

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

**Generación y análisis funcional de dos mutantes
murinos de la recombinasa RAD51B**

*Generation and functional analysis of two murine
mutants of the recombinase RAD51B*

TRABAJO FIN DE GRADO



SHEILA LUNA GONZÁLEZ

Curso 2022/2023

Para el mayor regalo que la vida me ha otorgado:

mi Tita Goyi.

Te quiero.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	1
ABREVIATURAS	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Gametogénesis	3
1.2. Meiosis	4
1.3. Recombinación meiótica	5
1.4. La recombinasa RAD51B	6
1.4.1. Insuficiencia ovárica prematura (POI)	8
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1. Modelos murinos utilizados	9
3.1.1. Bienestar animal	9
3.1.2. Edición genómica por CRISPR/Cas9.....	9
3.1.2.1. Diseño y obtención de sgRNAs, Cas9 y ssODNs	9
3.1.2.2. Microinyección de cigotos de ratón mediante el sistema CRISPR/Cas9.....	10
3.1.2.3. Caracterización de fundadores y establecimiento de la línea.....	10
3.2. Técnicas de Biología Molecular.....	10
3.2.1. Extracción de DNA genómico por lisis alcalina	10
3.2.2. Genotipado por PCR	10
3.2.3. Generación de vectores de expresión	11
3.2.3.1. Extracción de RNA	11
3.2.3.2. Transcripción reversa-PCR (RT-PCR).....	11
3.2.3.3. Clonación	12
3.2.3.4. Extracción de plásmido de DNA de E. coli por lisis alcalina	12
3.2.3.5. Análisis de restricción	13
3.3. Técnicas citológicas	13

3.3.1. Análisis histológico	13
3.3.2. Esparcido de espermatozoides (spread)	13
3.3.3. Aplastados de túbulos seminíferos (squash)	13
3.3.4. Inmunofluorescencia	14
3.3.5. Adquisición y análisis de imágenes	14
3.4. Cultivos celulares	14
3.4.1. Obtención de fibroblastos de oreja de ratón	14
3.4.2. Recuperación del DNA tras inducción de daño.	14
3.5. Análisis estadístico	15
4. RESULTADOS	15
4.1. Generación de los ratones Rad51b ^{ΔExon3/ΔExon3} y Rad51b ^{SAES5/SAES5}	15
4.2. Análisis de la espermatogénesis en ratones Rad51b ^{ΔExon3/ΔExon3} y Rad51b ^{SAES5/SAES5}	17
4.2.1. Análisis de la dinámica sináptica en espermatozoides Rad51b ^{ΔExon3/ΔExon3} y Rad51b ^{SAES5/SAES5}	17
4.2.2. Análisis de la recombinación meiótica en espermatozoides Rad51b ^{ΔExon3/ΔExon3} y Rad51b ^{SAES5/SAES5}	18
4.3. Análisis histológico de ovarios Rad51b ^{SAES5/SAES5}	23
4.4. Efectos de la variante Rad51b ^{SAES5/SAES5} en la eficiencia de reparación del DNA	24
5. DISCUSIÓN.....	24
6. CONCLUSIONES	28
7. BIBLIOGRAFÍA.....	29
8. ANEXOS.....	33

RESUMEN

La Insuficiencia Ovárica Prematura (POI) implica una alteración en la función ovárica que causa infertilidad femenina. Recientemente se ha identificado una variante de la recombinasa RAD51B con el extremo N-terminal truncado (RAD51B-c.92delT) en dos hermanas afectadas por POI (Franca et al., 2022). Partiendo de estos resultados, se decidió ratificar la letalidad embrionaria asociada a la deficiencia de *Rad51b* en ratones, así como validar la función de su extremo N-terminal en meiosis. Para ello, se generaron mediante la tecnología de edición genómica CRISPR/Cas9 los mutantes *Rad51b*^{SAES5/SAES5} y *Rad51b*^{ΔExon3/ΔExon3}. El análisis de sus meiocitos reveló un fenotipo similar al de los ratones *Rad51b*^{c.92delT/c.92delT}, con defectos en la reparación del DNA por una acumulación de γ H2AX, RAD51 y BRME1 en los ejes cromosómicos y una reducción en el número de entrecruzamientos, que no impidió la generación de espermatozoides. Estos resultados demuestran que la pérdida de integridad del dominio N-terminal de RAD51B, pese a no causar infertilidad, afecta a la recombinación meiótica y cuestiona si la función de RAD51B es indispensable para el desarrollo embrionario en el ratón.

PALABRAS CLAVE: Fertilidad, espermatogénesis, meiosis, RAD51B.

ABSTRACT

Primary ovarian insufficiency (POI) produces female infertility by means of normal ovarian function alteration. Recently in our laboratory, a RAD51B variant (RAD51B-c.92delT) was identified in two sisters affected with POI, resulting in a N-terminal truncated protein (Franca et al., 2022). Based on these results, we decided to both ratify the embryonic lethality associated with RAD51B deficiency in mice and validate the function of RAD51B N-terminal in meiosis. To this end, using CRISPR/Cas9 genome editing technology we generated *Rad51b*^{SAES5/SAES5} and *Rad51b*^{ΔExon3/ΔExon3} mutant mice. Meiocytes analysis revealed a similar phenotype to *Rad51b*^{c.92delT/c.92delT} specimens, with defects in DNA reparation due to an accumulation of γ H2AX, RAD51 and BRME1 in the chromosomic axes and a reduction in the number of crossovers, which did not impede spermatozoa generation. These results demonstrate that although the integrity of the N-terminal domain of RAD51B is non-essential regarding murine fertility, it does affect meiotic recombination and challenge the notion that RAD51B function is essential for embryonic development in mice.

KEYWORDS: Fertility, spermatogenesis, meiosis, RAD51B.

ABREVIATURAS

AE: Elemento axial (<i>Axial Element</i>)	ORF: Marco de lectura abierto (<i>Open Reading Frame</i>)
a.u.: unidades arbitrarias (<i>arbitrary units</i>)	PAR: Región pseudoautosómica (<i>Pseudoautosomal region</i>)
cDNA: DNA complementario	pb: par de bases
CE: Elemento central (<i>Central Element</i>)	PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
CO: entrecruzamiento (<i>crossover</i>)	PGC: Células Germinales primordiales (<i>Primordial Germ Cells</i>)
CRISPR: Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas (<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>)	POI: Insuficiencia ovárica prematura (<i>Primary Ovarian Insufficiency</i>)
crRNA: CRISPR RNA	PTC: codón de terminación prematuro (<i>Premature Termination Codon</i>)
DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole	RN: Nódulo de recombinación (<i>Recombination Nodule</i>)
dHJ: Unión doble de Holliday (<i>double Holliday Junction</i>)	RNA: Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
DMEM: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	rpm: Revoluciones por minuto
DNA: Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)	RT: Temperatura ambiente (<i>Room Temperature</i>)
dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato	RT-PCR: Transcripción Reversa- PCR
DSBs: Roturas de doble hebra (<i>Double Strand Breaks</i>)	SC: Complejo sinaptonémico (<i>Synaptonemal Complex</i>)
EJC: complejo de unión de exón (<i>Exon Junction Complex</i>)	sgRNA: RNA de guía única (<i>single guide RNA</i>)
FBS: suero bovino fetal (<i>Fetal Bovine Serum</i>)	SPF: libre de patógenos específicos (<i>specific-pathogen free</i>)
HR: recombinación homóloga (<i>homologous recombination</i>)	ssDNA: DNA de hebra simple (<i>single-strand DNA</i>)
IF: inmunofluorescencia	ssODN: Oligonucleótido donador de hebra simple (<i>single-stranded Oligodeoxynucleotide</i>)
KI: <i>knock-in</i>	TF: Filamento transversal (<i>Transversal Filament</i>)
LE: Elemento lateral (<i>Lateral Element</i>)	tracrRNA: CRISPR RNA transactivante (<i>trans-activating crRNA</i>)
mRNA: RNA mensajero	WT: silvestre (<i>Wild-Type</i>)
NCO: no entrecruzamiento (<i>non-crossover</i>)	
NHEJ: reparación de extremos no homólogos (<i>Non-Homologous End Joining</i>)	
NMD: <i>Nonsense-Mediated mRNA Decay</i>	
n.s.: no significativo	

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Gametogénesis

En la reproducción sexual de mamíferos, la fusión de dos células haploides o gametos da lugar a un cigoto a partir del cual se desarrolla un organismo diploide. El proceso biológico por el que se obtienen los gametos a partir de las células germinales se denomina gametogénesis. Las células germinales primordiales (PGCs), que son células madre indiferenciadas que aparecen durante el desarrollo embrionario temprano, pueden diferenciarse tanto a espermatogonias como a oogonias que a su vez se diferenciarán para dar lugar a espermatozoides y oocitos respectivamente. Mientras que las hembras únicamente poseen un número determinado de oocitos que se diferencian en el estadio embrionario y que, durante la pubertad, terminan de desarrollarse; los machos producen espermatozoides desde la pubertad a lo largo de toda su vida (Larose et al., 2019).

En los machos de ratón, las PGCs aparecen al sexto día embrionario (E6) en el epiblasto y migran para infiltrarse en E11 en la cresta gonadal. Posteriormente, interaccionan con células de Sertoli, células mioideas y células de Leydig, completando así la determinación sexual y la formación del testículo embrionario (Larose et al., 2019). Las PGCs se dividen por mitosis originando proespermatozonias que en E13,5 entran en bloqueo mitótico. La proliferación no se recupera hasta 5 días después del parto, cuando estas células migran a los túbulos seminíferos y se establecen como espermatogonias o células madre espermatogénicas (SSCs) (De Rooij & Grootegoed, 1998).

En ratón, las espermatogonias pueden ser de dos tipos: tipo A, que mantienen el *pool* de células madre por divisiones mitóticas y que se diferencian en las espermatogonias de tipo B, que son células progenitoras que terminan originando los espermatozoides. Las espermatogonias de tipo B, se diferencian en espermatozonios primarios, que entra en la primera división meiótica generándose espermatozonios secundarios. Tras la meiosis II se obtienen espermátidas redondas haploides (n) que finalmente se diferencian en espermatozoides maduros por la condensación y elongación del núcleo y la formación del flagelo y acrosoma. El proceso de diferenciación de las células germinales masculinas comienza en la base del tubo seminífero y van progresando a lo largo del mismo hasta finalmente liberar los espermatozoides maduros al lumen (De Rooij & Grootegoed, 1998; Griswold, 2016; Larose et al., 2019; Nishimura & L'Hernault, 2017). El ciclo completo de espermatogénesis dura 35 días, sin embargo, cada 8,6 días comienza un nuevo ciclo solapándose con el anterior, asegurando de esta manera una producción rápida y constante de gametos. Como consecuencia del solapamiento, se pueden encontrar células en distinto estado de diferenciación a lo largo del tubo seminífero (Griswold, 2016).

1.2. Meiosis

La meiosis es un proceso clave en la generación de gametos haploides (n) que consiste en una división celular reduccional. Para ello se parte de una célula diploide que tras dos divisiones consecutivas con una única replicación del DNA genera cuatro células hijas haploides. En la primera división meiótica se separan los cromosomas homólogos y en la segunda las cromátidas hermanas (Huang & Roig, 2023).

La profase meiótica es la etapa más larga de la meiosis y se divide en 5 subetapas atendiendo al grado de ensamblaje del complejo sinaptonémico (SC): leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis (Fig 1). El SC es un complejo multiproteico que sirve de andamiaje para que se produzca la recombinación meiótica entre los homólogos, manteniéndolos físicamente unidos entre sí (sinapsis). Presenta una estructura tripartita conformada por dos elementos axiales (AEs), que tras la sinapsis pasan a llamarse elementos laterales (LEs), un elemento central (CE) y filamentos transversales (TFs) que mantienen unidos a los dos primeros (F. Zhang et al., 2022). En leptoteno, se inicia la recombinación meiótica, con el ensamblaje de los AEs y la condensación de los cromosomas. Los cromosomas homólogos comienzan a emparejarse en zigoteno a través del ensamblaje de los filamentos transversales del SC, llegando a completarse la sinapsis en el estadio paquiteno. En machos, la sinapsis no se completa en los cromosomas X e Y porque solo presentan homología en una pequeña región denominada región pseudoautosómica (PAR). Por último, a lo largo de diploteno y diacinesis, los homólogos desinapsan hasta quedar unidos únicamente por los quiasmas. Los quiasmas son uniones físicas entre las cromátidas no hermanas que mantienen unidos los bivalentes hasta anafase I permitiendo una correcta segregación de los cromosomas homólogos y así completar la primera división meiótica (Bolcun-Filas & Handel, 2018; Handel & Schimenti, 2010; Simmler et al., 1985).

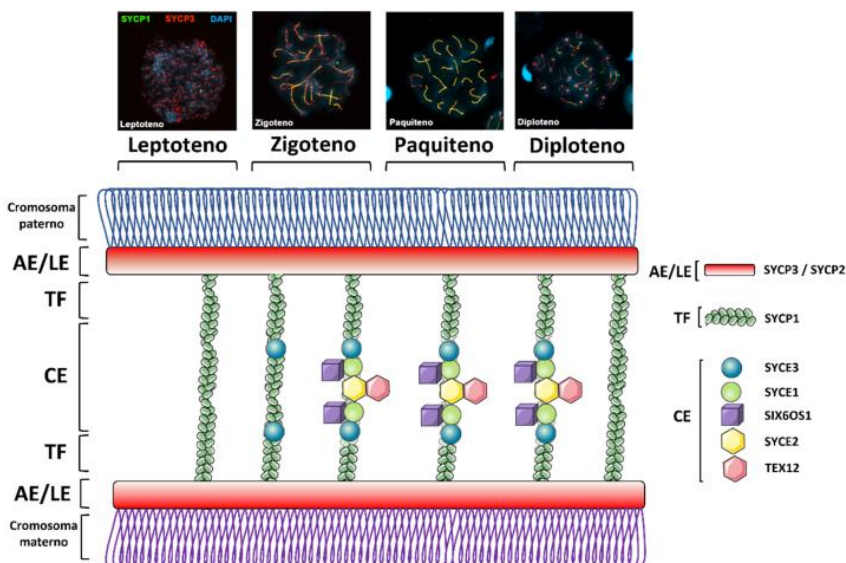


Figura 1. Representación esquemática de la estructura tripartita del complejo sinaptonémico. Los LEs se acoplan a cada uno de los cromosomas homólogos y la sinapsis ocurre a través de los TFs de SYCP1 y el ensamblaje del CE. En la parte superior del panel se muestran esparcidos de espermatocitos de ratón teñidos con SYCP1 (verde), SYCP3 (rojo) y DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole, azul) durante los distintos subestadios de la profase I (Sánchez-Sáez, 2023).

1.3. Recombinación meiótica

El objetivo de la recombinación meiótica es generar diversidad genética a través de la formación no mutagénica de nuevas combinaciones alélicas, así como establecer uniones físicas que permitan el correcto apareamiento, sinapsis y segregación de los cromosomas homólogos (Zickler & Kleckner, 2015).

