003) Karyotyping of human metaphase II oocytes by multifluor fluorescence in situ hybridization. *Fertility and Sterility* 80,1003-1011
- Codina-Pascual M, Kraus J, Speicher M, Oliver-Bonet M, Murcia V, Sarquella J, Egozcue J, Navarro J and Benet J (2004) Characterization of all human male synaptonemal complexes by subtelomere multiplex-FISH. *Cytogenet Genome Res* 107,18-21
- Codina-Pascual M, Oliver-Bonet M, Navarro J, Campillo M, Garcia F, Egozcue S, Abad C, Egozcue J and Benet J (2005) Synapsis and meiotic recombination analyses: MLH1 focus in the XY pair as an indicator. *Hum. Reprod.* 20,2133-2139
- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F and Egozcue J (2000) Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 6,93-105
- Fauth C, Zhang H, Harabacz S, Brown J, Saracoglu K, Lederer G, Rittinger O, Rost I, Eils R, Kearney L and Speicher MR (2001) A new strategy for the detection of subtelomeric rearrangements. *Hum Genet* 109,576-583
- Foss E, Lande R, Stahl FW and Steinberg CM (1993) Chiasma Interference as a Function of Genetic Distance. *Genetics* 133,681-691
- Fung JC, Rockmill B, Odell M and Roeder GS (2004) Imposition of crossover interference through the nonrandom distribution of synapsis initiation complexes. *Cell* 116,795-802
- Gilbert N, Boyle S, Fiegler H, Woodfine K, Carter NP and Bickmore WA (2004) Chromatin Architecture of the Human Genome: Gene-Rich Domains Are Enriched in Open Chromatin Fibers. *Cell* 118,555-566
- Gutiérrez-Mateo C, Benet J, Wells D, Colls P, Bermudez MG, Sanchez-Garcia JF, Egozcue J, Navarro J and Munne S (2004) Aneuploidy study of human oocytes first polar body comparative genomic hybridization and metaphase II fluorescence in situ hybridization analysis. *Hum. Reprod.* 19,2859-2868
- Hassold T and Hunt PA (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2,280-290
- Hassold TJ, Judis L, Chan ER, Schwartz S, Seftel A and Lynn A (2004) Cytological studies of meiotic recombination in human males. *Cytogenet Cell Genet* 107,249-255
- Hassold TJ, Sherman SL, Pettay D, Page DC and Jacobs PA (1991) XY chromosome nondisjunction in man is associated with diminished recombination in the pseudoautosomal region. *Am J Hum Genet* 49,253-260
- Holmquist GP (1992) Chromosome bands, their chromatin flavors, and their functional features. *Am J Hum Genet* 51,17-37
- Hultén MA (1974) Chiasma distribution at diakinesis in the normal human male. *Hereditas* 76,55-78

## Resultats

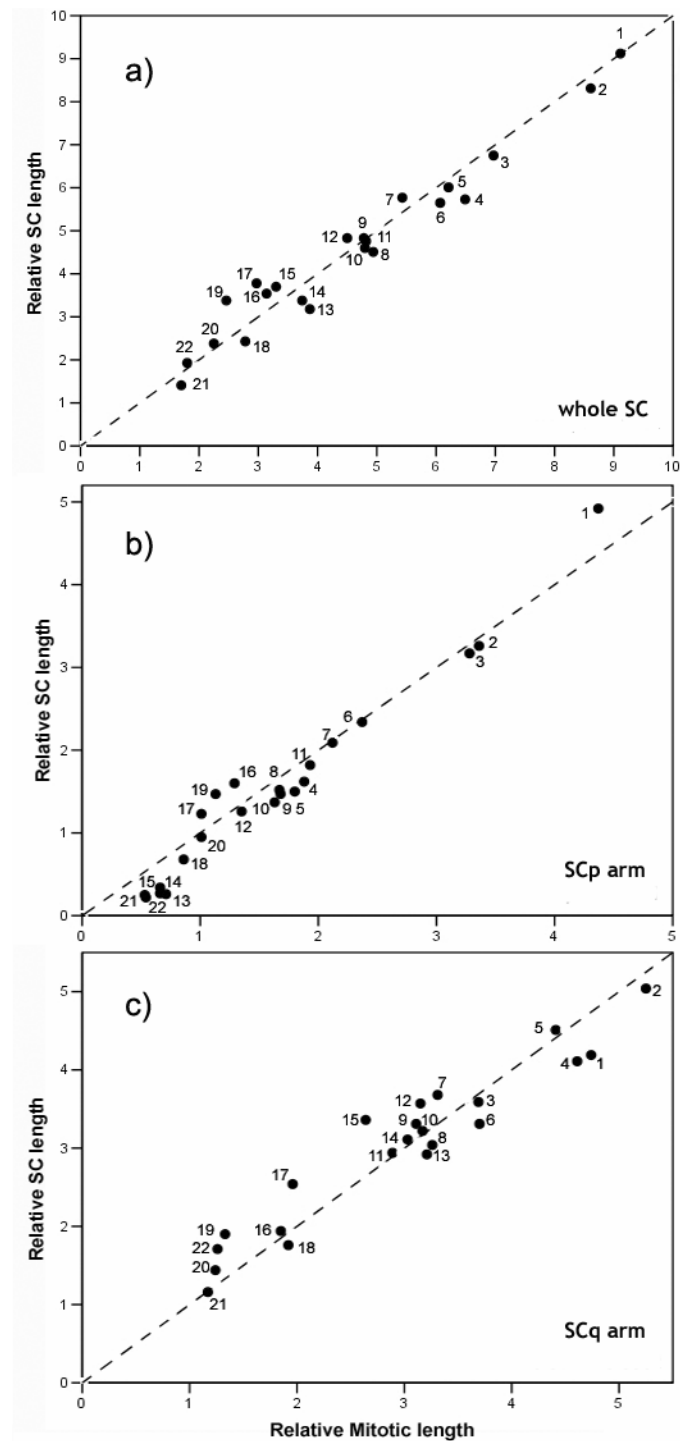
- Hunter N and Kleckner N (2001) The Single-End Invasion: An Asymmetric Intermediate at the Double-Strand Break to Double-Holliday Junction Transition of Meiotic Recombination. *Cell* 106,59-70
- International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1985). An international system for human cytogenetic nomenclature. Birth defects original article series. D. G. Harnden and H. P. Klinger. New York, S. Karger. 21.
- Kaback DB, Barber D, Mahon J, Lamb J and You J (1999) Chromosome Size-Dependent Control of Meiotic Reciprocal Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*: The Role of Crossover Interference. *Genetics* 152,1475-1486
- Kleckner N, Zickler D, Jones GH, Dekker J, Padmore R, Henle J and Hutchinson J (2004) A mechanical basis for chromosome function. *PNAS* 101,12592-12597
- Kong A, Gudbjartsson DF, Sainz J, Jonsdottir GM, Gudjonsson SA, Richardsson B, Sigurdardottir S, Barnard J, Hallbeck B, Masson G, Shlien A, Palsson ST, Frigge ML, Thorgeirsson TE, Gulcher JR and Stefansson K (2002) A high-resolution recombination map of the human genome. *Nat Genet* 31,241-247
- Lammers JHM, Offenbergh HH, van Aalderen M, Vink ACG, Dietrich AJJ and Heyting C (1994) The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol* 14,1137-1146
- Laurie DA and Hultén MA (1985a) Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. *Ann Hum Genet* 49,189-201
- Laurie DA and Hultén MA (1985b) Further studies on chiasma distribution and interference in the human male. *Ann Hum Genet* 49,203-214
- Lynn A, Ashley T and Hassold T (2004) Variation in human meiotic recombination. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5,317-349
- Lynn A, Koehler KE, Judis L, Chan ER, Cherry JP, Schwartz S, Seftel A, Hunt PA and Hassold TJ (2002) Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates. *Science* 296,2222-2225
- Mahadevaiah SK, Turner JMA, Baudat F, Rogakou EP, Boer Pd, Blanco-Rodríguez J, Jasin M, Keeney S, Bonner WM and Burgoyne PS (2001) Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* 27,271-276
- Matise TC, Sachidanandam R, Clark AG, Kruglyak L, Wijsman E, Kakol J, Buyske S, Chui B, Cohen P, de Toma C, Ehm M, Glanowski S, He C, Heil J, Markianos K, McMullen I, Pericak-Vance MA, Silbergleit A, Stein L, Wagner M, Wilson AF, Winick JD, Winn-Deen ES, Yamashiro CT, Cann HM, Lai E and Holden AL (2003) A 3.9-centimorgan-resolution human single-nucleotide polymorphism linkage map and screening set. *Am J Hum Genet* 73,271-284
- Meuwissen RL, Offenbergh HH, Dietrich AJ, Riesewijk A, van Iersel M and Heyting C (1992) A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J* 11,5091-5100

- Oliver-Bonet M, Liehr T, Nietzel A, Heller A, Starke H, Claussen U, Codina-Pascual M, Pujol A, Abad C, Egozcue J, Navarro J and Benet J (2003) Karyotyping of human synaptonemal complexes by cenM-FISH. *Eur J Hum Genet* 11,879-883
- Oliver-Bonet M, Turek PJ, Sun F, Ko E and Martin RH (2005) Temporal progression of recombination in human males. *Mol. Hum. Reprod.* 11,517-522
- Roig I, Liebe B, Egozcue J, Cabero L, Garcia M and 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
- Romanienko PJ and Camerini-Otero RD (2000) The Mouse Spo11 Gene Is Required for Meiotic Chromosome Synapsis. *Molecular Cell* 6,975-987
- Sarrate Z, Blanco J, Egozcue S, Vidal F and Egozcue J (2004) Identification of meiotic anomalies with multiplex fluorescence in situ hybridization: Preliminary results. *Fertility and Sterility* 82,712-717
- Savage A, Petersen M, Pettay D, Taft L, Allran K, Freeman S, Karadima G, Avramopoulos D, Torfs C, Mikkelsen M, Hassold T and Sherman S (1998) Elucidating the mechanisms of paternal non-disjunction of chromosome 21 in humans. *Hum. Mol. Genet.* 7,1221-1227
- Shi Q, Spriggs E, Field L, Ko E, Barclay L and Martin RH (2001) Single sperm typing demonstrates that reduced recombination is associated with the production of aneuploid 24,XY human sperm. *Am J Med Genet* 99,34-38
- Stack SM (1984) Heterochromatin, the synaptonemal complex and crossing over. *J Cell Sci* 71,159-176
- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Ko E, Rademaker AW, Navarro J, Benet J and Martin RH (2004) Human male recombination maps for individual chromosomes. *Am J Hum Genet* 74,521-531
- Sun F, Trpkov K, Rademaker AW, Ko E and Martin RH (2005) Variation in meiotic recombination frequencies among human males. *Hum Genet* 116,172-178
- Svetlanov A and Cohen PE (2004) Mismatch repair proteins, meiosis, and mice: understanding the complexities of mammalian meiosis. *Exp Cell Res* 296,71-79
- Tease C, Hartshorne GM and Hultén MA (2002) Patterns of meiotic recombination in human fetal oocytes. *Am J Hum Genet* 70,1469-1479
- Templado C, Bosch M and Benet J (2005) Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 111,199-205
- Thomas NS, Collins AR, Hassold TJ and Jacobs PA (2000) A reinvestigation of non-disjunction resulting in 47,XXY males of paternal origin. *Eur J Hum Genet* 8,805-808
- Venter CJ, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA and al e (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291,1304-1351
- Yokota H, Singer MJ, van den Engh GJ and Trask BJ (1997) Regional differences in the compaction of chromatin in human G0/G1 interphase nuclei. *Chromosome Research* 5,157-166

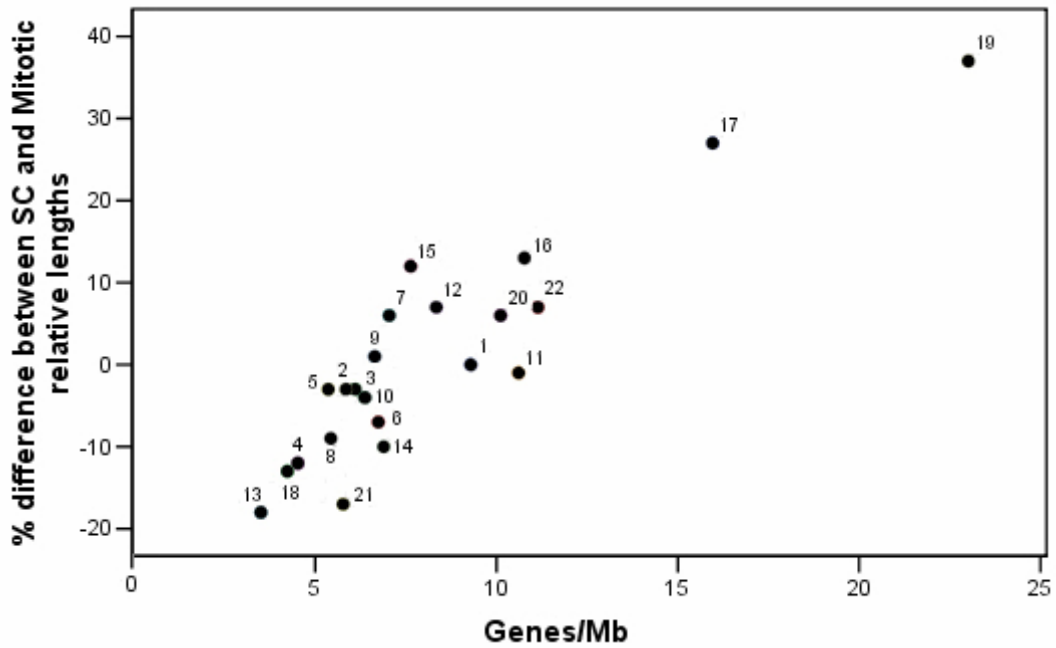


**Figure 1** a) Human pachytene spermatocyte with all SCs identified. SCs are immunolabeled in red, centromeres in blue and MLH1 foci in yellow. b) Corresponding composite stM-FISH image. c) Example of identification of overlapped SCs. Detail of the overlapped SC (*upper left*). DEAC, Alexa488, Cy3 and TexasRed channels (*lower right*) are shown separately from Cy5, Cy5.5 and Cy7 (*upper right*). Color combination for each SC is shown in the scheme table (*lower left*).

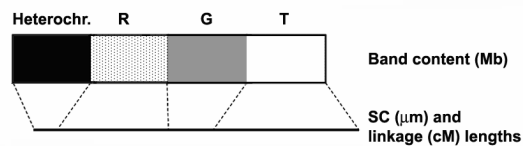




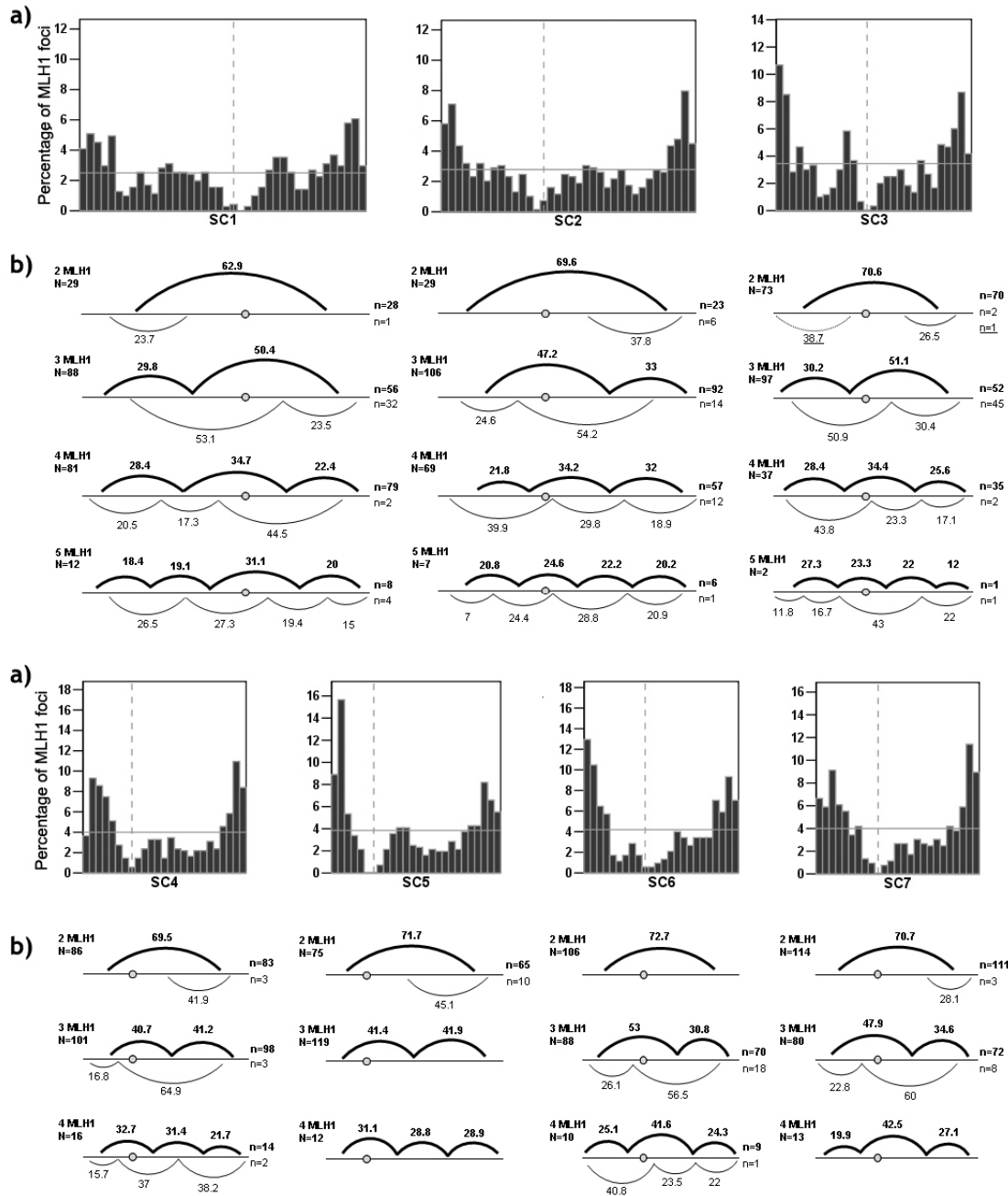
**Figure 2** SC and mitotic relative length (ISCN 1985) scatterplots for individual SCs when the whole SC (a), SCp arm (b) and SCq arm (c) are considered ( $P < 0.0001$ ;  $r^2 = 0.96$ ,  $r^2 = 0.96$  and  $r^2 = 0.92$ , respectively). The diagonal lines ( $r^2 = 1$ ) correspond to a 1:1 relation between SC and mitotic relative lengths. Values over this line indicate SC > mitotic; values close to the line indicate SC  $\approx$  mitotic; values under the line indicate SC < mitotic.



**Figure 3** Scatterplot between the variation of SC relative length and gene density for individual SCs (Ensembl genes/Mb). The variation of the SC length is expressed as the percentage of difference between SC and mitotic relative lengths (% difference = [(relative SC length/relative mitotic chromosome length)-1] x 100). ( $P < 0.0001$ ;  $r^2 = 0.8$ )

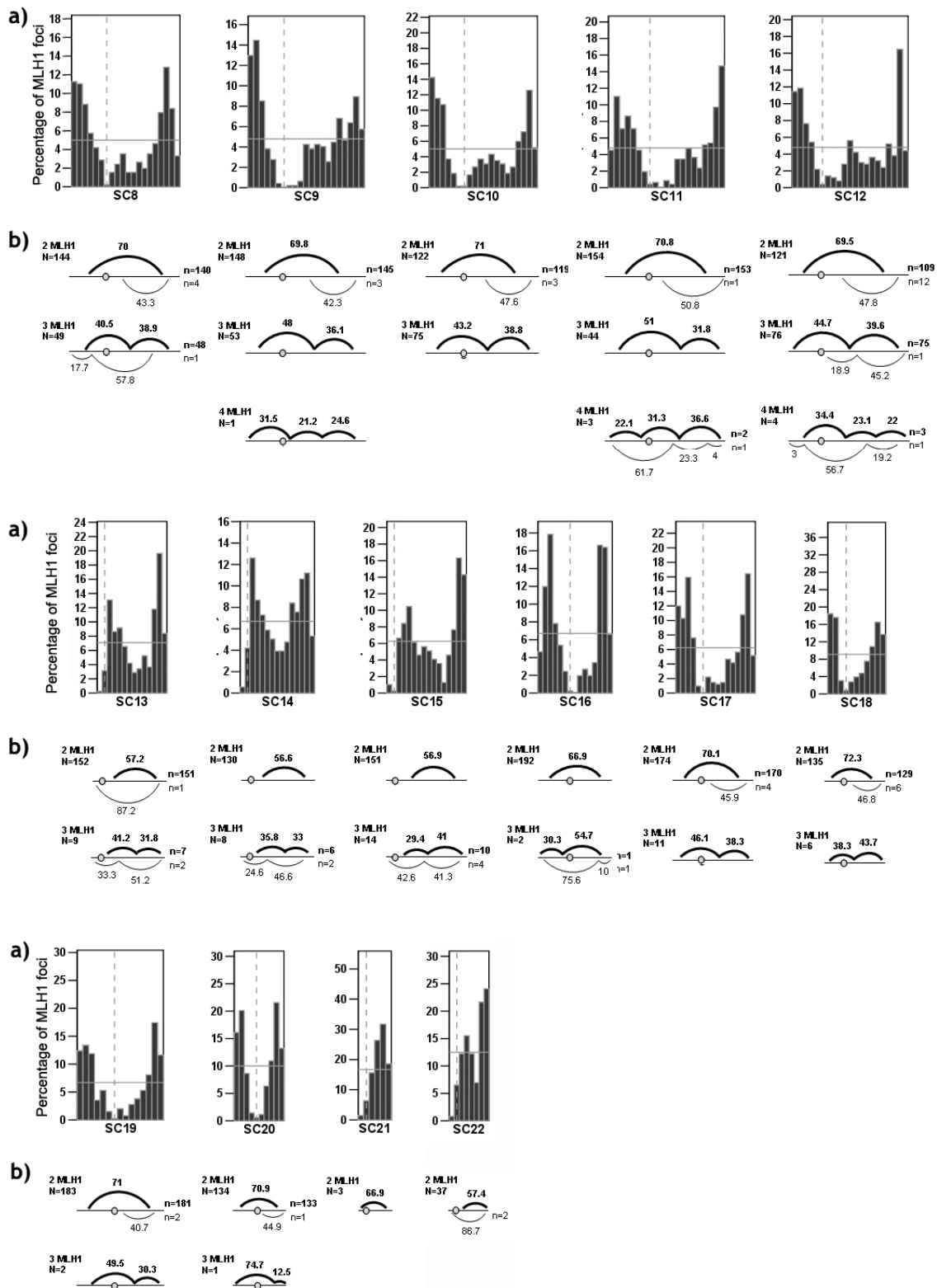


**Figure 4** Model for band content, SC and linkage lengths (Mb,  $\mu\text{m}$ , cM) of bands with different base-composition (adapted from Holmquist 1992).

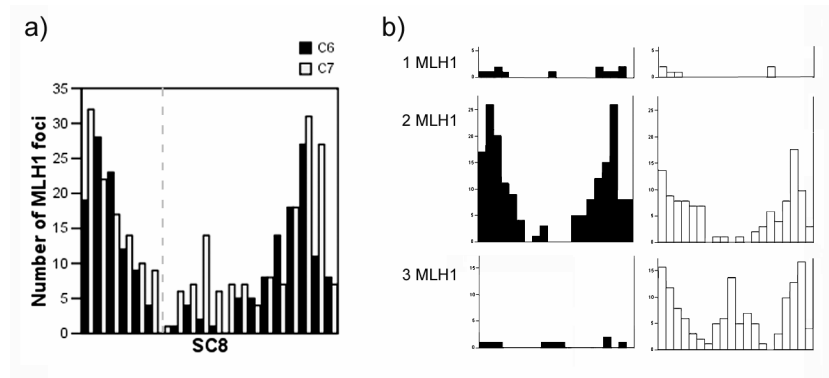


**Figure 5** a) General MLH1 distribution for individual SC is shown. Bars represent SC divisions of 0.7µm approximately. Bars indicate the probability of a single MLH1 focus to be placed in the region. The percentage of SCs that have an MLH1 focus in the region results from the product of each bar value and the mean of MLH1 foci in the SC (Table III). Centromere position is shown by the discontinuous vertical line. The horizontal line indicates the equal-probability line for which all MLH1 observed in a SC would be distributed at random. MLH1 distributions over this line indicate hot recombination regions while conversely, distributions under the line correspond to cold recombination regions. b) Detailed distribution of the MLH1 foci in the SC and mean interfoci distances between adjacent foci are graphically presented for individual SCs. They are shown separately according to the

## Resultats



number of MLH1 foci. Distances between MLH1 foci are expressed as a percentage of SC length. The bold line indicates the most frequent distribution of the MLH1 foci in the SC. The thin line indicates the least frequent distribution of the MLH1 foci in the SC.



**Figure 6** a) Overall MLH1 distributions for SC8 in the two cases, displaying the lowest and the highest meiotic recombination frequency, respectively. b) MLH1 distributions for SC8 presenting different numbers of recombination foci.

