

**Proyecto de Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas – PEDECIBA Biología**

## **Bases moleculares de la meiosis: regulación por ARNs no codificantes largos**

**Eliana de los Santos Silva**

**Tutora:** Adriana Geisinger

**Co-tutora:** Rosana Rodríguez Casuriaga

**Lugar de realización:** Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Laboratorio de Biología Molecular de la Reproducción - Departamento de Biología Molecular

### **Resumen**

La meiosis es una división celular única que en los metazoarios forma parte del proceso de formación de las células reproductoras, y es esencial para la continuidad de la especie. Durante la misma ocurren el apareamiento, recombinación y segregación de cromosomas homólogos, mediados por los complejos sinaptonémicos, y cuya alteración está en la base de numerosas patologías, incluyendo infertilidad y otras. A pesar de su enorme importancia, poco se sabe sobre las bases moleculares de los mecanismos de reconocimiento, apareamiento y recombinación meióticas; algunas evidencias sugieren la participación de ARNs no codificantes. Los ARNs no codificantes largos (lncRNAs) son moléculas que no dirigen la síntesis de proteínas, presentes en todos los eucariotas. En los vertebrados son particularmente abundantes en el testículo, y especialmente en las células meióticas y posmeióticas, donde podrían desempeñar importantes roles regulatorios. En un proyecto anterior del laboratorio, empleando técnicas de secuenciación masiva (RNAseq) se generó un catálogo de los lncRNAs expresados en las distintas etapas a lo largo de la espermatogénesis del ratón. Ahora, en este proyecto de tesis doctoral, nos proponemos caracterizar un subgrupo de esos lncRNAs específicos o diferenciales de la meiosis, de modo de aportar información acerca de su posible rol en la regulación de los procesos meióticos como apareamiento y recombinación de cromosomas homólogos, entre otros. Con ese fin, realizaremos estudios de localización mediante RNA-FISH en colocalización con diversos componentes meióticos, evaluación de su presencia y distribución en testículos de ratones mutantes de pérdida de función con arresto meiótico y falla de apareamiento homólogo, y estudios funcionales de silenciamiento génico

*in vivo* el en testículo para evaluar posibles consecuencias sobre la meiosis y la espermatogénesis. Finalmente, planeamos seleccionar algunos de esos ratones con silenciamiento testicular de lncRNAs para estudios de RNAseq, con el objeto de descifrar alteraciones transcripcionales inducidas por dicho silenciamiento.

## **Introducción**

### **La espermatogénesis y la meiosis**

La espermatogénesis es el mecanismo por el cual se producen los espermatozoides, que son los gametos masculinos en los metazoarios. El proceso consta de tres etapas: i) la proliferativa, ii) la meiótica; y iii) la espermiogénesis (de Kretser *et al.*, 1998). La etapa proliferativa se denomina así por la multitud de mitosis que se producen en ella. El principal objetivo es formar muchas células precursoras, llamadas espermatogonias. Algunas de estas espermatogonias entrarán a la vía de diferenciación, dando lugar a los meiocitos, que son las células que se dividen por meiosis, y que en el caso de la meiosis masculina se denominan espermatocitos. La meiosis es una división celular única de las células de la línea germinal, tiene lugar en todos los eucariotas desde las levaduras hasta el hombre, y consiste en dos divisiones (meiosis I y II): en la primera, se producen los espermatocitos secundarios [células haploides (n) con contenido de ADN 2C]. Sin duplicación de material genético, se procede a realizar la segunda división. En ésta las cromátidas hermanas se separan, siendo un evento similar a una mitosis, y sus células resultantes son las espermátidas redondas (n y con contenido de ADN C). Por último, en la espermiogénesis ocurren cambios estructurales y bioquímicos necesarios para que las espermátidas se transformen en espermatozoides funcionales, dotados de la capacidad de motilidad e interacción con el gameto femenino.

La necesidad de profundizar el conocimiento de las bases moleculares de la meiosis es evidente: además del interés biológico, eventuales alteraciones en el proceso usualmente desencadenan problemas de fertilidad y otras patologías, incluyendo diferentes síndromes y cáncer (Geisinger & Benavente, 2016; Feichtinger & McFarlane, 2019). A pesar de su enorme importancia, el estudio a nivel molecular de la meiosis en los organismos pluricelulares se ha visto enfrentado a algunos grandes obstáculos. La primera gran limitación proviene de la inexistencia de sistemas confiables de cultivo de células meióticas (Komeya *et al.*, 2018; Bharti *et al.*, 2020), lo que obliga a realizar los estudios *in vivo*. Además, en las hembras la meiosis

ocurre en la fase embrionaria del organismo y el número de ovocitos es escaso (Hernández-López *et al.*, 2020), lo que dificulta su análisis. En consecuencia, la mayoría de los estudios se efectúan en machos, dado que en éstos la meiosis se inicia en la vida posnatal, y la cantidad de gametos producidos es enorme. No obstante, el hecho de que la meiosis masculina sea parte de la espermatogénesis, un proceso tremendamente complejo, trae aparejado el problema de la heterogeneidad celular: en los testículos de los mamíferos adultos coexisten más de 30 tipos celulares diferentes, incluyendo células espermatogénicas en sus diferentes etapas de diferenciación, y diversos tipos de células de sostén (Griswold, 2016). Esta gran heterogeneidad ha representado un enorme obstáculo para los estudios moleculares de la meiosis, y en general de las distintas etapas espermatogénicas, ya que los mismos requieren disponer del tipo celular de interés en forma aislada.