Su inicio en leptoteno viene marcado por la generación de roturas de doble hebra (DSBs) por la acción de las topoisomerasas SPO11 y TOPOVIB-*like*, en conjunto con otras proteínas como MEI4, REC114 e IHO1 (Robert et al., 2016). Estas DSBs se producen en lugares determinados del genoma denominados *hotspots* (puntos calientes) en los que la proteína PRDM9 trimetila la histona H3 en lisina 4 (H3K4me3) (Baudat et al., 2010; Myers et al., 2010). Posteriormente, la quinasa ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*) fosforila a la histona H2AX en serina la 139 (γ H2AX), siendo esta la señal de activación de la respuesta de reparación de daño (Bellani et al., 2005).

El primer paso para el procesamiento de estas roturas es la eliminación de SPO11 del DNA mediada por el complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) (Qiu & Huang, 2021; B. Zhang et al., 2020). Seguidamente se produce la resección del extremo 5' por la exonucleasa EXO1, de forma que quedan extremos 3' sobresalientes de DNA de hebra simple (ssDNA) que son protegidos de la degradación por nucleasas por las proteínas de unión al ssDNA RPA, SPATA22 y MEIOB (Zakharyevich et al., 2010; Ribeiro et al., 2016). A continuación, estas proteínas son reemplazadas por las recombinasas RAD51 y DMC1, formándose así los nódulos de recombinación (RNs) tempranos (Shinohara & Shinohara, 2004). Este intercambio de proteínas es un paso crítico en el que interviene decisivamente la proteína supresora de tumores BRCA2, a través de la interacción con el heterodímero HSF2BP/BRME1 (Thorslund & West, 2007; Felipe-Medina et al., 2020). Los filamentos nucleoproteicos recubiertos con RAD51 y DMC1 invaden al cromosoma homólogo de forma que producen un desplazamiento de la hebra y la elongación del extremo 3'. Las estructuras formadas se denominan *D-loops*. Estos intermediarios de recombinación pueden resolverse de dos maneras, con entrecruzamiento (COs), en los que el intercambio de información genética entre los cromosomas homólogos es recíproco; o sin entrecruzamiento (NCOs), en los que el intercambio de información genética es unidireccional (Baudat et al., 2013). La hipótesis más comúnmente aceptada es que, en el primero de los casos, la E3 sumo ligasa RNF212 estabiliza a los intermediarios de recombinación para que se resuelvan como CO. La E3 ubiquitín ligasa HEI10, por el contrario, los desestabiliza, favoreciendo así su maduración como NCOs (Qiao et al., 2014; Rao et al., 2017). De forma preferente, los intermediarios se resuelven como NCOs. En este caso la hebra invasora vuelve a conectarse con el extremo perteneciente a su mismo cromosoma y el *D-loop* anilla con su cromátida hermana. Los

NCOs también pueden producirse por la disolución de las uniones dobles de Holliday (dHJ), mientras que cuando estas son resueltas, se generan COs (McMahill et al., 2007).

La resolución final de los intermediarios de recombinación ocurre en paquiteno y es importante que las proteínas de la ruta *mismatch repair* MLH1/MLH3 (complejo MutL γ) y EXO1 aseguren que haya al menos un CO por bivalente que dará lugar a un quiasma (Toledo et al., 2019; Wei et al., 2003). Estas uniones físicas son esenciales para la correcta segregación de los cromosomas homólogos en metafase I y evitar así la generación de gametos aneuploides (Baudat et al., 2013).

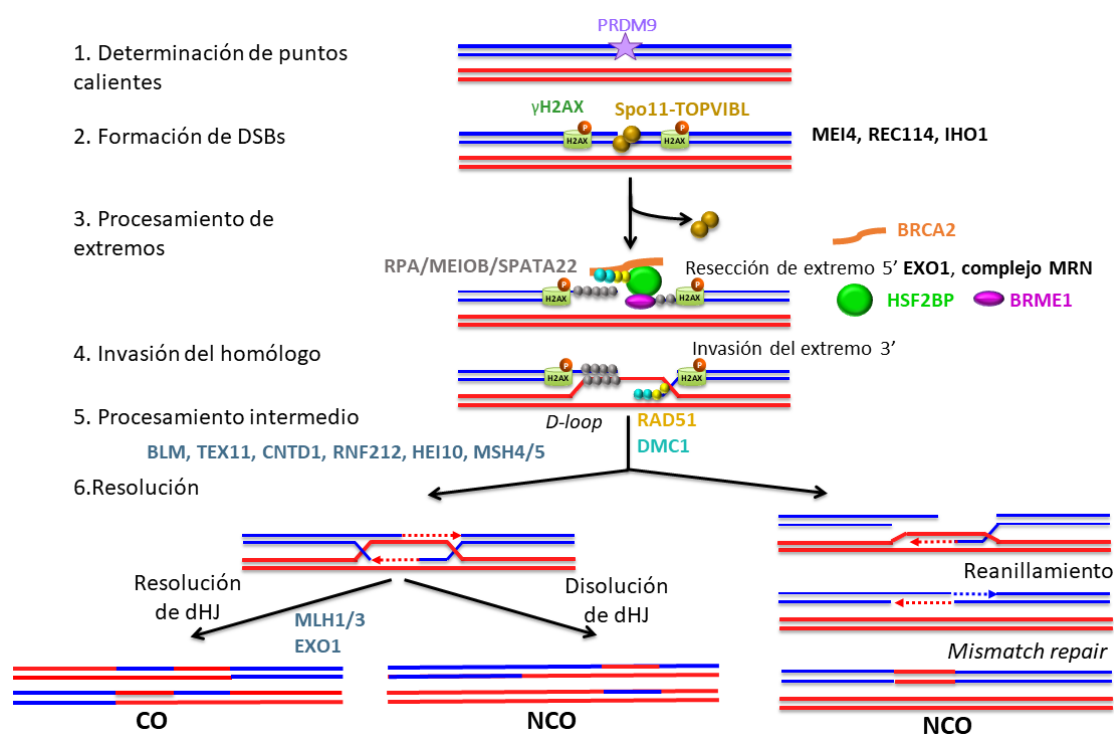


Figura 2. Representación esquemática de la recombinación meiótica. En primer lugar, se determinan los puntos calientes donde se forman las DSBs. A continuación, los extremos 5' son procesados y los 3' invaden al cromosoma homólogo, generando D-loops que podrán resolverse como CO o NCO. Adaptada de (Sánchez-Sáez, 2023).

1.4. La recombinasa RAD51B

En mamíferos se han identificado siete parálogos de la recombinasa RAD51 que surgieron por duplicaciones del gen *Rad51*: RAD51, DMC1, XRCC2, XRCC3, RAD51B (también denominado RAD51L1/hREC2), RAD51C (RAD51L2) y RAD51D (RAD51L3). Esta familia de proteínas participa en la reparación de DSBs por recombinación homóloga (HR), recubriendo los extremos de ssDNA para invadir al homólogo, emparejarse e intercambiar información genética. Los parálogos de RAD51 forman dos complejos: el complejo BCDX2 conformado por RAD51B-RAD51C-RAD51D-XRCC2 y el complejo CX3 integrado por RAD51C-XRCC3. Tanto RAD51 como sus parálogos presentan dos dominios ATPasa conservados: el motivo Walker A (GXXXXGKT/S) y motivo Walker B (R/K-XXX-G-XXX-LhhhD) (Bonilla et al., 2020; Takata et al., 2000).

La función concreta de RAD51B no ha sido aún establecida y todavía se desconoce el mecanismo específico por el cual cada uno de sus parálogos promueven la HR. Esto es debido a que el estudio de estas proteínas es complicado por su baja concentración celular, su tendencia a formar agregados insolubles *in vitro* y porque los ratones deficientes en las mismas presentan letalidad embrionaria (Bonilla et al., 2020; Deans et al., 2000; Kuznetsov et al., 2009; Pittman et al., 1998; Prakash et al., 2021; Shu et al., 1999).

Shu y colaboradores generaron mediante *gene targeting* un ratón mutante de RAD51B que supuestamente daba lugar a un alelo nulo y que, en homocigosis, mostraba letalidad embrionaria. Para ello, se interrumpió por recombinación homóloga el exón 2, dirigiendo un *cassette* dicistrónico de β -galactosidasa–neomicina (β -geo). Además, este constructo contenía la secuencia del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) de picornavirus, un sitio de aceptación del *splicing* y un codón de terminación. La proteína truncada resultante carecía de ambos motivos Walker, responsables de la actividad ATPasa, y la zona de unión al DNA. Mientras que los ratones heterocigotos se desarrollaron de forma normal hasta la vida adulta, los embriones mutantes homocigotos *Rad51b*^{-/-} morían entre E5,5 y E6,5. Esta letalidad embrionaria fue parcialmente rescatada en un fondo nulo de p53, en cuyo caso su muerte se retrasó hasta E8,5-E9,5 (Shu et al., 1999).

La letalidad embrionaria suponía un desafío para el análisis del fenotipo celular *in vivo* de los ratones y células madre embrionarias *knock-out* de *Rad51b* (Shu et al., 1999). Por ello, se analizó el fenotipo de células de vertebrados (línea celular de pollo hiperrecombinogénico DT40) deficientes en RAD51B. Esta línea celular tolera la ausencia de los parálogos de RAD51 probablemente porque es deficiente en p53 (Sullivan & Bernstein, 2018). Las células DT40 *RAD51B*^{-/-} presentaron defectos en la reparación por HR, aportando así una evidencia genética de la implicación de la recombinasa en esta vía. Además, al inducir daño a las células, el número de *foci* de RAD51 en el núcleo disminuye con respecto a las células WT (silvestres), mientras que en el análisis por Western Blot se observaron niveles normales de esta proteína. Por lo tanto, la deficiencia de RAD51B provoca fallos en la distribución de RAD51 en la respuesta a daño celular. La visualización de *foci* de RAD51 en el núcleo depende, no solo de su correcta localización, sino de su capacidad para formar filamentos de una longitud adecuada (Raderschall et al., 1999). Estos resultados sugieren que la participación de RAD51B en la HR consiste en favorecer que RAD51 forme filamentos nucleoproteicos mayores o participando en su estabilización una vez ya se hayan formado, aumentando de esta manera la eficacia en la búsqueda de homología. En este estudio también se pone de manifiesto la importancia de RAD51B en el mantenimiento de la estabilidad genómica, pues su deficiencia vino acompañada de frecuentes aberraciones cromosómicas (Takata et al., 2000).

1.4.1. Insuficiencia ovárica prematura (POI)

Recientemente, en nuestro laboratorio se ha identificado una variante de RAD51B–(c.92delT) por secuenciación del exoma completo de dos hermanas con POI. Esta mutación origina un codón de terminación prematuro (PTC) en el exón 3, lo cual resultaría en una proteína truncada no funcional. Dado que la deficiencia en RAD51B es letal embrionario (Shu et al., 1999), se hipotetizó que la traducción podría reiniciarse en otra de las metioninas que hay aguas abajo de la mutación. Esta premisa se comprobó identificando péptidos correspondientes al extremo C-terminal en extractos de células linfoblastoides humanas *RAD51B*^{WT/c.92delT} y *RAD51B*^{c.92delT/c.92delT}, así como llevando a cabo análisis *in vitro*, que revelaron que la traducción reiniciaba en la metionina 64 (Franca et al., 2022).

Los ratones homocigotos portadores de la mutación descrita en la secuencia humana no presentaron ningún fenotipo somático, eran fértiles y los análisis histológicos demostraron una apariencia normal de los túbulos seminíferos, epidídimo y ovarios (Franca et al., 2022). Sin embargo, los meiocitos de estos ratones mostraron defectos en la reparación de DSBs, evidenciados por la acumulación en los ejes cromosómicos de las proteínas RAD51 y BRME1/HSF2BP. La reparación aberrante de las roturas condujo a una reducción en el número de COs. En células somáticas también se detectaron defectos en la reparación del DNA y una elevada incidencia de roturas cromosómicas (Franca et al., 2022).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, la hipótesis de la que parte este trabajo es que ***Rad51b* es prescindible para la gametogénesis y el desarrollo embrionario del ratón y que la letalidad reportada anteriormente es debida a la tecnología empleada en la generación del ratón *knock-out* (nulo)** (Shu et al., 1999).

El objetivo principal de este proyecto es ratificar dicha hipótesis, desarrollando y caracterizando un nuevo mutante nulo de RAD51B mediante la tecnología de edición génica CRISPR (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas)/Cas9. Para ello, se llevarán a cabo los siguientes objetivos secundarios:

1. Diseñar una mutación en el locus *Rad51b* que genere un alelo nulo.
2. Generación de ratones portadores de la mutación diseñada mediante el empleo de la tecnología de edición genómica CRISPR/Cas9.
3. Análisis *in vivo* de los efectos de la mutación en los ratones homocigotos portadores de la mutación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Modelos murinos utilizados

3.1.1. Bienestar animal

Los ratones fueron estabulados en una instalación libre de patógenos específicos (SPF) en jaulas con ventilación individual, temperatura regulada, dieta estándar y un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas de acuerdo con las regulaciones establecidas por la Unión Europea en el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca (USAL). Los protocolos llevados a cabo con ratones han sido aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la USAL.

3.1.2. Edición genómica por CRISPR/Cas9

Los modelos *Rad51b*^{ΔExon3/ΔExon3} y *Rad51b*^{SAE55/SAE55} se generaron haciendo uso de la tecnología CRISPR/Cas9 en la que la endonucleasa (Cas9) lleva a cabo cortes en el DNA y por RNAs guía (sgRNA) que dirigen a la Cas9 a su diana en el genoma (Anexos 1 y 2). Las DSBs pueden repararse por unión de extremos no homólogos (NHEJ) o a partir de un donador de DNA de hebra simple (ss-ODN) que sirva como molde para generar inserciones, deleciones y mutaciones puntuales (H. Yang et al., 2014).

3.1.2.1. Diseño y obtención de sgRNAs, Cas9 y ssODNs

Los sgRNAs están conformados por dos componentes: los crRNAs (CRISPR RNAs) y los tracrRNA (crRNA transactivantes). Mientras que los crRNAs son los que contienen la secuencia complementaria a la diana específica, los tracrRNAs actúan como andamiaje para la unión del RNA a la Cas9 y al DNA para llevar a cabo el corte dirigido (Wang et al., 2016).

Por lo tanto, para cada edición se diseñaron crRNAs específicos, mientras que en el caso de los tracrRNAs la secuencia fue siempre la misma. El diseño de los crRNAs se realizó con la ayuda del servidor de IDT (https://eu.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM):

Modelo	Identidad del crRNA	Secuencia (5'-3')
<i>Rad51b</i> ^{ΔExon3/ΔExon3}	sgRNA1	CTAGAACTTATGAAAGTGAC
	sgRNA2	TCGTGTAACCTAATTATAAG
<i>Rad51b</i> ^{SAE55/SAE55}	sgRNA3	TTTGTATAAACATTGTAAGC
	sgRNA4	TGAGTTTTTCCGCAACCTGG

Tabla 1. Identidad y secuencia de los crRNAs utilizados en la generación de los modelos murinos *Rad51b*^{ΔExon3/ΔExon3} y *Rad51b*^{SAE55/SAE55} mediante la tecnología CRISPR/Cas9.