**Table I:** MLH1 foci number and autosomal SC length in pachytene spermatocytes

Case	Cells	MLH1 in autosomes			MLH1 per cell			MLH1 in XY
	N	Mean	SD	MLH1/10 $\mu$ m	Mean	SD	Range	% cells
C6	105	42	3.8	1.53	42.6	3.9	32-52	62.9
C7	108	52.2	5.6	1.54	53	5.7	35-63	74.1
Total/Mean	213	47.1		1.53	47.8		32-63	68.5

## Resultats

**Table II:** Lengths for each autosomal SC

SC	Absolute SC length (µm)				Relative SC length (%)		SC Centromere Index		Mitotic chromosome	
	C6		C7		Cases Mean	SD	Cases Mean	SD	Relative length	Centromere index
	Mean	SD	Mean	SD						
1	23.76	3.35	29.61	4.20	9.12	0.56	0.54**	0.02	9.11	0.48
2	21.52	3.15	27.23	4.27	8.31	0.60	0.39	0.03	8.61	0.39
3	17.69	2.78	21.88	3.32	6.75	0.55	0.47	0.02	6.97	0.47
4	14.48	2.25	19.28	3.58	5.73**	0.56	0.28	0.03	6.49	0.28
5	15.42	2.31	19.90	3.46	6.01	0.53	0.25*	0.02	6.21	0.27
6	14.38	1.92	18.83	3.59	5.65*	0.50	0.41**	0.03	6.07	0.38
7	15.19	2.41	18.62	2.82	5.77*	0.51	0.36	0.03	5.43	0.37
8	11.68	1.58	14.77	2.23	4.51**	0.35	0.33	0.02	4.94	0.33
9	12.55	1.64	15.79	2.91	4.83	0.46	0.31	0.03	4.78	0.33
10	12.12	1.66	14.79	2.33	4.60	0.33	0.30**	0.02	4.8	0.32
11	12.62	2.04	15.23	2.38	4.76	0.42	0.38*	0.02	4.82	0.41
12	12.67	1.81	15.65	2.88	4.83*	0.40	0.26	0.02	4.5	0.27
13	8.30	1.03	10.33	1.40	3.18**	0.21	0.08**	0.02	3.87	0.17
14	8.91	1.21	10.85	1.61	3.38**	0.25	0.08**	0.02	3.74	0.18
15	9.89	1.38	11.70	1.77	3.70**	0.30	0.09**	0.02	3.3	0.18
16	9.60	1.20	11.06	1.69	3.54**	0.27	0.45*	0.02	3.14	0.43
17	10.20	1.13	11.77	1.61	3.78**	0.31	0.33	0.03	2.97	0.32
18	6.41	0.74	7.80	0.97	2.43**	0.15	0.28	0.02	2.78	0.27
19	9.21	1.04	10.42	1.41	3.38**	0.30	0.44	0.02	2.46	0.45
20	6.45	0.70	7.43	0.86	2.38*	0.18	0.40**	0.03	2.25	0.46
21	3.57	0.40	4.66	0.58	1.41**	0.14	0.18**	0.05	1.7	0.29
22	5.26	0.59	5.96	0.73	1.93*	0.17	0.11**	0.02	1.8	0.28
Total	261.9		323.6							

Relative SC length = (SC length / total length of SC set)x100

Relative SC lengths and centromere indexes were compared to the mitotic values in the ISCN 1985.

\*P<0.05. \*\*P<0.001

**Table III:** Average number of MLH1 foci in each autosomal SC from the two cases

CS	N	MLH1 foci									Map Units (cM)
		p arm			q arm			Bivalent			
		Mean	SD	Range	Mean	SD	Range	Mean	SD	Range	
1	212	1.76	0.56	0-4	1.58	0.54	0-3	3.34	0.83	1-6	167.2
2	213	1.34	0.55	0-3	1.90	0.52	0-3	3.23	0.76	1-5	161.7
3	213	1.41	0.54	0-3	1.40	0.55	0-3	2.81	0.77	1-5	140.6
4	212	0.98	0.26	0-2	1.60	0.63	0-3	2.58	0.69	1-4	129.2
5	212	0.94	0.26	0-2	1.71	0.58	0-3	2.65	0.63	1-4	132.3
6	213	1.11	0.36	0-2	1.35	0.54	0-3	2.46	0.66	1-4	123.2
7	213	1.07	0.36	0-2	1.40	0.51	0-2	2.47	0.66	1-4	123.5
8	213	0.93	0.27	0-2	1.19	0.51	0-2	2.13	0.58	0-3	106.3
9	213	0.95	0.22	0-1	1.26	0.48	0-3	2.21	0.53	1-4	110.3
10	213	0.96	0.19	0-1	1.31	0.57	0-2	2.28	0.59	1-3	113.8
11	212	0.99	0.17	0-2	1.19	0.49	0-3	2.18	0.53	1-4	109.2
12	213	0.90	0.31	0-2	1.44	0.56	0-3	2.34	0.61	1-4	116.9
13	213	0.01	0.12	0-1	1.78	0.50	0-3	1.79	0.51	0-3	89.7
14	213	0.01	0.10	0-1	1.67	0.55	0-3	1.68	0.56	0-3	83.8
15	213	0.02	0.14	0-1	1.82	0.49	1-3	1.84	0.52	1-3	92.0
16	213	0.97	0.20	0-2	0.95	0.23	0-2	1.92	0.30	1-3	96.0
17	212	0.90	0.30	0-1	1.02	0.34	0-2	1.92	0.42	1-3	96.2
18	213	0.66	0.48	0-1	1.02	0.30	0-2	1.68	0.54	0-3	84.0
19	213	0.89	0.31	0-1	0.97	0.26	0-2	1.86	0.42	0-3	93.0
20	213	0.76	0.43	0-1	0.88	0.36	0-2	1.63	0.50	0-3	81.7
21	213	0.01	0.12	0-1	0.95	0.21	0-1	0.97	0.25	0-2	48.4
22	213	0.01	0.10	0-1	1.14	0.41	0-1	1.15	0.42	0-2	57.5
Total	4.681							47.13			2352

**Table IV:** Percentage of SC with no MLH1

Case	SC							
	8	13	14	18	19	20	21	22
C6	0.95	0.95	0.95	1.9	3.81	0.95	4.76	3.81
C7	0.93		0.93				4.63	0.93

**Annex: Results obtained from the analysis of the three infertile men (OTA7, AZO2 and AZO3) and discussion. Detailed tables for the two controls and three infertile men are shown.**

All data shown in this annex was included in a former manuscript but, as no significant differences were observed between these three infertile men and the two controls, reviewers suggested to remove this part from the manuscript and to focus on the differences detected between the two controls. However, we think this data provides further evidence of what has been observed in controls; therefore, we have included it as an annex

### **SC lengths**

The length of each SC identified was measured and expressed as a mean of absolute ( $\mu\text{m}$ ) and relative (%) lengths. Absolute SC lengths for the SC set and detailed for each autosomal SC are shown for the five cases analyzed (Tables 1 and 3, respectively). In the infertile cases, the absolute SC length also covariates to the mean number of meiotic recombination events in pachytene nuclei as observed for the two controls. Relative SC lengths showed no differences among the five individuals and correlated with their corresponding relative mitotic lengths (International System for Human Cytogenetic Nomenclature, 1985).

As observed for the control cases, more than 80% of SC1 presented the SC1p arm longer than the SC1q in all three infertile cases analyzed. This corroborates the idea proposed for controls in which, for a given SC, the variation in length in one arm is independent of the variation in the other one. This variation occurs according to the GC content and gene density of the arm and may be an expression of the amount of open and of compact chromatin fibers present in the region.

### **MLH1 count**

The mean number of MLH1 foci per pachytene nucleus obtained for the three infertile patients were within the range limited by the two controls (Table 1). The mean number of MLH1 foci per autosomal SC observed in all five cases is  $48.6 \pm 4.1$ , and ranges from  $42 \pm 3.8$  to  $52.2 \pm 5.6$ .

MLH1 foci for each identified autosomal SC were also scored. The observed MLH1 values in each SC were not significantly different between controls and infertile cases (Tables 4 and 5). As described for controls, autosomal SCs had, in general, at least one MLH1 focus. Due to the reduced number of cells analyzed for the infertile cases, only two SCs in OTA7 and AZO3 had no MLH1 foci. These two SCs corresponded to bivalents 14 and 22. Both bivalents were also observed without MLH1 focus in the two controls, and the SC22 was described as one of the most prone to become achiasmate together with the SC21, SC19, SC18 and the XY pair. The low incidence of SC14s without MLH1 focus observed in controls suggested that it might be due to MLH1 foci underscoring. However, the fact that one SC14 without MLH1 focus has also been observed in a low number of cells of one infertile man indicates that the absence of



## Resultats

MLH1 focus in the SC14 may not always be as a consequence of underscoring and that SC14 may also be more prone to be achiasmate than other autosomal SCs.

Evaluation of the localization of MLH1 foci within the 44 autosomal p and q arms was also carried out in the three infertile cases. As observed in controls, the presence of an MLH1 focus in the p arm of acrocentric bivalents was seldom seen, and only in cases with a high meiotic recombination rate (AZO2 and AZO3).

Usually, all non-acrocentric SCs had at least one MLH1 focus per arm. However, between 1% and 8% of each autosomal SC had none MLH1 foci in one of their arms.

Sometimes, the small non-acrocentric SCs of the infertile cases also lacked an MLH1 focus in its p arm, and the SC18p was the one with the highest incidence. As in controls, the lower is the crossover rate in an individual the higher is the number of small SCs without an MLH1 focus in one of the arms (e.g. SC18p arm without MLH1 focus: 26.7% in OTA7. 25% in AZO3 and 12% in AZO2).

The presence of an MLH1 focus in the XY pair was also analyzed in the three infertile cases (table 1). About 80% of the XY pairs had an MLH1 focus and corroborates the correlation between the frequency of cells with a recombination focus in the XY pair and the total number of autosomal crossover foci per cell previously described by Codina-Pascual et al. (2005).

### **MLH1 foci distribution**

The distribution of MLH1 foci along each autosomal SC observed for the three infertile cases show no difference to that for the two controls. This observation supports the idea that MLH1 foci are distributed along the SCs following a specific pattern. This pattern may be the best one to ensure the proper segregation of homologous chromosomes.

In summary, the main conclusions reported for the two control cases are corroborated by the results obtained in these three infertile cases. The analysis of MLH1 foci provides evidence that none of the infertility of these three infertile cases might be as a consequence of alterations in the process of crossing over.

## Detailed tables for all the five cases analyzed:

Table 1: MLH1 foci number and autosomal SC length in pachytene spermatocytes

Case	Cells	Autosomal SC length	MLH1 in autosomes			MLH1 per cell			MLH1 in XY
	N	$\mu\text{m}$	Mean	SD	MLH1/10 $\mu\text{m}$	Mean	SD	Range	%
C6	105	273.8	42	3.8	1.53	42.6	3.9	32-52	62.9
C7	108	338.3	52.2	5.6	1.54	53	5.7	35-63	74.1
OTA7	30	294.7	47.8	4.8	1.62	48.6	4.8	40-60	80
AZO2	25	291.8	51.9	3.7	1.78	52.7	3.7	41-58	88
AZO3	32	411.7	49.3	4.9	1.20	50.0	5	33-62	75
Total	300	322	48.6		1.53	49.4		32-63	76

Table 2 :Percentage of bivalents with no MLH1 focus

Case	8	13	14	18	19	20	21	22
	%	%	%	%	%	%	%	%
C6	0.95	0.95	0.95	1.90	3.81	0.95	4.76	3.81
C7	0.93		0.93				4.63	0.93
OTA7								3.33
AZO2								
AZO3				3.13				



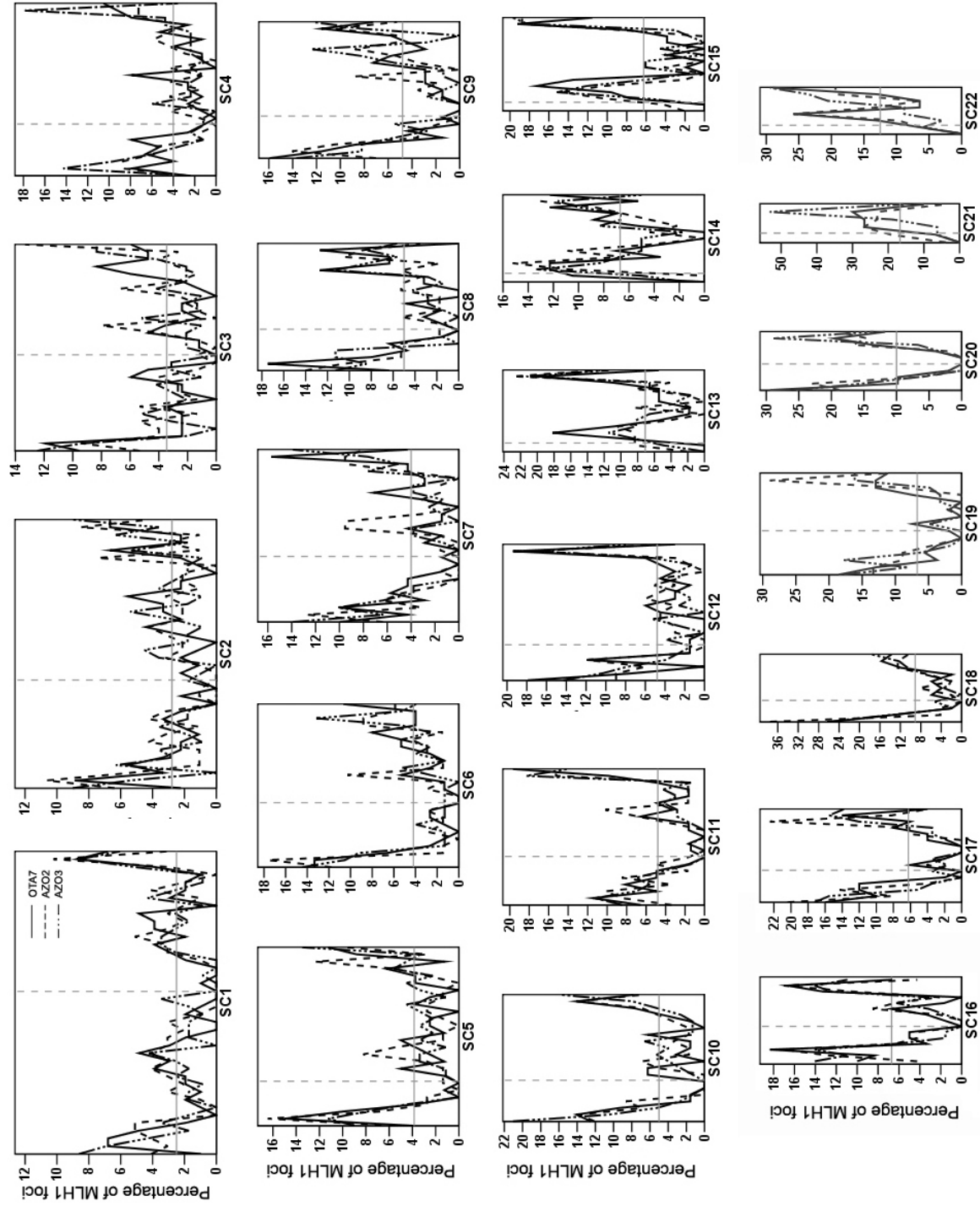
Table 4: MLH1 foci in each autosomal SC in the two control cases studied

SC	MLH1 foci																
	p Arm						q Arm						Bivalent		Map Units (cM)		
	C6	C7	Mean	SD	C6	C7	Mean	SD	C6	C7	Mean	SD	Range	Mean	SD	Range	Mean
1	105	107	1.54 ± 0.52	1.97 ± 0.52	1.38 ± 0.53	1.79 ± 0.48	2.92 ± 0.68	1.5	1.5	3.76 ± 0.76	1-6	146.2	187.9				
2	105	108	1.14 ± 0.43	1.53 ± 0.59	1.72 ± 0.51	2.06 ± 0.48	2.87 ± 0.59	1-4	1-4	3.59 ± 0.74	1-5	143.3	179.6				
3	105	108	1.23 ± 0.50	1.58 ± 0.51	1.18 ± 0.46	1.62 ± 0.54	2.41 ± 0.58	1-4	1-4	3.20 ± 0.73	2-5	120.5	160.2				
4	105	107	0.92 ± 0.27	1.04 ± 0.23	1.28 ± 0.51	1.93 ± 0.58	2.20 ± 0.58	1-3	1-3	2.96 ± 0.58	2-4	110.0	148.1				
5	105	107	0.91 ± 0.28	0.96 ± 0.23	1.43 ± 0.53	1.99 ± 0.49	2.34 ± 0.57	1-3	1-3	2.94 ± 0.55	1-4	117.1	147.2				
6	105	108	1.07 ± 0.29	1.16 ± 0.41	1.05 ± 0.38	1.65 ± 0.52	2.11 ± 0.49	1-4	1-4	2.81 ± 0.62	1-4	105.7	140.3				
7	105	108	0.96 ± 0.24	1.17 ± 0.42	1.13 ± 0.37	1.67 ± 0.49	2.10 ± 0.43	1-3	1-3	2.83 ± 0.63	1-4	104.8	141.7				
8	105	108	0.90 ± 0.29	0.96 ± 0.23	0.99 ± 0.33	1.39 ± 0.58	1.90 ± 0.41	0-3	0-3	2.35 ± 0.63	0-3	94.8	117.6				
9	105	108	0.94 ± 0.23	0.95 ± 0.21	1.12 ± 0.33	1.39 ± 0.56	2.07 ± 0.40	1-3	1-3	2.34 ± 0.60	1-4	103.3	117.1				
10	105	108	0.96 ± 0.19	0.96 ± 0.19	1.05 ± 0.40	1.57 ± 0.58	2.01 ± 0.43	1-3	1-3	2.54 ± 0.62	1-3	100.5	126.9				
11	105	107	0.98 ± 0.14	1.00 ± 0.19	0.97 ± 0.29	1.41 ± 0.55	1.95 ± 0.32	1-3	1-3	2.41 ± 0.60	1-4	97.6	120.6				
12	105	108	0.87 ± 0.34	0.94 ± 0.28	1.16 ± 0.42	1.70 ± 0.55	2.03 ± 0.45	1-3	1-3	2.64 ± 0.60	1-4	101.4	131.9				
13	105	108	0	0.03 ± 0.17	1.60 ± 0.51	1.95 ± 0.42	1.60 ± 0.51	0-2	0-2	1.98 ± 0.43	1-3	80.0	99.1				
14	104	108	0	0.02 ± 0.14	1.46 ± 0.52	1.87 ± 0.49	1.46 ± 0.52	0-2	0-2	1.89 ± 0.52	0-3	72.9	94.4				
15	105	108	0	0.04 ± 0.19	1.67 ± 0.47	1.97 ± 0.46	1.67 ± 0.47	1-2	1-2	2.01 ± 0.50	1-3	83.3	100.5				
16	105	108	0.97 ± 0.17	0.96 ± 0.23	0.97 ± 0.17	0.94 ± 0.28	1.94 ± 0.23	1-2	1-2	1.90 ± 0.36	1-3	97.1	94.9				
17	105	107	0.85 ± 0.36	0.95 ± 0.21	0.98 ± 0.28	1.07 ± 0.40	1.83 ± 0.43	1-3	1-3	2.02 ± 0.39	1-3	91.4	100.9				
18	105	108	0.46 ± 0.50	0.85 ± 0.36	0.98 ± 0.24	1.06 ± 0.34	1.44 ± 0.54	0-2	0-2	1.92 ± 0.44	1-3	71.9	95.8				
19	105	108	0.85 ± 0.36	0.94 ± 0.25	0.94 ± 0.27	0.99 ± 0.26	1.79 ± 0.49	0-2	0-2	1.93 ± 0.33	1-3	89.5	96.3				
20	105	108	0.56 ± 0.50	0.94 ± 0.23	0.82 ± 0.39	0.94 ± 0.31	1.38 ± 0.51	0-2	0-2	1.88 ± 0.35	1-3	69.0	94.0				
21	105	108	0	0.03 ± 0.17	0.95 ± 0.21	0.95 ± 0.21	0.95 ± 0.21	0-1	0-1	0.98 ± 0.27	0-2	47.6	49.1				
22	105	108	0	0.02 ± 0.14	0.99 ± 0.26	1.29 ± 0.47	0.99 ± 0.26	0-2	0-2	1.31 ± 0.48	0-2	49.5	65.3				
Total	2,309	2,371					42 ± 3.8			52.2 ± 5.6		2097.6	2609.3				



Table 5: continued

CS		MLH1 foci												
		Bivalent						Map Units (cM)						
		OTA7		AZO2		AZO3		OTA7		AZO2		AZO3		
Mean	SD	Range	Mean	SD	Range	Mean	SD	Range	Mean	SD	Range	Mean	SD	Range
1	3.52	± 0.83	1-5	3.92	± 0.76	2-5	3.62	± 0.66	1-4	175.9		196		181.3
2	3.10	± 0.62	2-4	3.76	± 0.88	2-5	3.47	± 0.67	2-5	155.2		188		173.4
3	2.90	± 0.67	1-4	3.12	± 0.80	2-4	3.00	± 0.76	1-4	144.8		156.3		150
4	2.62	± 0.56	2-4	2.88	± 0.61	2-4	2.62	± 0.49	2-3	131		143.8		131.3
5	2.63	± 0.67	1-4	2.92	± 0.64	2-4	2.78	± 0.71	1-4	131.7		146		139.1
6	2.50	± 0.57	2-4	2.72	± 0.68	1-4	2.37	± 0.55	1-3	125		136		118.8
7	2.38	± 0.68	1-4	2.63	± 0.58	1-3	2.47	± 0.67	2-4	119		131.3		123.4
8	2.17	± 0.54	1-3	2.28	± 0.54	1-3	2.22	± 0.55	1-3	108.6		114		110.9
9	2.27	± 0.58	1-3	2.48	± 0.59	2-4	2.35	± 0.49	2-3	113.3		123.9		117.7
10	2.29	± 0.60	1-3	2.42	± 0.50	2-3	2.38	± 0.61	1-3	114.3		120.8		118.8
11	2.18	± 0.61	1-4	2.46	± 0.59	1-3	2.22	± 0.61	1-3	108.9		122.9		110.9
12	2.31	± 0.47	2-3	2.68	± 0.56	2-4	2.41	± 0.56	1-3	115.5		134		120.3
13	1.96	± 0.33	1-3	1.92	± 0.28	1-2	1.91	± 0.30	1-2	98.2		96		95.3
14	1.90	± 0.31	1-2	1.84	± 0.47	1-3	1.88	± 0.49	0-3	95		92		93.8
15	1.86	± 0.36	1-2	1.92	± 0.40	1-3	2.06	± 0.44	1-3	92.9		96		103.1
16	2.03	± 0.33	1-3	1.88	± 0.33	1-2	2.00	± 0.00	2-2	101.7		94		100
17	1.79	± 0.42	1-2	2.04	± 0.46	1-3	1.87	± 0.43	1-3	89.3		102.1		93.5
18	1.76	± 0.44	1-2	1.92	± 0.28	1-2	1.78	± 0.42	1-2	87.9		96		89.1
19	1.86	± 0.44	1-3	1.87	± 0.34	1-2	1.94	± 0.35	1-3	93.1		93.8		96.9
20	1.76	± 0.44	1-2	1.92	± 0.28	1-2	1.84	± 0.37	1-2	87.9		96		92.2
21	1.00	± 0.00	1-1	1.04	± 0.20	1-2	1.00	± 0.00	1-1	50		52		50
22	1.03	± 0.32	0-2	1.24	± 0.44	1-2	1.06	± 0.25	1-2	51.7		62		53.1
Total	47.8			51.9			49.3			2390.9		2592.7		2462.9



**Figure 1:** General MLH1 foci distribution for individual autosomal SCs for the three infertile cases: OTA7, AZO2 and AZO3. Bars represent SC divisions of about  $0.7\mu\text{m}$  approx. Bars indicate the probability of a single MLH1 focus to be placed in the region. Centromere position is shown by the discontinuous vertical line. The horizontal line indicates the equal-probability line for which all MLH1 observed in a SC would be distributed at random. MLH1 distributions over this line indicate hot crossover regions.

## **Article 5**

**A human tetraploid pachytene as the  
possible origin of diploid sperm**

**Human Reproduction (en prensa)**

**Índex impacte 2004: 3.365**



**TITLE:** A human tetraploid pachytene as the possible origin of diploid sperm

**AUTHORS:** Codina-Pascual M<sup>1</sup>, Navarro J<sup>1</sup>, Egozcue J<sup>1</sup>, Benet J<sup>1</sup>

**RUNNING TITLE:** Human tetraploid pachytene

**ADDRESS:** <sup>1</sup>Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona; Bellaterra, Spain.

**To whom correspondence should be addressed:** J Benet and M Codina-Pascual, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193, Spain; Tel: +34 935811773; Fax: +34 935811025; Email: [jordi.benet@uab.es](mailto:jordi.benet@uab.es), [montserrat.codina@uab.es](mailto:montserrat.codina@uab.es).

**ABSTRACT**

**BACKGROUND:** Diploid spermatozoa represent 0.2%-0.3% of all spermatozoa in the normal population and cause 8.3% of diandric triploids. Errors in meiosis I and II are the most common mechanisms by which diploid spermatozoa are produced. Endoreduplication previous to meiosis has been suggested as a possible origin for tetraploid meiocytes, which might, in turn, produce diploid sperm. **METHODS:** Synaptonemal complex spreads of a fertile man were immunolabeled (SCP3, MLH1 and CENP) and hybridized with subtelomere-specific multiplex-FISH assay (stM-FISH) for SCs identification. **RESULTS and CONCLUSIONS:** The unexpected finding of a tetraploid pachytene cell and the identification of all of its SCs demonstrates that synapsis and crossover events can occur in human tetraploid cells. Moreover, it indicates that diploid sperm may also originate from mitotic errors (endoreduplication) previous to meiosis.

**KEY WORDS:** crossing over / diploid sperm / stM-FISH / synaptonemal complex / tetraploid pachytene.

## INTRODUCTION

Human triploidy is one of the most frequent chromosomal abnormalities and is responsible for about 10% of all spontaneous abortions. Paternal origin of triploids is more frequent than maternal origin and it generally occurs as a consequence of dispermy (McFadden *et al.*, 2002). Nevertheless, diploid sperm cause 8.3% of diandric triploids. Diploid spermatozoa represent 0.2%-0.3% of all spermatozoa in the normal population. Errors in meiosis I and II are the most common mechanisms by which diploid spermatozoa are produced (Zaragoza *et al.*, 2000; Egozcue *et al.*, 2002). It has been suggested that an endoreduplication, DNA duplication without cell division, previous to meiosis could result in tetraploid meiocytes (Miller and Therman, 2001), which consequently might produce diploid sperm. Synapsis and crossing over between homologous chromosomes are two essential processes that must occur in meiocytes to proceed in meiosis. Herein, is described the observation of a tetraploid pachytene from a fertile male in which synapsis and crossover events are observed. This could support the possible role of endoreduplication in spermatogonia as a possible origin of some diploid sperm.