### **La profase meiótica I**

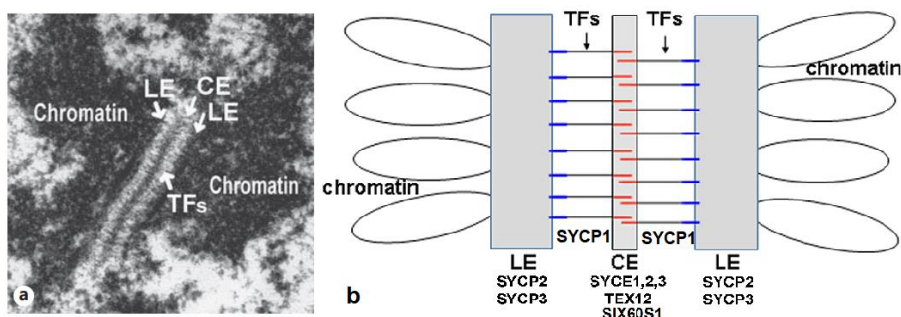
En la profase de la primera división meiótica ocurren algunos de los procesos más importantes de la espermatogénesis: el apareamiento y recombinación de los cromosomas homólogos, fuente fundamental de biodiversidad de las especies sexuadas; y, su posterior segregación, necesaria para mantener el número de cromosomas de la especie (Bolcun-Filas & Handel, 2018). Por estas razones gran parte de los estudios se centran en dicha etapa.

La extensa profase meiótica I consta de cinco fases: leptoteno (L), cigoteno (Z), paquiteno (P), diploteno (D) y diacinesis, marcadas por el estado del complejo sinaptonémico (CS), estructura típica de células en profase I, altamente conservada en la evolución, que se detallará más adelante (Fraune *et al.*, 2012-A). El L/Z está marcado por la formación del CS y el inicio del apareamiento de los cromosomas homólogos. Además, sobre el CS pueden observarse nódulos de recombinación temprana. En el P es donde ocurre efectivamente la recombinación (*crossing-over*) de los cromosomas homólogos, y aparecen nódulos de recombinación tardíos, menores en número, correspondientes a aquellos intercambios efectivamente resueltos como *cross-overs* (Handel & Schimenti, 2010). En el D los CSs se desensamblan, y los cromosomas homólogos permanecen unidos a través de los quiasmas, estructuras que evidencian el intercambio ocurrido.

Dada que estos eventos son cruciales para la segregación cromosómica posterior, es entendible que la alteración de genes relevantes para estos procesos pueda tener consecuencias dramáticas para la fertilidad. Se ha descrito que el 10% de los casos de azoospermia no

obstructiva (ausencia total de espermatozoides sin alteraciones en los conductos de eyaculación) se debe a interrupciones de la profase I meiótica (Topping *et al.*, 2006). El síndrome de Down constituye un ejemplo clínico de formación defectiva de CS (Bolor *et al.*, 2009).

Como se mencionó anteriormente, el CS es altamente necesario para que los eventos de la profase I ocurran. El CS es una estructura proteica que mantiene los cromosomas homólogos apareados durante la profase I (desde el Z al P). Consiste en una estructura tipo cremallera con dos elementos laterales (ELs), un elemento central (EC) y filamentos transversales (FTs) que unen los ELs con el EC (**Figura 1**). En los mamíferos, hasta el momento, se han identificado 8 proteínas estructurales que lo componen: SYCP2 y SYCP3, componentes de los ELs (siendo SYCP3 el principal de ambos); SYCP1, que constituye los FTs; y, las proteínas SYCE1, SYCE2, SYCE3, TEX12 y SIX6OS1 que componen el EC (**Figura 1b**, Fraune *et al.*, 2012-B; Gómez *et al.*, 2016). Sin embargo, se sabe muy poco sobre la función del CS y los mecanismos que regulan el reconocimiento y apareamiento meióticos (Grey & de Massy, 2021). Se ha sugerido que habría presencia de ARNs en los CSs, aunque se ignora su identidad y función.



**Figura 1.** Estructura del CS de mamíferos. **a)** Micrografía electrónica. **b)** Esquema clásico de la organización del CS, y localización de sus componentes proteicos. Las siglas corresponden a los nombres en inglés de los distintos elementos. (Fuente: Geisinger y Benavente, 2016)

### Los ARNs no codificantes largos

En los humanos el genoma se transcribe aproximadamente en un 80%, pero únicamente el 2% corresponde a proteínas (Djebali *et al.*, 2012). Un tipo de transcripto poco estudiado, pero especialmente abundante en las células meióticas y posmeióticas del testículo, son los ARNs no codificantes largos (lncRNAs), definidos como ARNs mayores de 200 nucleótidos que generalmente no codifican productos proteicos (Li *et al.*, 2017). Están presentes en todos los eucariotas estudiados hasta el momento, usualmente presentan niveles de expresión más

bajos que los genes codificantes, y poseen patrones de expresión altamente específicos (Fatica & Bozzoni, 2014).