3.1.2.2. Microinyección de cigotos de ratón mediante el sistema CRISPR/Cas9

La microinyección se realizó en cigotos B6/CBA F2 por parte de la Unidad de Transgénicos de la Universidad de Salamanca (Dr. Manuel Sánchez Martín). Para ello, primero se preparó en el laboratorio la mezcla que contenía 30 ng/μL de Cas9 recombinante, 20 ng/μL de cada sgRNA anillado y 10 ng/μL del ssODN (Tabla 2). En el caso del mutante *Rad51b*^{SAES5/SAES5} no se utilizó ssODN.

Modelo	Secuencia del ssODN (5'-3')
<i>Rad51b</i> ^{ΔExon3/ΔExon3}	<p>TATTATATCTTTGCTACACATGCATGTTAAACTATTTTTCTTTACTT</p> <p>TTTTTTCCTTTTAGCACTTTTAAAGTCTCTCCCCACTAGAACTTAT</p> <p>GAAAGTAAGGGGTGTTATTTACTTTGGGGGGTCAGAATAGCTTCC</p> <p>TTGTGAGAACAATGCTCTAGCTAAAATGTGAAGGATGAATAGGG</p> <p>GAGACAGGCAAACACAT</p>

Tabla 2. Secuencia del ssODN utilizado para generar el modelo murino indicado mediante la tecnología CRISPR/Cas9. En rojo se indica el brazo de homología con el extremo 3' y en verde el brazo de homología con el extremo 5'.

3.1.2.3. Caracterización de fundadores y establecimiento de la línea

Los ratones fundadores portadores de la edición fueron identificados por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) empleando oligonucleótidos que flanquean la edición y DNA molde genómico extraído de tejido.

Modelo	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Alelo	Tamaño del amplicón
<i>Rad51b</i> ^{ΔExon3/ΔExon3}	F1	CGCCCGGCAAGTTTTCTGTTTT	WT	524 pb
	R1	CAGCTTCTCTCATTGGCTGCTTC	ΔExón3	410 pb
<i>Rad51b</i> ^{SAES5/SAES5}	F2	AACAGGAGAACATACAGGGAGTG	WT	519 pb
	R2	CCATGGAGCACAGGAGCTATAA	SAES5	444 pb

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para el genotipado de los modelos murinos desarrollados y tamaño de los amplicones en pares de bases generados para cada alelo. pb: pares de bases.

3.2. Técnicas de Biología Molecular

3.2.1. Extracción de DNA genómico por lisis alcalina

La extracción de DNA genómico se realizó a partir de biopsias de cola de ratones de entre 14 y 21 días. Estas fueron incubadas con 600 μL de NaOH 50 mM durante 30 minutos a 95°C. Posteriormente, se disgregaron empleando un vórtex y se neutralizó la lisis agregando 50 μL de Tris-HCl 1 M pH 8,8.

3.2.2. Genotipado por PCR

El genotipado de los ratones se realizó mediante PCR. Los oligonucleótidos utilizados flanquean la región editada (Tabla 3). La mezcla de amplificación contenía 1 μL de cada oligonucleótido, 2 μL de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), 2,5 μL de tampón polimerasa 1X, 0,15 μL de enzima Taq

polimerasa diluida en 1,85 μL de agua MQ y 1,5 μL de DNA en un volumen final de 25 μL . La curva de amplificación de la PCR consistió en: desnaturalización inicial de 2 min a 94°C y 35 ciclos compuestos de 20 s a 94°C, seguida de la fase de anillamiento de 20 s a 57°C (59 °C en el caso de *Rad51b* ^{$\Delta\text{Exon3}/\Delta\text{Exon3}$}) y, la fase de elongación de 30 s a 72°C; por último, una fase de elongación final de 5 min a 72°C. El producto de la PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 2%.

3.2.3. Generación de vectores de expresión

3.2.3.1. Extracción de RNA

Para extraer RNA, se colocaron 100 mg del tejido en un tubo Eppendorf de 2 mL y se añadieron 750 μL de GIT (tiocianato de guanidinio 4M, citrato de sodio 25 mM, sodio lauril sarcosinato 0,5% (w/v) y β -mercaptoetanol 0,1 M). Posteriormente, el tejido se disgregó con un homogeneizador Polytron y se agregaron de forma consecutiva 0,1 volúmenes de acetato de sodio 2 M pH 4,0, un volumen de fenol equilibrado con agua y 0,4 volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se incubó 15 minutos a temperatura ambiente (RT) y se centrifugó a 13000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa superior (contiene el RNA) se transfirió a un tubo nuevo, se precipitó añadiendo 1 volumen de isopropanol y se centrifugó 15 minutos a 13000 rpm y 4°C. El pellet de RNA se lavó dos veces con etanol 70% y se dejó secar al aire. Por último, el RNA se resuspendió en H₂O Milli-Q y se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm haciendo uso de un NanoDrop.

3.2.3.2. Transcripción reversa-PCR (RT-PCR)

Para obtener el cDNA (DNA complementario) del RNA extraído se llevó a cabo una reacción de retrotranscripción a partir de 5 μg de RNA total haciendo uso de un cebador oligo(dT) y del kit comercial SuperScript® IV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Life Technologies). A continuación, se emplearon 2 μL de este cDNA para amplificar por PCR el marco de lectura abierto (ORF) de los distintos genes utilizando oligonucleótidos específicos. Los amplicones se generaron haciendo uso de la polimerasa Phusion High-Fidelity (Thermo Fisher Scientific). Además del cDNA molde, la mezcla de PCR contenía 0,4 mM de cada oligonucleótido, dNTPs 200 μM , 1X *buffer* polimerasa y 0,8U de la polimerasa Phusion. En todo caso se realizó un control negativo y un control positivo del amplicón de *Brca2* para corroborar que el RNA ha sido correctamente extraído. La curva de amplificación de la PCR consistió en: desnaturalización inicial de 2 min a 94°C y 35 ciclos compuestos de una primera fase de desnaturalización de 20 s a 94°C, seguida de la fase de anillamiento de 20 s a 55°C (57 °C para el amplicón de *Brca2*) y, la fase de elongación de 2 min a 72°C; por último, una fase de elongación final de 5 min a 72°C.

ORF	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)
Rad51b	F3	CATGAGCAGCAAGAACTAAGAC	WT: 1060 ΔExón3:946
	R3	GTATCCCTATGGTCTTTCGTGGC	ΔExón5: 923 Δ17pb ex5: 1043
Brca2	F4	GTTTCAATCTTACCGGCTCACG	1536
	R4	ATCTGGGTCTGATGCATACTGC	

Tabla 4. Genes amplificados para su clonning en vectores de expresión, oligonucleótidos empleados y tamaño de los amplicones obtenidos. ORF: Open Reading Frame, pb: pares de bases.

Se corroboró que el tamaño de los productos de la PCR era el adecuado mediante análisis por electroforesis en gel de agarosa.

3.2.3.3. Clonación

Los productos amplificados por PCR se purificaron utilizando columnas (NZYTech) y se fosforilaron con la T4 polinucleótido quinasa (Takara, 1 hora a 37°C). Los DNAs fueron clonados en el plásmido pBlueScript abierto con EcoRV usando la enzima T4 DNA ligasa (Takara, 3h a RT) y fueron transformados en células *Escherichia coli* (*E. coli*) competentes DH5α con 4 μL del producto de ligación mediante choque térmico (33s a 42°C y 1 min a 4°C). Las bacterias se dejaron recuperar 1 hora en 1 mL de medio LB líquido a 37°C, para permitir así la expresión del gen *resisteincai* a ampicilina. Finalmente, las bacterias se sembraron en placa de LB agar-ampicilina y se incubaron a 37°C toda la noche.

3.2.3.4. Extracción de plásmido de DNA de *E. coli* por lisis alcalina

Las colonias resistentes se picaron e incubaron a 37°C en 2ml de LB-ampicilina en agitación toda la noche. El cultivo se centrifugó 2 minutos a 13000 rpm y el pellet se resuspendió en 200 μL de buffer P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM y RNAsa 100 μg/mL). Seguidamente, se lisaron las bacterias añadiendo 200 μL de buffer P2 (NaOH 0,2 M y SDS 1%), mezclando por inversión e incubando a RT durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 200 μL de buffer P3 (acetato de potasio 3M y ácido acético glacial 11,5%) para neutralizar la lisis y precipitar tanto el DNA bacteriano como las proteínas. Tras centrifugar 10 minutos a 13000 rpm, el sobrenadante (que contiene el DNA plasmídico) se precipitó añadiendo 400 μL de isopropanol, agitando y centrifugando nuevamente 10 minutos a 13000 rpm. Se lavó el pellet de DNA con etanol al 70%, se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm, se aspiró el sobrenadante y se dejó secar a RT. Por último, el pellet se resuspendió en 100 μL de TE.

3.2.3.5. *Análisis de restricción*

Para identificar las colonias que contenían el plásmido de interés, se realizó un análisis por digestión enzimática del DNA plasmídico. Para esto, se digirió 1 μ L de DNA con 0,2 μ L de cada una de las enzimas de restricción necesarias, diluido en el buffer compatible con las enzimas hasta un volumen final de 10 μ L. La mezcla se incubó durante 1 hora, generalmente a 37°C, pero pudiendo variar según la enzima. Los fragmentos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. Los plásmidos con un patrón de restricción correcto se validaron mediante secuenciación Sanger.

3.3. Técnicas citológicas

3.3.1. *Análisis histológico*

Las técnicas histológicas fueron llevadas a cabo por el servicio de “Patología Molecular Comparada” del Centro de Investigación del Cáncer. Los órganos fueron fijados durante 24h a RT en formol al 10%, se depositaron en parafina y se cortaron en secciones de 5 μ m las cuales se tiñeron con hematoxilina-eosina. Las muestras fueron fotografiadas en un microscopio OLYMPUS BX51.

3.3.2. *Esparcido de espermatozoides (spread)*

Los esparcidos de espermatozoides se hicieron por la técnica clásica dry-down descrita en (Peters et al., 1997). Para ello, primero se retiró la túnica albugínea de los testículos que se depositaron en una placa Petri con 1 mL de PBS (tampón fosfato salino). Los túbulos seminíferos fueron disgregados y las células extraídas fueron recogidas en 6 mL de PBS y centrifugadas en un tubo de 15 mL, 9 min a 1200 rpm. El pellet se volvió a lavar con 6 mL de PBS y, tras repetir la centrifugación, las células se resuspendieron en sacarosa 100 mM pH 8,4 (80-200 μ L). A continuación, se extendieron 400 μ L de fijador de esparcidos (Paraformaldehído (PFA) 1%, Tritón X-100 0,15%, PBS 0,05%, tetraborato de sodio 2,5 mM, ajustando a pH 9,2) sobre portaobjetos, se añadieron 20 μ L de la suspensión celular y se distribuyó suavemente. Las preparaciones se incubaron en una cámara cerrada durante 2 horas y media y, posteriormente, se secaron al aire y se lavaron con Photo-Flo 0,08% (Kodak).

3.3.3. *Aplastados de túbulos seminíferos (squash)*

Se llevó a cabo el protocolo descrito en (Parra et al., 2002) para obtener una monocapa de células que mantienen su estructura tridimensional. Se retiró la túnica albugínea de los testículos y se fijaron durante 10 minutos en una solución de PBS con un 2% de formaldehído y 0,1% de Triton X-100. Los portaobjetos fueron pretratados con poli-L-lisina (1 mg/ml, Sigma-Aldrich). Los túbulos seminíferos son aplastados sobre el portaobjetos con un cubre y la ayuda de un lápiz. Tras sumergir las preparaciones en nitrógeno líquido, el cubre se retira y las preparaciones se lavan en PBS.

3.3.4. Inmunofluorescencia

Los esparcidos de espermatozoides se incubaron con el anticuerpo primario (Anexo 3) diluido en PBS durante 1 hora a RT en una cámara húmeda. Posteriormente, se lavaron tres veces en PBS 5 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo (Anexo 4) diluido en PBS durante 1 hora. Por último, se repitieron los 3 lavados de 5 minutos en PBS y las preparaciones se montaron en Vectashield® (Vector Laboratories) y DAPI (10 µg/mL) para teñir el DNA, a excepción de las triples inmunofluorescencias (IFs) en donde no se utilizó DAPI. En las IFs de proteínas que forman *foci*, para reducir el ruido de fondo, primero se bloquearon 30 minutos con *buffer* ADB 10% (Suero Fetal Bovino (FBS) 10%, Albúmina de Suero Bovino (BSA) 3%, y Tritón X-100 0,05% en PBS 1X) y los anticuerpos se diluyeron en este mismo *buffer*.

3.3.5. Adquisición y análisis de imágenes

Los esparcidos de espermatozoides se visualizaron en un microscopio Leica DM6000 B y fueron fotografiados con una cámara Hamamatsu ORCA-ER C4742- 80 usando valores de exposiciones constantes para una correcta comparación. La cuantificación del número de *foci* en los ejes cromosómico se realizó con el programa Adobe Photoshop CS6. Por otro lado, para la cuantificación de la intensidad de fluorescencia eliminando la señal de fondo se empleó el software ImageJ 1.52a.

3.4. Cultivos celulares

3.4.1. Obtención de fibroblastos de oreja de ratón

Las orejas del ratón se lavaron con etanol, se cortaron y se volvieron a lavar con 1 mL de PBS y 4X de penicilina/estreptomicina. Sobre una placa de 6 cm, la oreja se cortó en trozos de unos 10 mm² y se añadieron 20 µL de colagenasa/dispasa. Seguidamente, se disgregó el tejido haciendo movimientos de cizallamiento con dos bisturís y se agregaron otros 100 µL de colagenasa/dispasa y se incubó durante 45 minutos a 37°C. Posteriormente, se añadieron 5 mL de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con un 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*) y 5X de penicilina/estreptomicina y se incubó a 37 °C toda la noche. Al día siguiente, el medio se pasó a un Falcon con PBS y se centrifugó 5 minutos a 1200 rpm y el pellet se incubó durante 15 minutos con tripsina, la cual fue neutralizada con el mismo volumen de medio de cultivo. La suspensión resultante se disgregó con una pipeta y se transfirió a una placa de 6 cm con medio de cultivo. Las células se pasaron 1:3 al llegar a confluencia.

3.4.2. Recuperación del DNA tras inducción de daño.

Se indujeron DSBs por tratamiento con mitomicina C (MMC). Se sembraron 1,4 x10⁴ células (pase 2-3) en placas de 3,5 cm. Al día siguiente, se añadió 1 µg/mL de MMC durante 1 hora. Después, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron a 37°C en medio sin MMC. Los fibroblastos

fueron fijados a los tiempos 0, 24, 48 y 72h con PBS con un 4% de paraformaldehído (7 minutos a 4°C). Por último, se realizó una IF frente a γ H2AX para detectar la presencia de DSBs sin reparar.