## MATERIAL AND METHODS

A testicular biopsy was obtained from a fertile man while undergoing a vasectomy under local anaesthesia. Written consent was obtained from the patient, and the study was approved by our Institutional Ethics Committee. The biopsy was processed for synaptonemal complex spreads. These were immunolabeled with anti-SCP3, anti-MLH1 and CREST serum and subsequently hybridized with the seven-fluorochrome stM-FISH assay for SCs identification, as described elsewhere (Codina-Pascual *et al.*, 2004). The identification of all SCs was performed by projection of the stM-FISH hybridization result into the image of the immunolabeled pachytene cell.

## RESULTS AND DISCUSSION

During the analysis of 105 immunolabeled pachytene cells, a nucleus with an unexpected appearance was found. The cell seemed to have twice the number of SCs as that of a normal pachytene cell (i.e., 46). Hybridization with the seven-fluorochrome stM-FISH assay allowed for the identification of all the SCs of the cell and confirmed that it was a tetraploid pachytene cell (Figure 1A).

Although in human meiotic chromosome preparations it is not unusual to find metaphase I nuclei which are apparently tetraploid, it is impossible to demonstrate that this appearance does not result from the mix-up of bivalents from two normal metaphases because as is well known, meiosis occurs in waves on a given Sertoli cell. To the best of our knowledge, in mammals, only one tetraploid pachytene has been reported (Solarí and Moses, 1977). This single example in mice and the nucleus herein shown, both observed among hundreds of spermatocytes analysed, indicate that tetraploidy in spermatocytes is a rare event.

## Resultats

This pachytene nucleus does demonstrate that human tetraploid cells can enter meiosis, and that synapsis and meiotic recombination can take place even when the genetic material is duplicated. In this cell, heterologous synapsis was not observed. Most autosomal chromosomes were present as two bivalents. Nevertheless, five quadrivalent structures were observed, which corresponded to the four chromosomes 1, 2, 9, 16 and 20 (Figures 1A and 1B). Unlike in a normal pachytene cell, the sex chromosomes formed two separate bivalents (Figures 1A and 1D). The X bivalent synapsed completely, forming an entire SC. The Y bivalent synapsed by the short arms, but the long arms remained unsynapsed. It is worth noting that each X and Y bivalent, in this tetraploid cell, contains two identical chromosomes. The fact that the quadrivalents and some SCs were not yet fully synapsed (Figures 1A and 1C) indicates that this nucleus might be in an early pachytene stage. The unsynapsed regions of quadrivalents 1, 9, 16 and of the bivalent Y correspond to non centromeric heterochromatic blocks, which have been described as the last regions to synapse (Solari *et al.*, 1991) ; Codina-Pascual *et al.*, unpublished data). Moreover, heterochromatin has been proposed to act as organising centres in the interface nucleus from animals and plants (van Driel and Fransz, 2004). Therefore, the quadrivalents of chromosomes 1, 9 and 16, and the bivalent Y largely unsynapsed in this tetraploid nucleus, could be consequence of a structural role of non centromeric heterochromatic blocks in the early prophase I nucleus.

In this tetraploid pachytene, meiotic recombination foci (MLH1) were present at places where synapsis had occurred. The cell had 73 MLH1 foci, i.e., more than the range described for controls (42.9-52.3) (Codina-Pascual *et al.*, 2005), but less than twice the mean of MLH1 foci for this man (42.5, Codina-Pascual *et al.*, unpublished data). MLH1 foci were distributed similarly to a normal pachytene cell, generally, one MLH1 focus per arm in a distal location; but it is interesting to note that a different localization of MLH1 foci in some “homologous” SCs in this tetraploid cell is observed (SC7s, SC10s, SC12s, SC19s and SC21s in Figure 1E). Therefore, the variable localization of crossover events observed in a given SC among different cells (Sun *et al.*, 2004b); Codina-Pascual *et al.*, unpublished data) can also occur in a single tetraploid cell. The Y bivalent had one MLH1 focus in the short synapsed arm, possibly in the PAR1 region. The X bivalent presented one MLH1 focus in each arm with a distal distribution similar to that for the C-group chromosomes.

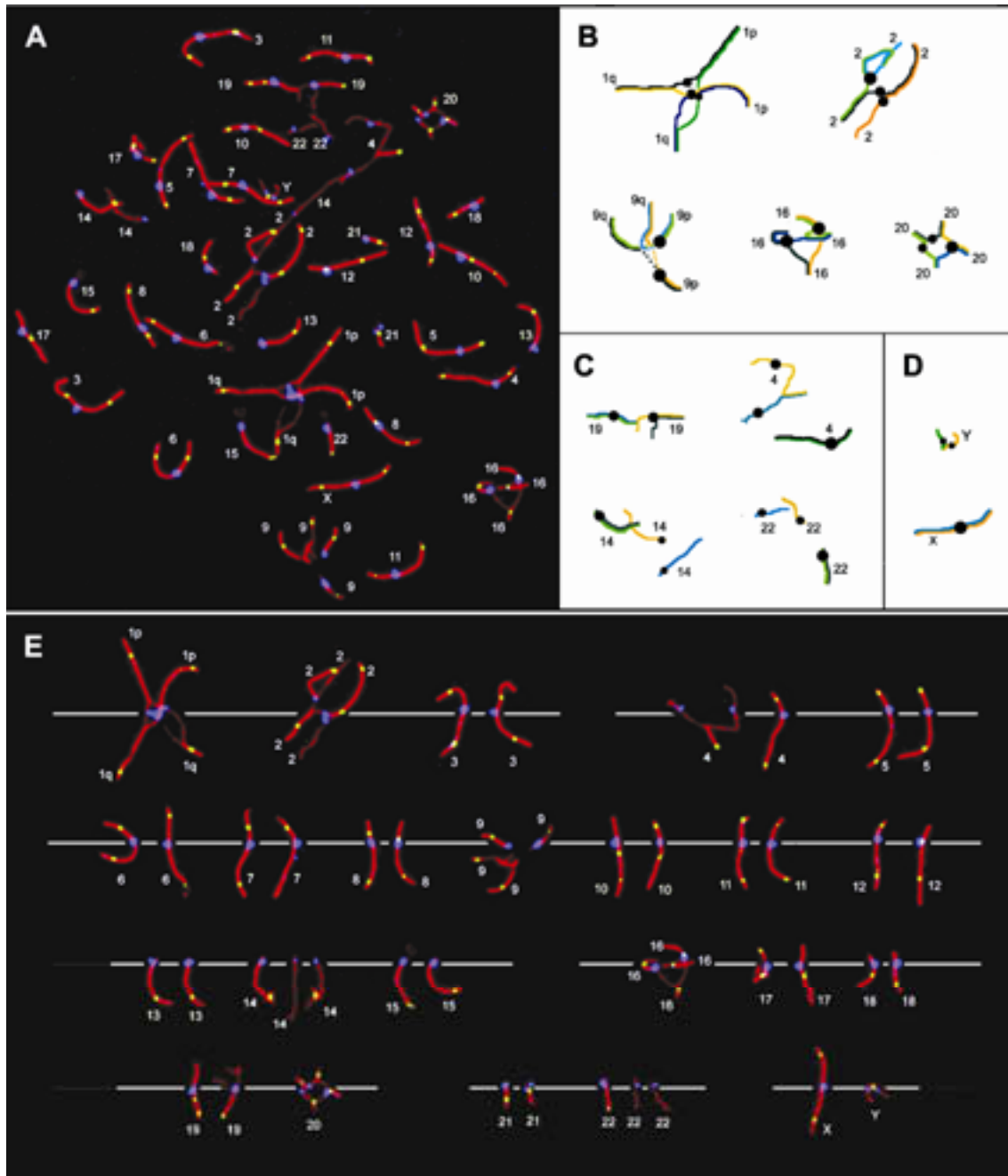
For years, the origin of human diploid spermatozoa has been explained by errors in meiosis I and II (Zaragoza *et al.*, 2000; Egozcue *et al.*, 2002). Endoreduplication was suggested to be another possible mechanism for the formation of tetraploid meiocytes (Miller and Therman, 2001), but that has never been proven. The tetraploid pachytene cell shown in this work provides evidence that diploid sperm may also originate as a consequence of mitotic errors previous to meiosis and not only by non-disjunction at meiosis I or II.

**ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Drs. C. Heyting and W. Earnshaw for SCP1, SCP3 antibodies and CREST serum, respectively, and Drs. MR Speicher, J.Kraus and C. Fauth for providing stM-FISH DNA pools. MCP was a recipient of a grant of the Generalitat de Catalunya (2001FI00468). The study was supported by the Fondo Investigación Sanitaria (Madrid) (Project PI020258), the Generalitat de Catalunya (Project 2005 SGR 00495) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SP 460/4-1).

**REFERENCES**

- Codina-Pascual M, Kraus J, Speicher M, Oliver-Bonet M, Murcia V, Sarquella J, Egozcue J, Navarro J and Benet J (2004) Characterization of all human male synaptonemal complexes by subtelomere multiplex-FISH. *Cytogenet. Genome. Res.* 107,18-21
- Codina-Pascual M, Oliver-Bonet M, Navarro J, Campillo M, Garcia F, Egozcue S, Abad C, Egozcue J and Benet J (2005) Synapsis and meiotic recombination analyses: MLH1 focus in the XY pair as an indicator. *Hum. Reprod.* 20,2133-2139
- Egozcue S, Blanco J, Vidal F and Egozcue J (2002) Diploid sperm and the origin of triploidy. *Hum. Reprod.* 17,5-7
- McFadden DE, Jiang R, Langlois S and Robinson WP (2002) Dispermy--origin of diandric triploidy: Brief Communication. *Hum. Reprod.* 17,3037-3038
- Miller, O. J. and E. Therman (2001). *Human chromosomes*. New York, Springer.
- Solari AJ and Moses MJ (1977) Synaptonemal complexes in a tetraploid mouse spermatocyte. *Exp. Cell. Res.* 108,464-467
- Solari AJ, Ponzio R and Rey Valzacchi G (1991) Synaptonemal complex karyotyping in an oligospermic patient with heterochromatin duplication in chromosome n. 9. *Medicina (B Aires)* 51,217-221
- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Ko E, Rademaker AW, Navarro J, Benet J and Martin RH (2004) Human male recombination maps for individual chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 74,521-531
- van Driel R and Fransz P (2004) Nuclear architecture and genome functioning in plants and animals: what can we learn from both? *Exp. Cell Res.* 296,86-90
- Zaragoza MV, Surti U, Redline RW, Millie E, Chakravarti A and Hassold TJ (2000) Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatiform mole. *Am. J. Hum. Genet.* 66,1807-1820



**Figure 1** A) Tetraploid pachytene cell observed in a fertile man with all synaptonemal complexes identified by stM-FISH. SCs are in red, MLH1 foci in green and centromeres in blue. B) Representation of the five quadrivalents of the cell. Each one of the four homologous chromosomes in the quadrivalent is drawn in a different color. Centromeres are in black. C) Representation of the four partially or totally unsynapsed SCs and their fully synapsed SC partner. Each one of the four homologous chromosomes is drawn in a different color. D) Representation of the partially synapsed Y bivalent and the fully synapsed X bivalent. E) SC karyotype of the tetraploid pachytene cell.

## **Article 6**

**FISH characterization of a dicentric Yq (p11.32)  
isochromosome in an azoospermic male**

**American Journal of Medical Genetics 127A, 302-306 (2004)**

Índice impacte 2004: 3.659 (0.815)

## Clinical Report

# FISH Characterization of a Dicentric Yq (p11.32) Isochromosome in an Azoospermic Male

M. Codina-Pascual,<sup>1\*</sup> M. Oliver-Bonet,<sup>1</sup> J. Navarro,<sup>1</sup> H. Starke,<sup>2</sup> T. Liehr,<sup>2</sup> C. Gutiérrez-Mateo,<sup>1</sup> J.F. Sánchez-García,<sup>1</sup> O. Arango,<sup>3</sup> J. Egozcue,<sup>1</sup> and J. Benet<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

<sup>2</sup>Institute of Human Genetics and Anthropology, Jena, Germany

<sup>3</sup>Departament d'Urologia, Hospital del Mar, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

The most common structural rearrangements of the Y chromosome result in the production of dicentrics. In this work, we analyze an abnormal Y chromosome, detected as a mosaic in an azoospermic male ascertained for infertility. FISH with seven different DNA probes specific for Y chromosome sequences (Y  $\alpha$ -satellite, Y  $\alpha$ -satellite III, non- $\alpha$ -satellite centromeric Y, SRY gene, subtelomeric Yp, subtelomeric Yq, and PNA-tel) and CGH analysis were performed. FISH results showed that the abnormal Y chromosome was a dicentric Yq isochromosome and that the breakpoint was distally in band Yp11.32. Lymphocyte chromosomes showed a mosaicism with 46,X,idiY(qter→p11.32::p11.32→qter) (51.7%), 46,XY (45.6%), and other cell lines (2.7%). In oral interphase cells, the mosaicism was 46,XidicY (62.8%), 46,XY (25.7%), 45,X (6.6%), and others (4.9%). The possible origin of this dicentric Yq isochromosome is discussed. Finally, we compare differences in mosaicism and phenotype among three reported cases with the breakpoint at Yp11.32 © 2004 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** dicentric Y isochromosome; FISH; mosaicism; azoospermia

## ELECTRONIC-DATABASE INFORMATION

National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/static/MVstart.html> Stanford <http://www-shgc.stanford.edu/mapping>

## INTRODUCTION

Structural abnormalities affecting the human Y chromosome include deletions, rings, Y-autosomal or Y–X translocations, isochromosomes, and dicentrics. Among these structural abnormalities, dicentric Y chromosomes are the most commonly found [Hsu, 1994; Yoshida et al., 1997]. These dicentric Y chromosomes correspond to two different types: dic(Yq), resulting from the fusion between the short arms of two Y chromosomes in which some Yp material is maintained, and dic(Yp) in which only the Yq arms fuse. If the dicentric has completely symmetric arms, it is considered an isodicentric chromosome. The sites of breakage and fusion at Yp and Yq are variable [Robinson et al., 1999].

Most (90%) dicentric Y chromosomes are present in mosaic form. The mosaicism may be more or less complex depending on its meiotic or post-zygotic origin and on its mitotic stability, and it usually includes a 45,X cell line. Errors occurring during gametogenesis, before the spermatid stage, or in the first mitotic division after fertilization would result in a mosaicism without a normal 46,XY cell line. If the errors occur after the first zygotic division, a normal 46,XY cell line can be present [Fernandez et al., 2002]. Patients carrying a dicentric Y chromosome have a wide range of somatic, genital, and gonadal phenotypic manifestations, depending on the structure of the dicentric Y chromosome, the Yp and Yq breakpoints, and the types of mosaicism [Tuck-Muller et al., 1995]. As previously reviewed [Hsu, 1994], 40.9% of affected subjects were phenotypic females, 31.8% were phenotypic males, and 27.3% had different degrees of intersexuality.

Many studies have reported the use of PCR to determine the presence or absence of specific Y chromosome sequences. Some of them amplify genes or chromosome regions which are needed for the male development (SRY, ZFY, DYZ1), or the Y centromere sequence (DYZ3) [Tuck-Muller et al., 1995; Robinson et al., 1999], but the results obtained using PCR do not provide enough information to determine the structure of the abnormal Y chromosome. The application of DNA probes specific for Y chromosome sequences present in Yp, in Yq, and in the centromeric Y region allows the structural characterization of abnormal Y chromosomes by FISH [Robinson et al., 1999].

In the present study, we determined the structure of a dicentric Yq isochromosome and its breakpoints in an

Grant sponsor: Fondo Investigacion Sanitaria (Madrid) Project; Grant number: PI020258; Grant sponsor: Generalitat de Catalunya (Project); Grant number: 2001SGR 00201; Grant sponsor: The EU (to TL); Grant number: ICA2-CT-2000-10012; Grant sponsor: The Dr. Robert Pflieger-Stiftung (to TL); Grant sponsor: The Generalitat de Catalunya (grant to MCP); Grant number: 2001FI00468.

\*Correspondence to: M. Codina-Pascual, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain. E-mail: montserrat.codina@uab.es

\*\*Correspondence to: J. Benet, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain. E-mail: jordi.benet@uab.es

Received 3 June 2003; Accepted 10 October 2003

DOI 10.1002/ajmg.a.30027



azoospermic male by FISH. We used seven different specific Y chromosome DNA probes. We also analyzed the possible difference in mosaicism between blood lymphocytes and oral epithelial cells.

## MATERIALS AND METHODS

### Subject

A phenotypically normal infertile 37-year-old male was referred for chromosomal analysis. Cytogenetic analysis showed a 46,X,der(Y)[14]/46,XY[13] mosaicism. Semen analysis revealed azoospermia. Ultrasound showed right and left testicular volumes of 5 ml. Varicocele was present. Secondary sexual characters were normal. Serum follicle stimulating hormone (FSH) was high (35.2 mIU/ml). The patient has an older brother with three daughters, and a younger sister with no progeny. The patient's mother had two abortions with no sex characterization. Blood samples from the patient's father were not available for karyotype analysis. This study was approved by the institutional ethics committee. The patient gave informed consent.

### FISH and CGH Analysis

Comparative genomic hybridization (CGH) was performed using extracted DNA from lymphocytes [Kallioniemi et al., 1992]. Quips software (Vysis) was used for CGH analysis. Gains and losses were respectively defined by 1.20 and 0.80 intensity ratios.

G- and C-banding analyses were performed on lymphocyte metaphases. Five in situ hybridizations, combining two and three-color FISH were also carried out following manufacturer's instructions. Seven different DNA probes specific for Y sequences were used: (a) CEPY  $\alpha$ -satellite (SpectrumOrange, Vysis) specific for the centromere region of the Y; (b) LSI-SRY (SpectrumOrange, Vysis) specific for the SRY gene at Yp11.3; (c) the most proximal probe in the long arm Yq11.2 (bA489H20); (d) CEPY  $\alpha$ -satellite III (SpectrumAqua, Vysis) specific for the heterochromatin of Yq21; (e) the pantelomeric (CCCTAA)<sub>3</sub> peptide-nucleic acid (PNA-telomere) probe; (f) TelVysion Xq/Yq (SpectrumOrange, Vysis) specific for the subtelomeric locus EST Cdy16c07 in Xq and Yq (GenBank 243206); and (g) TelVysion Xp/Yp (SpectrumGreen, Vysis) specific for the subtelomeric locus DXYS129 in Xp and Yp. The Stanford-G3 map indicates that the DXYS129 locus is the first one after the Xp and Yp telomere sequences (see Electronic-Data Base Information). Figure 1 shows the localization of all probes used.

Epithelial oral cells were collected, kept in PBS, washed, and fixed by means of two washes in 60% acetic acid and three washes in Carnoy. FISH analysis was carried out as described by Oliver-Bonet et al. [2001], using three probes: CEPY  $\alpha$ -satellite (SpectrumRed), CEPY  $\alpha$ -satellite III (SpectrumAqua), and CEPX  $\alpha$ -satellite (SpectrumGreen) (all from Vysis).

Slides were counterstained and mounted with antifade (Vector Lab, Inc.) containing DAPI (Sigma). Slides were analyzed using an Olympus BX 70 microscope. Images were captured using a cool camera (Sensys) and analyzed in an Apple system (Vysis).

## RESULTS AND DISCUSSION

In G-banded spreads, an abnormal Y chromosome was detected. The apparent karyotype was 46,X,der(Y)[14]/46,XY[13] (Fig. 1(2A,3A)). No other cell line was found. By C-banding, the abnormal Y chromosome showed a darkly stained band at the end of both arms (Fig. 1(3B)) indicating the presence of two distal heterochromatic regions. In general,

only one primary constriction and one centromeric C-band were visible, and although in some cases two internal regions of centromeric heterochromatin were present, only one was constricted (Fig. 1(3B)).

A standard CGH protocol was performed to exclude the presence of autosomal euchromatin between the two heterochromatic regions of the marY. No gain of autosomal euchromatin was observed. However, the CGH profile of chromosome Y showed the gain of one full Y chromosome (Fig. 1(4)).

These indicated that the abnormal Y was a dicentric Yq isochromosome. Since the 1970s, when dicentric Y isochromosomes were first reported [Ying and Ives, 1971; Schmid and D'Apuzzo, 1978], many cases have been described [Hsu, 1994; Tuck-Muller et al., 1995]. Here, for the structural characterization of a dicentric Yq isochromosome, we have used seven different DNA probes specific for Y. All probes hybridized to the expected zones in the Y chromosome of the 46,XY cells (Fig. 1(2C,2D,2E)). In the abnormal Y, two CEPY  $\alpha$ -satellite FISH signals (Fig. 1(3C,3G), red signals) confirmed the presence of two centromeres (Fig. 1(3B)). The LSI-SRY probe showed two very close signals, which revealed two SRY genes in the isochromosome (Fig. 1(3D) red signals); thus, the Yp breakpoint was more distally located. The TelVysion Xq/Yq probe hybridized to the subtelomeric loci in both Yq arms of the abnormal Y and in the Xq arm (Fig. 1(3E) red signals). The TelVysion Xp/Yp probe hybridized to the fusion zone of the dicentric Yq isochromosome. The size of the hybridization signal was twice the one in the normal Y, which revealed the presence of two adjacent interstitial Yp subtelomeric loci DXYS129 in the abnormal Y (Fig. 1(3E) green signals). By using the PNA-telomere probe [Hande et al., 1999] no interstitial telomeric signals were detected, although the probe hybridized to the Yq telomeric sequences (Fig. 1(3F)), indicating that the Yp telomeres were not present in the dicentric Yq isochromosome and that the breakpoint was located distally in band Yp11.32. The two remaining DNA probes, CEPY  $\alpha$ -satellite III and bA489H20, also exhibited two hybridization spots (Fig. 1(3C,3D,3F) aqua signals and Fig. 1(3D) green signals). All FISH signals appeared symmetrically distributed along the dicentric Yq isochromosome. Figure 1(5) represents the theoretical structure of the dicentric Yq isochromosome according to FISH results. Nevertheless, submicroscopic rearrangements such as deletions or duplications, which are not detectable by FISH, cannot be discarded.

Many mechanisms of dicentric isochromosome formation have been described [Darlington, 1939; Therman et al., 1974; Wolff et al., 1996]. The most frequent mechanism is sister-chromatid breakage and reunion [Wolff et al., 1996; Robinson et al., 1999]. Since FISH results revealed the loss of the Yp telomere we could explain its formation as a consequence of a sister-chromatid breakage distally in band Yp11.32 and a reunion of the broken ends after the S-phase. The subsequent cell divisions would result in several cell lines depending on the stability of the dicentric.

The gametogenic or early zygotic origins of dicentrics result in a non-detectable 46,XY cell line even if the patient is a mosaic. But, a late post-zygotic origin will lead to the presence of a normal cell line. At least 97% of patients with dicentric isochromosomes Y are mosaics without a normal cell line [Hsu, 1994] which indicates that gametogenic or early post-zygotic origins are the most frequent. At the same time, a 45,X cell line is usually found as part of this mosaicism: 95.5% [Hsu, 1994] and 88% [Tuck-Muller et al., 1995]. Sometimes a cell line may remain undetectable in blood lymphocytes as a consequence of its origin in the very early zygote.

To characterize the percentages of mosaicism, 342 lymphocyte metaphases were analyzed, 170 stained by CEPX and CEPY  $\alpha$ -satellite, and 172 labeled by TelXqYq and TelXpYp. The CEPX probe was used as a control. The TelXqYq and

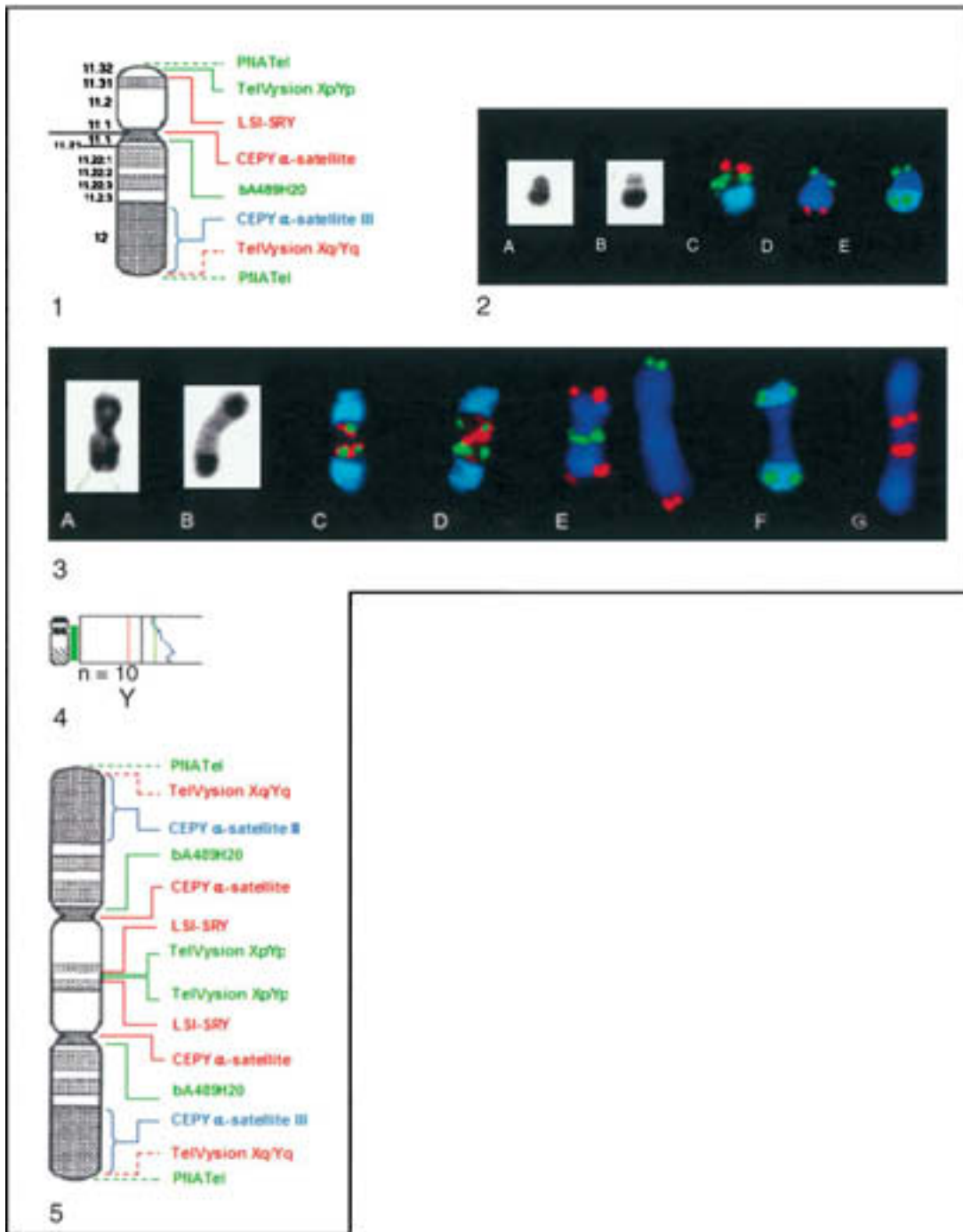


Fig. 1. 1: Ideogram of the G-banding pattern of the normal human Y chromosome (ISCN 1995) with the localization of the seven DNA probes used. 2: Y chromosome. (A) G banded (B) C banded (C) FISH with LSI-SRY probe (red), bA489H20 probe (green) and CEPY  $\alpha$ -satellite III probe (aqua) (D) FISH with TelXqYq probe (red), Tel XpYp probe (green), and DAPI (blue) (E) FISH with PNA-tel probe (green), CEPY  $\alpha$ -satellite III probe (aqua), and DAPI (blue) 3: Dicentric Y isochromosome. (A) G banded (B) C banded (C) FISH with CEPY  $\alpha$ -satellite probe (red), bA489H20 probe (green) and CEPY  $\alpha$ -satellite III probe (aqua) (D) FISH with LSI-SRY probe (red), bA489H20

probe (green), and CEPY  $\alpha$ -satellite III probe (aqua) (E). The dicentric Y isochromosome and the X chromosome labeled with Tel XqYq probe (red), Tel XpYp probe (green), and DAPI (blue) (F) FISH with PNA-tel probe (green), CEPY  $\alpha$ -satellite III probe (aqua), and DAPI (blue) (G) Dicentric Y isochromosome labeled only with CEPY  $\alpha$ -satellite (red) and DAPI (blue). 4: CGH profile of chromosome Y showing the gain of a full chromosome Y. 5: Ideogram of the theoretical G-banding pattern for the dicentric Yq isochromosome according to the FISH results from the seven DNA probes used.