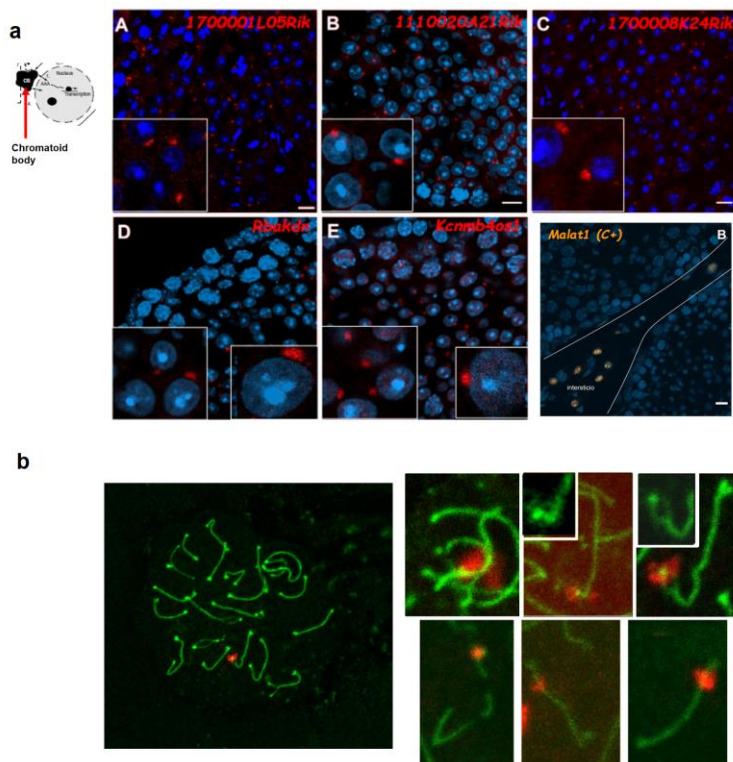
Algunos lncRNAs han sido implicados en la regulación de diversos procesos biológicos y/o vinculados al desarrollo de distintas patologías (Trovero & Geisinger, 2019). Resulta interesante que algunos lncRNAs desempeñarían funciones vinculadas a la regulación de procesos meióticos (ingreso en meiosis y progresión de la misma, regulación de proteínas esenciales, etc.), aunque aún se conocen pocos ejemplos (Geisinger *et al.*, 2021). Sin duda, se irán descubriendo nuevos roles para estos lncRNAs meióticos en el futuro cercano. Un ejemplo en este sentido es el hallazgo realizado por Ding y colaboradores (Ding *et al.*, 2012), quienes encontraron un lncRNA que mediaba el reconocimiento homólogo y el apareamiento robusto durante la profase meiótica I en levaduras de la especie *Schizosaccharomyces pombe*. El lncRNA se acumulaba en las inmediaciones del *locus* a partir del cual es transcripto: cuando se deletaba dicho *locus* se perdía el apareamiento en ese punto y cuando se transponía a otro sitio, ocurría apareamiento en ese sitio ectópico. Posteriormente, también encontraron otros lncRNAs que mediaban el reconocimiento y apareamiento en otros dos *loci* de dicha levadura (Ding *et al.*, 2019). Dado este descubrimiento, cabe preguntarse si hay lncRNAs que participen en el apareamiento y reconocimiento de cromosomas homólogos durante la profase meiótica en los eucariotas superiores.

## **Antecedentes del grupo**

Desde hace años, el grupo de investigación se ha dedicado al estudio de la espermatogénesis con énfasis en la meiosis. En el marco de una tesis doctoral del grupo (defendida en diciembre 2020), se confeccionó una lista de lncRNAs de expresión diferencial de las distintas etapas de la espermatogénesis del ratón mediante RNAseq a partir de genotecas direccionales. Dichas genotecas se generaron partiendo de poblaciones celulares de las distintas etapas con muy alto nivel de pureza, obtenidas por citometría de flujo empleando metodologías desarrolladas por nuestro grupo (e.g. Rodríguez-Casuriaga *et al.*, 2014; Geisinger & Rodríguez-Casuriaga, 2017; Rodríguez-Casuriaga & Geisinger, 2021). Los lncRNAs identificados se caracterizaron respecto a longitud y número de exones, distribución cromosómica, biotipos predominantes (intergénicos, antisentido solapantes con genes codificantes, etc.), conservación evolutiva, co-expresión con genes codificantes adyacentes o solapantes, etc. (Trovero *et al.*, 2020).

Con el fin de avanzar en la caracterización de dichos lncRNAs, se seleccionaron algunos para su localización a través de hibridación *in situ* fluorescente (RNA-FISH). Como se mencionó, en general, los niveles de expresión de los lncRNAs son muy bajos comparados con los de ARNs mensajeros; esta característica dificulta su detección por RNA-FISH convencional. Para superar este inconveniente, se emplearon sondas *Stellaris*<sup>TM</sup> (Biosearch). La técnica hace uso de oligonucleótidos de ADN cortos pre-marcados fluorescentemente (alrededor de 20 nucleótidos de longitud), agrupados en conjuntos de hasta 48 sondas individuales, permitiendo así un mayor nivel de sensibilidad (Orjalo & Johansson, 2016). El abordaje permitió confirmar la co-localización de un ARNm con un lncRNA antisentido solapante, *Kcnmb4os1*, en las espermatidas, lo que refuerza la idea de una posible relación funcional entre ambos (Trovero *et al.*, 2020). Además, se observó que una buena parte de los lncRNAs posmeióticos analizados se localizaban en el cuerpo cromatoide (**Figura 2a**), un organelo citoplásmico perinuclear sin membrana característico de las espermatidas, cuya función aparentemente se vincula con la regulación postranscripcional y secuestro de ARNm (Meikar *et al.*, 2014). Este hallazgo sería de altísima relevancia, al sugerir la participación de lncRNAs en el secuestro de ARNm. En este sentido, es importante señalar que hacia el final de la espermiogénesis las espermatidas elongadas se vuelven transcripcionalmente inertes, dado el elevado nivel de compactación de su cromatina, en la que la mayor parte de las histonas han sido sustituidas por protaminas, con la consiguiente pérdida de marcas epigenéticas (e.g. Legrand & Hobbs, 2018; Geisinger *et al.*, 2021). En consecuencia, el secuestro de ARNm podría garantizar la síntesis proteica altamente regulada hacia el final de la espermiogénesis.