3.5. Análisis estadístico

Los resultados expuestos en este estudio se expresan como media \pm desviación estándar. Para comparar datos entre distintas condiciones, se realizaron análisis estadísticos de tipo Welch's t-test (t-test con varianzas desiguales) dado que los resultados de las cuantificaciones se ajustaban a una distribución normal y, en su mayoría, los grupos exhibían varianzas desiguales. Se aplicó una prueba *two-sided* (bilateral) en todos los casos. Los asteriscos señalan la significancia estadística: ***: p-valor $< 0,001$; **: p-valor $< 0,01$; *: p-valor $< 0,05$; n.s.: p-valor $\geq 0,05$ (sin diferencias significativas). El análisis estadístico se ejecutó haciendo uso del programa GraphPad Prism 8.

4. RESULTADOS

4.1. Generación de los ratones *Rad51b* ^{Δ Exon3/ Δ Exon3} y *Rad51b*^{SAES5/SAES5}

Con el objetivo de caracterizar el papel de RAD51B en meiosis y determinar la posible letalidad embrionaria de su deficiencia, se diseñó una estrategia basada en CRISPR/Cas9. Las guías se dirigieron al exón 3 e intrón 3 y se proporcionó un ssODN en el que se eliminó el sitio donador de *splicing* del exón 3, *spliced donor of exon 3 site* (SDES3, *Rad51b*^{SDES3/SDES3}). De esta manera, se generaría un PTC dando lugar a un 3'UTR en el intrón 3 (Anexo 1). La edición de la región 3' del exón 3 se llevó a cabo para evitar el reinicio de la traducción en la metionina 64, como ocurre en el ratón *Rad51b*^{c.92delT/c.92delT} analizado previamente en nuestro laboratorio, al que se nombrará de aquí en adelante como *Rad51b*^{knock-in/knock-in} (KI) para simplificar (Anexo 5) (Franca et al., 2022). Una vez generado el ratón homocigoto se caracterizaron los transcritos del locus *Rad51b*^{SDES3/SDES3} mediante la amplificación de la ORF por RT-PCR del RNA extraído de cola. La secuenciación directa del amplicón evidenció la eliminación completa del exón 3 por empalme o *spliced out*, quedando en pauta los exones 2 y 4. Por lo tanto, el PTC insertado no se encuentra codificado en el mRNA. El ratón así generado se denominará de aquí en adelante *Rad51b* ^{Δ Exon3/ Δ Exon3} o Δ exon3 para simplificar. Este ratón, a pesar de no generar un alelo nulo de *Rad51b*, carece de un porcentaje de proteína similar al mutante *Rad51b*^{KI/KI} en el extremo N-terminal (Δ exón3:10,86% y KI: 18% de un total de 350 aminoácidos) y se ha empleado para validar la función del extremo N-terminal de RAD51B en meiosis.

Con el fin de generar el mutante verdaderamente nulo de RAD51B, se diseñó una segunda estrategia de edición genómica. En este caso, las guías fueron dirigidas al intrón 4 y exón 5, esperándose la deleción del sitio de aceptación del *splicing*, *spliced acceptor of exon 5 site* (SAES5, *Rad51b*^{SAES5/SAES5}) el cual generaría un PTC por cambio de pauta, dando lugar a una proteína truncada carente de los

dominios funcionales de la recombinasa. En una nueva microinyección usando estas guías, se generaron diferentes fundadores que resultaron quimeras. De todos ellos, se seleccionó un ratón fundador portador de una delección de 75 pb desde finales del intrón 4 hasta principios del exón 5 (17pb del exón 5), el cual se cruzó con una hembra WT (Anexo 2). Los descendientes heterocigotos a los que el fundador quimera les transmitió el alelo de interés fueron cruzados a su vez para así obtener ratones portadores de la mutación en homocigosis que fueron analizados en este trabajo.

Para analizar el alelo generado, se amplificó la ORF de *Rad51b* a partir del cDNA de cola y testículo mediante RT-PCR. En ambos tejidos se observó que el locus editado se comporta de dos maneras. Por un lado, uno de los transcritos detectados presenta un nuevo patrón de *splicing* como consecuencia de la eliminación del sitio de aceptación del *splicing* del exón 5 y la activación de un sitio de *splicing* críptico en el interior del exón 5. Este nuevo comportamiento da lugar a un cambio de la pauta de lectura que evita la generación de un dominio funcional Walker A, generando un PTC muy próximo que truncaría *in silico* la proteína.

Por otro lado, el segundo transcrito sufre un *spliced out* del exón 5 generando un PTC al inicio del exón 6 como consecuencia del cambio de pauta entre el exón 4 y el exón 6. Por todo ello, la predicción *in silico* de las proteínas codificadas por los dos transcritos presentes en el locus *Rad51b*^{SAES5/SAES5} serían potencialmente dos proteínas truncadas carentes de 2/3 del extremo C-terminal incluyendo los dominios catalíticamente esenciales para su función como recombinasa. Por este motivo, de aquí en adelante se considerará un alelo nulo.

Otro de los ratones fundadores resultante de la segunda microinyección presentó una delección parecida al ratón *Rad51b*^{SAES5/SAES5}, en este caso presentaba una delección en la misma región, pero de 72 pb en lugar de 75 pb (denominado *Rad51b*^{SAES5'/SAES5'}) (Anexo 6). El fundador fue cruzado de

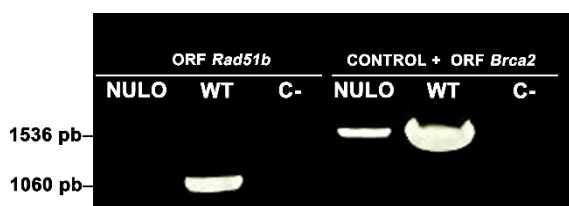


Figura 3. Amplificación de la ORF de *Rad51b* por RT-PCR a partir del RNA extraído de ratones *Rad51b*^{NULO/NULO} y *Rad51b*^{WT/WT}. También se amplificó la ORF de *Brca2* como control positivo de que el RNA ha sido correctamente extraído. NULO: *Rad51b*^{NULO/NULO}, C-: control negativo

forma similar al descrito previamente, y los descendientes homocigotos fueron analizados mediante RT-PCR. Los resultados mostraron que los ratones *Rad51b*^{SAES5'/SAES5'} carecen de transcrito de *Rad51b* utilizando como control positivo un amplicón de *Brca2* (Fig 3). Por tanto, a partir de ahora se denominarán *Rad51b*^{NULO/NULO}.

El análisis morfométrico de los ratones Δ exon3 y SAES5 indicaron un tamaño corporal normal, espermatozoides en el epidídimo y un peso de testículos ligeramente reducido en comparación con el WT.

4.2. Análisis de la espermatogénesis en ratones $Rad51b^{\Delta Exon3/\Delta Exon3}$ y $Rad51b^{SAES5/SAES5}$

4.2.1. Análisis de la dinámica sináptica en espermatoцитos $Rad51b^{\Delta Exon3/\Delta Exon3}$ y $Rad51b^{SAES5/SAES5}$

En primer lugar, se analizó la dinámica de ensamblaje del SC a través del estudio mediante inmunofluorescencia de las proteínas SYCP1 (de los filamentos transversales) y SYCP3 (del elemento lateral) (F.-G. Zhang et al., 2021). En ningún caso se observó una distribución alterada de estas proteínas y, por lo tanto, se concluye que no existen errores en la sinapsis ni en la desinapsis en espermatoцитos $Rad51b^{\Delta Exon3/\Delta Exon3}$ y $Rad51b^{SAES5/SAES5}$ (Fig 4 y 5). Sin embargo, al igual que en $Rad51b^{KI/KI}$, en ambos mutantes se observó un elevado número de diplonemas en detrimento de paquinemas, lo cual puede indicar una progresión irregular de la profase I asociada a una alteración en la recombinasa RAD51B (Fig 4 y 5).

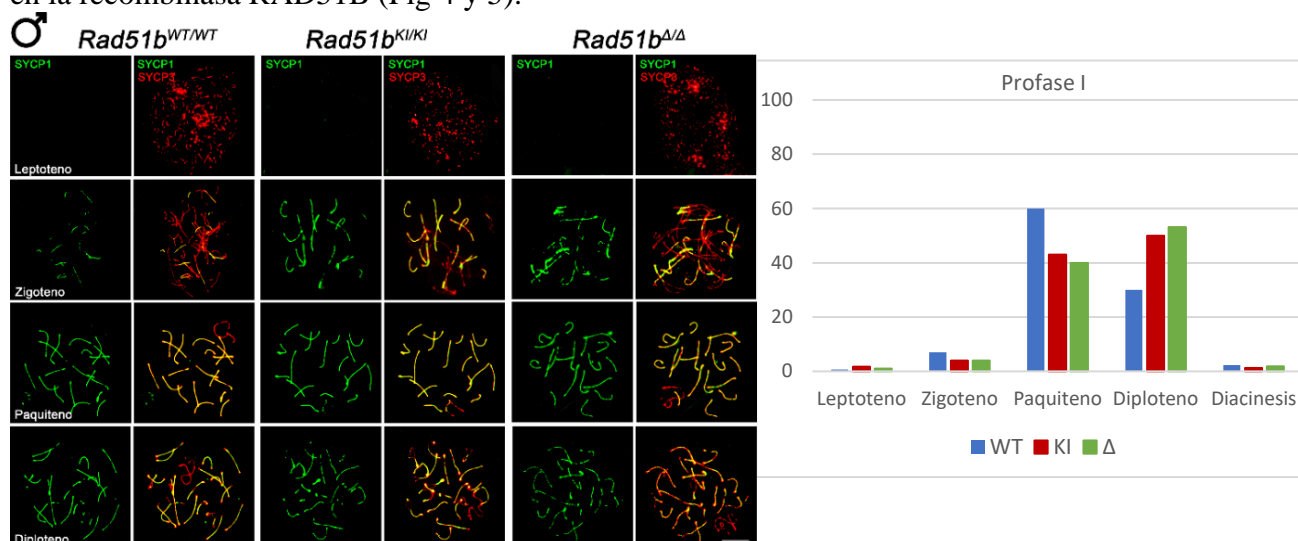


Figura 4. Los espermatoцитos $Rad51b^{\Delta Exon3/\Delta Exon3}$ no muestran defectos en sinapsis ni desinapsis, pero presentan un mayor número de diplonemas. Doble inmunofluorescencia de SYCP1 (verde) y SYCP3 (rojo) de espermatoцитos de ratones WT, KI y $\Delta exon3$ en la que se observa un patrón normal, indicando un correcto ensamblaje del SC. A la derecha, en la gráfica se muestra la cuantificación de células en distintos estadios de la profase I en imágenes tomadas al azar. Se observa un mayor número de diplonemas en los mutantes KI y $\Delta exon3$ acompañado de menor cantidad de paquinemas en comparación con el WT. Barra de escala, 10 μm

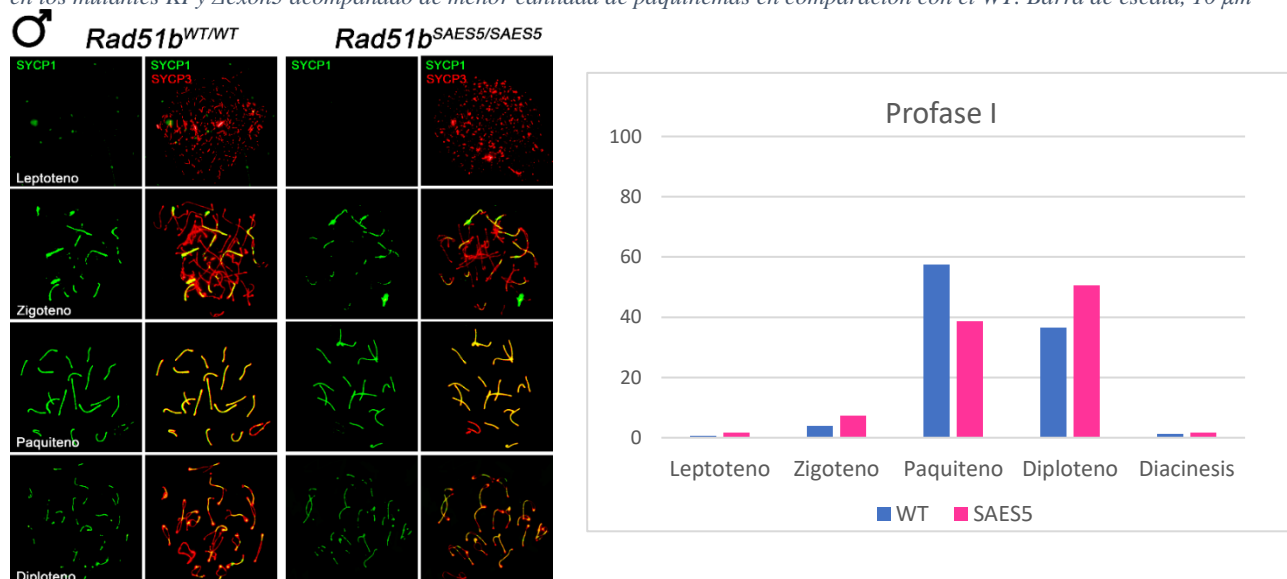


Figura 5. Los espermatoцитos $Rad51b^{SAES5/SAES5}$ no muestran defectos en sinapsis ni desinapsis, pero presentan un mayor número de diplonemas. Doble inmunofluorescencia de SYCP1 (verde) y SYCP3 (rojo) de meiocitos de ratones WT y SAES5 en la que se observa

un patrón normal, indicando un correcto ensamblaje del SC. A la derecha, en la gráfica se muestra la cuantificación de células en distintos estadios de la profase I en imágenes tomadas al azar. Se observa un mayor número de diploemas en el mutante *SAES5* acompañado de menor cantidad de paquinemas en comparación con el WT. Barra de escala, 10 μ m.

4.2.2. Análisis de la recombinación meiótica en espermaticitos *Rad51b* ^{Δ Exon3/ Δ Exon3} y *Rad51b*^{SAES5/SAES5}

La recombinación comienza con la formación de DSBs por parte de la topoisomerasa SPO11 en leptoteno (Romanienko & Camerini-Otero, 2000). Seguidamente, como respuesta al daño y para la activación de los mecanismos de reparación de roturas en el DNA, la histona H2AX es fosforilada por la quinasa ATM en la serina 139, denominada γ -H2AX (Burma et al., 2001). De esta manera, mediante inmunofluorescencia frente a γ -H2AX se pueden detectar DSBs y monitorizar su reparación a medida que avanza la profase I. En condiciones normales, cuando se generan DSBs en leptoteno, se observa señal de γ -H2AX por todo el núcleo, que va desapareciendo hasta finalmente quedar restringida en el *sex body* (XY) en paquiteno, cuando las roturas en autosomas han sido reparadas. En el mutante *Rad51b* ^{Δ Exon3/ Δ Exon3}, al igual que en el control KI, se observó un marcaje de señal normal desde leptoteno a zigoteno, pero este persistió en paquiteno para finalmente desaparecer en diploteno (Fig 6). En el caso del mutante *Rad51b*^{SAES5/SAES5}, la señal de γ -H2AX persistió hasta diploteno (Fig 7). Estos resultados indican la formación de DSBs que no están siendo correctamente reparados.