TelXpYp were also used as controls because of their homology with the X chromosome. Results are shown in Table I. Interphase nuclei from epithelial oral cells were also analyzed by FISH with CEPY  $\alpha$ -satellite, CEPX  $\alpha$ -satellite, and CEPY  $\alpha$ -

satellite III probe. We scored 183 cells; results are shown in Table II.

The characteristics of the mosaicism detected in lymphocytes and epithelial oral cells strongly suggest that the

TABLE I. Mosaicism Present in Metaphase Lymphocytes Analyzed Using TelVysion Xp/Yp-TelVysion Xq/Yq and CEPY  $\alpha$ -sat-CEPX  $\alpha$ -sat

Cell karyotype	TelVysion Xp/Yp		CEPY $\alpha$ -sat		Total	
	Cells	%	Cells	%		
					TelVysion Xq/Yq	
46,X, idicY	88	51.1	89	52.3	177	51.7
46,XY	80	46.5	76	44.7	156	45.6
92,XXYY	1	0.6	2	1.2	3	0.9
45,X	0	0.0	2	1.2	2	0.6
47,X, idicY, idicY	0	0.0	1	0.6	1	0.3
47,XX, idicY	1	0.6	0	0.0	1	0.3
46, idicY, idicY	1	0.6	0	0.0	1	0.3
45, idicY	1	0.6	0	0.0	1	0.3
Total	172	100	170	100	342	100

dicentric Yq isochromosome originated post-zygotically. Only a few cells had different sex chromosome compositions. This means that this dicentric Yq isochromosome is highly stable.

In most cases of isodicentric Y chromosomes one primary constriction and one centromeric C-band are visible, while the other centromeric C-band is double and not constricted [Guttenbach et al., 1990; Tuck-Muller et al., 1995]. This suggests that one of the centromeres may have been inactivated [Hsu, 1994]. Similar results are found in dicentrics where acrocentric chromosomes are involved [Lemyre et al., 2001; Wandall et al., 2002]. These dicentric chromosomes would then behave as monocentrics increasing their stability. However, the stability of dicentrics with two active centromeres can also be explained according to the distance between them. A long distance between active centromeres increases the probability that each sister chromatid attachment point may turn around its orientation. Then, a sister chromatid will be pulled to opposite poles, forming an anaphase bridge. The subsequent breakage will either lead to unstable broken chromosomes and cell lines, or originate a bridge-breakage-fusion-bridge cycle [Mc Clintock, 1941; Chang et al., 2001]. Active centromeres of dicentrics in which acrocentric chromosomes are involved are close enough to avoid this process. In conclusion, dicentrics where acrocentric chromosomes are present have a high mitotic stability, no matter whether they have one or two active centromeres. This would explain their predominance in clinical genetics [Lemyre et al., 2001] and in chromosome evolution (e.g. human chromosome 2 [Egozcue et al., 1973]).

Patients with a dicentric Y range from Turner-like females to infertile males. The structure of the dicentric Y isochromosome, the Yp or Yq breakpoints and the level and distribution of the mosaicism are the variables responsible for the phenotype. But, it is difficult to establish an accurate phenotype-karyotype correlation. Our patient had a 46,XY/46,X, idic(Y)-

TABLE II. Mosaicism in Interphase Epithelial Oral Cells Analyzed Using CEPY  $\alpha$ -sat, CEPX  $\alpha$ -sat, and CEPY  $\alpha$ -sat III probes

Cell karyotype	Cells	%
46,X, idicY	115	62.8
46,XY	47	25.7
45,X	12	6.6
47,X, idicY, idicY	6	3.3
47,XY, idicY	3	1.6
Total	183	100

(qter  $\rightarrow$  p11.32::p11.32  $\rightarrow$  qter) mosaicism. As far as we know, only three cases have been described of patients with Yp arm breakpoints distally in band Yp11.32. Two Turner-like females presenting a 46,X, idic(Y) cell line in mosaicism with 45,X cells, but without the 46,XY cell line, both of them with the SRY gene in the dicentric chromosome [Tuck-Muller et al., 1995; Robinson et al., 1999]. We found no significant proportions of 45,X cells in our patient. One could think that in spite of the presence of the SRY gene the existence of a 45,X cell line would result in a female phenotype. But, the third case, an azoospermic male with a 45,X cell line and only a few 46,XY cells does not support this idea [Guttenbach et al., 1990]. The possibility that the 46,XY cell line might lead to a male phenotype is discarded by two cases of females carrying the 46,XY cell line [Tuck-Muller et al., 1995]. Thus, the phenotype depends both on the presence and on the frequency and tissue distribution of the cell lines present in mosaic form.

The small testicular volume and high FSH levels, suggest that the patient may lack germ cells (Sertoli-cell-only syndrome) [Bergmann et al., 1994]. Prepubertal human individuals and SCO patients present Sertoli cells with condensed sex chromosomes [Speed et al., 1993; Kofman-Alfaro et al., 1994]. Garagna et al. [2001] found this sex chromosome behavior in Sertoli cells of mice carriers of Robertsonian translocations. They suggested that changes in spatial territories may alter the meiotic process and the proper functioning of the Sertoli cells. In our case, the presence of an isodicentric Y could have a similar effect. These changes might have altered gene expression in somatic (Sertoli cells) and germ cells affecting their interaction in testes development and in spermatogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. M. Rocchi (Bari, Italy) who kindly provided bA489H20 probe and Dr. F Solé (Servei Hematologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain).

REFERENCES

Bergmann M, Behre HM, Nieschlag E. 1994. Serum FSH and testicular morphology in male infertility. *Clin Endocrinol* 40:133–136.

Chang S, Khoo C, DePinho RA. 2001. Modeling chromosomal instability and epithelial carcinogenesis in the telomerase-deficient mouse. *Semin Cancer Biol* 11:227–238.

Darlington C. 1939. Misdivision and the genetics of the centromere. *J Genet* 37:341–364.

Egozcue J, Caballin MR, Goday C. 1973. Banding patterns of the chromosomes of man and the chimpanzee. *Humangenetik* 18:77–80.

Fernandez R, Marchal JA, Sanchez A, Pasaro E. 2002. A point mutation, R59G, within the HMG-SRY box in a female 45,X/46,X,psu dic(Y)(pter $\rightarrow$ q11;q11 $\rightarrow$ pter). *Hum Genet* 111:242–246.

Garagna S, Zuccotti M, Thornhill A, Fernandez-Donoso R, Berrios S, Capanna E, Redi CA. 2001. Alteration of nuclear architecture in male germ cells of chromosomally derived subfertile mice. *J Cell Sci* 114:4429–4434.

Guttenbach M, Müller U, Schmid M. 1990. Cytogenetic and molecular analysis of a Yq isochromosome. *Hum Genet* 86:147–150.

Hande MP, Samper E, Lansdorp P, Blasco MA. 1999. Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice. *J Cell Biol* 144:589–601.

Hsu LYF. 1994. Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. *Am J Med Genet* 53:108–140.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818–821.

Kofman-Alfaro S, Speed RM, Boyle S, Chandley AC. 1994. Condensation behaviour of the human X chromosome in male germ cells and Sertoli cells examined by fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res* 2:439–444.

- Lemyre E, Kaloustian VMD, Duncan AMV. 2001. Stable non-Robertsonian dicentric chromosomes: Four new cases and a review. *J Med Genet* 38:76–79.
- Mc Clintock B. 1941. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 26:234–282.
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Codina-Pascual M, Carrera M, Egozcue J, Benet J. 2001. Meiotic segregation analysis in a t(4;8) carrier: Comparison of FISH methods on sperm chromosome metaphases and interphase sperm nuclei. *Eur J Hum Genet* 9:395–403.
- Robinson DO, Dalton P, Jacobs PA, Mosse K, Power MM, Crolla JA. 1999. A molecular and FISH analysis of structurally abnormal Y chromosome in patients with Turner syndrome. *J Med Genet* 36:279–284.
- Schmid W, D'Apuzzo V. 1978. Centromere inactivation in a case of Turner variant with two dicentric iso-long arm Y chromosome. *Hum Genet* 41:217–223.
- Speed RM, Vogt P, Köhler MR, Hargreave TB, Chandley AC. 1993. Chromatin condensation behaviour of the Y chromosome in the human testis. *Chromosoma* 102:421–427.
- Therman E, Sarto GE, Patau K. 1974. Apparently isodicentric but functionally monocentric X chromosome in man. *Am J Hum Genet* 26:83–92.
- Tuck-Muller CM, Chen H, Martinez JE, Shen C-C, Li S, Kusyk C, Batista DAS, Bhatnagar YM, Dowling E, Wertelecki W. 1995. Isodicentric Y chromosome: Cytogenetic, molecular, and clinical studies and review of the literature. *Hum Genet* 96:119–129.
- Wandall A, Andersen C, Ostergaard M, Koch J. 2002. Extensive cytogenetic analysis of a stable dicentric isochromosome 21, idic(21), formed by fusion of the terminal long arms. *Cytogenet Genome Res* 97:145–148.
- Wolff DJ, Miller AP, Van Dyke DL, Schwartz S, Willard HF. 1996. Molecular definition of breakpoints associated with human Xq isochromosomes: Implications for mechanisms of formation. *Am J Hum Genet* 58:154–160.
- Ying KL, Ives EJ. 1971. Mitotic behavior of human dicentric Y chromosome. *Cytogenet* 10:208–218.
- Yoshida A, Nakahori Y, Kuroki Y, Motoyama M, Araki Y, Miura K, Shirai M. 1997. Dicentric Y chromosome in an azoospermic male. *Mol Hum Reprod* 3:709–712.

## **5.DISCUSSIÓ**

## 5.1 VALORACIÓ DE LES TÈCNIQUES EMPRADES

### 5.1.1 PROTOCOL D'EXTENSIÓ-FIXACIÓ I APLICACIÓ DE LA IMMUNOCITOFLORESCÈNCIA.

Els primers estudis en els que es van analitzar SCs a MO s'utilitzava un protocol d'extensió i fixació en el que s'aplicava com a fixador el formaldehid a un pH proper a 10. Posterior a la fixació es realitzava una tinció uniforme amb nitrat de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). Emprant aquesta tècnica es tenyien de manera inespecífica totes les proteïnes que formen part del SC (Solari, 1980; Navarro *et al.*, 1981).

Per tal de poder marcar específicament les proteïnes del SC i les de recombinació meiótica cal aplicar una altra tècnica, la d'immunocitofluorescència (IF). Aquesta nova tècnica requereix un protocol d'extensió i fixació similar al esmentat anteriorment, però emprant un fixador que té un pH proper a 9 (Barlow and Hultén, 1998). Aquesta reducció del pH, necessària per a la detecció de les proteïnes a través dels anticossos específics, evita que la cromatina es degradi.

En una primera etapa, es va utilitzar el protocol ja descrit en la literatura per a IF (protocol #1) (Barlow and Hultén, 1996), però, aplicant aquest protocol, no sempre s'aconseguien bones extensions. Per tal de millorar la qualitat de les extensions, s'han introduït modificacions que han donat lloc a un nou protocol (protocol #2) (Articles 3 i 4). Aquest nou protocol inclou una incubació del teixit testicular amb un medi amb agents que debiliten les unions intercel·lulars (veure Material i Mètodes, apartat 3.1.2.2). A la vegada, inclou un alliberament de les cèl·lules en un medi hipotònic, una fixació que es realitza en cambra humida i un major temps de fixació. Totes aquestes modificacions permeten que la qualitat de l'extensió dels SCs de les cèl·lules sigui més bona i uniforme per a totes les cèl·lules i que disminueix la superposició de SCs facilitant el seu anàlisi.

Com s'ha dit anteriorment, la tècnica d'IF, aplicada en preparacions de SC, permet la detecció de proteïnes específiques. La detecció combinada de proteïnes de SC (SCP1 i SCP3), de proteïnes que intervenen en el procés de recombinació meiótica (MLH1) i de proteïnes centromèriques (CENP) en extensions de SCs de cèl·lules en estadi de paquitè, ha permès obtenir informació relativa a la sinapsi de cada parell de cromosomes homòlegs, a la distribució dels punts de recombinació meiótica i determinar la posició del centròmer en cada un dels SCs. La tècnica també s'ha emprat en altres estudis per detectar altres proteïnes que formen part del SC o que estan presents en els diferents estadis de la profase I meiótica (e.g MLH3, RPA,  $\gamma$ -H2AX, Rec8, etc) (Roig *et al.*, 2004; Oliver-Bonet *et al.*, 2005b; Roig *et al.*, 2005). Una gran avantatge de la tècnica d'IF és que manté la cromatina força preservada, i

per tant, permet l'aplicació posterior de tècniques de hibridació *in situ* fluorescent (FISH) (Barlow and Hultén, 1996).

### 5.1.2 APLICACIÓ DEL MÈTODE MULTIPLEX-FISH AMB SONDES SUBTELOMÈRIQUES ESPECÍFIQUES (STM-FISH)

La FISH amb sondes de DNA específiques en extensions de SCs, en les que s'hi ha aplicat prèviament la IF, permet identificar els SCs o zones concretes d'aquests. En preparacions de SC humans marcats amb IF, la FISH es va aplicar per primera vegada, emprant una única sonda de DNA en cada d'hibridació (Barlow and Hultén, 1996). Posteriorment, s'aplicaren en una mateixa hibridació dues i tres sondes marcades de colors diferents (Lynn *et al.*, 2002). L'aparició de les tècniques multiplex-FISH (M-FISH) en les que s'utilitzen barreges de sondes marcades amb diferents fluorocroms (Schröck *et al.*, 1996; Speicher *et al.*, 1996) varen permetre la identificació de tots els cromosomes d'una cèl·lula a través d'una combinació específica de colors. Des de llavors s'han anat desenvolupant diferents metodologies basades en la M-FISH. Amb l'aparició d'aquestes tècniques de M-FISH es realitzà la primera identificació de tots els SCs d'una cèl·lula en ratolí (Froenicke *et al.*, 2002), per la qual es necessitaren dues rondes consecutives d'hibridació. En humans la primera identificació de tots els SCs d'una cèl·lula es realitzà aplicant una tècnica de M-FISH amb sondes específiques de centròmer (cenM-FISH) (Oliver-Bonet *et al.*, 2003). Però el cenM-FISH presenta una certa limitació. Com que el cenM-FISH només marca els centròmers és difícil identificar la totalitat del SC quan hi ha superposició de SCs. Aquesta limitació es pot evitar aplicant un altre mètode de M-FISH que aconsegueixi marcar específicament ambdós extrems dels SCs. El mètode alternatiu escollit ha estat el *subtelomere* M-FISH (stM-FISH) que s'havia desenvolupat per tal de detectar reorganitzacions subtelomèriques (Fauth *et al.*, 2001). A més, aquesta nova metodologia aporta altres avantatges. Les sondes del cenM-FISH es marquen específicament amb combinacions de fins a quatre fluorocroms d'un total de cinc. Per tant, per tal d'identificar un SC cal una combinació de fins a quatre fluorocroms diferents. En el cas del stM-FISH, pel marcatge específic de totes les sondes s'utilitzen set fluorocroms que es combinen de dos en dos, excepte pels cromosomes 19, 20 i Y que es marquen amb un sol fluorocrom. D'aquesta forma la identificació dels SC és més fàcil i ràpida.

La stM-FISH marca cada cromosoma en els seus dos extrems, excepte els acrocèntrics i el cromosoma 1 en els que només se'n marca un. Aquest fet implica que els nombre de marques gairebé es duplica respecta del cenM-FISH, passant de 24 marques corresponents als centròmers a 42 marques corresponents a extrems p i/o q (Taula 5.1). No obstant tot i augmentar el nombre de marques en l'extensió, 78 respecta de les 52 observades amb el cenM-FISH, la utilització de set fluorocroms permet que el nombre de senyals per cada un

dels canals de captura del fluorocrom sigui similar al del cenM-FISH sense incrementar la complexitat d'interpretació (Taula 5.1)

Per altra banda, en el stM-FISH, totes les sondes i combinacions de colors són específiques i úniques per a cada cromosoma. Per tant el resultat de la hibridació permet la identificació tots i cada un dels SCs. En canvi en el cas del cenM-FISH, els cromosomes 13 i 21 presenten la mateixa combinació de colors degut a l'elevat grau d'homologia entre el seus DNA  $\alpha$ -satèl·lit i és la longitud del SC el que permet diferenciar entre un i l'altre.

	cenM-FISH en SCs	stM-FISH en SCs
Llocs marcats	24	42
Nombre de senyals per canal de captura de fluorocroms	DEAC	10
	Alexa488	12
	Cy3	13
	TexasRed	13
	Cy5	9
	Cy5.5	11
	Cy7	10
$\Sigma$ senyals	52	78
Senyal / canal de captura	10,5	11,1

A més, el fet de marcar, en comptes del centròmer, els extrems dels bivalents, que són les zones per on s'inicia la sinapsi, permet la identificació de bivalents fins i tot abans de que aquests hagin completat la sinapsi, el que permet la identificació de SCs en estadis de zigotè (veure Figura 3.11)

## 5.2 ELS SUBESTADIS DE PAQUITÈ: INICIAL I TARDÀ

L'estadi de paquitè té una durada més llarga que els altres estadis de la profase I. Aquest es pot subdividir en inicial i tardà depenent del grau de sinapsi i compactació assolit per als bivalents. En espermatòcits humans la morfologia del parell XY va canviant a mida que la cèl·lula progressa en l'etapa de paquitè. En SCs tenyits amb AgNO<sub>3</sub> es van identificar cinc morfologies diferents de parell XY (Solari, 1980) que serveixen com a indicador del subestadi de paquitè en el que es troba la cèl·lula. En SCs marcats amb IF també s'identifiquen aquestes diferents morfologies (Figura 1a Article 2).



En base a les cinc morfologies diferents del parell XY, les cèl·lules s'han classificat en paquitè inicial, morfologia 1 i 2, i en paquitè tardà, morfologies 3, 4 i 5. Una mitjana d'un 37% de les cèl·lules analitzades corresponien a paquitens inicials i la resta a paquitens tardans (Taula 5.2). Dos altres estudis realitzats en un sol individu, mostren proporcions dins del rang dels valors trobats en individus del nostre grup (Barlow and Hultén, 1998; Guichaoua *et al.*, 2005). Aquests resultats mostren una variabilitat interindividual en la proporció de subestadis de paquitè (Taula I Article 2, Taula I Article 3, i Taula 5.2), tant en individus controls com en infèrtils. Una variabilitat interindividual atribuïble a l'acció del punt de control de paquitè que actua a mig paquitè (Guichaoua *et al.*, 2005) podria explicar aquests valors.

Taula 5.2 Estadis de paquitè inicial o tardà, en espermatòcits d'individus controls

Cas	N cèl·lules	Paquitè inicial (%)	Paquitè tardà (%)
C1	48	18,8	81,2
C2	41	34,1	65,9
C3	72	52,8	47,2
C4	37	48,6	51,4
C5	26	23,1	76,9
C6	105	26,7	73,3
C7	108	55,6	44,4
Mitja <sup>A</sup>		37,1	62,9
<sup>A</sup> Barlow and Hultén, 1998 (1 cas)	46	37	63
<sup>B</sup> Guichaoua <i>et al.</i> , 2005 (1 cas)	141	46	54

<sup>A</sup>5 morfologies del parell XY; <sup>B</sup>4 morfologies del parell XY

C1-C5 en el Article 2

C6-C7 en el Article 3

## 5.3 SINAPSI I ANOMALIES SINÀPTIQUES

La identificació de tots els bivalents en espermatòcits en estadi de zigotè tardà (Figura 3.11) mostra que la sinapsi (formació del SC madur) en espermatòcits humans s'inicia a les zones subtelomèriques dels braços p i q dels bivalents metacèntrics i submetacèntrics, i dels braços q en els bivalents acrocèntrics coincidint amb resultats recentment publicats (Brown *et al.*, 2005). A més aquests autors proposen que la sinapsi avança en direcció al centròmer i que quan la sinapsi hi arriba, aquesta s'atura. Un cop les cèl·lules arriben a paquitè, tots els SCs dels bivalents autosòmics es troben formats. No és però infreqüent que a paquitè inicial en algunes zones d'algun bivalent els dos elements laterals (LE) del SC es trobin separats formant el que s'anomena *splits* (Figura 1C Article 3).

També algunes vegades en alguns bivalents apareixen discontinuïtats amb absència SCs i dels seus LEs. Aquestes discontinuïtats s'anomenen *gaps* (Figura 1C Article 3). El fet que no

s'observi els LEs es deuria a que en aquestes regions els LEs no estarien adequadament estructurats. Aquest tipus d'alteració ja ha estat descrita, en l'anàlisi amb tinció generalitzada i inespecífica de proteïnes amb AgNO<sub>3</sub> visualitzant els SCs fragmentats (Solari, 1980; Vidal *et al.*, 1982; Navarro *et al.*, 1986a). La presència a paquítè de *gaps* de SC, de *splits* o d'asinapsi completa de SCs ha estat considerat com un comportament anòmal de la sinapsi i una possible causa d'aturada total o parcial de la meiosi responsable de seminogrames anòmals (Solari, 1980; Vidal *et al.*, 1982; Navarro *et al.*, 1986a; Solari, 1999; Judis *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2004a; Guichaoua *et al.*, 2005).

### 5.3.1 INCIDÈNCIA D'ANOMALIES SINÀPTIQUES EN INDIVIDUS INFÈRTILS VS CONTROLS

Les anomalies meiòtiques afecten a un 8% de la població infèrtil, i d'aquestes un 74% corresponen a anomalies sinàptiques (revisat a (Egozcue *et al.*, 2005). En el decurs de l'estudi dut a terme (Article 2), s'ha observat que *gaps* i *splits*, també estan presents en les espermatòcits d'individus control. Al voltant d'un 50% d'aquestes cèl·lules presenten *gaps* en algun dels seus SCs (Taula III), i un 12% presenten *splits* (Taula II). En el cas d'espermatòcits d'individus infèrtils les freqüències de *gaps* i *splits* són similars. Pel que fa als *splits* s'ha observat, en un estudi que analitza la sinapsi meiòtica en infèrtils obstructius, no obstructius i controls que aproximadament en un 10% dels espermatòcits d'individus infèrtils obstructius i controls presenten *splits* (Guichaoua *et al.*, 2005). En general però, s'ha observat que tant en el grup d'individus control com en el d'infèrtils hi ha una gran variabilitat interindividual en el nombre de cèl·lules amb SCs que presenten *gaps* i *splits*.

En el present estudi (Articles 2 i 3), s'ha estudiat el grau d'afectació en paquítens d'individus control i d'individus infèrtils. S'ha observat que en els individus control i en la majoria del infèrtils estudiats gran part de les cèl·lules estudiades o no estaven afectades o presentaven un o dos SCs amb *gaps*. Les cèl·lules amb un o dos SCs amb *gaps* o *splits* han estat considerades com a cèl·lules normals, ja que en un estudi previ en un individu fèrtil aproximadament un 50% dels SCs dels cromosomes 1 i 9 presentaven *gaps* a les zones heterocromàtiques (Barlow and Hultén, 1996). En menor quantitat, altres paquítens, presentaven més de dos SCs amb *gaps* i fins i tot en alguns casos una gran quantitat de *gaps*, interpretada com una fragmentació general dels SCs (Taula III Article 2, Taules 1 i 2 Article 3) (Figura 1b-e Article 2). Els paquítens amb una fragmentació general dels SCs podrien correspondre a cèl·lules apoptòtiques. Dos dels individus infèrtils analitzats (AZO1 i AST) han presentat més del 55% dels espermatòcits amb dos o més SCs afectats per *gaps*, és a dir, cèl·lules amb un elevat grau d'afectació (Taula III Article 2). Aquest grau elevat d'afectació podria comportar una reducció de les cèl·lules que progressarien a la meiosi afectant d'aquesta manera la producció d'espermatozoides. Alteracions generalitzades en espermatòcits a paquítè s'han relacionat amb l'existència de bloqueig en la gametogènesi

responsable d'espermogrames anòmals (Vidal *et al.*, 1982; Navarro *et al.*, 1986a). El cas AZO1, a més de l'elevat nombre de cèl·lules altament afectades, presenta la major freqüència de paquitens inicials de tots els casos estudiats (61,7%) (Taula I Article 2), alguns d'aquests espermatòcits mostraven fragmentació generalitzada dels SCs. Aquesta elevada freqüència de paquitens inicials suggereix que aquest individu pateix una aturada parcial en aquest estadi i està d'acord amb el fet que els estudis de cromosomes meiòtics, d'aquest mateix individu, han mostrat molt pocs espermatòcits en estadis post-paquità. Aquest bloqueig parcial dóna suport a l'existència d'un punt de control a mig paquità (Guichaoua *et al.*, 2005).