Adicionalmente, el lncRNA *Kcnmb4os1*, no sólo se detectó en células posmeióticas sino que también se observó, con un muy alto nivel de expresión, en células de profase meiótica, con aparente asociación con el CS. Se observó en cortes y en esparcidos de núcleos meióticos (**Figura 2b**) en localización sub-telomérica, coincidiendo con la ubicación del *locus* a partir del cual se transcribe. Este hallazgo recuerda al reportado para *S. pombe*, y sugiere que lncRNAs podrían estar participando en la búsqueda de homologías y/o alineamiento homólogo durante la profase meiótica en mamíferos lo cual, de ser así, constituiría un descubrimiento revolucionario.



**Figura 2.** Patrones de localización mediante RNA-FISH de algunos lncRNAs analizados. **a)** Varios lncRNAs (rojo) se localizan en el cuerpo cromatoide de las células posmeióticas. Los núcleos están contrateñidos con DAPI. Dentro de los recuadros se observan ampliaciones en cada caso. La ventana inferior derecha muestra un control para un lncRNA no específico de la espermatogénesis (*Malat1*), con un patrón de localización en las células intersticiales (somáticas) del testículo. El esquema en el borde superior izquierdo muestra la ubicación del cuerpo cromatoide en las espermátidas redondas. **b)** Inmunofluorescencia con anticuerpo anti-CS (verde) y RNA-FISH secuencial del lncRNA *Kcnmb4os1* (rojo) sobre esparcidos de espermatocitos de ratón.

Por otra parte, la lista de lncRNAs generada muestra unos 50 ARNs (antisentido e intergénicos) cuya expresión aumenta en la profase meiótica. En un análisis primario mediante *High-scoring segment pair* (HSP), se detectaron aproximadamente una veintena de estos lncRNAs que tendrían un único sitio de alineamiento (*hit*) en un único autosoma, similar al descrito anteriormente. Además, se detectaron algunos lncRNAs que dan un patrón de alineamiento que cubre el total del cromosoma a partir del cual se transcriben. No obstante, se carece de estudios funcionales sobre estos lncRNAs.

## Hipótesis y Objetivos

### Hipótesis

1) Existen lncRNAs expresados diferencialmente durante la profase meiótica en los eucariotas superiores, que desempeñan funciones regulatorias vinculadas a dicha etapa. En particular, proponemos que algunos de ellos se localizan sobre los cromosomas en la meiosis masculina del ratón, y podrían estar participando en el reconocimiento/alineamiento de cromosomas homólogos (tal vez de forma análoga a lo identificado en la levadura) y/o recombinación.

2) Existen en el testículo del ratón lncRNAs específicos o diferenciales de la profase meiótica que desempeñan roles esenciales para la meiosis y/o espermatogénesis, y cuyo silenciamiento producirá alteraciones en dicho proceso.

### **Objetivo general**

Aportar conocimiento original sobre las bases moleculares de la meiosis, en particular en lo relativo al posible rol de secuencias de lncRNAs específicos o diferenciales de la profase meiótica masculina en el ratón. Nos interesa conocer acerca de su posible participación en la regulación de los distintos procesos que tienen lugar durante la misma, y cómo su alteración puede afectar al desarrollo de la meiosis y la espermatogénesis. De modo particular, nos interesa evaluar la posible participación de lncRNAs en los eventos de apareamiento y reconocimiento de homologías durante la meiosis.

### **Objetivos específicos**

- Determinar la localización (nuclear, citoplásmica) de lncRNAs de alta expresión en la profase meiótica del ratón. Nos interesa conocer si existen otros lncRNAs meióticos que den un patrón similar al *Kcnmb4os1*.
- Para lncRNAs candidatos que den señal nuclear asociada a la cromatina en los espermatocitos en los experimentos anteriores, evaluar la posible alteración de la señal en espermatocitos de testículo de ratones mutantes con arresto meiótico. Nuestro interés es determinar si la localización de estos lncRNAs cambia en situaciones de arresto meiótico.
- Poner a punto ensayos de silenciamiento génico *in vivo*.
- Evaluar los efectos morfológicos y fenotípicos causados por el silenciamiento de los lncRNAs seleccionados.
- Iniciar análisis de posibles cambios de expresión génica en células meióticas de ratones con lncRNA silenciado (mediante RNAseq), con el fin de contribuir al conocimiento de los eventuales mecanismos regulatorios mediados por ese lncRNA, y cómo su silenciamiento puede afectar a la expresión génica.
- Conocer si hay otros lncRNAs meióticos que también se localicen en el cuerpo cromatoide en las células posmeióticas, al igual que otros que ya hemos identificado. Nos interesa saber si la localización de lncRNAs (incluyendo los que se encuentran regulados

positivamente durante la profase meiótica) en el cuerpo cromatoide en las células posmeióticas, es un fenómeno tan extendido como nos parece, a juzgar por los resultados que se han obtenido en el laboratorio hasta ahora. En caso de ser así, contribuir a la comprensión de su posible rol en estas células. Como hemos mencionado, esto podría sugerir un novedoso y original mecanismo de regulación postranscripcional en la espermiogénesis.