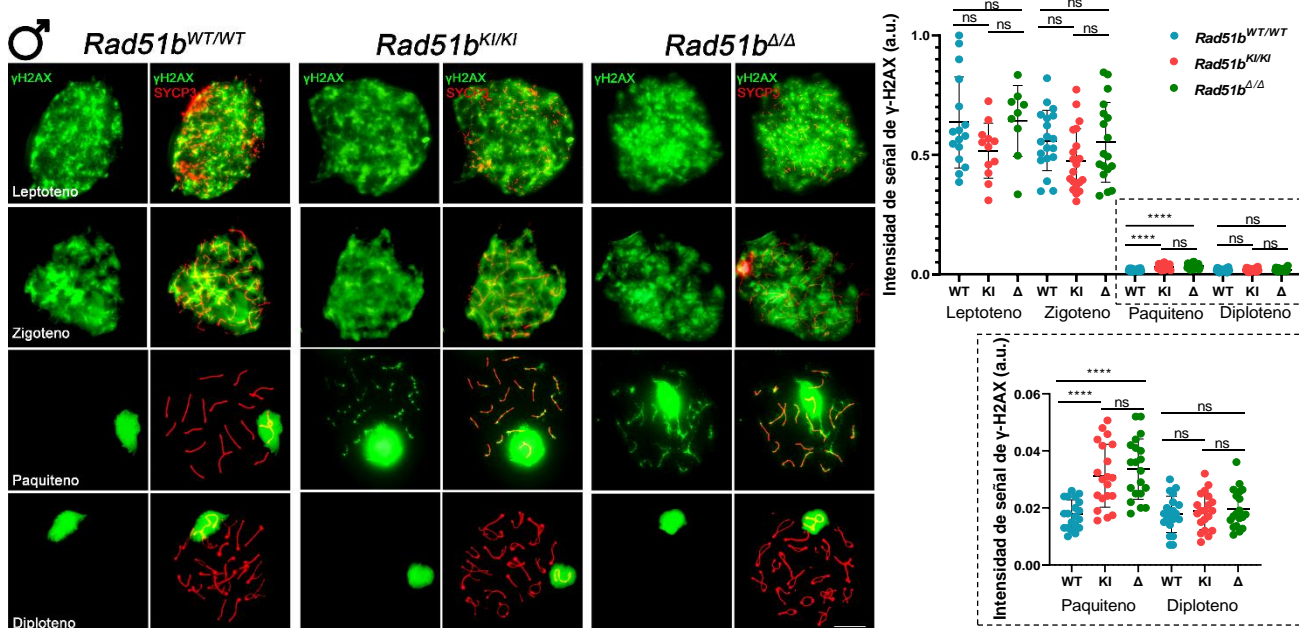


Figura 6. Doble inmunomarcaje de γ H2AX (verde) y SYCP3 (rojo) de espermaticitos de ratones WT, KI y Δ exon3 que muestra la acumulación de γ H2AX en las paquinemas de los mutantes. La gráfica a la derecha muestra la cuantificación de la intensidad de señal de γ H2AX en los diferentes estadios. Análisis Welch's t-test: ns (no significativo), *****p*-valor<0,0001. Barra de escala, 10 μ m. a.u.: unidades arbitrarias (arbitrary units).

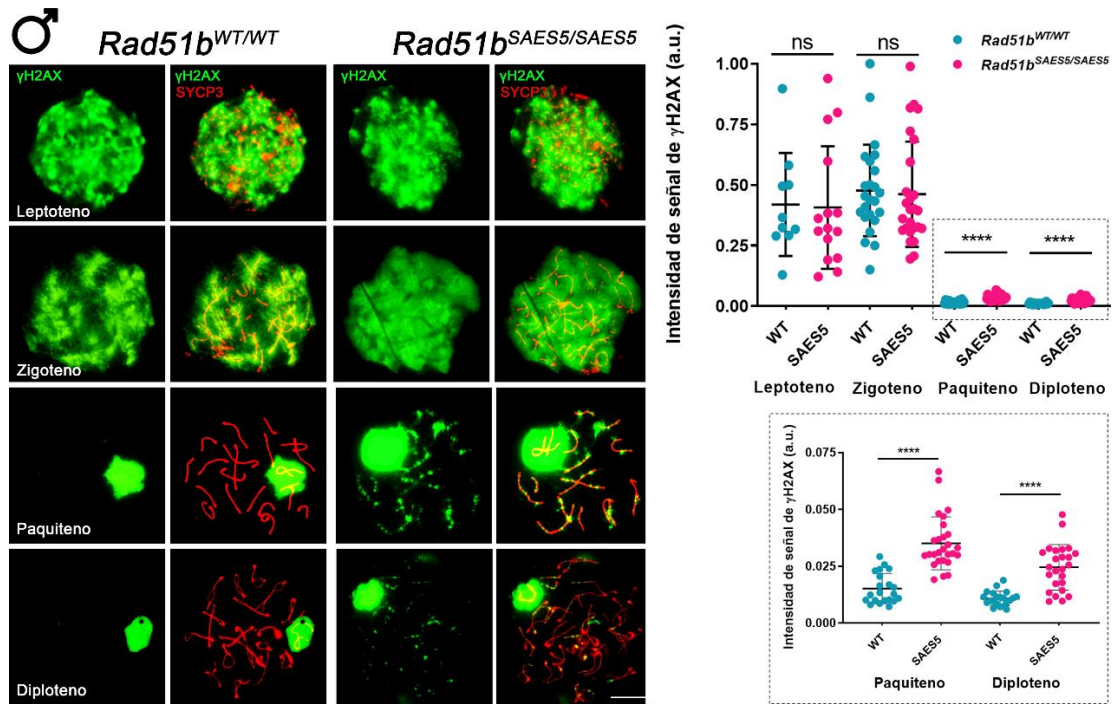


Figura 7. Doble inmunomarcaje de γ H2AX (verde) y SYCP3 (rojo) de meiocitos WT y SAES5 que muestra la acumulación de γ H2AX en las paquinemas y diplonemas de los mutantes. La gráfica a la derecha muestra la cuantificación de la intensidad de γ H2AX en los diferentes estadios. Análisis Welch's t-test: ns (no significativo), **** p -valor $<0,0001$. Barra de escala, 10 μ m. a.u.: unidades arbitrarias (arbitrary units).

Una vez activada la señal de respuesta a daño, el siguiente paso en la recombinación meiótica es el reclutamiento de las recombinasas RAD51 y DMC1 que permitan la reparación de DSBs por HR. Este reclutamiento está mediado principalmente por la proteína BRCA2 que forma un complejo proteico con HSF2BP y BRME1 (J. Zhang et al., 2020; Felipe-Medina et al., 2020). Ante la imposibilidad de detectar BRCA2 en ratones por la inexistencia de anticuerpos que la reconozcan, se analizó mediante inmunofluorescencia la dinámica de BRME1. Los meiocitos WT presentan *foci* de BRME1 en los ejes en zigoteno y paquiteno temprano, que desaparecen a medida que avanza hasta paquiteno tardío. En los meiocitos $Rad51b^{Exon3/\Delta Exon3}$, al igual que en el control $Rad51b^{KI/KI}$, se observó un marcaje normal de BRME1 en zigoteno y paquiteno temprano, pero la señal persistió en paquiteno tardío, desapareciendo finalmente en diploteno (Fig 8).

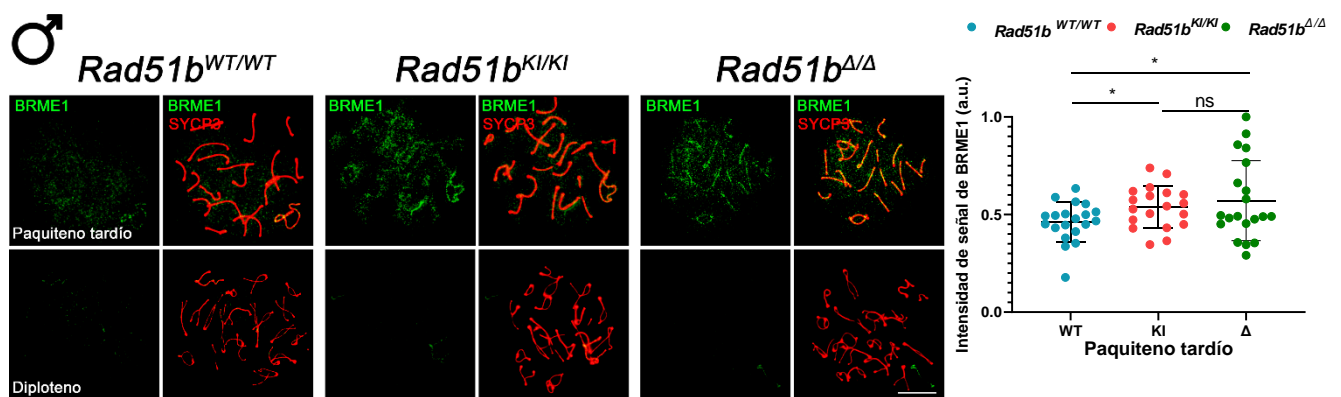


Figura 8. Doble etiquetado de BRME1 (verde) y SYCP3 (rojo) de extensiones de espermatozoides de ratones WT, KI y Δ que muestran la acumulación de BRME1 en las paquinemas tardías mutantes. La gráfica a su derecha representa la cuantificación de la

intensidad de señal de BRME1 en paquiteno tardío. Análisis Welch's t-test: ns (no significativo), * p -valor $<0,05$. Barra de escala, 10 μ m. a.u.: unidades arbitrarias (arbitrary units).

Por otro lado, los espermatoцитos $Rad51b^{SAES5/SAES5}$ presentaron un inmunomarcaje de BRME1 normal en zigoteno. Sin embargo, en paquiteno temprano se observó un aumento tanto en el número de *foci* como en la intensidad de señal de los mismos, que persistió hasta diploteno (Fig 9).

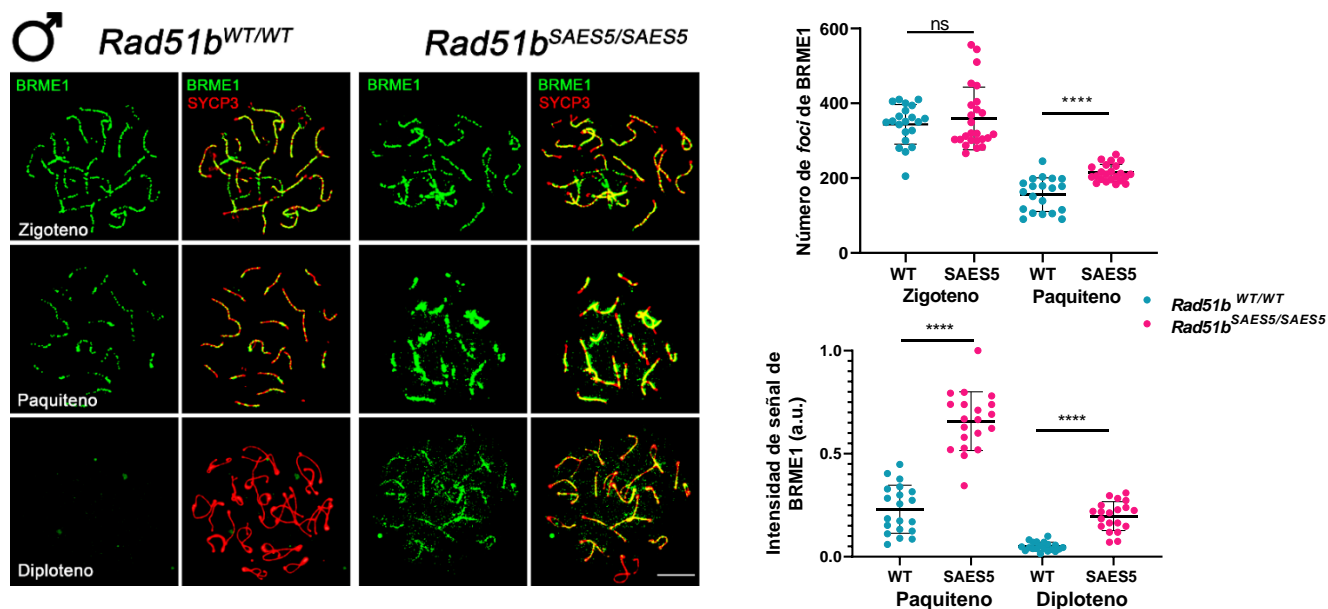


Figura 9. Doble etiquetado de BRME1 (verde) y SYCP3 (rojo) de extensiones de espermatoцитos de ratones WT y SAES5 que muestran la acumulación de BRME1 en las paquinemas y diplonemas mutantes. Las gráficas a la derecha muestran, arriba la cuantificación del número de foci de BRME1 en zigoteno y paquiteno y abajo la intensidad de señal de BRME1 en paquiteno y diploteno. Análisis Welch's t-test: ns (no significativo), **** p -valor $<0,0001$. Barra de escala, 10 μ m. a.u.: unidades arbitrarias (arbitrary units).

A continuación, se analizaron las recombinasas RAD51 y DMC1 reclutadas por el complejo BRCA2-HSF2BP-BRME1. Estas proteínas se unen al extremo 3'-ssDNA para permitir la invasión de la hebra al cromosoma homólogo que servirá como molde para la reparación de la rotura (Hinch et al., 2020). Cada una presenta un patrón de expresión distinto: mientras que DMC1 es específica de células meióticas, la recombinasa RAD51 interviene en la reparación del DNA por HR tanto en células meióticas como somáticas (Xu et al., 2021). Mediante inmunofluorescencia, se observa señal de *foci* de ambas recombinasas en los ejes cromosómicos desde zigoteno hasta paquiteno. El mutante $Rad51b^{AExon3/AExon3}$ mostró una señal normal de RAD51 en zigoteno, pero un aumento en el número de *foci* en paquiteno, al igual que en el control $Rad51b^{KI/KI}$ (Fig 10 a). Sin embargo, no se detectaron variaciones en el número de *foci* de DMC1 en ninguna de las fases (Fig 10 b). Por otro lado, el mutante $Rad51b^{SAES5/SAES5}$ presentó un patrón normal de RAD51 en zigoteno con un aumento en el número de *foci* en paquiteno y una acumulación de señal hasta diploteno (Fig 11a). De nuevo, en este mutante no hubo variaciones en la señal de DMC1 con respecto al WT (Fig 11b). El incremento en los niveles de RAD51, pero no de DMC1 puede indicar la activación de una vía de reparación por HR similar a la somática, en la que actúa RAD51, pero no DMC1 (Enguita-Marruedo et al., 2019).