### 5.3.2 INCIDÈNCIA D'ANOMALIES SINÀPTIQUES EN ELS 22 SCS AUTOSÒMICS

L'aplicació del mètode de stM-FISH per a la identificació de tots els SCs d'un espermatòcit ha permès analitzar la incidència d'anomalies sinàptiques en cada un dels 22 SCS autosòmics (Article 3).

S'ha observat que els *gaps* i *splits* es troben més freqüentment en aquelles zones dels SCs que contenen blocs d'heterocromatina no centromèrica (Figura 1 Article 3). Tot i amb això, mentre que els *splits* pràcticament només s'han observat en aquestes regions, els *gaps* s'han observat també en altres regions (Taulas 1, 2 i 3 Article 3). Aquesta predominança de *gaps* i *splits* en zones heterocromàtiques no centromèriques, juntament amb el fet que, en general, s'observen més freqüentment en paquitens inicials que en tardans, suggereix que les zones heterocromàtiques no centromèriques serien les últimes regions cromosòmiques en fer sinapsi. Aquestes observacions podrien indicar que possiblement aquestes regions són les que presenten una sinapsi més tardana de tot el genoma humà, i per tant *gaps* i *splits* en aquestes regions no poden ser considerats com anomalies sinàptiques. Només aquells *gaps* i *splits* que afecten zones no heterocromàtiques o aquells que perduren fins a paquità tardà es podrien considerar com a anomalies sinàptiques més severes, ja que podrien ser resultat d'una sinapsi anòmala i no d'un retard en la sinapsi. En canvi, els *gaps* i *splits* que afecten als blocs d'heterocromatina no centromèrica dels braços q dels cromosomes 1 (1qh) i 9 (9qh), i dels braços p dels cromosomes acrocèntrics correspondrien a una anomalia menys severa de la sinapsi i, fins a cert punt, podrien ser considerats com a "normals".

Els individus infèrtils AZO2 i AZO3 han estat analitzats inicialment (Article 2), sense identificació dels SCs i, posteriorment, s'ha procedit a fer la identificació i anàlisi de tots els SCs (Article 3). En el primer estudi, cap d'ells han presentat diferències significatives en el percentatge de cèl·lules amb anomalies sinàptiques respecte dels controls. Ara bé, quan s'han identificat els bivalents afectats s'ha demostrat que, l'individu AZO3 presenta la gran majoria dels *gaps* (30/39, 77%) i *splits* (4/7, 57%) en zones no heterocromàtiques, i que moltes d'aquestes anomalies estan presents a paquità tardà (Taula 1 Article 3). L'individu

AZO2, en aquest últim estudi tampoc ha mostrat valors diferents als dels controls. Així doncs, tres dels tretze individus infèrtils estudiats (AZO1, AST i AZO3) presenten el procés sinàptic altament afectat respecte dels controls .

Tot i que les zones heterocromàtiques no centromèriques presenten més freqüentment *gaps* i *splits*, no totes elles mostren la mateixa incidència. De fet, la regió 9qh és la que més freqüentment s'ha observat, seguida de la 1qh, i de les regions 15p, 21p, 22p, 14p i 16p en les que només s'hi han observat *splits*. Anteriors estudis que només havien analitzat algun bivalent amb heterocromatina ja suggerien que la incidència d'anomalies en aquest bivalents podia ser molt elevada (Solari *et al.*, 1991; Barlow and Hultén, 1996; Sun *et al.*, 2005a). El nostre estudi ha permès analitzar simultàniament el procés sinàptic per a tots els bivalents i ha pogut confirmar que els bivalents 9 i 1 són els més afectats. A més a més, ha demostrat que altres bivalents amb regions heterocromàtiques no centromèriques, no estudiats fins al moment, també es veuen afectats. La resta de bivalents també presenten *gaps* i *splits*, encara que amb menor freqüència i depenent del individu.

Les diferències observades en la incidència de *gaps* i *splits* en aquestes set zones heterocromàtiques no centromèriques indica que existeixen diferències en el temps que tarden aquestes zones en fer sinapsi. Aquest fet podria explicar-se per una diferent mida, composició i organització molecular de l'heterocromatina en cada una de regions heterocromàtiques no centromèriques (Tagarro *et al.*, 1994; Strachan and Read, 1999b).

També s'ha observat una certa variació en la incidència de *gaps* i *splits* per una determinada zona heterocromàtica entre els cinc casos estudiats. Les regions 9qh i la 1qh han resultat ser les més variables. El cas AZO2, que és portador d'un polimorfisme en l'heterocromatina del cromosoma 1 (1qh+), presenta la incidència de *gaps* i *splits* a la zona 1qh més elevada dels cinc casos analitzats (Taula 3 Article 3). El cromosoma 9 humà és dels que presenta un grau més elevat de variacions morfològiques citogenètiques que afecten a la zona pericentromèrica. La incidència en la població general del polimorfisme 9qh+ és del 6-8% i la d'inversions pericentromèriques d'un 1% (Madan and Bobrow, 1974). Aquest freqüent polimorfisme de la zona 9qh en la població general i polimorfismes de la 1qh, com l'observat en l'individu AZO2, podrien explicar la variabilitat interindividual en el nombre de SCs dels bivalents 1 i 9 amb *gaps* i *splits*. Possiblement, part de les diferències interindividuals observades en el nombre d'espermatoïts amb *gaps* i *splits* en el primer estudi (Article 2) siguin degudes a les variacions interindividuals en la incidència de *gaps* i *splits* en aquestes zones heterocromàtiques.

El cromosoma 9, a part de presentar una elevada incidència de *gaps* i *splits* a paquità, també se'l veu afectat per trencaments que produeixen bivalents asimètrics en metafases I (Sarrate

*et al.*, 2004) i anomalies cromosòmiques estructurals en espermatozoides humans (Brandriff *et al.*, 1988; Estop *et al.*, 1995) (revisat a Templado *et al.*, 2005).

## 5.4 LOCALITZACIÓ DELS SCs AUTOSÒMICS RESPECTE DEL PARELL XY

### 5.4.1 SCs AUTOSÒMICS PROPERS I ASSOCIATS AL PARELL XY: PAPER DE L'HETEROCROMATINA

La identificació de cada un dels SCs ha permès analitzar el seu grau de proximitat respecte del parell XY en un total de 310 espermatozoides de cinc casos analitzats (Article 3). Tal i com seria d'esperar en una distribució a l'atzar dels SCs, s'ha observat que tots els SCs podien trobar-se propers al parell XY. Però, els SCs dels bivalents 15 i 21 s'han trobat propers al XY en major freqüència que la resta de bivalents en tots els casos estudiats (Taula 4 Article 3). Els SCs corresponents als bivalents 13 i 14, només en dos casos (OTA7 i C6), s'observen també, propers al parell de cromosomes sexuals, però en menor freqüència.

S'ha observat una associació clara entre SCs autosòmics i el parell XY, en aproximadament un 17% dels paquitens analitzats. La freqüència d'associació al parell XY observada per a un determinat SC autosòmic ha estat de menys de un 1%, però pels SCs15 i 21 aquesta freqüència ha estat més elevada que per a la resta, essent del 5% i del 3%, respectivament (Taula 4 i Figures 1D i 1E Article 3).

Una associació entre el SC15 i el parell XY ha estat prèviament descrita en un estudi de cromosomes meiótics en espermatozoides en estadi de paquitè emprant la tècnica de FISH (Metzler-Guillemain *et al.*, 1999). Tant en aquest estudi previ com en el present treball (Article 3) l'extensió sobre portaobjectes del material cel·lular implica el pas de una distribució tridimensional dels bivalents cromosòmics dins del nucli a una distribució en un pla. Per aquest motiu, una superposició de bivalents cromosòmics podria confondre's amb una associació entre bivalents. Però, en el present treball, donat que l'associació s'han visualitzat com a filaments proteics continus entre el SC i el parell XY (Figures 1D i 1E Article 3), aquest possible error de interpretació queda minimitzat. Metzler-Guillemain *et al.*, (1999) descriuen que el 30-40% dels bivalents 15 analitzats s'associen al parell XY. En el present estudi, un 40% dels SC15 estan propers al parell XY, però únicament un 5% estan clarament associats. De manera similar, pel SC21 al voltant del 30% apareixen propers al parell XY, però només un 3% hi estan associats.

Els cromosomes 15 i 21, com tots els altres cromosomes acrocèntrics, presenten una regió organitzadora nucleolar (NOR) i un bloc heterocromàtic al braç p. S'ha proposat que la heterocromatina té un paper fonamental en l'associació de SCs autosòmics i sexuals (Metzler-Guillemain *et al.*, 1999). L'heterocromatina no centromèrica del cromosoma 15 presenta una certa homologia amb l'heterocromatina no centromèrica del cromosoma Y (Burk *et al.*, 1985). A la vegada, el braç curt del cromosoma 15 també presenta una certa homologia amb les regions subtelomèriques Xq/Yq (Brown *et al.*, 1990; Ciccociola *et al.*, 2000). Però, a més a més, s'ha descrit que material del braç curt del cromosoma 15 es troba en alguns cromosomes Y satèl·lit (Kühl *et al.*, 2001), i en els braços curts dels cromosomes 13, 14 i 21 com a formes polimòrfiques (Smeets *et al.*, 1991; Stergianou *et al.*, 1992; Wilkinson and Crolla, 1993). Aquesta homologia entre les zones heterocromàtiques mencionades dels cromosomes 15 i Y, i el fet que part d'aquest material també pot estar present en altres cromosomes acrocèntrics, explicarien la tendència observada dels cromosomes 15 i 21 a associar-se al parell XY.

## 5.5 RECOMBINACIÓ MEIÒTICA

El terme recombinació meiòtica inclou la recombinació recíproca entre cromosomes homòlegs, la conversió gènica i altres processos independents. En aquest estudi s'ha analitzat només la recombinació recíproca entre cromosomes homòlegs, a través de la proteïna MLH1 (veure apartat 1.5.1.1.2). Al llarg de la discussió es parla de la recombinació fent referència exclusivament a la recombinació meiòtica recíproca entre cromosomes homòlegs.

En l'Article 2 on es recullen part dels resultats obtinguts en l'anàlisi de la recombinació meiòtica s'indica que no hi ha diferència significativa en el nombre mig de punts de MLH1 entre els paquitens inicials i els tardans. Altres estudis recents també han observat que no hi ha variació en el nombre de MLH1 al llarg de paquitè en humans (Barlow and Hultén, 1998; Lynn *et al.*, 2002; Oliver-Bonet *et al.*, 2005b). En ratolí, en canvi, el comportament és diferent. S'ha descrit que els punts de MLH1 inicien la seva aparició a paquitè inicial, arriben al nombre màxim a mig paquitè i decreixen a paquitè tardà (Baker *et al.*, 1996). Els resultats en espermatòcits humans mostren que un cop la cèl·lula ha adquirit el màxim nombre de punts de MLH1 a paquitè inicial, aquest nombre es manté al llarg de tot l'estadi de paquitè.

També s'ha observat que els punts de MLH1 sempre es troben en llocs on el SC està totalment estructurat. No s'ha detectat cap variació significativa en el nombre de punts de MLH1 presents en les cèl·lules amb diferents graus d'afectació per *gaps* i *splits*. Aquesta observació està d'acord amb el fet, recentment descrit, que en llevat els llocs de recombinació poden actuar com a llocs d'inici de formació del SC (Fung *et al.*, 2004).

### 5.5.1 VARIABILITAT INDIVIDUAL EN LA RECOMBINACIÓ

L'anàlisi del nombre de punts de MLH1 tant en espermatoïcits dels individus control com en els d'infèrtils (Articles 2 i 4) mostra que existeix una variabilitat interindividual en el nombre mig de punts MLH1 per cèl·lula (rang de 42,6 a 53 punts MLH1). Ja en els primers estudis en els que s'analitzen quiasmes en espermatoïcits humans (Laurie and Hultén, 1985a; Laurie and Hultén, 1985b) es va observar una variació interindividual en el nombre mig de quiasmes per cèl·lula amb un rang aproximat de 44 a 56 quiasmes. Més recentment, l'anàlisi de punts de MLH1 en altres sèries d'individus control i infèrtils (Lynn *et al.*, 2002; Gonsalves *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2005c) ha confirmat aquesta variació amb unes mitjanes de punts de MLH1 per espermatoïcit que van de 42 a 55. Aquesta variació interindividual de la recombinació en humans s'ha descrit que no depèn de l'edat de l'individu, ni de característiques fisiològiques (e.g. vasectomia, varicocele, tumor testicular), ni de les diferents etapes de l'estadi de paquitè (i.e. inicial, mitjà i tardà) (Lynn *et al.*, 2002). Un estudi recent del nombre de punts de recombinació en oòcits humans ha descrit que també en aquests hi ha una gran variació (Lenzi *et al.*, 2005). Tenint en compte els resultats obtinguts en el present treball i els prèviament descrits, es pot afirmar que la variació del nombre de punts de MLH1 entre individus, en el rang descrit, és més una característica individual que no pas una característica associada a la fertilitat ni a cap tipus d'infertilitat en concret.

En estudis indirectes de la recombinació basats en l'estudi de marcadors polimòrfics, realitzats en ambdós sexes, s'observa que la variació interindividual en la freqüència de recombinació està present en femelles però no en mascles (Broman *et al.*, 1998; Kong *et al.*, 2002). Aquesta discordança entre els resultats obtinguts entre estudis directes i indirectes en mascles, pot ser deguda al nombre de productes meiòtics analitzats en ambdues metodologies. En els estudis directes de la recombinació, mitjançant comptatge de MLH1 es poden analitzar un nombre molt elevat d'espermatoïcits fet que incrementa la potència del estudi estadístic i es poden detectar variacions petites entre individus (veure Introducció apartat 1.5.1.2).

La freqüència de recombinació observada en tres dels individus infèrtils analitzats (OTA3, OTA4 i NOR; Article 2) és significativament inferior a freqüència mitjana i freqüència mínima observada en els individus controls (Taula I, Article 2). Ara bé, aquesta reducció no és significativa si els valors obtinguts es comparen amb els de l'individu control C6 del segon estudi (Article 3) o amb dels controls d'altres estudis publicats (Gonsalves *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2005c). Aquest fet seria atribuïble a la variació interindividual que s'ha descrit per a la recombinació. Per tant, només es pot confirmar l'existència d'una reducció significativa de la recombinació en aquells casos en que s'hi observi una disminució severa del nombre de punts de MLH1 (Gonsalves *et al.*, 2004). Només en aquests casos es podria relacionar la reducció de la recombinació amb la infertilitat.

Els rangs de punts de MLH1 per cèl·lula obtinguts, en els dos estudis realitzats (Articles 2 i 4), han estat de 32 a 63 en els individus controls, i de 34 a 66 en els individus infèrtils. Altres estudis directes de punts de MLH1 realitzats en humans tant en mascles (Lynn *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2005c) com en femelles (Tease *et al.*, 2002; Lenzi *et al.*, 2005) han descrit una gran variació de la freqüència de recombinació en els espermatoïcits I i en els oòcits I d'un mateix individu. En mascles, aquesta variació pot anar de 34 a 66 punts de MLH1 mentre que en femelles pot variar de 48 a 102.

Recentment, s'ha proposat que el nombre mínim de punts MLH1 esperat per espermatoïcit seria de 39, corresponent a un per cada un dels 39 braços p i q dels cromosomes autosòmics, excloent-ne els braços curts dels cromosomes acrocèntrics (Lynn *et al.*, 2002). En el nostre treball (Articles 2 i 4) el valor mínim observat és menor, de 32 a 34, degut a que alguns dels braços curts dels SCs no sempre presenten el corresponent punt de MLH1.

Basant-nos en el nombre màxim de punts de MLH1 observat per cada SCs (Taula III Article 4), el valor màxim teòric de punts MLH1 presents en un espermatoïcit seria de 78. Aquest valor difereix en més de 10 unitats respecte del màxim observat en espermatoïcits (i.e. 66). Aquest fet suggereix que els espermatoïcits poden tenir un control del nombre de punts MLH1, de forma que s'asseguraria el nombre mínim de punts de recombinació per a cada SC sense assolir el seu potencial màxim.

### 5.5.2 PRESÈNCIA DE RECOMBINACIÓ EN EL PARELL XY

S'ha avaluat la presència de punts MLH1 en el parell XY, en tots els espermatoïcits en estadi de paquitè inclosos en l'estudi. S'ha observat un punt de MLH1 en un 63,6% i en un 69,5% dels parells XY dels individus infèrtils i dels controls, respectivament, sense que aquests valors siguin significativament diferents entre si (Taula I Article 2 i Taula 1 Annex Article 4). S'han observat valors semblants en altres estudis realitzats en individus fèrtils (Barlow and Hultén, 1998; Sun *et al.*, 2004b). Dos dels individus infèrtils analitzats (AZO4 i OTA6) mostren freqüències d'un punt MLH1 en el parell XY menors (45% i 40%, Taula 1 Article 2), fet que indica una reducció en la taxa de recombinació entre els cromosomes sexuals en aquests dos individus. Aquesta reducció de la recombinació en la regió PAR1 del parell XY pot, conseqüentment, dur a una no disjunció de cromosomes sexuals i incrementar l'aneuploidia d'aquests cromosomes (Shi *et al.*, 2001) o, fins i tot, provocar una aturada del procés meiótic (Hale, 1994; Egozcue *et al.*, 2000). Aquests dos individus (AZO4 i OTA6), en un estudi meiótic paral·lel realitzat en extensions de bivalents meiótics, han mostrat evidències d'una aturada parcial i total de la meiosi, respectivament, fet que corrobora la hipòtesi que una reducció de la recombinació a la regió PAR1 pot estar relacionada amb una aturada del procés meiótic.



La freqüència amb la que la regió PAR1 dels cromosomes sexuals presenta un punt MLH1 s'ha mantingut constant al llarg de paquitè, sense mostrar diferències entre els estadis de paquitè inicial i de paquitè tardà. Aquest comportament en humans és diferent al descrit en ratolins en els que el parell XY adquireix el punt MLH1 a paquitè inicial i aquest desapareix a paquitè mitjà, abans de que el nombre de punts MHL1 en SCs autosòmics arribi al seu valor màxim (Anderson *et al.*, 1999).

S'ha observat, en el present treball (Article 2) que hi ha una relació directa entre la quantitat d'espermatoïcits que presenten un parell XY amb un punt MLH1 i la taxa general de recombinació de l'individu. Aquest dos valors mostren una correlació positiva: com més elevada és la taxa general de recombinació de l'individu major és la quantitat de parells XY amb un punt MLH1. De manera similar, s'ha descrit que el grau d'aparellament dels cromosomes sexuals i dels autosòmics també correlacionen positivament (Mittwoch and Mahadevaiah, 1992). A la vegada, s'ha descrit que la taxa de formació de bivalents XY seria un indicador de l'èxit de l'espermatogènesi en individus azoospermics (Yogev *et al.*, 2002).

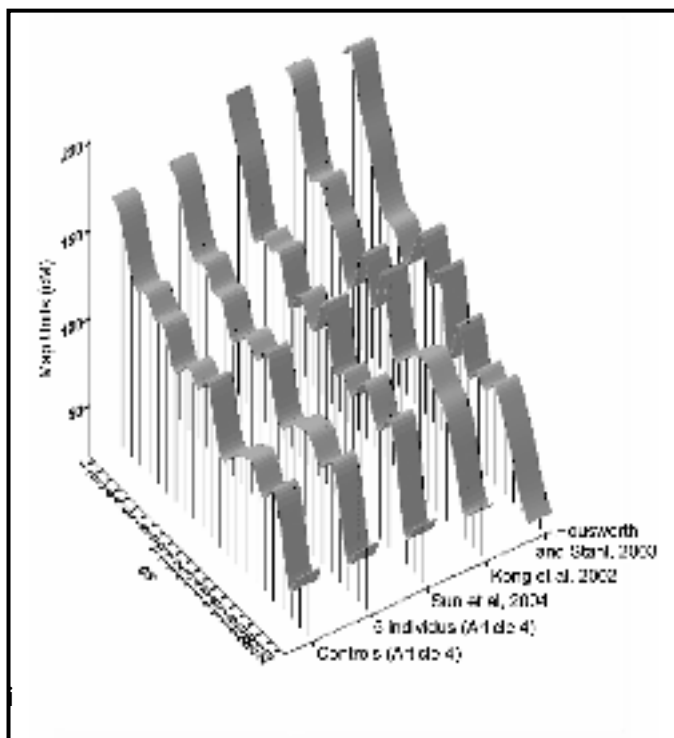
El resultat obtinguts en aquest treball juntament amb totes aquestes observacions suggereixen que la freqüència amb la que el parell XY presenta un punt MLH1 és un indicador de la taxa de recombinació general i un marcador de la progressió del procés meiótic.

### 5.5.3 FREQUÈNCIA DE RECOMBINACIÓ EN ELS SCs AUTOSÒMICS

La identificació, amb stM-FISH, de cada un dels SCs, ha permès analitzar el nombre, localització i distribució dels punts de MLH1 al llarg de cada un dels SCs autosòmics. Aquesta anàlisi s'ha realitzat en dos individus controls i en tres d'infèrtils. (C6, C7, OTA7, AZO2, AZO3; Article 4 i Annex).

S'ha observat que el nombre de punts de recombinació no és igual per tots els bivalents, i que com més llarg és el SC major és el valor mig de punts MLH1 que presenta. Aquesta observació està d'acord amb la correlació recentment descrita entre longitud de SC i nombre de punts de recombinació (Lynn *et al.*, 2002). Un estudi previ realitzat en bivalents meiótics en diacinesi ja va detectar un variació en el nombre de quiasmes presents en bivalents llargs respecte dels bivalents curts (Laurie and Hultén, 1985b). Més recentment, estudis indirectes de la recombinació han evidenciat que com més petits són els cromosomes més densitat de recombinació (cM/Mb) presenten, fet que assegura que hi hagi, com a mínim, un punt de recombinació per bivalent (Kong *et al.*, 2002; Matise *et al.*, 2003). D'aquesta manera s'afavoreix una correcta segregació dels homòlegs

Considerant que cada punt MLH1 equival a un interval de 50 cM de longitud genètica, a cada SCs li correspon una longitud genètica determinada d'acord amb el valor promig de punts MLH1 observats. La longitud genètica observada en cada un dels 22 SCs autosòmics en els cinc casos analitzats en aquest treball (Taula III Article 4 i Annex) és similar a la descrita en estudis d'anàlisi indirecta de la recombinació (Kong *et al.*, 2002; Housworth and Stahl, 2003) i a l'obtinguda en un estudi d'anàlisi de MLH1 en SCs en un individu fèrtil (Sun *et al.*, 2004b) (Figura 5.1). La concordança de resultats valida ambdós models d'anàlisi de la recombinació.



**Figura 5.1** Representació de la longitud genètica (cM) de cada un dels 22 bivalents autosòmics observada en els dos individus control, per separat, i en els cinc individus del present treball, conjuntament (Article 4 i Annex). A la vegada, es representa la longitud genètica observada en estudis indirectes (Kong *et al.*, 2002; Housworth and Stahl, 2003) i directes (Sun *et al.*, 2004b) de la recombinació.

En general, cada SC autosòmic presenta, com a mínim, un punt MLH1, encara que ocasionalment alguns SCs no en mostren cap. Entre aquests últims, el parell XY i el SC21 són els més afectats seguits dels SC18, SC19 i SC22 (Taula IV Article 4 i Annex). Els braços p o q dels SCs no acrocèntrics petits (i.e. SC17, SC18, SC19, SC20) són els que més freqüentment mostren absència de punts MLH1, essent el braç p el més afectat. Pel que fa als SCs acrocèntrics, rarament presenten MLH1 en els seu braç p, encara que en algunes ocasions se n'hi ha observat (Taula 1 Article 4).

És ben conegut que la segregació meiótica requereix, com a mínim, un lloc de recombinació entre els cromosomes homòlegs d'un bivalent, i que una reducció de la taxa de recombinació pot augmentar l'aparició d'univalents a metafase I (revisat a Egozcue *et al.*, 2000) i

incrementar la freqüència d'aneuploidia (revisat a Hassold and Hunt, 2001). Així doncs i d'acord amb els resultats obtinguts en aquest treball, el parell de cromosomes sexuals i el bivalent 21 seguit pels bivalents 22, 19 i 18 serien els més propensos a formar bivalents aquiasmàtics potencialment responsables de generar aneuploidia. Els resultats dels estudis d'aneuploidies en caps descondensats d'espermatozoides són concordants amb els resultats del present treball ja que les aneuploidies més freqüentment observades són les disomies dels cromosomes sexuals i dels cromosomes 21 i 22 (revisat a Templado *et al.*, 2005). També hi ha concordança amb els resultats d'un estudi citogenètic en espermatòcits humans, realitzat amb tècniques de M-FISH, que mostren que els cromosomes que més freqüentment presenten univalents són els cromosomes 18 i 19 (Sarrate *et al.*, 2004). Així mateix, també s'ha identificat en oòcits, una freqüència elevada d'aneuploidia pel cromosoma 19 respecte dels altres cromosomes (Clyde *et al.*, 2003; Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2004).

No obstant, cal destacar que les taxes d'aneuploidia en espermatozoides humans pels cromosomes sexuals, 21, 22, 19 i 18 són inferiors a les freqüències amb que aquests mateixos cromosomes presenten absència de MLH1 en els corresponents SCs. Aquest fet podria ser degut a que alguns espermatòcits amb univalents podrien quedar bloquejats en l'espermatogènesi, mentre que d'altres no s'aturarien i produirien gàmetes aneuploides.