## **Materiales y Métodos**

### **Animales**

Para los experimentos de RNA-FISH (ver a continuación) se emplearán ratones juveniles de la cepa CD1-Swiss recién destetados (23-24 días), ya que presentan una mayor proporción de células en profase meiótica que los individuos adultos. Eventualmente para algunos experimentos se podrán utilizar también adultos jóvenes. Además, se trabajará con una línea de ratones mutantes para un componente del CS generada anteriormente por el grupo (contexto genético B6D2), con fenotipo infértil por falla del apareamiento meiótico (Hernández-López *et al.*, 2020). Dichos animales se encuentran alojados en el bioterio del Institut Pasteur de Montevideo (IPMont). Con respecto a las microinyecciones para los experimentos de silenciamiento génico (ver más abajo), los mismos se realizarán en la Unidad de Biotecnología de Animales de Laboratorio (UBAL) del IPMont, empleando ratones juveniles B6D2 de 3 semanas de edad. Tanto los ratones mutantes como los silenciados se trasladarán al IIBCE, donde se procesarán en el día. Todo el manejo de especímenes se realizará según las regulaciones de la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA). Contamos con protocolo de experimentación aprobado para todos los ensayos a realizar (protocolo CEUA IPMont 007-18; protocolo CEUA IIBCE 001/02/2012).

### **Diseños de sondas y RNA-FISH**

A partir de las listas de lncRNAs diferenciales, se seleccionarán algunos de profase meiótica que en los alineamientos de HSP presenten un sólo *hit* o un patrón de cobertura a lo largo del cromosoma. Se diseñarán sondas *Stellaris* empleando el software *Probe Designer v4.2* (<http://www.biosearchtech.com/stellaris-designer>).

Se localizarán los lncRNAs mediante RNA-FISH en corte y esparcidos (*spreading*), siguiendo el protocolo utilizado previamente en el laboratorio. Eventualmente, a los lncRNAs

que presenten un patrón de tinción nuclear, vinculado a la cromatina de meiocitos, se les procederá a realizar la co-localización con componentes proteicos del CS, mediante inmunofluorescencia, siguiendo el protocolo propuesto por Trovero *et al.*, 2020 (<https://www.biosearchtech.com/support/resources/stellaris-protocols>). Adicionalmente, se contrateñirá cada cromosoma mediante *chromosome painting*, y eventualmente otras sondas que permitan mejor localización del *locus* (ej. sondas teloméricas, o centroméricas, dependiendo de la ubicación del *locus* de cada lncRNA). Los resultados se visualizarán con microscopio confocal Zeiss LSM 800, con módulo de super-resolución *AiryScan* (Carl-Zeiss, Alemania).

### **Localización en testículos con arresto meiótico**

Como hemos mencionado, contamos con ratones mutantes para un componente del CS generados durante un proyecto previo del laboratorio. Para los lncRNAs que den señal asociada a los cromosomas meióticos, se probarán los lncRNAs seleccionados en cortes y esparcidos de espermatocitos de ratones mutantes, con el fin de comparar si el patrón de localización varía respecto a lo observado en núcleos meióticos de ratones normales. Este estudio incluirá al lncRNA *Kcnmb4os1*, previamente caracterizado por Trovero *et al.*, 2020.

### **Estudios funcionales de los lncRNAs: silenciamiento *in vivo***

La metodología a emplear para realizar estudios funcionales de los lncRNAs es la técnica de *knockdown* (KD). Es importante recordar la ausencia de líneas de cultivo celular confiables de células meióticas, lo que limita las posibilidades de experimentación *in vitro*. Por otra parte, cabe mencionar que la generación de ratones *knockout* (KO) no es la metodología más apropiada para estudiar genes no codificantes. En primer lugar, dado que en los lncRNAs no existe un marco abierto de lectura, no tiene sentido introducir una inserción/delección de unos pocos nucleótidos mediante CRISPR/Cas9, estrategia comúnmente utilizada en genes codificantes. Otra estrategia empleada es la delección del gen completo, mediante el uso de dos ARNs guía. No obstante, la depleción de un lncRNA puede tener eventualmente consecuencias desconocidas e imposibles de evaluar, al poder afectar la expresión de uno o múltiples genes codificantes vecinos, ya sea por la eliminación de regiones regulatorias (ej. *enhancers*), eliminación de marcas epigenéticas, etc. (Bassett *et al.*, 2014; Barman *et al.*, 2019). Más aún,

una importante proporción de los lncRNAs son antisentido de genes codificantes y parcialmente solapantes con éstos (Trovero *et al.*, 2020), lo que haría imposible su delección sin afectar al gen codificante. Es por todo lo antedicho, que el KD nos parece la estrategia más apropiada. De todas formas, realizar el silenciamiento por KD tiene algunas ventajas y desventajas. La ventaja más clara es que es más rápido y sencillo que efectuar un KO, y además es muy útil para el silenciamiento de genes no codificantes puesto que no se altera la molécula de ADN. Como contraparte, presenta como desventaja que no se logra el silenciamiento total del ARN blanco, y que el efecto es transitorio (si bien existe la posibilidad de realizar silenciamiento estable, o transitorio de larga duración).

Hemos evaluado distintas estrategias posibles para la realización de silenciamiento *in vivo*. Una posibilidad sería el uso de interferencia de ARN (RNAi) mediada por vector, lo que permite silenciamiento estable o transitorio de larga duración, y ha sido utilizado recientemente con éxito para lncRNAs de espermátidas (Li *et al.*, 2021). No obstante, este abordaje emplea la maquinaria celular de RNAi (e.g. <https://www.thermofisher.com/uy/en/home/products-and-services/promotions/rnai-genome-modulation-handbook.html>) y, por lo tanto, en principio es de esperar que funcione de modo correcto para el silenciamiento de ARNs en el citoplasma, no así para el silenciamiento de ARNs nucleares, como sería el caso de los lncRNA en los meiocitos con los que se desea trabajar, e.g. *Kcnmb4os1*. Dicho esto, trabajos recientes han evidenciado la existencia de componentes del complejo RISC núcleo-específicos, y silenciamiento a nivel nuclear para ciertos mensajeros (e.g. Bottini *et al.*, 2017). Más aún, existe al menos un reporte de silenciamiento de lncRNAs nucleares mediante RNAi mediado por vector (Li *et al.*, 2021). A pesar de ello, no conocemos el alcance y extensión del RNAi a nivel nuclear (es decir, cuál es el grado de silenciamiento, si éste sólo ocurre en ciertos transcritos específicos, etc.). Tampoco sabemos si en el reporte mencionado el resultado fue casual, ocurrió por un mecanismo diferente de la vía de RNAi, y/o obedeció a que dicho lncRNA también estaba operativo a nivel citoplásmico. Por todo lo antedicho, la estrategia que hemos elegido, en principio, es la utilización de oligonucleótidos antisentido (ASOs: *antisense oligonucleotides*).