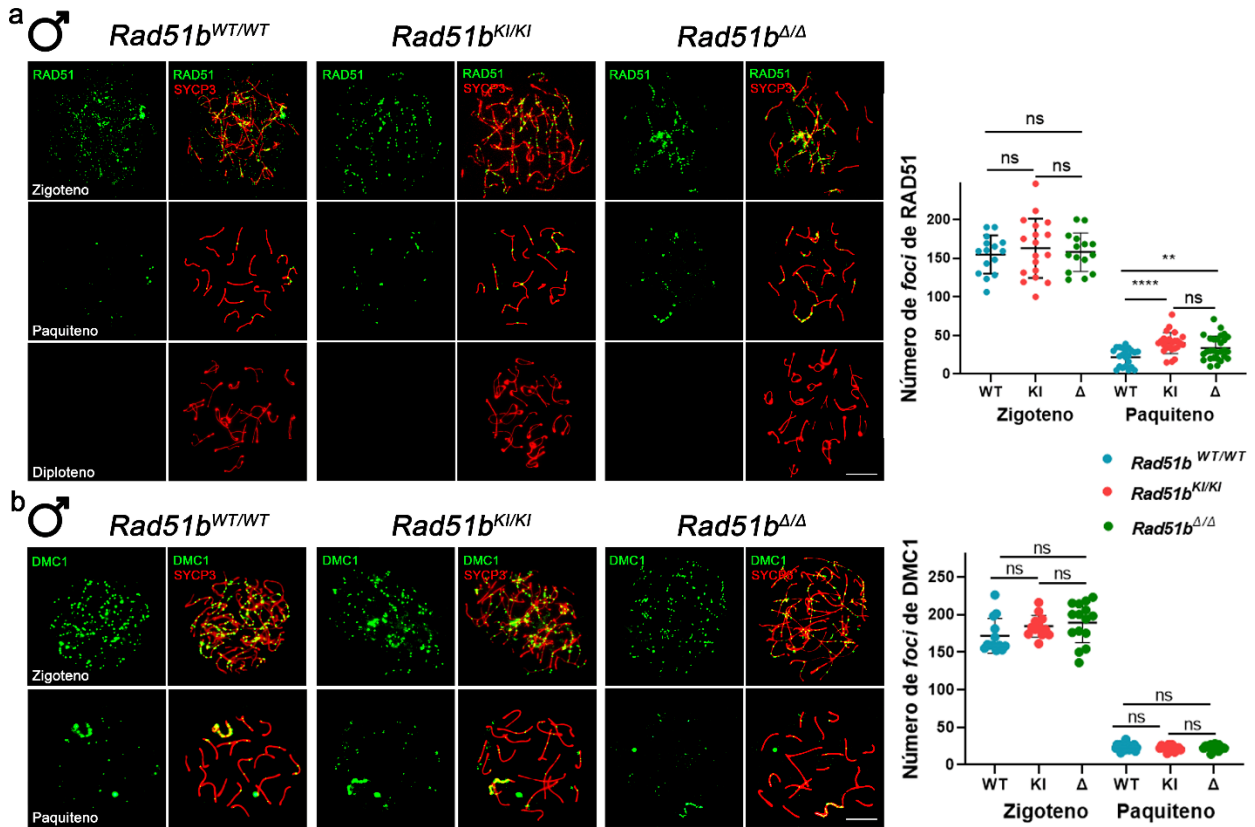


Figura 10. (a) Doble inmunomarcaje de RAD51 (verde) y SYCP3 (rojo) de esparcidos de espermatocitos de ratones WT, KI y Δ exon3 que muestran la acumulación de RAD51 en paquiteno. La gráfica a la derecha muestra la cuantificación de foci de RAD51 en zigoteno y paquiteno. (b) Inmunofluorescencia doble de DMC1 (verde) y SYCP3 (rojo) de meiocitos WT, KI y Δ exon3 en los que no se observan diferencias. A la derecha del panel, aparece la gráfica de cuantificación del número de foci de DMC1 en zigoteno y paquiteno. Análisis Welch's t-test: ns (no significativo), **p-valor < 0,01, ****p-valor < 0,0001. Barra de escala, 10 μ m.

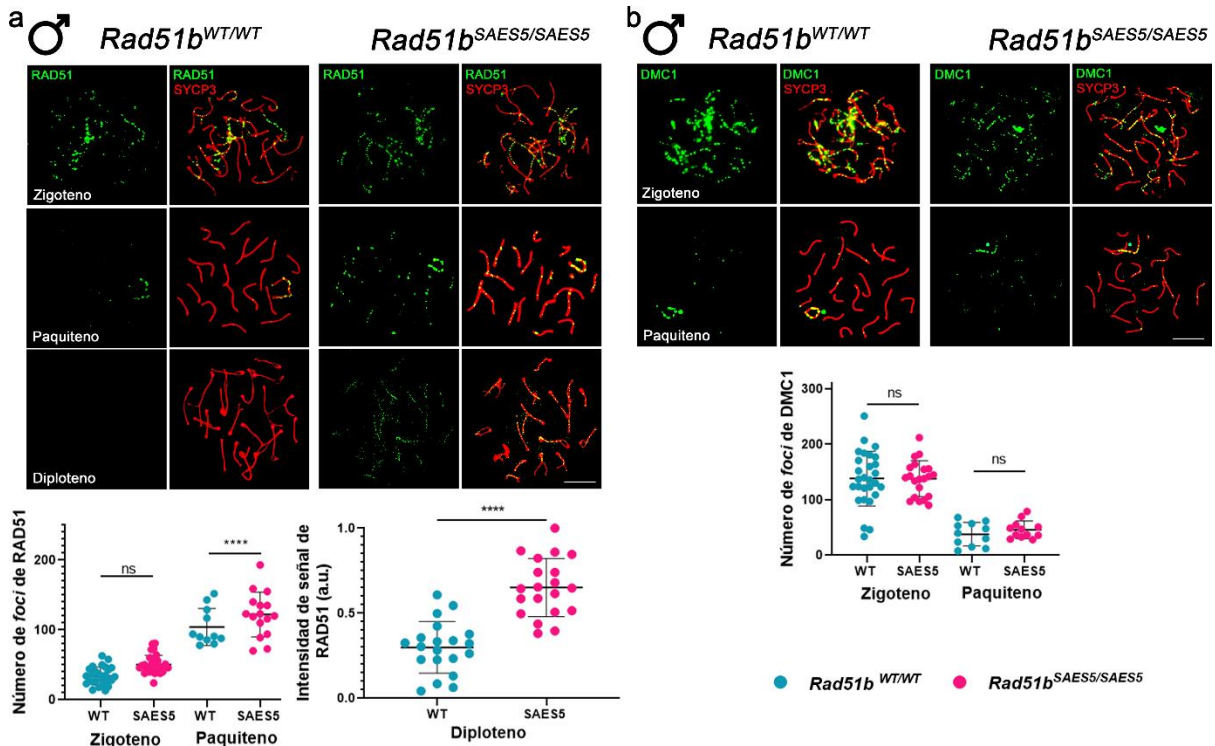
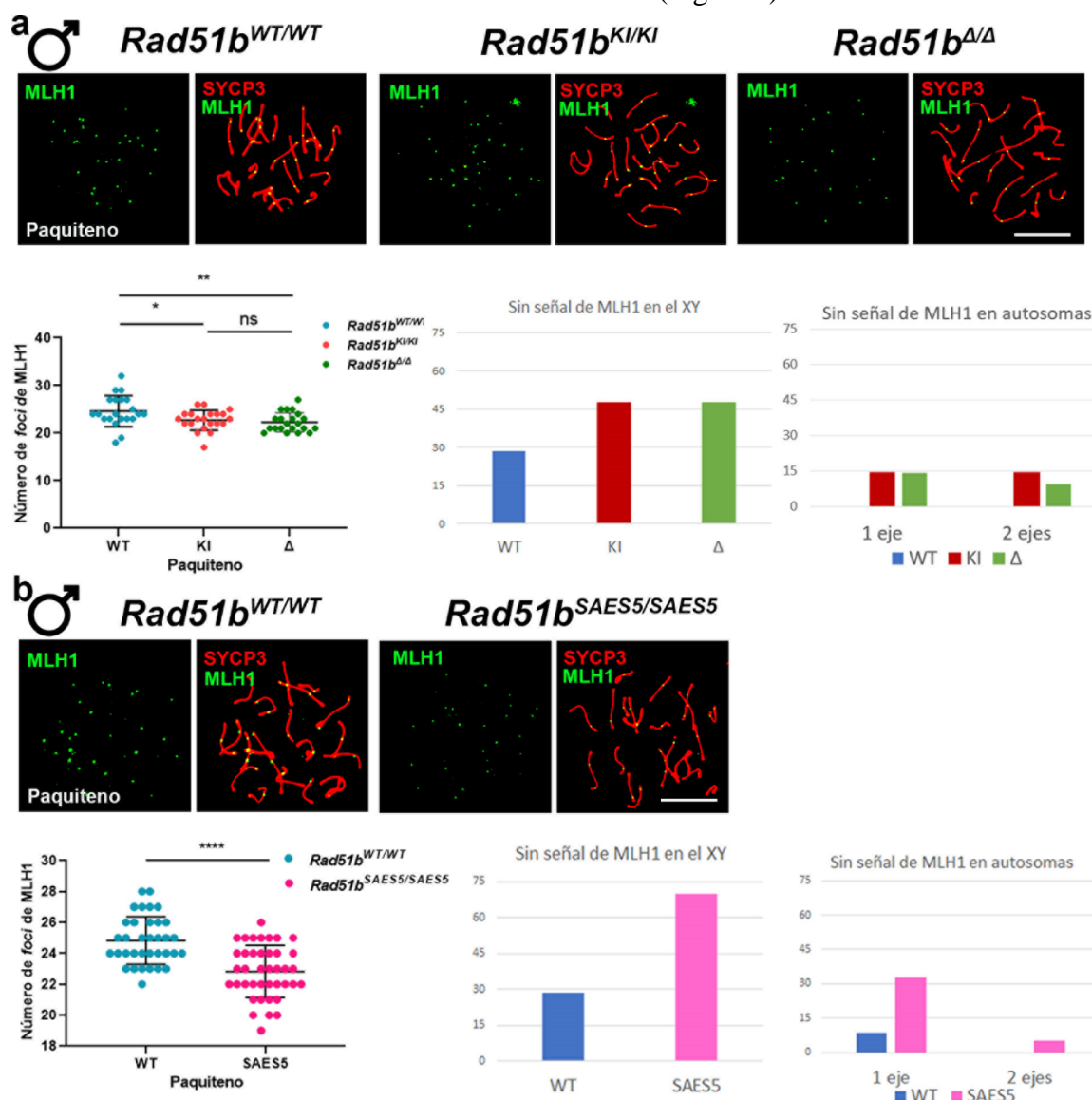


Figura 11. (a) Doble inmunomarcaje de RAD51 (verde) y SYCP3 (rojo) de esparcidos de espermatocitos de ratones WT y SAES5 que muestran la acumulación de RAD51 en paquiteno y diploteno. La gráfica debajo del panel a la izquierda muestra la cuantificación del número de foci de RAD51 en zigoteno y paquiteno y a la derecha de intensidad de señal de RAD51 en diploteno. (b) Inmunofluorescencia doble de DMC1 (verde) y SYCP3 (rojo) de meiocitos WT y SAES5 en los que no se observan diferencias. Debajo

del panel aparece la gráfica de cuantificación del número de foci de DMC1 en zigoteno y paquíteno. Análisis Welch's t-test: ns (no significativo), ***p-valor<0,0001. Barra de escala, 10 μ m. a.u.: unidades arbitrarias (arbitrary units).

Finalmente, los intermediarios se resuelven como COs o NCOs. Para que la segregación de los cromosomas sea correcta y evitar aneuploidías debe haber al menos un quiasma por bivalente (Baudat et al., 2013). La proteína MLH1 participa en la resolución de los intermediarios mediante CO y, por lo tanto, su inmunomarcaje nos permite predecir los quiasmas que se van a producir (Baker et al., 1996). Los *foci* de MLH1 son visibles en paquíteno y su cuantificación indicó en todos los mutantes una disminución en el número de *foci* con respecto al WT. Además, un elevado porcentaje de bivalentes XY y, en menor medida, autosómicos, carecieron de señal de MLH1 (Fig 12 a y b). La ausencia de MLH1 fue más notoria en el mutante SAES5 (Fig 12 b).



de células sin señal de MLH1 en el par sexual XY y el porcentaje de ejes autosómicos sin focos de MLH1. Análisis Welch's t-test: ns (no significativo), *p-valor<0,05, **p-valor<0,01, ***p-valor<0,0001. Barra de escala, 10 μ m.

Dada la mayor intensidad fenotípica del mutante SAES5, se llevó a cabo un análisis más exhaustivo del mismo.

La ausencia de COs (MLH1) en las paquinemas funcionalmente dará lugar a una segregación errónea en metafase I. Para poder demostrarlo, se realizaron aplastados de espermatocitos (*squash*), una técnica mediante la cual se conserva la estructura tridimensional del núcleo y permite observar las placas metafásicas bajo la tensión del huso acromático. Dado que en metafase todos los cromosomas quedan alineados en la placa metafásica por sus centrómeros, estos fueron visualizados mediante inmunofluorescencia haciendo uso del anticuerpo *Anti-Centromere Antibodies* (ACA). Se observó una acumulación de metafases en meiocitos SAES5 en comparación con el WT y, además, estos presentaron mayor incidencia de univalentes fuera de la placa metafásica (Fig 13). Este fenómeno dará lugar a fallos en la segregación cromosómica generando aneuploidías.