### 5.5.3.1 Diferències observades entre individus

La taxa de recombinació observada en els dos individus controls C6 i C7 són força diferents, 42,6 i 53, respectivament (Taula 1 Article 4). Aquests valors són propers als valors mínim i màxim del rang observat en espermatòcits humans (veure apartat 5.5.1).

L'individu C6 presenta un major nombre de parells XY i de SC22, SC19 i SC18 amb absència de punt MLH1 que el C7. Ara bé, en ambdós controls la incidència de SC21 amb absència de punt MLH1 és similar. Diversos estudis han descrit una reducció de la recombinació en espermatozoides disòmics 24, XY respecte dels normals (Shi *et al.*, 2001), i en pares d'individus amb síndrome 21 o 47, XXY d'origen patern (Savage *et al.*, 1998) (Hassold *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 2000).

D'acord amb aquests treballs, els nostres resultats suggereixen que l'individu C6, amb una baixa taxa de recombinació, presentaria un risc més elevat de segregacions anòmales pels cromosomes sexuals, 22, 19 i 18 que el C7, mentre que pel cromosoma 21 la incidència d'aneuploidia seria similar en ambdós casos. Així, es pot dir que els individus amb una baixa taxa de recombinació poden presentar un major risc de formar gàmetes aneuploides, sobretot per aquells cromosomes de mida més petita.

#### 5.5.4 DISTRIBUCIÓ DE RECOMBINACIÓ EN ELS SCs AUTOSÒMICS

La resolució de la tècnica d'immunodetecció de MLH1 és de 10Mb (Lynn *et al.*, 2004), valor que equival a unes 0,7 $\mu$ m. Els punts de MLH1 s'han observat en totes les regions dels SCs excepte als centròmers, per tant, es pot dir que a una resolució de 10Mb qualsevol regió del genoma pot contenir una possible diana per a la recombinació meiòtica. No obstant, l'estudi de la distribució dels punts de MLH1 mostra que les zones subtelomèriques són les zones més calentes del genoma i les zones peri-centromèriques les més fredes (Figura 5a Article 4 i Figura 1 Annex), Aquests resultats estan d'acord amb els d'estudis de quiasmes en espermatòcits a diacinesi (Hultén, 1974; Laurie and Hultén, 1985a; Laurie and Hultén, 1985b), i amb els d'estudis de la distribució de MLH1 en SCs (Barlow and Hultén, 1998; Lynn *et al.*, 2002; Tease *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2004b). No obstant, en el present treball, s'observa que en bivalents acrocèntrics la zona pericentromèrica del braç q és una zona calenta de recombinació, el que indicaria que el centròmer no té un efecte inhibidor de la recombinació. Tenint en compte la distribució dels punts de recombinació observada, es pot dir que una variació de la localització d'un punt de MLH1 dins el bivalent és permesa, mentre que el nombre màxim de punts de recombinació en el cromosoma està ben definit.

S'ha observat que la distribució dels punts de MLH1 és força similar en tots els SCs amb una mida semblant i que aquesta distribució no és a l'atzar. Ja a principis del segle XX, quan es varen començar a construir els mapes genètics de *Drosophila*, es va observar que els llocs de recombinació no es localitzaven a l'atzar al llarg dels cromosomes (Muller, 1916). Es va descriure que la presència d'un punt de recombinació interferia impedit l'establiment d'un altre punt de recombinació pròxim en el mateix parell de cromosomes. Aquest fet s'anomena interferència. En el present treball (Figura 5 Article 4 i Figura 1 Annex), la distribució de punts MLH1 i la separació observada entre punts adjacents evidencia l'existència, en humans, d'aquest fenomen d'interferència positiva, coincidint amb resultats d'altres estudis directes (Barlow and Hultén, 1998; Lynn *et al.*, 2002; Tease *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2004b) i indirectes (Broman and Weber, 2000) de la recombinació.

La distància entre punts adjacents de MLH1 és l'expressió física de la interferència positiva entre ells. Per tant, una manera d'avaluar aquesta interferència és analitzar les distàncies entre punts de MLH1. En l'estudi dut a terme (Article 4) s'ha mesurat la distància entre punts de recombinació adjacents i el resultat s'ha expressat tant en unitats físiques ( $\mu$ m) com en unitats relatives a la longitud del SC (distància relativa). Els resultats obtinguts mostren que, per a cada bivalent, la distància entre punts de MLH1 adjacents situats en diferents braços del SC (distància trans-centromèrica) és major que la distància entre punts de MLH1 situats dins un mateix braç (distància intra-braç) (Figura 5b Article 4). S'ha confirmat que la distància entre punts de recombinació depèn del nombre de punts que hi ha en el SC i de la seva localització (Laurie and Hultén, 1985b; Sun *et al.*, 2004b). A més a més, els nostres resultats mostren que per a un nombre determinat de punts MLH1 per braç els SCs

acrocèntrics presenten una distància entre punts de recombinació major que la observada pels SCs no acrocèntrics, quan s'expressen en distàncies relatives. Si s'expressa la distància d'interferència en unitats de distància física ( $\mu\text{m}$ ), els SCs més llargs, presenten una separació mitjana entre punts de MLH1 adjacents superior a la dels SCs més curts indicant una major interferència en els SCs llargs. Aquest fet, està d'acord amb observacions fetes en llevat (Kaback *et al.*, 1999). Però si la distància s'expressa en distància relativa a la longitud del SC, els SCs més curts, presenten una distància mitjana entre punts de MLH1 adjacents superior a la dels SCs mes llargs (Taula 5.3).

Taula 5.3 Mitjana de la distància relativa i l'absoluta entre punts MLH1 per cada SC pels individus C6 i C7

SC	C6			C7		
	Distància relativa (%)		Distància absoluta ( $\mu\text{m}$ )	Distància relativa (%)		Distància absoluta ( $\mu\text{m}$ )
	Mitjana	SD	Mitjana	Mitjana	SD	Mitjana
1	43,2	13,4	10,3	31,4	9,4	9,3
2	44,3	14,5	9,5	34,1	9,7	9,3
3	55,6	18,0	9,8	41,6	15,7	9,1
4	60,1	17,4	8,7	44,1	14,1	8,5
5	57,6	17,4	8,9	43,9	12,8	8,7
6	67,8	16,2	9,8	47,3	15,2	8,9
7	67,3	15,9	10,2	45,7	14,5	8,5
8	68,9	12,9	8,0	55,3	17,7	8,2
9	64,5	15,7	8,1	59,3	18,5	9,4
10	67,5	17,3	8,2	51,4	17,1	7,6
11	69,2	12,8	8,7	58,4	18,5	8,9
12	63,6	16,6	8,1	50,8	15,8	8,0
13	56,8	12,4	4,7	56,0	13,5	5,8
14	57,0	12,0	5,1	54,5	14,5	5,9
15	56,1	13,3	5,5	54,6	13,5	6,4
16	67,0	13,7	6,4	66,3	14,4	7,3
17	67,8	11,5	6,9	68,0	14,4	8,0
18	75,0	11,8	4,8	67,2	15,9	5,2
19	72,8	13,9	6,7	68,1	15,3	7,1
20	71,7	11,0	4,6	69,9	13,3	5,2
21				66,9	12,7	3,1
22	62,0	10,6	3,3	58,7	11,9	3,5
Total	62,7		171,7	54,3		183,5

Però, quina de les dues expressions de la distància d'interferència entre punt MLH1 adjacent reflexa millor el grau de interferència?

Possiblement una combinació d'ambdues expressaria adequadament el grau de interferència ja que la intensitat de la interferència entre punts dependria de la distància física entre punts de MLH adjacents, però que aquesta estaria modulada per la longitud total del SC. El resultat de ambdós efectes permetria una distribució preferent de punts de MLH1 al llarg de cada SC assegurant la correcta segregació dels cromosomes homòlegs

### 5.5.4.1 Diferències observades entre individus

En general, en els dos casos control i en els tres infèrtils estudiats (Article 4 i Annex) es presenta una distribució similar dels llocs calents de recombinació. No obstant, s’han observat petites diferències en la distribució dels punts de recombinació en els dos individus controls, C6 i C7. El cas C7, amb una taxa de recombinació més elevada, presenta una mitjana de punts MLH1 per braç superior a la del C6. Aquest fet es reflexa en la distribució de punts MLH1 en cada braç: d’una banda, amb una localització del punt de MLH1 proper a telòmer encara més distal i, d’altra banda, amb una incidència més elevada de punts MLH1 tant a la zona intermèdia del braç com a la zona més propera al centròmer. Ara bé, per a un mateix nombre de punts de MLH1 observats en un mateix braç, la distribució és similar en ambdós casos (Figura 6 Article 4).

L’individu amb els SCs més llargs (C7) presenta, per cada SC, una distància mitjana d’interferència entre MLH1 adjacents similar a la del individu amb SCs més curts (C6), quan aquesta distància s’expressa en unitats físiques ( $\mu\text{m}$ ), però menor quan s’expressa en distància relativa a la longitud del SC (Taula 5.3). Ara bé, per a un nombre concret de punts MLH1 per SC, la distància d’interferència mitjana entre MLH1 adjacents és major en el C7 que en el C6 si la distància s’expressa en  $\mu\text{m}$ , però menor quan s’expressa en distància relativa (Taula 5.4). Aquest fet és similar al l’observat en SCs de diferent mida d’un mateix espermatòcit (veure apartat anterior)

**Taula 5.4** Distàncies relatives i absolutes entre punts MLH1 pels SC1 i SC2, amb diferent nombre de punts, en els individus C6 i C7

SC	MLH1/SC	C6				C7				
		N	Distància relativa (%)		Distància absoluta ( $\mu\text{m}$ )		N	Distància relativa (%)		Distància absoluta ( $\mu\text{m}$ )
			Mitjana	SD	Mitjana		Mitjana	SD	Mitjana	
1	2	24	62,3	14	14,8	5	57,9	20,2	17,1	
	3	63	39,8	4,2	9,5	25	38,6	5,9	11,4	
	4	16	29,5	1,9	7	65	28,2	2,7	8,4	
	5	1	23,6		5,6	10	22	1,4	6,5	
	6					1	21,3		6,3	
	Total	104	43,2	13,4	10,3	106	31,4	9,4	9,3	
2	2	23	64,6	17,4	13,9	6	57	22,2	15,5	
	3	70	40	4,6	8,6	36	40	4,1	10,9	
	4	11	28,6	2,5	6,2	58	29,5	2	8	
	5					7	21,7	1,2	5,9	
	Total	104	44,3	14,5	9,5	107	34,1	9,7	9,3	

### 5.5.5 COM POT ACTUAR LA INTERFERÈNCIA ENTRE PUNTS DE RECOMBINACIÓ?

Una interpretació, generalment acceptada, de com actua la interferència és que cada punt de recombinació genera un senyal que evita la formació de nous punts de recombinació pròxims, i que aquest senyal es transmet una certa distància al llarg del bivalent. S'han proposat diversos models per explicar com actua aquesta interferència. El model de *counting* (Foss *et al.*, 1993) proposa que entre dos punts de recombinació hi ha un nombre fix de punts de recombinació potencials que no esdevenen punts de recombinació. Aquest model suggereix que la cèl·lula ha de tenir capacitat de “comptar” els punts potencials de recombinació. Recentment, s'ha proposat un nou model basat en forces mecàniques (Börner *et al.*, 2004; Kleckner *et al.*, 2004). Aquest model suggereix que els cromosomes, durant la profase I meiótica, estan sota un estrès a causa de les successives expansions i contraccions de la cromatina. Proposen que als llocs on hi ha recombinació hi ha un alliberament d'estrès, i que aquest alliberament s'estén al llarg del bivalent prevenint la formació de nous punts de recombinació. En aquells llocs on l'alliberament d'estrès no hi arriba, aquest s'hi torna a acumular afavorint l'aparició d'un nou punt de recombinació.

En llevat, s'ha descrit que els llocs on hi ha recombinació coincideixen amb els llocs on s'inicia l'estructuració del SC (Fung *et al.*, 2004) i s'ha suggerit que els llocs de recombinació poden promoure directament la nucleació i expansió del SC (Börner *et al.*, 2004). Recentment, s'ha descrit que en humans la sinapsi s'inicia en un nombre limitat de regions subtelomèriques i que aquesta avança cap al centròmer (Brown *et al.*, 2005). El fet que en humans les zones subtelomèriques són les zones més calentes en recombinació suggereix que els primers llocs de recombinació designats són els d'aquestes zones. Aquests primers llocs de recombinació iniciarien la nucleació del SC i, a la vegada, crearien interferència. En sentit cap al centròmer, un nou punt de recombinació seria designat sempre que la longitud del braç fos superior a la distància d'interferència. Aquest nou punt de recombinació crearia, de nou, interferència i, només si el braç fos suficientment llarg, s'hi col·locaria un nou punt de recombinació. Aquest fet tindria lloc de manera independent en cada un dels dos braços dels bivalents. Si el braç no és suficientment llarg com per a que es produeixi un nou punt de recombinació, la interferència arribaria a la zona centromèrica. Aquí, les interferències que provenen dels dos braços coincidirien evitant la formació d'un nou punt de recombinació. Com a conseqüència la interferència transcromèrica resultaria de la suma de distàncies d'interferència de cada un dels dos punts de recombinació pròxims a centròmer i el centròmer. D'acord amb aquesta interpretació, els resultats d'aquest estudi (Article 4) i d'altres estudis previs (Laurie and Hultén, 1985b; Sun *et al.*, 2004b) mostren que les distàncies transcromèriques entre punts de recombinació són majors que les distàncies entre dos punts dins d'un mateix braç (veure apartat 5.5.4) indicant que el centròmer per sí mateix no interferia directament en la localització dels punts de recombinació.

Algunes vegades s'han observat punts de MLH1 propers al centròmer especialment en SCs acrocèntrics llargs. Brown *et al.*, (2005) han demostrat que la sinapsi dels cromosomes acrocèntrics s'inicia només pels braços q i no pel p. En aquests cromosomes, la interferència entre punts de recombinació en sentit cap al centròmer, només provindria d'un dels dos extrems del SC (i.e. el braç q). Al centròmer, la interferència no se sumaria a cap altra provinent del braç p i permetria l'aparició d'un nou punt de recombinació proper al centròmer en el braç q, o en el p, si la distància d'interferència sobrepassa la regió centromèrica.

### 5.5.6 APLICABILITAT DELS PERFILS DE RECOMBINACIÓ: e.g. Inv(1)(p22p34.3)

És interessant conèixer la distribució dels punts de recombinació (punts MLH1) en cada un dels bivalents i la incidència específica en les diferents regions cromosòmiques dels diferents bivalents, ja que aporten un coneixement empíric de la recombinació. Fins al moment, es disposava de freqüències de recombinació basades en estudis realitzats en bivalents meiòtics en diacinesi/metafase I (Laurie and Hultén, 1985a; Laurie and Hultén, 1985b), però en extensions de bivalents meiòtics la resolució per determinar la localització dels quiasmes és menor que la que s'obté analitzant MLH1 en SCs (veure Introducció, apartat 1.5.1.1). Aquest coneixement empíric de la recombinació en els diferents bivalents es pot aplicar a la comprensió del comportament cromosòmic durant la segregació meiòtica de cromosomes implicats en reorganitzacions cromosòmiques equilibrades. En aquests casos, s'ha descrit que els espermatòcits a paquità presenten figures característiques dels cromosomes implicats en la reorganització que possibiliten la sinapsi i la recombinació i condicionen la proporció d'espermatozoides desequilibrats resultants de recombinació meiòtiques.

En les inversions paracèntriques, si el fragment invertit és molt curt, s'observen asinapsis o aparellaments heteròlegs en aquesta regió. En aquests casos no hi ha recombinació entre els homòlegs en aquesta zona. Ara bé, si la regió invertida és llarga, com la regió estudiada, aquesta pot girar sobre si mateixa i formar una ansa o bucle d'inversió, permetent així el reconeixement d'homologia, la sinapsi i la recombinació entre aquesta regió invertida i la seva homòloga.

El coneixement empíric de la recombinació obtingut en el present treball (Figura 5a Article 4) ha estat aplicat a l'anàlisi mitjançant FISH, en nuclis descondensats d'espermatozoides, de formes recombinants produïdes per un individu portador d'una inversió cromosòmica paracèntrica 46XY, inv(1)(p22p34.3) (Costa *et al.*, en preparació). En aquest portador, la freqüència d'espermatozoides amb complements cromosòmics resultants de la recombinació produïda en la regió invertida ha estat de 4,5%, essent la resta, complements cromosòmics no recombinants. La distribució dels punts de MLH1 que s'ha observat en individus control



(Figura 5a Article 4) en la corresponent regió invertida és del 74,8%. Per tant, si la figura en ansa es produís en tots els espermatòcits el percentatge d'espermatozoides recombinants seria de 37,4. El fet que la incidència de formes recombinants és només de 4,5% evidencia que en aquest portador de la inversió s'ha donat una reducció de la recombinació en més d'un 85% sobre la teòricament esperada. Aquest fet suggereix que la formació teòrica d'ansa d'inversió és molt reduïda i que molt probablement, en la majoria d'espermatòcits, en aquest bivalent reorganitzat es produiria una sinapsi heteròloga (Costa *et al.*, en preparació).

## 5.6 SINAPSI I RECOMBINACIÓ EN UN ESPERMATÒCIT TETRAPLOIDE

Durant l'anàlisi d'espermatòcits en estadi de paquitè de l'individu C6 (Articles 3 i 4) s'ha identificat un nucli amb una aparença no habitual. Aquest nucli semblava tenir el doble de SCs que en una paquitè normal, és a dir, 46 SCs. L'aplicació del stM-FISH ha permès confirmar que en efecte es tractava d'un espermatòcit tetraploid en estadi de paquitè (Article 5).

Tot i que en estudis de cromosomes meiòtics en mostres testiculars humanes no és inusual trobar espermatòcits en metafase I amb aparença tetraploid, és impossible demostrar que aquesta aparença no resulta del solapament de dues metafases I diploides, ja que és ben conegut que la meiosi masculina es produeix a tongades en els túbuls seminífers. Aquesta observació evidencia l'existència de meiòcits tetraploides. A la vegada, demostra que els espermatòcits tetraploides humans poden entrar en meiosi, i que poden produir-se els processos de sinapsi i recombinació meiòtica, tot i que el nombre de cromosomes homòlegs estigui duplicat. Espermatòcits tetraploides que progressin en la meiosi poden generar espermatozoides diploides.

Durant anys l'origen dels espermatozoides diploides s'ha explicat per errors de segregació produïts a la meiosi I o a la meiosi II (Egozcue *et al.*, 2000; Zaragoza *et al.*, 2000; Egozcue *et al.*, 2002). Aquest paquitè tetraploide evidencia que els espermatozoides diploides es poden originar també com a conseqüència d'errors mitòtics previs a la meiosi, en l'etapa proliferativa de les espermatogònies. L'origen més probable d'espermatòcits tetraploides, com l'observat, seria l'endoreduplicació, que consisteix en una duplicació del DNA en absència de divisió cel·lular (Miller and Therman, 2001).

### 5.6.1 APARELLAMENT EN UN ESPERMATÒCIT TETRAPLOIDE

En aquest espermatòcit tetraploide la majoria de cromosomes fan sinapsi formant dos bivalents per cromosoma. No obstant, s'observen cinc estructures quadrivalents que corresponen als quatre homòlegs dels cromosomes 1, 2, 9, 16 i 20 (Figures 1A, 1B i 1E Article 5), conseqüència de la sinapsi entre els quatre cromosomes homòlegs corresponents.

Aquest espermatòcit podria estar en un estadi de paquitè inicial pel fet que els quadrivalents i alguns SCs encara no estan completament en sinapsi (Figures 1A, 1C i 1E Article 5).

Entre els cinc cromosomes que formen quadrivalents, hi ha els cromosomes 1, 9 i 16 que són cromosomes amb blocs heterocromàtics no centromètrics grans. S'ha descrit que les zones heterocromàtiques semblen ser les més tardanes en el procés de la sinapsi (Article 3). Semblaria que els cromosomes amb blocs heterocromàtics, tindrien una menor capacitat, que la resta de cromosomes, d'avançar fins a completar l'aparellament dels braços p a q homòlegs. Tal vegada les regions heterocromàtiques ocupen compartiments nuclears que afavoreixen l'associació entre elles i que dificulten la formació dels dos SCs independents com a conseqüència de que la búsqueda de les zones homòlogues queda limitada.

Els cromosomes sexuals apareixen formant dos bivalents separats (Figures 1A, 1D i 1E Article 5). Donat que en aquest espermatòcit tetraploid s'ha originat per endoreduplicació, els dos cromosomes que formen els bivalents X i Y són genèticament idèntics. El bivalent X fa una sinapsi completa al llarg de tot l'eix de p i q, observant-se l'estructura d'un SC madur. No obstant, pel que fa al bivalent Y, s'observa exclusivament sinapsi en el braç curt on s'hi estructura el SC madur, mentre que a la resta del bivalent s'observen els AE/LE en asinapsi.

### 5.6.2 RECOMBINACIÓ EN UN ESPERMATÒCIT TETRAPLOIDE

Aquest espermatòcit tetraploide presenta 73 punts de recombinació meiòtica (punts MLH1), un valor menor al doble de la mitjana de punts MLH1 observats en aquest individu (42,6 Taula 1 Article 4).

La distribució dels punts de recombinació observats en els SCs autosòmics és similar a la d'un paquitè normal. La majoria de SCs presenten un punt MLH1 per braç en una localització distal propera a telòmer (Figura 1E Article 5).

Algunes de les parelles de SCs presenten una distribució dels punts de MLH1 lleugerament diferent. Aquesta variació també s'observa entre SCs de diferents espermatòcits, tal i com mostra la distribució dels punts de MLH1 descrita per cada SC (veure apartat 5.5.4). Aquest espermatòcit tetraploide fa evident, per primera vegada, que la variabilitat en la localització

dels punts de MLH1 no existeix només entre espermatòcits, sinó que també entre SCs d'un mateix espermatòcit.

El bivalent Y presenta un punt de MLH1 en el braç p, que es troba en sinapsi, i possiblement es localitza a la regió pseudoautosòmica PAR1. El bivalent X, per altra banda, presenta un punt de MLH1 a la part més distal de cada un dels braços, de manera similar als SCs dels cromosomes del grup C. Així doncs, com a mínim per als cromosomes sexuals, la recombinació detectada, s'ha produït entre còpies idèntiques d'un mateix cromosoma, produïts per endoreduplicació.

## 5.7 LONGITUD DEL SC

La mesura de la longitud física de cada SCs mostra que els individus amb una taxa de recombinació elevada presenten SCs més llargs que els individus amb una taxa de recombinació inferior (Article 4 i Annex). Aquest fet va ser observat per primera vegada per Lynn *et al.*, (2002) que van descriure que la longitud dels SCs covaria amb la taxa de recombinació. A més a més, es va observar que, entre cromosomes de mida similar, aquells que tenen una longitud genètica (cM) més gran són els que presenten SCs més llargs. Aquesta observació i la correlació entre longitud i recombinació prèviament descrita mostren que la longitud dels SCs és un reflex de la longitud genètica més que de la longitud física dels cromosomes (Lynn *et al.*, 2002).

És ben conegut que els cromosomes presenten diferències en el contingut de bases GC i AT, i en la densitat gènica (Venter *et al.*, 2001). Les bandes R, també conegudes com a bandes G negatives, són regions amb un alt contingut de bases GC i amb una elevada densitat gènica (gens/Mb). Per altra banda, les bandes G o G positives, són pobres en bases GC i en gens. De les bandes R, les bandes T són les que tenen la densitat gènica més elevada (Holmquist, 1992), la major distància genètica i són regions amb un alt contingut de fibres obertes de cromatina (Gilbert *et al.*, 2004).

La identificació i anàlisi de tots els SCs en els cinc individus estudiats (Article 4 i Annex) mostra que alguns SCs presenten una longitud relativa superior a la longitud relativa mitòtica, i que d'altres en presenten una d'inferior, corroborant resultats previs obtinguts en un sol individu (Sun *et al.*, 2004b). A més a més, aquesta variació de la longitud relativa s'ha observat que també es dona en els braços p i q quan s'analitzen per separat. Per a un SC determinat, la variació de la longitud relativa observada en un braç és independent de la variació observada en l'altre. És a dir, cada braç, independentment de l'altre, pot mostrar un augment o disminució de la longitud relativa, o simplement no mostrar variació de la

longitud. Com a conseqüència, alguns dels SCs presenten un índex centromèric diferent al corresponent en cromosomes mitòtics (Taula II Article 4).

L'anàlisi de la longitud dels complexos en dos individus control (C6 i C7) mostra que, la variació de la longitud relativa dels SCs correlaciona positivament amb la densitat gènica dels cromosomes. Aquells cromosomes que tenen una baixa proporció de bandes G, i per tant rics en gens, són aquells que presenten SCs amb longituds relatives majors a les mitòtiques (e.g. cromosomes 19 i 17), i a l'inrevés, aquells amb una alta proporció de bandes G són els que presenten SCs amb longituds relatives menors (e.g. cromosomes 13 i 18) resultats que estan d'acord amb els recentment publicats per Sun *et al.*, (2004). La representació gràfica d'aquesta correlació és molt similar a la descrita per Gilbert *et al.*, (2004) que mostra la correlació entre la densitat gènica d'un cromosoma i l'abundància de fibres obertes de cromatina per a aquest cromosoma. S'ha descrit que, en bivalents meiòtics a paquitè la regió heterocromàtica és més curta que en els cromosomes mitòtics, i que les regions heterocromàtiques en els bivalents meiòtics estan altament empaquetades (Stack, 1984). Tot i així, més recentment, s'ha descrit que les regions heterocromàtiques són molt heterogènies en estructura, i no totes presenten el mateix tipus d'empaquetament (Gilbert *et al.*, 2004). Totes aquestes observacions aporten evidències de que la variació de la longitud relativa dels SCs pot reflectir la quantitat de fibres de cromatina oberta i de cromatina compacta presents en el cromosoma. Les regions amb fibres obertes de cromatina estan citològicament descondensades en limfoblasts humans (Gilbert *et al.*, 2004), per tant, la cromatina a les bandes R i a les bandes T presenta un volum major que la cromatina a les bandes G (Yokota *et al.*, 1997; Gilbert *et al.*, 2004). D'altra banda, l'heterocromatina, en general, presenta un estat més condensat i presenta un menor volum (Stack, 1984; Gilbert *et al.*, 2004). L'empaquetament d'aquestes diferents regions ocupant diferents volums al llarg dels cromosomes meiòtics profàsics podria forçar que els eixos proteics de les cromàtides tinguin una extensió diferent (Blat *et al.*, 2002), i que resultin en regions de SC amb diferents longituds. El fet que la distribució de fibres obertes i compactes de cromatina no és uniforme al llarg del cromosoma pot explicar que la variació de longituds en els dos braços d'un mateix SC sigui independent. El comportament observat pel SC1 (Article 4), en el que el braç p mostra un allargament de la seva longitud relativa i que el braç q mostra un escurçament, es pot explicar per aquesta relació descrita. A l'extrem del braç p del cromosoma 1 hi ha una zona bastant llarga molt rica en gens que seria la responsable de que el braç p s'allargui; pel contrari el braç q el cromosoma 1 té una zona heterocromàtica prop del centròmer que donaria lloc a un escurçament d'aquest braç.