Los ASOs son moléculas de ADN modificado (para su protección de la degradación por nucleasas) con fosforotioato y/o nucleótidos bloqueados en una única conformación, de entre 15 y 25 bases de largo, que se diseñan antisentido con respecto al ARN que se desea inhibir. El fundamento de la técnica es que silencian a su ARN objetivo al formar un heterodúplex entre el ARN/ADN, sustrato natural para la RNasa H celular endógena (e.g.

<https://www.idtdna.com/pages/products/functional-genomics/antisense-oligos>). En principio son más eficientes y producen un silenciamiento más duradero para ARNs nucleares que otras alternativas, y existe un reporte reciente que muestra su eficacia para el silenciamiento de un lncRNA nuclear en el testículo, habiéndose alcanzado niveles de silenciamiento cercanos al 80%, con una duración de hasta 10 días post-inyección (Chen *et al.*, 2021).

Se ingresarán los ASOs al ratón mediante microinyecciones en el conducto deferente en ambos testículos, bilateral, uno con el ASO de interés y el contralateral con ASO control, para excluir diferencias individuales. Se validará la eficiencia del KD por qRT-PCR, por triplicado, comparando en cada caso los testículos microinyectados con ASO de interés vs ASO control. Además, el diseño de los ASOs con un fluoróforo en el extremo 5' permitirá monitorear su ingreso a las células, y en particular al núcleo celular. En principio el efecto de silenciamiento se analizará a distintos tiempos, desde 48 hs post-inyección hasta 10 días. Para el diseño de los ASOs se recurrirá a la empresa IDT.

Una vez confirmado el silenciamiento, se analizarán los posibles efectos testiculares (histología gonadal, análisis citométrico en flujo de suspensiones celulares testiculares, nivel de apoptosis en el epitelio seminífero, morfología, conteo y motilidad espermática, inmunotinciones, etc.), para evaluar posibles alteraciones de la espermatogénesis. En particular, se evaluará si existe afectación del CS que pueda generar alteraciones en el apareamiento de los cromosomas meióticos. Para esto último, se hará tinción con anticuerpos contra componentes del CS sobre esparcidos de núcleos meióticos y, de ser posible, se hará contratinción mediante *chromosome painting* para el par cromosómico correspondiente al *locus* de ese lncRNA.

### **Inicios de secuenciación masiva**

Para contribuir a la comprensión de los mecanismos subyacentes a la acción de estos lncRNAs meióticos, proponemos seleccionar uno cuyo silenciamiento en los experimentos anteriores dé un fenotipo de interés (eventualmente podría ser *Kcnmb4os1*, u otro que surgiera de este proyecto), para realizar análisis transcriptómicos (RNAseq) en comparación con testículos microinyectados con control. El objetivo es descifrar alteraciones transcripcionales inducidas por el silenciamiento de dicho lncRNA.

Si fuera posible purificar mediante citometría de flujo únicamente las células silenciadas (es decir, aquellas a las que les ingresó el ASO, por su marca fluorescente acoplada), se podría realizar los estudios de RNAseq con estas células purificadas. En caso de que la señal no fuera suficiente para su detección por citometría de flujo, se debería recurrir al uso de testículo entero para los ensayos de RNAseq.

En la Figura 3 se observa una representación gráfica del abordaje experimental propuesto.