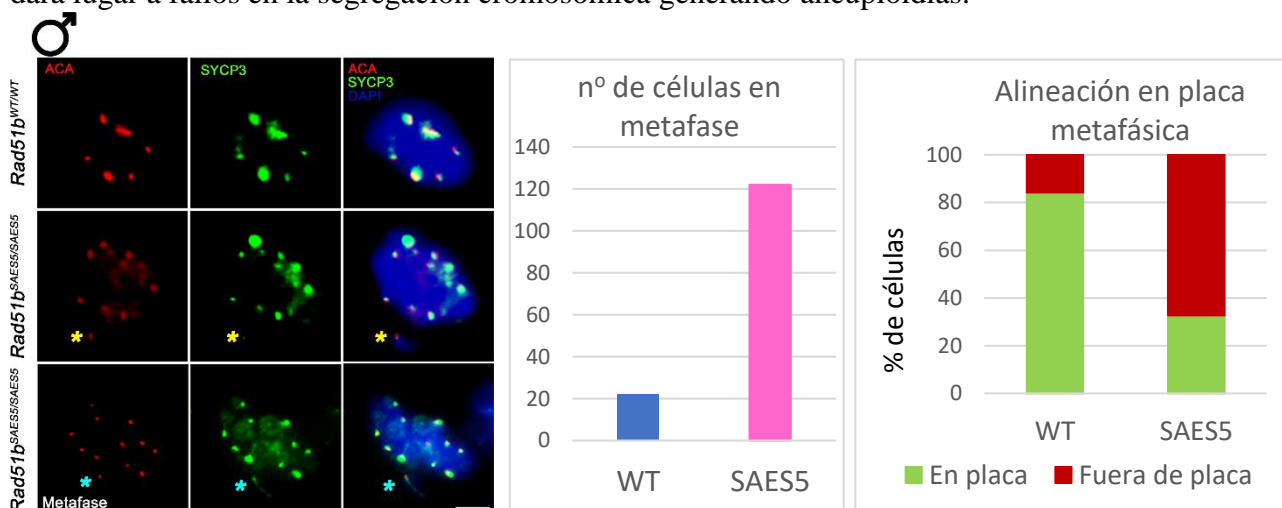


Figura 13. En el panel se muestra una triple inmunofluorescencia de ACA (rojo), SYCP3 (verde) y DAPI (azul) en aplastados de espermatocitos tridimensionales. Se presenta un plano representativo de los diversos que fueron tomados para verificar que todos los cromosomas se encontraran alineados en la placa metafásica. Con un "*" amarillo se señala un univalente autosómico y con uno azul, un univalente sexual fuera de la placa en un meiocito SAES5. A la derecha del panel se muestra la gráfica de cuantificación del número de células en estadio metafase del mutante SAES5 vs WT. La gráfica de la derecha muestra el porcentaje de células en el que se observaron bivalentes alineados en la placa metafásica y univalentes fuera de la placa. Barra de escala, 10 μ m

4.3. Análisis histológico de ovarios *Rad51b*^{SAES5/SAES5}

Con el objetivo de evaluar el impacto de la mutación SAES5 en la fertilidad de ratonas, se extrajeron ovarios de hembras adultas de 5 semanas de edad. El análisis histológico de los ovarios mutantes reveló la presencia de folículos primordiales y primarios normales en número y morfología (Fig 14).

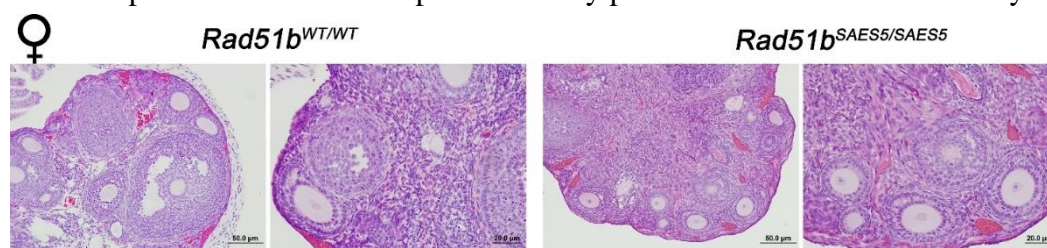


Figura 14. Histología de ovarios de hembras WT y SAES5 que muestran la presencia de folículos en desarrollo.

4.4. Efectos de la variante *Rad51b*^{SAES5/SAES5} en la eficiencia de reparación del DNA

Dado que los meiocitos de ratones mutantes SAES5 mostraban serios defectos en la reparación de DSBs y que la proteína RAD51B se expresa también en tejidos somáticos, se estudió la posibilidad de que la variante RAD51B-SAES5 alterase la reparación de DSBs en células somáticas.

Para ello, se cultivaron fibroblastos de oreja de ratones mutantes y WT. Se observó la presencia de numerosos micronúcleos en las células SAES5 (Fig 15) y algunos núcleos presentaron una morfología anormal de tipo *blebbing* o con ampollas (Fig 16). Como se dijo anteriormente, γ H2AX es un marcador de DSBs y, por lo tanto, sirve para monitorizar la reparación de daños en el DNA. Por ello, se indujo daño con MMC y se llevaron a cabo inmunofluorescencias frente a esta histona en los fibroblastos a distintos tiempos (0, 24, 48 y 72h). Los resultados obtenidos muestran la presencia de un mayor número de *foci* de γ H2AX en el mutante SAES5 en comparación con el WT, lo que sugiere que existe un retraso en la reparación del DNA somático (Fig 16).

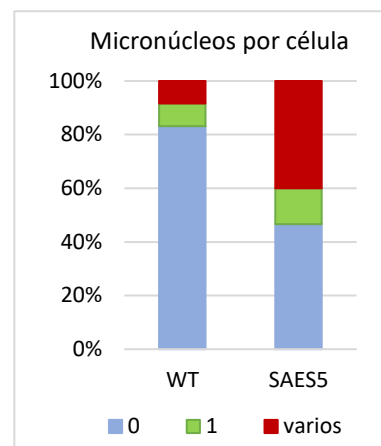


Figura 15. Porcentaje de células WT y SAES5 que presentaron 0, 1 o varios micronúcleos a las 72h.

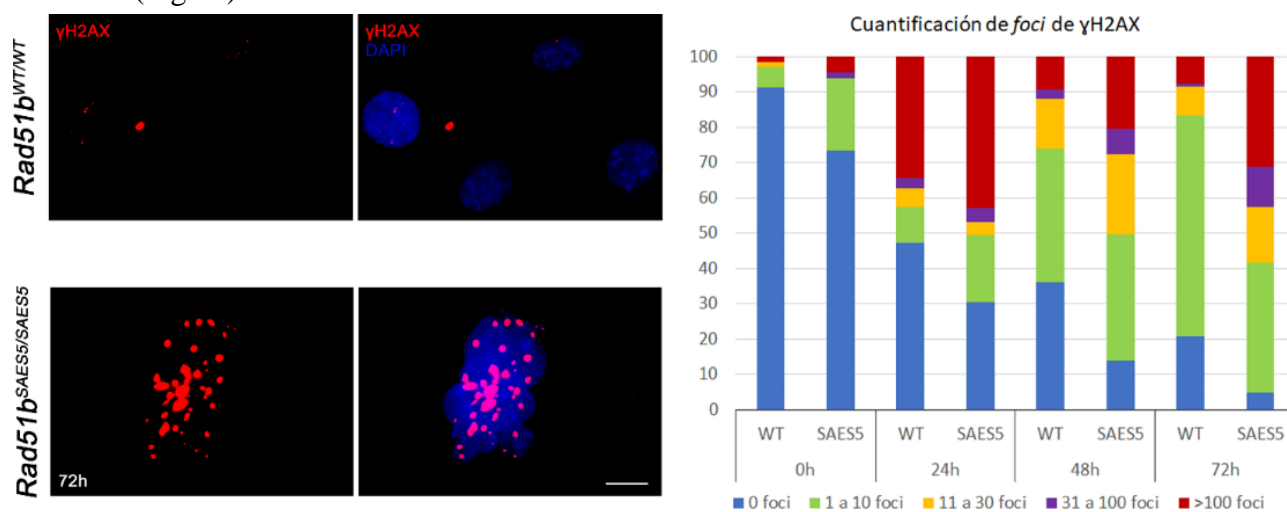


Figura 16. Marcaje de γ H2AX en fibroblastos WT y SAES5 a las 72h tras el tratamiento con MMC. Los fibroblastos se clasificaron en 5 grupos atendiendo al número de foci: 0 foci, 1 a 10 foci, 11 a 30 foci, 31 a 100 foci y más de 100 foci. En la gráfica se muestra el porcentaje de células de cada grupo a 0, 24, 48 y 72h tras el tratamiento con MMC.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se describen dos nuevos mutantes murinos de la recombinasa RAD51B. Transcripcionalmente, el mutante *Rad51b* ^{Δ Exon3/ Δ Exon3} hace *spliced-out* de la totalidad del exón 3 de *Rad51b*, quedando los exones 2 y 4 en pauta; mientras que el mutante *Rad51b*^{SAES5/SAES5} presenta un comportamiento dual, pudiendo hacer *spliced-out* del exón 5 completo o deletar únicamente las primeras 17 pb del mismo, lo que genera en los dos transcritos la aparición de un PTC que provocaría

en ambos casos el truncamiento de la proteína RAD51B. Dicha proteína truncada carecería *in silico* de función al estar desprovista de los motivos Walker A y B responsables de su reconocida actividad ATPasa, la cual se ha demostrado que es esencial para la función de los parálogos RAD51D y XRCC3 (Gruver et al., 2005; Rafii et al., 2003).

La incapacidad de detectar la proteína RAD51B endógena mediante anticuerpos tanto en inmunofluorescencia como mediante Western Blot imposibilita demostrar formalmente el resultado de la traducción de los transcritos en los locus ratones *Rad51b*^{SAES5/SAES5} y *Rad51b*^{ΔExon3/ΔExon3}. La única posible aproximación en nuestras manos pasaría por llevar a cabo inmunoprecipitación acoplada a espectrometría de masas como se hizo para el mutante *Rad51b*^{KI/KI} (Franca et al., 2022).

Las reglas establecidas que explican la traducción empleando codones alternativos (metioninas) al inicial son complejas y aún poco conocidas. En este proceso influyen diversos aspectos como la distancia con respecto al primer ATG, la dependencia de una secuencia IRES o de la caperuza 5' (complejo 5'CAP) para la traducción, así como ORFs alternativas aguas arriba (uORF) en el 5'UTR (Zur et al., 2013; Tidwell et al., 2014). La existencia de una correlación negativa entre la distancia de la metionina secundaria con respecto a la metionina iniciadora y la probabilidad de que se reinicie la traducción en esta no respalda la posibilidad de que la traducción se reinicie aguas abajo del exón 5. En cualquier caso, la ausencia de 2/3 del C-terminal, incluyendo los dominios catalíticos, nos permite afirmar que, desde cualquier punto de vista funcional, los ratones *Rad51b*^{SAES5/SAES5} son mutantes nulos y, por lo tanto, *Rad51b* es prescindible para el desarrollo embrionario del ratón, a diferencia de la letalidad observada por Shu y colaboradores en los mutantes *knock-out* (nulos) de RAD51B (Shu et al., 1999). Además, la ausencia de transcrito de *Rad51b* y, por lo tanto, de cualquier fragmento de proteína en el reciente fundador *Rad51b*^{NULO/NULO} demuestran que la deficiencia de RAD51B no es letal embrionario en el ratón. La ausencia de transcrito probablemente se deba a una activación del mecanismo de *Nonsense-Mediated mRNA Decay*. Este mecanismo elimina los transcritos en los que un PTC esté localizado aproximadamente a 50 nucleótidos aguas arriba del último complejo de unión de exón (EJC) (Lindeboom et al., 2016).

Las razones que explicarían las diferencias observadas entre este trabajo y el reportado por Shu y colaboradores podrían deberse a la técnica *gene targeting* empleada para la generación del mutante nulo de *Rad51b* (frente a la edición genómica empleada en este trabajo) en la cual se hizo uso de un *cassette* de resistencia a neomicina como marcador de selección en las células madre embrionarias usadas (Shu et al., 1999). El uso de *cassettes* de neomicina es controvertido porque puede modificar el entorno del locus, de forma que el fenotipo observado no sea debido a la edición del gen sino a la

influencia del *cassette* sobre el entorno genómico (Olson et al., 1996; Pham et al., 1996). Por este motivo, durante las últimas décadas se han empleado las recombinasas Cre del fago P1 o FLP de levaduras para la eliminación de dichos *cassettes* (S. Wang et al., 2009; Takeuchi et al., 2002). Esto ha sido ejemplificado en la región 5'HS2 del locus controlador del gen β -globina. Mientras que la presencia del *cassette* de neomicina en esta región provoca letalidad embrionaria en los ratones portadores de la mutación en homocigosis, esta se rescata al eliminar el *cassette* de neomicina mediante la acción de la recombinasa FLP (Fiering et al., 1995). Estos resultados evidencian la importancia de eliminar los marcadores de selección para evitar que influyan en el fenotipo de la mutación. Por todo ello, no es descartable que las diferencias observadas entre nuestros ratones nulos de *Rad51b* y los obtenidos por *gene targeting* (Shu et al., 1999), puedan ser debidos a la presencia del *cassette* de neomicina.

La acumulación de proteínas de reparación del DNA como son γ H2AX, BRME1 y RAD51 en paquinemas y la consecuente disminución en el número de COs en los ratones *Rad51b* ^{Δ Exon3/ Δ Exon3}, así como en los ratones *Rad51b*^{KI/KI}, demuestra que, aunque la integridad del dominio N-terminal es prescindible para la fertilidad murina, es necesario para una correcta recombinación meiótica. En este mismo sentido, la observación de que los ratones *Rad51b*^{SAES5/SAES5} mostraron un fenotipo meiótico más intenso que los ratones *Rad51b* ^{Δ Exon3/ Δ Exon3} y *Rad51b*^{KI/KI} dado que el acúmulo de las proteínas de reparación γ H2AX, BRME1 y RAD51 persistió más allá de paquinemas, llegando hasta diplonemas, y la consecuente mayor reducción en el número de COs (MLH1), indica que la función ATPasa de RAD51B es esencial para su función meiótica. El incremento en la señal de RAD51, sin un aumento en los niveles de DMC1 que se observa en los meiocitos de los tres mutantes de RAD51B, podría indicar que la persistencia de daño genético no reparado más allá de la mitad de la profase I da lugar a la activación de una vía de reparación somática por HR en la que participa RAD51, pero no su parálogo específico de meiosis DMC1. Este fenotipo ha sido previamente descrito en mutantes nulos de HSF2BP/BRME1 (J. Zhang et al., 2019).

El análisis de la formación de COs, así como la visualización de cromosomas fuera de la placa metafásica presentan limitaciones y ciertas dificultades debido a las técnicas empleadas. Por un lado, al visualizarlos en esparcidos de espermatoцитos se pierde la estructura tridimensional del núcleo lo que imposibilita observar la placa metafásica. En cambio, en el caso de aplastados de espermatoцитos, la estructura de la placa está bien conservada, pero su análisis está dificultado por su propia estructura 3D. La existencia en metafase I de los meiocitos *Rad51b*^{SAES5/SAES5} de univalentes fuera de la placa metafásica, haciendo uso de los controles genéticos pertinentes (*Rad51b*^{WT/WT} y *Rad51b*^{SAES5/SAES5}), en el análisis de aplastados evidenció la repercusión funcional de los defectos en la reparación de las

DSBs en la ausencia de COs. Conjuntamente, nuestra interpretación de la existencia de una disminución en el número de COs que da lugar a segregación errónea es consistente y robusta.