## 5.8 DISRUPCIÓ DE L'ESPERMATOGÈNESI EN UN PORTADOR D'UN ISOCROMOSOMA DICÈNTRIC Yq(p11.32)

Durant la realització d'aquest treball, s'ha identificat un individu infèril portador d'una reorganització cromosòmica en el cromosoma Y que, pel fet d'involucrar un cromosoma sexual, i la importància del parell XY en el procés meiótic, ha despertat en nostre interès a ser estudiat.

Les anomalies estructurals que afecten el cromosoma Y inclouen delecions, anells, translocacions amb cromosomes autosòmics o amb el cromosoma Y, isocromosomes i dicèntrics. Entre aquestes anomalies estructurals els Y dicèntrics són els més freqüents (Hsu, 1994; Yoshida *et al.*, 1997). De cromosomes dicèntrics n'hi ha dos tipus diferents: els dicèntrics Yq (i.e. dic(Yq)) que es formen per la fusió entre els dos braços curts de dos cromosomes Y en els quals es manté part del braç p, i els dicèntrics Yp (i.e. dic(Yp)) en els quals els dos cromosomes Y es fusionen pel braç q. Si el dicèntric és completament simètric s'anomena un isodicèntric.

La caracterització citogenètica de la reorganització cromosòmica del Y mitjançant tècniques de citogenètica clàssica i de FISH han permès concloure que es tractava d'un isocromosoma dicèntric Yq amb trencament a la banda p11.32 (idicYq(pter-p11.32::p11.32-pter)) i present en mosaicisme en un 51,7% dels limfòcits i en un 62,8% de les cèl·lules epitelials bucals. Les altres línies cel·lulars observades han estat majoritàriament aquelles amb un cariotip 46,XY en ambdós teixits.

### 5.8.1 ORIGEN I MECANISME DE FORMACIÓ DEL idic(Yq)

Pel que fa a l'origen pre- o post-zigòtic d'aquesta reorganització cromosòmica, el fet que hi hagi una línia cel·lular normal (i.e. 46,XY) en ambdós teixits estudiats indica que es tracta d'un origen post-zigòtic tardà. Els orígens més freqüents són el gametogènic o post-zigòtic primerenc (Hsu, 1994), que, a diferència del post-zigòtic tardà, fan que aquesta línia cel·lular normal no sigui present en el mosaic.

Dels diversos mecanismes per a la formació d'isocromosomes dicèntrics descrits (Darlington, 1939; Therman *et al.*, 1974; Wolff *et al.*, 1996), el més probable per a la formació d'aquest idic(Yq)(p11.32) és el trencament de cromàtides germanes i la unió entre elles (Wolff *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 1999). Els resultats de FISH demostren que en aquest idic(Yq) hi ha hagut una pèrdua dels telòmer de Yp, fet que es podria explicar com a conseqüència d'un trencament de cromàtides germanes en un punt més distal de Yp11.32, última banda subtelomèrica, i una reunió dels extrems lliures després de la fase S. Les divisions cel·lulars consecutives donaran lloc a diverses línies cel·lulars dependent de l'estabilitat del cromosoma

reorganitzat. El fet que en l'estudi de mosaïcisme s'han observat poques cèl·lules amb una dotació de cromosomes sexuals diferent a la normal i a la corresponent a la reorganització, demostra que el cromosoma reorganitzat és altament estable.

En aquest cas i en gran part de casos estudiats, els cromosomes Y isodicèntrics presenten majoritàriament una sola constricció primària i una banda C centromèrica indicant que un dels centròmers es pot trobar inactiu (Hsu, 1994). Aquests dicèntrics actuen com a monocèntrics augmentant així la seva estabilitat. Resultats similars s'observen en dicèntrics on hi ha cromosomes acrocèntrics implicats (Lemyre *et al.*, 2001; Wandall *et al.*, 2002). L'estabilitat dels dicèntrics amb dos centròmers actius també es pot explicar segons la distància entre els dos centròmers. Una distància llarga augmenta la probabilitat de que cada punt d'unió de les cromàtides germanes als microtúbuls canviï la seva orientació. Llavors, una mateixa cromàtide germana pot ser dirigida cap als dos pols oposats de la cèl·lula formant un pont anafàsic. El trencament d'aquest pont podria originar tant a un cromosoma inestable amb un trencament, com un cycle de pont, trencament, fusió, i altra cop pont (Mc Clintock, 1941; Chang *et al.*, 2001). Per altra banda, una distància curta entre centròmers actius evitaria aquest procés. Per tant es pot concloure que els cromosomes dicèntrics en els que hi ha implicats cromosomes acrocèntrics, com el idic(Yq) estudiat, són altament estables independentment de que hi hagi un o dos centròmers actius.

### 5.8.2 CARACTERÍSTIQUES FENOTÍPIQUES

Els individus portadors de cromosomes dicèntrics Y poden presentar des d'un fenotip de femelles Turner fins a un fenotip masculí amb infertilitat. Aquesta gran variabilitat de fenotips, somàtics, genitals i gonadals depenen de l'estructura del dicèntric Y, dels punts de trencament a Yp o Yq, i del tipus de mosaïcisme (Tuck-Muller *et al.*, 1995), però és difícil establir de manera acurada una correlació genotip-fenotip.

Fins al moment, a la literatura només s'han descrit tres casos de dicèntrics Y amb trencaments distals a la banda Yp11.32. Dos casos que presentaven el gen SRY en el dicèntric i un mosaïcisme amb cèl·lules 45,X, tenen un fenotip Turner. El tercer, un home infèril, presenta també un mosaïcisme amb cèl·lules 45,X i poques 46,XY. Així es podria pensar que la presència de la línia 46,XY podria originar un fenotip masculí, però dos casos de femelles portadores d'aquesta línia descarten aquesta possibilitat (Tuck-Muller *et al.*, 1995). Per tant, el fenotip depèn tant de la presència, com de la freqüència i la distribució tissular de les línies cel·lulars presents en l'individu mosaic.

El reduït volum testicular de l'individu estudiat va desaconsellar la realització d'un estudi del teixit testicular. De totes maneres, l'elevat nivell de FSH juntament amb el reduït volum testicular, suggereix que aquest pacient pateix el síndrome de SCO (*Sertoli Cell Only*), és a

dir, un testicle sense cèl·lules germinals. En aquest cas seria interessant conèixer com podria haver afectat aquest idic(Yq) a la formació del teixit testicular. En individus pre-púbbers i amb SCO s'ha descrit que les cèl·lules de Sertoli presenten una condensació dels cromosomes sexuals (Speed *et al.*, 1993; Kofman-Alfaro *et al.*, 1994). Aquest comportament dels cromosomes sexuals també s'ha observat en cèl·lules de Sertoli de ratolins portadors de translocacions Robertsonianes i s'ha suggerit que canvis territorials i espacials en el nucli cel·lular poden alterar el procés meiótic i el bon funcionament de les cèl·lules de Sertoli (Garagna *et al.*, 2001). En el cas de l'individu portador del idic(Yq) la presència d'aquest cromosoma reorganitzat pot haver provocat un efecte similar. Els canvis d'estructura del cromosoma Y pot haver alterat l'expressió gènica en les cèl·lules somàtiques (cèl·lules de Sertoli) i en les germinals afectant la seva interacció en el desenvolupament testicular i de l'espermatogènesi.

## **6.CONCLUSIONS**



**1.**

La combinació de les tècniques d'immunocitofluorescència i *subtelomere* multiplex-FISH (stM-FISH) ha permès identificar tots els SCs en espermatòcits humans en estadi de paquitè, i analitzar la sinapsi i la recombinació meiótica individualment en tots els SCs.

*Combination of immunocitofluorescence and subtelomere multiplex-FISH (stM-FISH) methodologies has allowed for the identification of all SCs in human spermatocytes at pachytene stage, as well as the analysis of synapsis and meiotic recombination individually for each SC.*

**2.**

Les anomalies sinàptiques (*gaps* i *splits*) presents en zones de SC on s'hi localitza heterocromatina no-centromèrica poden ser una expressió del retard d'aquestes zones en fer sinapsi. La zona 9qh, la que presenta més freqüentment *gaps* i *splits*, és la última en fer sinapsi, seguida de la 1qh i dels braços curts dels cromosomes acrocèntrics.

*Synaptic anomalies (gaps and splits) present in SC regions where non-centromeric heterochromatin localises may be an expression of delayed synapsis in these regions. The 9qh region, which has the highest incidence of gaps and splits, is the last region to synapse, followed by the 1qh region and the short arms of acrocentric chromosomes.*

**3.**

La variabilitat entre individus en la incidència de *gaps* i *splits* en les zones d'heterocromatina no-centromèrica es pot explicar pels polimorfismes presents en aquestes zones en la població general.

*Interindividual variability in the incidence of gaps and splits in non-centromeric heterochromatic regions may be explained by the polymorphism of these regions in the general population.*

**4.**

La presència de *gaps* i *splits* en diversos SCs i en regions diferents a les d'heterocromatina no-centromèrica, especialment a paquitè tardà, poden ser indicadors d'anomalies severes de la sinapsi. Espermatòcits amb aquests tipus d'anomalies poden patir un bloqueig meiòtic.

*Gaps and splits affecting several SCs and other regions than non-centromeric heterochromatin, especially at late pachytene, may indicate a severely affected synapsis. Spermatocytes having these severe anomalies may be arrested at meiosis.*

**5.**

Els SCs corresponents als bivalents 15 i 21 s'associen més freqüentment al parell XY que els altres bivalents autosòmics. Fet que es pot explicar per la presència, en els braços curts dels cromosomes 15 i 21, de seqüències homòlogues a l'heterocromatina i a la regió subtelomèrica de Yq.

*SCs of bivalents 15 and 21 associate with the XY pair more frequently than other autosomic bivalents. The presence of sequences homologous to the heterochromatin and the subtelomeric region of the Yq in the short arms of chromosomes 15 and 21 may explain this frequent association.*

**6.**

Els braços p i q dels SCs autosòmics varien la seva longitud relativa respecte de la longitud relativa mitòtica, i ho fan de manera independent l'un de l'altre donant lloc a índex centromèrics diferents als mitòtics. Aquesta variació pot ser una expressió de la quantitat de fibres de cromatina oberta i compacta presents a cada regió.

*Short and long arms of autosomal SCs vary their relative length in comparison to the corresponding mitotic one. This variation occurs in one arm independently to the other arm resulting, sometimes, in centromere indexes different from the mitotic ones. This variation can be an expression of the amount of open and compact chromatin fibers present in the region.*

**7.**

Les distància mitjana entre punts de MLH1, expressada en unitats físiques de longitud ( $\mu\text{m}$ ), és major en els SCs llargs que en els curts. Quan aquesta distància és expressada en relació a la longitud del SC (%), aquesta és menor en els SCs llargs que en els curts. Els resultats suggereixen que la distància física és l'expressió de la interferència i que la intensitat d'aquesta està modulada per la longitud del SC.

*The mean distance between MLH1 foci expressed as physical distance ( $\mu\text{m}$ ) is higher in long SCs than in short SCs. When this mean distance is expressed as distance relative to the SC length (%) it is shorter in long SCs than in short SCs. Results suggest that the physical distance between MLH1 foci is the expression of MLH1 foci interference and that the intensity of interference is modulated by the SC length.*

**8.**

En espermatòcits humans, les zones calentes de recombinació es localitzen principalment a les parts distals dels SCs. En els SCs acrocèntrics, especialment els del grup D, la zona pericentromèrica del braç q també és una zona calenta de recombinació, fet que indica que el centromer no interfereix en la recombinació.

*In human spermatocytes, hot recombination spots localise to distal parts of the SCs. In acrocentric SCs, especially those in the D group, the pericentromeric region is also a hot spot, indicating that centromere does not play a role in interference imposition.*

**9.**

El parell XY i el SC21 són els bivalents que més freqüentment s'observen sense cap punt MLH1, fet que coincideix amb que en espermatozoides humans s'ha detectat una major incidència d'aneuploidia per als cromosomes sexuals i 21.

*XY pair and the SC21 are the bivalents that most frequently have no MLH1 focus. This observation is consistent with the highest rate of aneuploidy observed in humans for these chromosomes.*

**10.**

Els resultats corroboren que la freqüència de recombinació correlaciona amb la longitud dels SCs. A la vegada, mostren que una baixa freqüència de recombinació incrementa l'absència de punts de recombinació a: la regió PAR 1 del parell XY, als bivalents de mida petita (18-22), als braços p dels acrocèntrics i a les regions medials i pròximes a centròmer de la resta de bivalents. Una reducció de la freqüència de recombinació pot augmentar la incidència de bivalents aquiasmàtics.

*Results corroborate that the frequency of recombination correlates with the SC length. In addition, results demonstrate that a low frequency of recombination increases the incidence of no MLH1 focus: in the PAR1 region of the XY pair, in short bivalents (18-22), in short arms of acrocentric bivalents and in medial and proximal to centromere SC regions. A reduced recombination frequency may increase the incidence of achiasmate bivalents.*

**11.**

La freqüència amb la que el parell XY presenta un punt MLH1 pot ser un indicador de la freqüència de recombinació general i un marcador de la progressió del procés meiótic.

*The frequency of XY pairs with an MLH1 focus may be an indicator of the general recombination frequency and a marker for meiotic progression.*

**12.**

La variabilitat interindividual en la freqüència de recombinació dins el rang observat en aquest treball (42,6-53 punts MLH1) no s'ha vist lligada a infertilitat, però pot explicar la variabilitat interindividual d'aneuploidia en espermatozoides humans.

*Interindividual variability in the recombination frequency within the range observed in this study (42,6-53 MLH1 foci) is not linked to infertility. However, this variability may explain the interindividual variability present in aneuploidy rates in human sperm.*

**13.**

L'espermatòcit tetraploide humà estudiat mostra que la sinapsi i la recombinació poden ocórrer en aquestes espermatòcits, i que els espermatozoides diploides també poden originar-se per errors mitòtics (endoreduplicació) previs a la meiosi.

*The tetraploid spermatocyte analysed demonstrates that synapsis and meiotic recombination can occur in these spermatocytes. It provides evidence that diploid sperm may also originate from mitotic errors (endoreduplication) prior to meiosis.*

**14.**

La caracterització citogenètica molecular d'un isocromosoma dicèntric Yq(p11.32) en un individu azoospèrmic i l'anàlisi del mosaïcisme indiquen que aquesta reorganització cromosòmica és altament estable. La presència d'aquesta reorganització del cromosoma Y modifica la disposició en el nucli dels cromosomes sexuals i podria alterar el funcionament de les cèl·lules de Sertoli i el procés meiòtic.

*The molecular cytogenetic characterisation of a dicentric Yq(p11.32) isochromosome in an azoospermic male and the analysis of mosaicism indicate that this chromosome reorganisation is highly stable. This chromosome Y reorganisation affects the disposition of sexual chromosomes in the nucleus and might alter the activity of Sertoli cells and the meiotic process.*

## **7.BIBLIOGRAFIA**

**A**

Anderson LK, Reeves A, Webb LM and Ashley T (1999) Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics* 151,1569-1579

**B**

Baker SM, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC, Yao X, Christie D-M, Monell C, Arnheim N, Bradley A, Ashley T and Liksay RM (1996) Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat Genet* 13,336-342

Barlow AL and Hultén MA (1996) Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I human spermatocytes. *Chromosome Res* 4,562-573

Barlow AL and Hultén MA (1998) Crossing over analysis at pachytene in man. *Eur J Hum Genet* 6,350-358

Baudat F, Manova K, Yuen JP, Jasin M and Keeney S (2000) Chromosome Synapsis Defects and Sexually Dimorphic Meiotic Progression in Mice Lacking Spo11. *Mol Cell* 6,989-998

Binz SK, Sheehan AM and Wold MS (2004) Replication Protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage. *DNA Repair* 3,1015-1024

Blat Y, Protacio RU, Hunter N and Kleckner N (2002) Physical and functional interactions among basic chromosome organizational features govern early steps of meiotic chiasma formation. *Cell* 111,791-802

Börner GV, Kleckner N and Hunter N (2004) Crossover/Noncrossover Differentiation, Synaptonemal Complex Formation, and Regulatory Surveillance at the Leptotene/Zygotene Transition of Meiosis. *Cell* 117,29-45

Brandriff BF, Gordon LA, Moore II D and Carrano AV (1988) An analysis of structural aberrations in human sperm chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 47,29-36

Broman KW, Murray JC, Sheffield VC, White RL and Weber JL (1998) Comprehensive human genetic maps: individual and sex-specific variation in recombination. *Am J Hum Genet* 63,861-869

Broman KW and Weber JL (2000) Characterization of human crossover interference. *Am J Hum Genet* 66,1911-1926

Brown PW, Judis L, Chan ER, Schwartz S, Seftel A, Thomas A and Hassold TJ (2005) Meiotic Synapsis Proceeds from a Limited Number of Subtelomeric Sites in the Human Male. *Am J Hum Genet* 77,556-566

## Bibliografia

- Brown WRA, MacKinnon PJ, Villasanté, Spurr N, Buckle W and Dobson MJ (1990) Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA. *Cell* 63,119-132
- Burk RD, Szabo P, O'Brien S, Nash WG, Yu L and Smith KD (1985) Organization and chromosomal specificity of autosomal homologs of human Y chromosome repeated DNA. *Chromosoma* 92,225-233
- Burke DJ (2000) Complexity in the spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev* 10,26-31

## C

- Chang S, Khoo C and DePinho RA (2001) Modeling chromosomal instability and epithelial carcinogenesis in the telomerase-deficient mouse. *Cancer Biol* 11,227-238
- Ciccodicola A, D'Esposito M, Esposito T, Gianfrancesco F, Migliaccio C, Miano MG, Matarazzo MR, Vacca M, Franze A, Cuccurese M, Cocchia M, Curci A, Terracciano A, Torino A, Cocchia S, Mercadante G, Pannone E, Archidiacono N, Rocchi M, Schlessinger D and D'Urso M (2000) Differentially regulated and evolved genes in the fully sequenced Xq/Yq pseudoautosomal region. *Hum Mol Genet* 9,395-401
- Clyde JM, Hogg JE, Rutherford AJ and Picton HM (2003) Karyotyping of human metaphase II oocytes by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril* 80,1003-1011
- Codina-Pascual M, Kraus J, Speicher M, Oliver-Bonet M, Murcia V, Sarquella J, Egozcue J, Navarro J and Benet J (2004) Characterization of all human male synaptonemal complexes by subtelomere multiplex-FISH. *Cytogenet Genome Res* 107,18-21
- Codina-Pascual M, Oliver-Bonet M, Navarro J, Campillo M, Garcia F, Egozcue S, Abad C, Egozcue J and Benet J (2005) Synapsis and meiotic recombination analyses: MLH1 focus in the XY pair as an indicator. *Hum Reprod* 20,2133-2139
- Costa Y, Speed R, Öllinger R, Alsheimer M, Semple CA, Gautier P, Maratou K, Novak I, Höög C, Benavente R and Cooke HJ (2005) Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *J Cell Sci* 118,2755-2762
- Crackower MA, Kolas NK, Noguchi J, Sarao R, Kikuchi K, Kaneko H, Kobayashi E, Kawai Y, Kozieradzki I, Landers R, Mo R, Hui C-C, Nieves E, Cohen PE, Osborne LR, Wada T, Kunieda T, Moens PB and Penninger JM (2003) Essential role of Fkbp6 in male fertility and homologous chromosome pairing in meiosis. *Science* 300,1291-1295

## D

- Darlington C (1939) Misdivision and the genetics of the centromere. *J Genet* 37,341-364
- De Braekeleer M and Dao TN (1991) Cytogenetic studies in male infertility: A review. *Hum Reprod* 6,245-250
- de Rooij DG and de Boer P (2003) Specific arrests of spermatogenesis in genetically modified and mutant mice. *Cytogenet Genome Res* 103,267-276



- de Vries FAT, de Boer E, van den Bosch M, Baarends WM, Ooms M, Yuan L, Liu J-G, van Zeeland AA, Heyting C and Pastink A (2005) Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev* 19,1376-1389
- Dobson M, Pearlman R, Karaiskakis A, Spyropoulos B and Moens P (1994) Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J Cell Sci* 107,2749-2760
- Donis-Keller H, Green P, Helms C, Cartinhour S, Weiffenbach B, Stephens K, Keith TP, Bowden DW, Smith DR, Lander ES and al. e (1987) A genetic linkage map of the human genome. *Cell* 51,319-337

## E

- Edelmann W, Cohen PE, Kane M, Lau K, Morrow B, Bennett S, Umar A, Kunkel T, Cattoretti G, Chaganti R, Pollard JW, Kolonder RD and Kucherlapati R (1996) Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. *Cell* 85,1125-1134
- Egozcue J, Templado C, Vidal F, Navarro J, Morer-Fragas F and Marina S (1983) Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Hum Genet* 65,185-188
- Egozcue J, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Sarrate Z and Vidal F (2003) Genetic Analysis of Sperm and Implications of Severe Male Infertility-A Review. *Placenta* 24,S62-S65
- Egozcue J, Sarrate Z, Codina-Pascual M, Egozcue S, Oliver-Bonet M, Blanco J, Navarro J, Benet J and Vidal F (2005) Meiotic abnormalities in infertile males. *Cytogenet Genome Res* 111,337-342
- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F and Egozcue J (2000) Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 6,93-105
- Egozcue S, Blanco J, Vidal F and Egozcue J (2002) Diploid sperm and the origin of triploidy. *Hum Reprod* 17,5-7
- Eijpe M, Offenbergh H, Jessberger R, Revenkova E and Heyting C (2003) Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SCM1b and SMC3. *J Cell Biol* 160,657-670
- Estop AM, Márquez C, Munne S, Navarro J, Cieply K, Van Kirk V, Martorell MR, Benet J and Templado C (1995) An analysis of human sperm chromosome break-points. *Am J Hum Genet* 56,452-460

## F

- Fauth C, Zhang H, Harabacz S, Brown J, Saracoglu K, Lederer G, Rittinger O, Rost I, Eils R, Kearney L and Speicher MR (2001) A new strategy for the detection of subtelomeric rearrangements. *Hum Genet* 109,576-583
- Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M and Nussenzweig A (2004) H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair* 3,959-967
- Foss E, Lande R, Stahl FW and Steinberg CM (1993) Chiasma Interference as a Function of Genetic Distance. *Genetics* 133,681-691
- Froenicke L, Anderson LK, Wienberg J and Ashley T (2002) Male mouse recombination maps for each autosome identified by chromosome painting. *Am J Hum Genet* 71,1353-1368
- Fung JC, Rockmill B, Odell M and Roeder GS (2004) Imposition of crossover interference through the nonrandom distribution of synapsis initiation complexes. *Cell* 116,795-802

## G

- Garagna S, Zuccotti M, Thornhill A, Fernandez-Donoso R, Berrios S, Capanna E and Redi CA (2001) Alteration of nuclear architecture in male germ cells of chromosomally derived subfertile mice. *J Cell Science* 114,4429-4434
- Gerton JL and Hawley RS (2005) Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nat Rev Genet* 6,477-487
- Gilbert N, Boyle S, Fiegler H, Woodfine K, Carter NP and Bickmore WA (2004) Chromatin Architecture of the Human Genome: Gene-Rich Domains Are Enriched in Open Chromatin Fibers. *Cell* 118,555-566
- Gonsalves J, Sun F, Schlegel PN, Turek PJ, Hopps CV, Greene C, Martin RH and Reijo Pera RA (2004) Defective recombination in infertile men. *Hum Mol Genet* 13,2875-2883
- Guichaoua MR, Perrin J, Metzler-Guillemain C, Saias-Magnan J, Giorgi R and Grillo JM (2005) Meiotic anomalies in infertile men with severe spermatogenic defects. *Hum Reprod* 20,1897-1902
- Gutiérrez-Mateo C, Benet J, Wells D, Colls P, Bermudez MG, Sanchez-Garcia JF, Egozcue J, Navarro J and Munne S (2004) Aneuploidy study of human oocytes first polar body comparative genomic hybridization and metaphase II fluorescence in situ hybridization analysis. *Hum Reprod* 19,2859-2868

## H

- Hale DW (1994) Is X-Y recombination necessary for spermatocyte survival during mammalian spermatogenesis? *Cytogenet Cell Genet* 65,278-282

- Hassold TJ, Sherman SL, Pettay D, Page DC and Jacobs PA (1991) XY chromosome nondisjunction in man is associated with diminished recombination in the pseudoautosomal region. *Am J Hum Genet* 49,253-260
- Hassold TJ and Hunt PA (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2,280-290
- Hassold TJ, Judis L, Chan ER, Schwartz S, Seftel A and Lynn A (2004) Cytological studies of meiotic recombination in human males. *Cytogenet Cell Genet* 107,249-255
- Henderson SA and Edwards RG (1968) Chiasma frequency and maternal age in mammals. *Nature* 218,22-28
- Holmquist GP (1992) Chromosome bands, their chromatin flavors, and their functional features. *Am J Hum Genet* 51,17-37
- Housworth EA and Stahl FW (2003) Crossover interference in humans. *Am J Hum Genet* 73,188-197
- Hsu LYF (1994) Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. *Am J Med Genet* 53,108-140
- Hultén MA, Eliasson R and Tillinger KG (1970) Low chiasma count and other meiotic irregularities in two infertile 46,XY men with spermatogenic arrest. *Hereditas* 65,285-290
- Hultén MA (1974) Chiasma distribution at diakinesis in the normal human male. *Hereditas* 76,55-78
- Hultén MA, Solari AJ and Skakkebaek NE (1974) Abnormal synaptonemal complex in an oligo-chiasmatic man with spermatogenic arrest. *Hereditas* 78,105-116
- Hunter N and 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