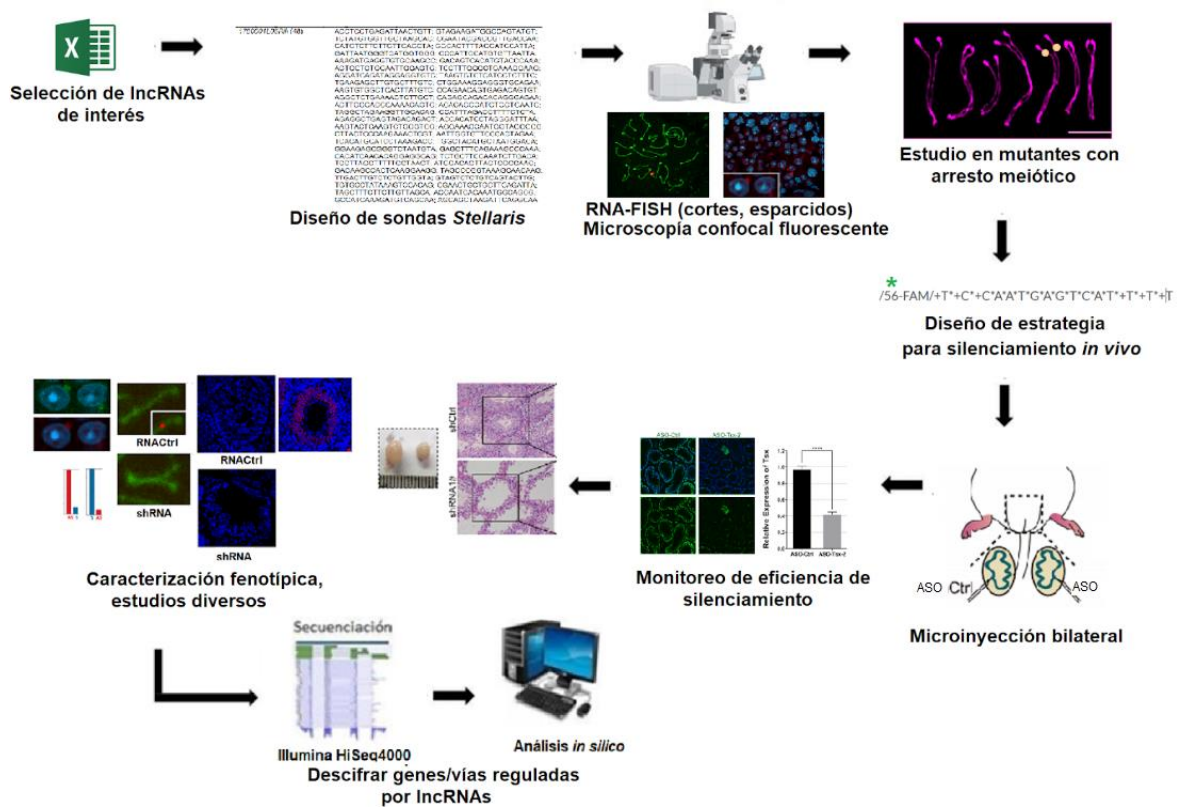


Figura 3. Abordaje experimental propuesto.

## Bibliografia

- Barman P, Divya R, & Sukesh RB. (2019). Mechanisms of antisense transcription initiation with implications in gene expression, genomic integrity and disease pathogenesis. *Non-coding RNA*, 5(1):11 <http://doi.org/10.3390/ncrna5010011>
- Bassett AR, Akhtar A, Barlow DP, Bird AP, Brockdorff N, Duboule D, ..., & Ponting CP. (2014). Considerations when investigating lncRNA function in vivo. *Elife*, 3:e03058 <http://doi.org/10.7554/eLife.03058>
- Bharti D, Jang SJ, Lee SY, Lee SL, & Rho GJ. (2020). In Vitro Generation of Oocyte Like Cells and Their In Vivo Efficacy: How Far We have been Succeeded. *Cells*, 9(3):557 <https://doi.org/10.3390/cells9030557>
- Bolcun-Filas E, & Handel MA. (2018). Meiosis: the chromosomal foundation of reproduction. *Biol. Reprod.*, 99(1):112–126 <https://doi.org/10.1093/biolre/iory021>
- Bolor H, Mori T, Nishiyama S, Ito Y, Hosoba E, Inagaki H, ..., & Kurahashi H. (2009). Mutations of the SYCP3 gene in women with recurrent pregnancy loss. *Am. J. Hum. Genet.*, 84(1):14-20 <http://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.12.002>
- Bottini S, Hamouda-Tekaya N, Mategot R, Zaragosi LE, Audebert S, Pisano S, ..., & Trabucchi M. (2017). Post-transcriptional gene silencing mediated by microRNAs is controlled by nucleoplasmic Sfpq. *Nat Commun.*, 8(1), 1-16 <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01126-x>
- Chen Z, Ling L, Shi X, Li W, Zhai H, Kang Z, ..., & Zheng K. (2021). Microinjection of antisense oligonucleotides into living mouse testis enables lncRNA function study. *Cell Biosci.*, 11(1):213 <http://doi.org/10.1186/s13578-021-00717-y>
- de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, & Wreford N. (1998). Spermatogenesis. *Hum Reprod.*, 13(Suppl 1):1-8. [http://doi.org/10.1093/humrep/13.suppl\\_1.1](http://doi.org/10.1093/humrep/13.suppl_1.1)
- Ding DQ, Okamasa K, Katou Y, Oya E, Nakayama JI, Chikashige Y, ..., & Hiraoka Y. (2019). Chromosome-associated RNA-protein complexes promote pairing of homologous chromosomes during meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Commun.* 10(1):5598 <http://doi.org/10.1038/s41467-019-13609-0>
- Ding DQ, Okamasa K, Yamane M, Tsutsumi C, Haraguchi T, Yamamoto M, & Hiraoka Y. (2012). Meiosis-specific noncoding RNA mediates robust pairing of homologous chromosomes in meiosis. *Science*. 336(6082):732-6. <http://doi.org/10.1126/science.1219518>
- Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, ..., & Gingeras TR. (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature.*, 489(7414):101-108 <http://doi.org/10.1038/nature11233>
- Fatica A, & Bozzoni I. (2014). Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nat. Rev. Genet.*, 15(1):7-21 <http://doi.org/10.1038/nrg3606>
- Feichtinger J, & McFarlane RJ. (2019). Meiotic gene activation in somatic and germ cell tumours. *Andrology*, 7(4):415-427 <https://doi.org/10.1111/andr.12628>
- Fraune J, Alsheimer M, Volff JN, Busch K, Fraune S, Bosch TC, & Benavente R. (2012-A). Hydra meiosis reveals unexpected conservation of structural synaptonemal complex proteins across metazoans. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 109(41):16588-16593 <http://doi.org/10.1073/pnas.1206875109>

- Fraune J, Schramm S, Alsheimer M, & Benavente R. (2012-B). The mammalian synaptonemal complex: protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Exp. Cell Res.*, 318(12):1340-1346 <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.018>
- Geisinger A, & Benavente R. (2016). Mutations in genes coding for synaptonemal complex proteins and their impact on human fertility. *Cytogenet. Genome Res.*, 150(2):77-85 <http://doi.org/10.1159/000453344>
- Geisinger A, & Rodríguez-Casuriaga R. (2017). Flow cytometry for the isolation and characterization of rodent meiocytes. In *Meiosis* (pp. 217-230). Humana Press, New York, NY. doi:10.1007/978-1-4939-6340-9\_11
- Geisinger A, Rodríguez-Casuriaga R, & Benavente R. (2021). Transcriptomics of meiosis in the male mouse. *Front. Cell Dev. Biol.*, 9:446 <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.626020>
- Gómez-H L, Felipe-Medina N, Sánchez-Martín M, Davies OR, Ramos I, García-Tuñón I, ..., & Pendas AM. (2016). C14ORF39/SIX6OS1 is a constituent of the synaptonemal complex and is essential for mouse fertility. *Nat. Commun.*, 7(1):1-16 <http://doi.org/10.1038/ncomms13298>
- Grey C, & De Massy B. (2021). Chromosome organization in early meiotic prophase. *Front. Cell Dev. Bio.*, 9:688878. <http://doi.org/10.3389/fcell.2021.688878>
- Griswold MD. (2016). Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol. Rev.*, 96(1):1-17 <http://doi.org/10.1152/physrev.00013.2015>
- Handel MA, & Schimenti JC. (2010). Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat. Rev. Genet.*, 11(2):124-36 <http://doi.org/10.1038/nrg2723>
- Hernández-López D, Geisinger A, Trovero MF, Santiñaque FF, Brauer M, Folle GA, Benavente R & Rodríguez-Casuriaga R. (2020). Familial primary ovarian insufficiency associated with an SYCE1 point mutation: defective meiosis elucidated in humanized mice. *Mol. Hum. Reprod.*, 26(7):485–497 <https://doi.org/10.1093/molehr/gaaa032>
- Komeya M, Sato T, & Ogawa T. (2018). In vitro spermatogenesis: A century-long research journey, still half way around. *Reprod Med Biol.*, 17(4):407-420 <http://doi.org/10.1002/rmb2.12225>
- Legrand JMD, & Hobbs RM. (2018). RNA processing in the male germline: Mechanisms and implications for fertility. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 79:80–91 <http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.10.006>
- Li K, Xu J, Luo Y, Zou D, Han R, Zhong S, ..., & Song W. (2021). Panoramic transcriptome analysis and functional screening of long noncoding RNAs in mouse spermatogenesis. *Genome. Res.*, 31(1):13-26 <http://doi.org/10.1101/gr.264333.120>
- Li LJ, Leng RX, Fan YG, Pan HF, & Ye DQ. (2017). Translation of noncoding RNAs: focus on lncRNAs, pri-miRNAs, and circRNAs. *Exp. Cell Res.*, 361(1):1-8 <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.10.010>
- Meikar O, Vagin VV, Chalmel F, Sõstar K, Lardenois A, Hammell M, ..., & Kotaja N. (2014). An atlas of chromatoid body components. *Rna*, 20(4):483-495 <http://doi.org/10.1261/rna.043729.113>
- Orjalo AV, & Johansson HE. (2016). Stellaris® RNA fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of immature and mature long noncoding RNAs in adherent cells. In *Long Non-Coding RNAs* (pp. 119-134). Humana Press, New York, NY. doi:10.1007/978-1-4939-3378-5\_10
- Rodríguez-Casuriaga R, & Geisinger A. (2021). Contributions of flow cytometry to the molecular study of spermatogenesis in mammals. *Int. J. Mol. Sci.*, 22(3):1151 <http://doi.org/10.3390/ijms22031151>
- Rodríguez-Casuriaga R, Santinaque FF, Folle GA, Souza E, Lopez-Carro B, & Geisinger A. (2014). Rapid preparation of rodent testicular cell suspensions and spermatogenic stages purification by flow

cytometry using a novel blue-laser-excitable vital dye. *MethodsX*, 1:239-243  
<https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.10.002>

Topping D, Brown P, Judis L, Schwartz S, Seftel A, Thomas A, & Hassold, T. (2006). Synaptic defects at meiosis I and non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 21(12):3171-3177  
<https://doi.org/10.1093/humrep/del281>

Trovero MF, & Geisinger A. (2019). Los ARNs no codificantes largos y su vinculación con las patologías testiculares. In *Anales de la Facultad de Medicina*, 6(1):12-47. Universidad de la República. Facultad de Medicina. doi: 10.25184/anfamed2019v6n1a8

Trovero MF, Rodríguez-Casuriaga R, Romeo C, Santiñaque F, François M, Folle GA, ..., & Geisinger A. (2020). Revealing stage-specific expression patterns of long noncoding RNAs along mouse spermatogenesis. *RNA Biology*., 17(3):350-365 <http://doi.org/10.1080/15476286.2019.1700332>

## Estimación de costos

Material	Cantidad	U\$S
Materiales e insumos generales	—	3.000
Sondas Sellaris y buffers (Biosearch, aprox. USD 700 c/u)	10	7.000
Sonda <i>chromosome painting</i> (Metasystems; USD 260 c/u)	5	1.500
Kit qRT-PCR (Thermo Cells-to-Ct kit, Invitrogen, Thermo Scientific, kit de alta sensibilidad)	1	1.300
ASOs para silenciamiento in vivo (mínimo 3 KD diferentes, con 3 ASOs c/u, y controles)	3	5.500
Microinyecciones, mantenimiento de animales (precios en calidad de colaboración)	?	2.500
RNAseq (KD x 3; Ctrl x 3)	1	3.000
<b>Total</b>		<b>21.100</b>