## J

- Judis L, Chan ER, Schwartz S, Seftel A and Hassold TJ (2004) Meiosis I arrest and azoospermia in an infertile male explained by failure of formation of a component of the synaptonemal complex. *Fertil Steril* 81,205-209

## K

- Kaback DB, Barber D, Mahon J, Lamb J and You J (1999) Chromosome Size-Dependent Control of Meiotic Reciprocal Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*: The Role of Crossover Interference. *Genetics* 152,1475-1486
- Keeney S, Giroux CN and Kleckner N (1997) Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88,375-384

## Bibliografia

- Kleckner N, Zickler D, Jones GH, Dekker J, Padmore R, Henle J and Hutchinson J (2004) A mechanical basis for chromosome function. *PNAS* 101,12592-12597
- Kofman-Alfaro S, Speed RM, Boyle S and Chandley AC (1994) Condensation behaviour of the human X chromosome in male germ cells and Sertoli cells examined by fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res* 2,439-444
- Kong A, Gudbjartsson DF, Sainz J, Jonsdottir GM, Gudjonsson SA, Richardsson B, Sigurdardottir S, Barnard J, Hallbeck B, Masson G, Shlien A, Palsson ST, Frigge ML, Thorgeirsson TE, Gulcher JR and Stefansson K (2002) A high-resolution recombination map of the human genome. *Nat Genet* 31,241-247
- Kühl H, Röttger S, Heilbronner H, Enders H and Schempp W (2001) Loss of the Y chromosomal PAR2-region in four familial cases of satellited Y chromosomes (Yqs). *Chromosome Res* 9,215-222

## L

- Lamb NE, Freeman SB, Savage-Austin A, Pettay D, Taft L, Hersey J, Gu Y, Shen J, Saker D, May KM, Avramopoulos D, Petersen MB, Hallberg A, Mikkelsen M, Hassold TJ and Sherman SL (1996) Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nat Genet* 14,400-405
- Lamb N, Feingold E, Savage A, Avramopoulos D, Freeman S, Gu Y, Hallberg A, Hersey J, Karadima G, Pettay D, Saker D, Shen J, Taft L, Mikkelsen M, Petersen M, Hassold T and Sherman S (1997) Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosome 21. *Hum Mol Genet* 6,1391-1399
- Lammers JHM, Offenbergh HH, van Aalderen M, Vink ACG, Dietrich AJJ and Heyting C (1994) The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol* 14,1137-1146
- Laurie DA and Hultén MA (1985a) Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. *Ann Hum Genet* 49,189-201
- Laurie DA and Hultén MA (1985b) Further studies on chiasma distribution and interference in the human male. *Ann Hum Genet* 49,203-214
- LeMaire-Adkins R, Radke K and Hunt PA (1997) Lack of Checkpoint Control at the Metaphase/Anaphase Transition: A Mechanism of Meiotic Nondisjunction in Mammalian Females. *J Cell Biol* 139,1611-1619
- Lemyre E, Kaloustian VMD and Duncan AMV (2001) Stable non-Robertsonian dicentric chromosomes: four new cases and a review. *J Med Genet* 38,76-79

- Lenzi ML, Smith J, Snowden T, Kim M, Fishel R, Poulos BK and Cohen PE (2005) Extreme heterogeneity in the molecular events leading to the establishment of chiasmata during meiosis I in human oocytes. *Am J Hum Genet* 76,112-127
- Li X and Nicklas RB (1995) Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. 373,630-632
- Liebe B, Alsheimer M, Höög C, Benavente R and 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
- Lien S, Szyda J, Schechinger B, Rappold G and Arnheim N (2000) Evidence for heterogeneity in recombination in the human pseudoautosomal region: high resolution analysis by sperm typing and radiation-hybrid mapping. *Am J Hum Genet* 66,557-566
- Lynn A, Koehler KE, Judis L, Chan ER, Cherry JP, Schwartz S, Seftel A, Hunt PA and Hassold TJ (2002) Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates. *Science* 296,2222-2225
- Lynn A, Ashley T and Hassold T (2004) Variation in human meiotic recombination. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5,317-349

## M

- Madan K and Bobrow M (1974) Structural variation in chromosome No.9. *Anns Génét* 17,81-86
- Mahadevaiah SK, Turner JMA, Baudat F, Rogakou EP, Boer Pd, Blanco-Rodríguez J, Jasin M, Keeney S, Bonner WM and Burgoyne PS (2001) Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* 27,271-276
- Martin RH, Shi Q and Field LL (2001) Recombination in the pseudoautosomal region in a 47,XXX male. *Hum Genet* 109,143-145
- Martínez-Flores I, Egozcue J, Cabero L and Garcia M (2001) Synaptic behaviour of some structural and numerical chromosome anomalies in female and male rats (*Rattus norvegicus*). *Histol Histopathol* 16,701-706
- Matise TC, Sachidanandam R, Clark AG, Kruglyak L, Wijsman E, Kakol J, Buyske S, Chui B, Cohen P, de Toma C, Ehm M, Glanowski S, He C, Heil J, Markianos K, McMullen I, Pericak-Vance MA, Silbergleit A, Stein L, Wagner M, Wilson AF, Winick JD, Winn-Deen ES, Yamashiro CT, Cann HM, Lai E and Holden AL (2003) A 3.9-centimorgan-resolution human single-nucleotide polymorphism linkage map and screening set. *Am J Hum Genet* 73,271-284
- Mc Clintock B (1941) The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 26,234-282
- Metzler-Guillemain C, Mignon C, Depetris D, Guichaoua MR and Mattei MG (1999) Bivalent 15 Regularly Associates With the Sex Vesicle in Normal Male Meiosis. *Chromosome Res* 7,369-378

## Bibliografia

- Meuwissen RL, Offenberg HH, Dietrich AJ, Riesewijk A, van Iersel M and Heyting C (1992) A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J* 11,5091-5100
- Miller, O. J. and E. Therman (2001). Human chromosomes. New York, Springer.
- Mittwoch U and Mahadevaiah SK (1992) Unpaired chromosomes at meiosis: cause or effect of gametogenic insufficiency? *Cytogenet Cell Genet* 59,274-279
- Miyamoto T, Hasuike S, Yogev L, Maduro MR, Ishikawa M, Westphal H and Lamb DJ (2003) Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *Lancet* 362,1714-1719
- Morelli MA and Cohen PE (2005) Not all germ cells are created equal: Aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction* 130,761-781
- Mroz K, Hassold T and Hunt P (1999) Meiotic aneuploidy in the XXY mouse: evidence that a compromised testicular environment increases the incidence of meiotic errors. *Hum Reprod* 14,1151-1156
- Muller HJ (1916) The mechanism of crossing over. *Am Nat* 50,193-221, 284-305, 350-366, 421-434 (available in PDF format from [www.jstor.org](http://www.jstor.org))
- Murakami H and Nurse P (1999) Meiotic DNA replication checkpoint control in fission yeast. *Genes Dev* 13,2581-2593

## N

- Navarro J, Vidal F, Guitart M and Egozcue J (1981) A method for the sequential study of synaptonemal complexes by light and electron microscopy. *Hum Genet* 59,419-421
- Navarro J (1983) Estudi seqüencial del complex sinaptnemic a microscopia òptica i electrònica: caracterització d'anomalies meiòtiques en la infertilitat masculina. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona
- Navarro J, Vidal F, Templado C, Benet J, Marina S, Pomerol JM and Egozcue J (1986a) Meiotic chromosome studies and synaptonemal complex analysis by light and electron microscopy in 47 infertile or sterile males. *Hum Reprod* 1,523-527
- Navarro J, Vidal F, Templado C, Benet J, Pomerol JM, Marina S and Egozcue J (1986b) A new synaptic anomaly: irregular synaptonemal complexes. *Hum Genet* 72,272-274

## O

- Offenberg HH, Schalk JAC, Meuwissen RL, van Aalderen M, Kester HA, Dietrich AJJ and Heyting C (1998) SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Res* 26,2572-2579

- Oliver-Bonet M, Liehr T, Nietzel A, Heller A, Starke H, Claussen U, Codina-Pascual M, Pujol A, Abad C, Egozcue J, Navarro J and Benet J (2003) Karyotyping of human synaptonemal complexes by cenM-FISH. *Eur J Hum Genet* 11,879-883
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Codina-Pascual M, Abad C, Guitart M, Egozcue J and Benet J (2004) From spermatocytes to sperm: meiotic behaviour of human male reciprocal translocations. *Hum. Reprod.* 19,2515-2522
- Oliver-Bonet M, Ko E and Martin RH (2005a) Male infertility in reciprocal translocation carriers: the sex body affair. *Cytogenet Genome Res* 111,343-346
- Oliver-Bonet M, Turek PJ, Sun F, Ko E and Martin RH (2005b) Temporal progression of recombination in human males. *Mol Hum Reprod* 11,517-522

## P

- Page SL and Hawley RS (2004) The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20,525-558
- Pankratz DG and Forsburg SL (2005) Meiotic S-Phase Damage Activates Recombination without Checkpoint Arrest. *Mol. Biol. Cell* 16,1651-1660
- Pelttari J, Hoja M-R, Yuan L, Liu J-G, Brundell E, Moens PB, Santucci-Darmanin S, Jessberger R, Barbero JL, Heyting C and Höög C (2001) A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells. *Mol Cell Biol* 21,5667-5677
- Petronczki M, Siomos MF and Nasmyth K (2003) Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112,423-440

## R

- Renauld H and Gasser S (1997) Heterochromatin: a meiotic matchmaker. *Trends Cell Biol* 7,201-205
- Rives N, Mazurier S, Bellet D, Joly G and Mace B (1998) Assessment of autosome and gonosome disomy in human sperm nuclei by chromosome painting. *Hum Genet* 102,616-623
- Robinson DO, Dalton P, Jacobs PA, Mosse K, Power MM and Crolla JA (1999) A molecular and FISH analysis of structurally abnormal Y chromosome in patients with Turner syndrome. *J Med Genet* 36,279-284
- Roeder GS (1997) Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes & Development* 11,2600-2621
- Roeder GS and Bailis JM (2000) The pachytene checkpoint. *Trends Genet* 16,395-403

## Bibliografía

- Roig I, Liebe B, Egozcue J, Cabero L, Garcia M and 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, Martinez-Flores I, Cabero L, Egozcue J, Liebe B, Scherthan H and Garcia M (2005) Chromosome 18 pairing behavior in human trisomic oocytes. Presence of an extra chromosome extends bouquet stage. *Reproduction* 129,565-575
- Romanienko PJ and Camerini-Otero RD (2000) The Mouse Spo11 Gene Is Required for Meiotic Chromosome Synapsis. *Mol Cell* 6,975-987
- Ross LO, Maxfield R and Dawson D (1996) Exchanges are not equally able to enhance meiotic chromosome segregation in yeast. *PNAS* 93,4979-4983

## S

- Sage J, Yuan L, Martin L, Mattei MG, Guenet JL, Liu JL, Hoog C, Rassoulzadegan M and Cuzin F (1997) The Sycp1 loci of the mouse genome: successive retropositions of a meiotic gene during the recent evolution of the genus. *Genomics* 44,118-126
- Sarrate Z, Blanco J, Egozcue S, Vidal F and Egozcue J (2004) Identification of meiotic anomalies with multiplex fluorescence in situ hybridization: Preliminary results. *Fertil Steril* 82,712-717
- Savage A, Petersen M, Pettay D, Taft L, Allran K, Freeman S, Karadima G, Avramopoulos D, Torfs C, Mikkelsen M, Hassold T and Sherman S (1998) Elucidating the mechanisms of paternal non-disjunction of chromosome 21 in humans. *Hum Mol Genet* 7,1221-1227
- Schalk JAC, Dietrich AJJ, Vink ACG, Offenbergh HH, van Aalderen M and Heyting C (1998) Localization of SCP2 and SCP3 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Chromosoma* 107,540-548
- Scherthan H, Eils R, Trelles-Sticken E, Dietzel S, Cremer T, Walt H and Jauch A (1998) Aspects of tree-dimensional chromosome reorganization during the onset of human male meiotic prophase. *J Cell Science* 111,2337-2351
- Scherthan H (2001) A bouquet makes ends meet. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2,621-627
- Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am J, Soenksen D, Garini Y and Ried T (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273,494-497
- Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempest H and Griffin DK (2003) The genetic basis of infertility. *Reproduction* 126,13-25
- Shi Q, Spriggs E, Field L, Ko E, Barclay L and Martin RH (2001) Single sperm typing demonstrates that reduced recombination is associated with the production of aneuploid 24,XY human sperm. *Am J Med Genet* 99,34-38



- Shi Q, Spriggs E, L. FL, Rademaker A, Ko E, Barclay L and Martin RH (2002) Absence of age effect on meiotic recombination between human X and Y chromosomes. *Am J Hum Genet* 71,254-261
- Smeets DFCM, Merks GFM and Hopman AHM (1991) Frequent occurrence of translocation of the short arm of chromosome 15 to other D-group chromosomes. *Hum Genet* 87,44-48
- Snowden T, Acharya S, Butz C, Berardini M and Fishel R (2004) hMSH4-hMSH5 Recognizes Holliday Junctions and Forms a Meiosis-Specific Sliding Clamp that Embraces Homologous Chromosomes. *Mol Cell* 15,437-451
- Solari AJ (1980) Synaptonemal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. *Chromosoma* 81,315-337
- Solari AJ, Ponzio R and Rey Valzacchi G (1991) Synaptonemal complex karyotyping in an oligospermic patient with heterochromatin duplication in chromosome n. 9. *Medicina (B Aires)* 51,217-221
- Solari AJ (1999) Synaptonemal complex analysis in human male infertility. *Eur J Histochem* 43,265-276
- Speed RM, Vogt P, Köhler MR, Hargreave TB and Chandley AC (1993) Chromatin condensation behaviour of the Y chromosome in the human testis. *Chromosoma* 102,421-427
- Speicher MR, Gwyn Ballard S and Ward DC (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12,368-375
- Stack SM (1984) Heterochromatin, the synaptonemal complex and crossing over. *J Cell Sci* 71,159-176
- Stergianou K, Gould CP, Waters JJ and Hultén M (1992) High population incidence of the 15p marker D15Z1 mapping to the short arm of one homologue 14. *Hum Genet* 88,364
- Strachan, T. and A. P. Read (1999a). *Instability of the human genome: mutation and DNA repair. Human Molecular Genetics 2. F. Kingston. Oxford, UK, BIOS Scientific Publishers, Ltd. 1.*
- Strachan, T. and A. P. Read (1999b). *Organization of the human genome. Human Molecular Genetics 2. F. Kingston. Oxford, UK, BIOS Scientific Publishers, Ltd. 1.*
- Sun F, Kozak G, Scott S, Trpkov K, Ko E, Mikhaail-Philips M, Bestor TH, Moens PB and Martin RH (2004a) Meiotic defects in a man with non-obstructive azoospermia: Case report. *Hum Reprod* 19,1770-1773
- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Ko E, Rademaker AW, Navarro J, Benet J and Martin RH (2004b) Human male recombination maps for individual chromosomes. *Am J Hum Genet* 74,521-531
- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Trpkov K, Ko E, Rademaker A and Martin RH (2005a) Discontinuities and unsynapsed regions in meiotic chromosomes have a cis effect on meiotic recombination patterns in normal human males. *Hum Mol Genet* 14,3013-3018
- Sun F, Oliver-Bonet M, Turek PJ, Ko E and Martin RH (2005b) Meiotic studies in an azoospermic human translocation (Y:1) carrier. *Mol Hum Reprod* 11,361-364

## Bibliografia

- Sun F, Trpkov K, Rademaker AW, Ko E and Martin RH (2005c) Variation in meiotic recombination frequencies among human males. *Hum Genet* 116,172-178
- Svetlanov A and Cohen PE (2004) Mismatch repair proteins, meiosis, and mice: understanding the complexities of mammalian meiosis. *Exp Cell Res* 296,71-79

## T

- Tagarro I, Fernandez-Peralta AM and Gonzalez-Aguilera JJ (1994) Chromosomal localization of human satellites 2 and 3 by a FISH method using oligonucleotides as probes. *Hum Genet* 93,383-388
- Tease C, Hartshorne GM and Hultén MA (2002) Patterns of meiotic recombination in human fetal oocytes. *Am J Hum Genet* 70,1469-1479
- Telenius H, Pelmeur AH, Tunnacliffe A, Carter NP, Behemel A, Ferguson-Smith MA, Nordenskjöld M, Pfragner R and Ponder BA (1992) Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer* 4,257-263
- Templado C, Marina S and Egozcue J (1976) Three cases of low chiasma frequency associated with infertility in man. *Andrologia* 8,285-289
- Templado C, Bosch M and Benet J (2005) Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 111,199-205
- Therman E, Sarto GE and Patau K (1974) Apparently isodicentric but functionally monocentric X chromosome in man. *Am J Hum Genet* 26,83-92
- Thomas NS, Collins AR, Hassold TJ and Jacobs PA (2000) A reinvestigation of non-disjunction resulting in 47,XXY males of paternal origin. *Eur J Hum Genet* 8,805-808
- Tuck-Muller CM, Chen H, Martínez JE, Shen C-C, Li S, Kusyk C, Batista DAS, Bhatnagar YM, Dowling E and Wertelecki W (1995) Isodicentric Y chromosome: cytogenetic, molecular and clinical studies and review of the literature. *Hum Genet* 96,119-129
- Turner JMA, Mahadevaiah SK, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig A, Xu X, Deng CX and Burgoyne PS (2005) Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat Genet* 37,41-47

## V

- Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Jorid H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A and Liebaers I (1996) Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod* 11,1-24
- Vendrell JM, García F, Veiga A, Calderon G, Egozcue S, Egozcue J and Barri PN (1999) Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia. *Hum Reprod* 14,375-378

- Venter CJ, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA and al e (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291,1304-1351
- Vidal F, Templado C, Navarro J, Brusadin S, Marina S and Egozcue J (1982) Meiotic and synaptonemal complex studies in 45 subfertile males. *Hum Genet* 60,301-304

## W

- Wandall A, Andersen C, Ostergaard M and Koch J (2002) Extensive cytogenetic analysis of a stable dicentric isochromosome 21, idic(21), formed by fusion of the terminal long arms. *Cytogenet Genome Res* 97,145-148
- Warren AC, Charkravarti A, Wong C, Slaugenhaupt SA, Halloran SL, Watkins PC and Metazotu C (1987) Evidence for reduced recombination on the nondisjoined chromosome 21 in Down syndrome. *Science* 237
- Westerveld GH, Repping S, Lombardi MP and van der Veen F (2005) Mutations in the chromosome pairing gene FKBP6 are not a common cause of non-obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod* 11,673-675
- Wilkinson TA and Crolla JA (1993) Molecular cytogenetic characterization of three familial cases of satellited Y chromosomes. *Hum Genet* 91,389-391
- Wolff DJ, Miller AP, Van Dyke DL, Schwartz S and Willard HF (1996) Molecular definition of breakpoints associated with human Xq isochromosomes: Implications for mechanisms of formation. *Am J Hum Genet* 58,154-160
- Woods LM, Hodges CA, Baart E, Baker SM, Liskay M and Hunt PA (1999) Chromosomal Influence on Meiotic Spindle Assembly: Abnormal Meiosis I in Female Mlh1 Mutant Mice. *J Cell Biol* 145,1395-1406
- Wu L, Chan KL, Ralf C, Bernstein DA, Garcia PL, Bohr VA, Vindigni A, Janscak P, Keck JL and Hickson ID (2005) The HRDC domain of BLM is required for the dissolution of double Holliday junctions. *The EMBO Journal* 24,2679-2687

## X

- Xu H, Beasley M, Verschoor S, Inselman A, Handel MA and McKay MJ (2004) A new role for the mitotic RAD21/SCC1 cohesin in meiotic chromosome cohesion and segregation in the mouse. *The EMBO Journal* 5,378-384

## Y

- Yogev L, Gamzu R, Paz G, Kleiman S, Botchan A, Hauser R and Yavetz H (2002) Rate of homologous chromosome bivalents in spermatocytes may predict completion of spermatogenesis in azoospermic men. *Hum Genet* 110,30-35
- Yokota H, Singer MJ, van den Engh GJ and Trask BJ (1997) Regional differences in the compaction of chromatin in human G0/G1 interphase nuclei. *Chromosome Res* 5,157-166
- Yoshida A, Nakahori Y, Kuroki Y, Motoyama M, Araki Y, Miura K and Shirai M (1997) Dicentric Y chromosome in an azoospermic male. *Mol Hum Reprod* 3,709-712
- Yu H-G and Koshland DE (2003) Meiotic condensin is required for proper chromosome compaction, SC assembly, and resolution of recombination-dependent chromosome linkages. *J Cell Biol* 163,937-947
- Yu J, Lazzeroni L, Qin J, Huang MM, Navidi W, Erlich H and Arnheim N (1996) Individual variation in recombination among human males. *Am J Hum Genet* 59,1175-1183
- Yuan L, Liu J-G, Hoja M-R, Wilbertz J, Nordqvist K and Höög C (2002) Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science* 296,1115-1118
- Yuan L, Liu J-G, Zhao J, Brundell E, Daneholt B and Höög C (2000) The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell* 5,73-83
- Yuan L, Pelttari J, Brundell E, Bjorkroth B, Zhao J, Liu J-G, Brismar H, Daneholt B and Hoog C (1998) The Synaptonemal Complex Protein SCP3 Can Form Multistranded, Cross-striated Fibers In Vivo. *J Cell Biol* 142,331-339

## Z

- Zaragoza MV, Surti U, Redline RW, Millie E, Chakravarti A and Hassold TJ (2000) Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatiform mole. *Am J Hum Genet* 66,1807-1820
- Zickler D and Kleckner N (1998) The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annual Review of Genetics* 32,619-697

## **AGRAÏMENTS**

A tots vosaltres...

...que des del primer dia que em vaig endinsar en aquesta “aventura” heu format part del dia a dia.

Als meus pares, pel tot el seu suport incondicional des dels meus inicis fins avui, tant en els moments d’alegria com en aquells més durs, per no dubtar mai en els moments en que jo ho feia, per fer tot el que han fet i per ser simplement qui són.

A l’Albert, per estar al meu costat, per compartir amb mi molts moments bonics i per donar-me suport en decisions difícils de prendre.

Al Jordi i a la Quima, els “jefes”, per donar-me la oportunitat, fa uns quants anys, d’iniciar-me en el món de la recerca. Gràcies pel vostre entusiasme en tot moment, per la paciència en les llargues i interminables reunions de correccions, pel vostre suport i per a les ganes i dedicació a una tasca que us apassiona, la d’investigar.

Al Josep Egozcue, a qui cada dos per tres li anava a buscar les mostres que em “guardava”. Gràcies, per les discussions, correccions, consells i punts de vista durant el decurs d’aquest estudi.

A la Montse, la Cristina, la Carme, la Rosa, les altres “profes” de la Unitat, pels aclariments, suggeriments i discussions sobre diferents temes.

A na Maria, una persona entusiasta, expressiva i “pallassa” amb qui vaig aprendre a fer les primeres immunos, hibridacions, captures al Vysis, etc. A qui, cada dos per tres, interrompia per preguntar-li qualsevol “problema” que se’m presentava. Maria, gràcies per la paciència! Però, també voldria agrair-te l’ajut i les converses d’aquests últims mesos.

A la Merche, pel seu gran ajut en l’estadística d’aquest treball i per les ganes i dedicació que ha demostrat. Gràcies, per tot el que has fet!

A la Cristina Gutiérrez, el Jordi Camps i l'Ignasi Roig, amb qui he compartit els inicis a la Unitat, sol·licituds de beques, cursos de doctorat, congressos, etc. Al Jörge, una persona introvertida però només a primera vista.

A l'Aïda Pujol, per pensar en mi quan el Jordi i la Quima buscaven algun/a doctorant.

A l'Àngels Niubó, entre moltes altres coses, per interessar-te per com m'anaven les coses, i per aconseguir "interrompre", de bon grat, les llargues estones de feina davant l'ordinador.

A l'Imma, entre d'altres coses, pel dia a dia del laboratori i per estar sempre disposada a solucionar petits "problemes" informàtics.

A l'Esther, contemporània de tesi, per la "companyia emocional" en aquesta recta final.

A la Mònica, la Raquel, el Pedro, la Cristina Hernando i la Núria Camats, pels moments compartits al laboratori i als congressos.

A la Meritxell, l'Albert i l'Elsa, que tot i ser els "junior" de l'equip ja han fet les Amèriques!

Al Javi, l'Ariadna, l'Anna Donate, la Yolanda, la Bea, el Pere, la Gemma, la Rosana, el Miguel, la Laia i l'Aïda, per totes les estones divertides compartides.

A l'Ana, la "secre", per dur amb serenitat tots els aquells assumptes de la Unitat, en els que nosaltres ens perdem, i per la paciència.

A la M<sup>a</sup> Àngels Rigola, per deixar-me ocupar la teva taula durant aquests últims mesos.

A la Susana Egozcue, al Ferran Garcia, a l'Octavio Arango, al Carlos Abad i al Joan Sarquella, sense la col·laboració dels quals aquest treball no hauria estat possible. Especialment a l'Octavio per l'entusiasme que transmet.

I also want to thank...

Michael Speicher for accepting me twice in his lab in Munich, for giving me the opportunity to learn about other research topics and for making me feel like one more of his lab members.

Jürgen, for being an excellent “supervisor”! Thank you for your patience during my first days in the Institute, for the funny moments, for the talks, for all your help inside and outside the lab, for the e-mails and....for many other things (maybe I should build a table and write them in, oder?!). Without your help most of this work wouldn't have been possible. Thank you!

Katrin, for your contagious happiness and for your friendship during all this time. Cora, Isabell, Cristine, Simone, Jochen, Sabine, Corinna, Gabi, Carmen, Doris, for making me feel like at home!

Annette, for being the way you are, for the excellent moments in Munich, Austria, Barcelona and Sabadell, for your truthful friendship and because you made my stays in Munich unforgettable.