Por otro lado, la acumulación de un mayor número de *foci* de γ H2AX tras la inducción de daño en los fibroblastos $Rad51b^{SAES5/SAES5}$ en comparación con los $Rad51b^{KI/KI}$, realizado previamente con el mismo protocolo en nuestro laboratorio (Franca et al., 2022), evidencia así mismo una mayor alteración de la reparación del daño en el DNA en las células somáticas $Rad51b^{SAES5/SAES5}$. La morfología anormal del núcleo conocida como *blebbing* o ampollas observadas en las células somáticas $Rad51b^{SAES5/SAES5}$ demuestra una elevada inestabilidad genómica la cual se observa también asociada a patologías como la progeria o síndrome de Hutchinson-Gilford y la distrofia muscular de Emery-Dreifuss (Funkhouser et al., 2013). Además, la presencia de numerosos micronúcleos en estas células son otra señal de inestabilidad genómica que suele darse como consecuencia de la segregación errónea de cromosomas en mitosis (Crasta et al., 2012). En ellos se da una alta tasa de cromotripsis, que consiste en la fragmentación masiva de los cromosomas y su posterior reordenamiento, lo cual ocasiona una alta mutagénesis, que se asocia al desarrollo de tumores (C.-Z. Zhang et al., 2015).

Por todo ello, la presencia de mayores defectos en la reparación del DNA tanto en meiocitos como células somáticas en el mutante $Rad51b^{SAES5/SAES5}$ reivindica que *in vivo* la actividad recombinasa de RAD51B es esencial para llevar a cabo su función. Teniendo en cuenta todo ello, la serie alélica se puede ordenar de mayor a menor intensidad fenotípica como sigue: $Rad51b^{SAES5/SAES5} > Rad51b^{KI/KI} = Rad51b^{AExon3/\Delta Exon3}$.

Teniendo en cuenta los resultados generados en el presente trabajo, la similitud fenotípica entre los ratones $Rad51b^{KI/KI}$ y $Rad51b^{AExon3/\Delta Exon3}$ convierte al mutante $Rad51b^{AExon3/\Delta Exon3}$ en la prueba genética de que el mutante $Rad51b^{KI/KI}$ reinicia en la metionina 64, dado que ambos pierden una fracción semejante del extremo N-terminal y tienen un fenotipo análogo. Por el contrario, si la traducción de RAD51B en el mutante $Rad51b^{KI/KI}$ no se reiniciase, este presentaría un fenotipo similar al mutante nulo $Rad51b^{SAES5/SAES5}$.

En resumen, en este trabajo se describen dos nuevos mutantes murinos de RAD51B. El mutante $Rad51b^{AExon3/\Delta Exon3}$, conjuntamente con el $Rad51b^{KI/KI}$ analizado anteriormente en nuestro laboratorio, demuestra que el dominio N-terminal es importante para una correcta recombinación meiótica, aunque prescindible para la fertilidad murina. Además, este mutante es la prueba genética de que en los ratones $Rad51b^{KI/KI}$ la traducción se reinicia en la metionina 64. Por otro lado, los ratones nulos $Rad51b^{SAES5/SAES5}$ demuestran que la deficiencia de RAD51B no es letal embrionario en ratón; afirmación que se ve respaldada por los estudios preliminares en el mutante $Rad51b^{NULO/NULO}$ que es

viable a pesar de carecer de transcrito de *Rad51b*. La acumulación de proteínas de reparación (γ H2AX, BRME1 y RAD51) en los ejes cromosómicos de los tres mutantes con la consecuente disminución en el número de COs, evidencia defectos en la reparación de DSBs como resultado de la ausencia (*Rad51b*^{SAES5/SAES5}) de RAD51B o la falta de integridad del N-terminal (*Rad51b* ^{Δ Exon3/ Δ Exon3} y *Rad51b*^{KI/KI}). Esta ausencia de COs en algunos bivalentes tuvo como consecuencia la presencia de univalentes alineados fuera de la placa metafásica en el caso del mutante *Rad51b*^{SAES5/SAES5}, el cual también mostró defectos en la reparación del DNA somático. Considerando todo ello, el fenotipo observado de mayor a menor intensidad es: *Rad51b*^{SAES5/SAES5} > *Rad51b*^{KI/KI} = *Rad51b* ^{Δ Exon3/ Δ Exon3}. Por cuestiones de tiempo y dificultad técnica no se han llevado a cabo estos estudios en hembras. La ausencia de defectos en el desarrollo de los folículos en las histologías de ovarios no excluye que las hembras presenten defectos en la reparación de DSBs como ocurre en machos, lo cual deberá ser corroborado llevando a cabo análisis análogos en esparcidos de oocitos embrionarios.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que:

1. Los ratones *Rad51b* ^{Δ Exon3/ Δ Exon3} y *Rad51b*^{SAES5/SAES5} son viables, pero sus meiocitos presentan defectos en la reparación de DSBs que dan lugar a la acumulación de proteínas de reparación en los ejes cromosómicos, lo cual conduce a una reducción en el número de CO.
2. El fenotipo de la serie alélica en orden decreciente de intensidad es: *Rad51b*^{SAES5/SAES5} > *Rad51b*^{KI/KI} = *Rad51b* ^{Δ Exon3/ Δ Exon3}
3. La ausencia de COs en algunos bivalentes produjo una alineación errónea de cromosomas en la placa metafásica de los meiocitos *Rad51b*^{SAES5/SAES5}.
4. El desacoplamiento entre los niveles incrementados de RAD51 y el normal patrón de distribución de DMC1 indicaría la activación de un mecanismo de reparación somático de las DSBs.
5. El mutante *Rad51b* ^{Δ Exon3/ Δ Exon3} es la prueba genética de que la variante *Rad51b-c.92delT* conduce a un reinicio en la traducción en la metionina 64 aguas abajo de la mutación, que genera una proteína con el extremo N-terminal truncado.
6. Los resultados derivados del análisis de los ratones *Rad51b* ^{Δ Exon3/ Δ Exon3} demuestran que el dominio N-terminal de RAD51B sí es necesario para la correcta compleción de la reparación de las DSBs, a pesar de ser dispensable para la fertilidad murina.
7. Los ratones *Rad51b*^{SAES5/SAES5} también presentan defectos en la reparación del DNA en células somáticas, que además exhiben una alta incidencia en la formación de micronúcleos.
8. Los ratones *Rad51b*^{SAES5/SAES5} ratifican nuestra hipótesis y, por lo tanto, evidencian que la ausencia de actividad recombinasa de RAD51B no causa letalidad embrionaria en ratón.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Baker, S. M., Plug, A. W., Prolla, T. A., Bronner, C. E., Harris, A. C., Yao, X., Christie, D. M., Monell, C., Arnheim, N., Bradley, A., Ashley, T., & Liskay, R. M. (1996). Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nature Genetics*, 13(3), 336–342. <https://doi.org/10.1038/NG0796-336>
- Baudat, F., Buard, J., Grey, C., Fledel-Alon, A., Ober, C., Przeworski, M., Coop, G., & de Massy, B. (2010). PRDM9 Is a Major Determinant of Meiotic Recombination Hotspots in Humans and Mice. *Science*, 327(5967), 836–840. <https://doi.org/10.1126/science.1183439>
- Baudat, F., Imai, Y., & de Massy, B. (2013). Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg3573>
- Bejarano-Condezo Y. (2022). Functional analysis of a truncating variant of RAD51B and two ultraconserved genomic elements. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.
- Bellani, M. A., Romanienko, P. J., Cairatti, D. A., & Camerini-Otero, R. D. (2005). SPO11 is required for sex-body formation, and Spo11 heterozygosity rescues the prophase arrest of *Atm*^{-/-} spermatocytes. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 15), 3233–3245. <https://doi.org/10.1242/JCS.02466>
- Bolcun-Filas, E., & Handel, M. A. (2018). Meiosis: the chromosomal foundation of reproduction. *Biology of Reproduction*, 99(1), 112–126. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox021>
- Bonilla, B., Hengel, S. R., Grundy, M. K., & Bernstein, K. A. (2020). RAD51 Gene Family Structure and Function. Annual Review of Genetics, 54, 25–46. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENET-021920-092410>
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A., & Chen, D. J. (2001). ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks. *Journal of Biological Chemistry*, 276(45), 42462–42467. <https://doi.org/10.1074/JBC.C100466200>
- Crasta, K., Ganem, N. J., Dagher, R., Lantermann, A. B., Ivanova, E. V., Pan, Y., Nezi, L., Protopopov, A., Chowdhury, D., & Pellman, D. (2012). DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature*, 482(7383), 53–58. <https://doi.org/10.1038/nature10802>
- De Rooij, D. G., & Grootegoed, J. A. (1998). Spermatogonial stem cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(6), 694–701. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(98\)80109-9](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(98)80109-9)
- Deans, B., Griffin, C. S., Maconochie, M., & Thacker, J. (2000). *Xrcc2* is required for genetic stability, embryonic neurogenesis and viability in mice. *The EMBO Journal*, 19(24), 6675. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/19.24.6675>
- Enguita-Marruedo, A., Martín-Ruiz, M., García, E., Gil-Fernández, A., Parra, M. T., Viera, A., Rufas, J. S., & Page, J. (2019). Transition from a meiotic to a somatic-like DNA damage response during the pachytene stage in mouse meiosis. *PLoS Genetics*, 15(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1007439>
- Felipe-Medina, N., Caburet, S., Sánchez-Sáez, F., Condezo, Y. B., de Rooij, D., Gómez-H, L., García-Valiente, R., Todeschini, A. L., Duque, P., Sánchez-Martín, M., Shalev, S. A., Llano, E., Veitia, R. A., & Pendás, A. M. (2020). A missense in HSF2BP causing primary ovarian insufficiency affects meiotic recombination by its novel interactor C19ORF57/BRME1. *ELife*, 9, 1–93. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.56996>
- Fiering, S., Epner, E., Robinson, K., Zhuang, Y., Telling, A., Hu, M., Martin, D. I., Enver, T., Ley, T. J., & Groudine, M. (1995). Targeted deletion of 5'HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus. *Genes & development*, 9(18), 2203–2213. <https://doi.org/10.1101/gad.9.18.2203>
- Franca, M. M., Condezo, Y. B., Elzaiat, M., Felipe-Medina, N., Sánchez-Sáez, F., Muñoz, S., Sainz-Urruela, R., Martín-Hervás, M. R., García-Valiente, R., Sánchez-Martín, M. A., Astudillo, A., Mendez, J., Llano, E., Veitia, R. A., Mendonça, B. B., & Pendás, A. M. (2022). A truncating variant of RAD51B associated with primary ovarian insufficiency provides insights into its meiotic and somatic functions. *Cell Death & Differentiation* 2022 29:12, 29(12), 2347–2361. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-01021-z>
- Funkhouser, C. M., Sknepnek, R., Shimi, T., Goldman, A. E., Goldman, R. D., & Olvera de la Cruz, M. (2013). Mechanical model of blebbing in nuclear lamin meshworks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(9), 3248–3253. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300215110>
- Griswold, M. D. (2016). Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev*, 96, 1–17. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2015.-Mam>

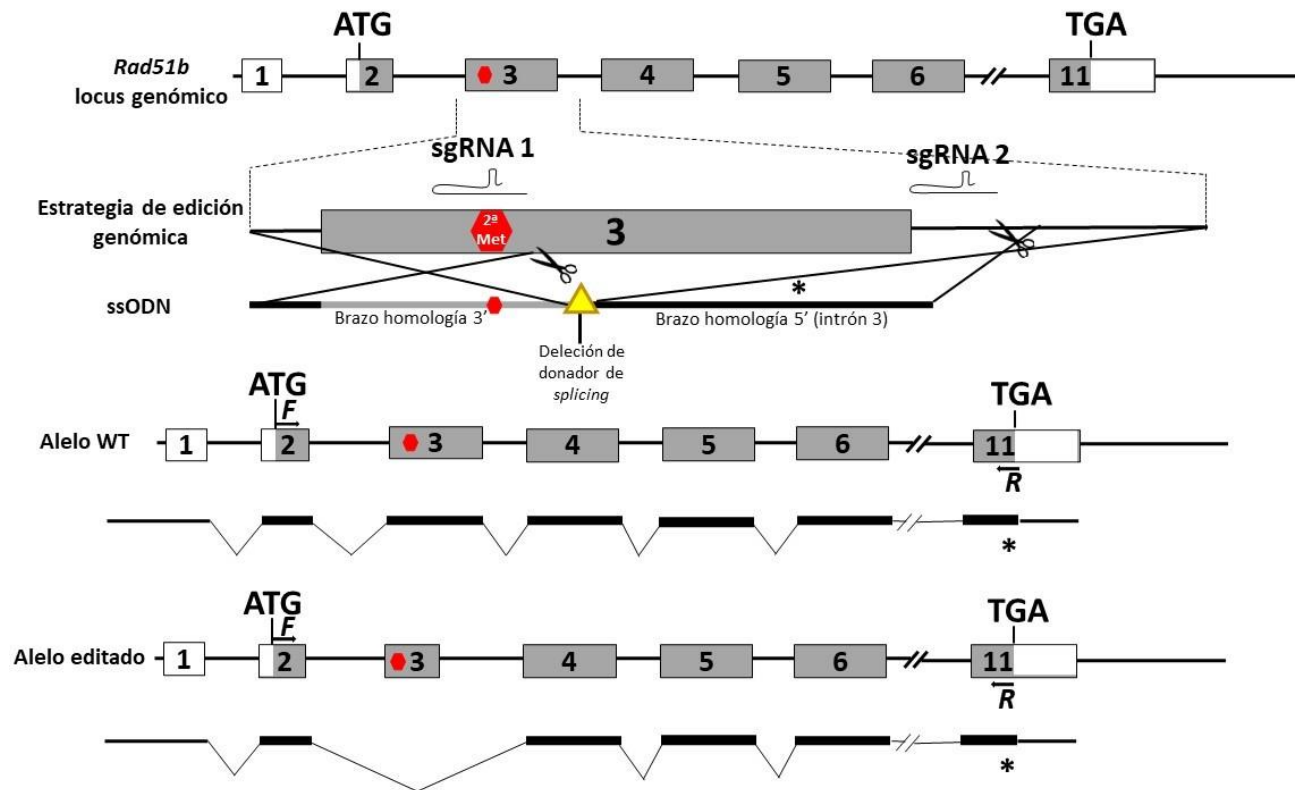
- Gruver, A. M., Miller, K. A., Rajesh, C., Smiraldo, P. G., Kaliyaperumal, S., Balder, R., Stiles, K. M., Albala, J. S., & Pittman, D. L. (2005). The ATPase motif in RAD51D is required for resistance to DNA interstrand crosslinking agents and interaction with RAD51C. *Mutagenesis*, 20(6), 433–440. <https://doi.org/10.1093/mutage/gei059>
- Handel, M. A., & Schimenti, J. C. (2010). Genetics of mammalian meiosis: Regulation, dynamics and impact on fertility. *Nature Reviews Genetics*, 11(2), 124–136. <https://doi.org/10.1038/nrg2723>
- Hinch, A. G., Becker, P. W., Li, T., Moralli, D., Zhang, G., Bycroft, C., Green, C., Keeney, S., Shi, Q., Davies, B., & Donnelly, P. (2020). The Configuration of RPA, RAD51, and DMC1 Binding in Meiosis Reveals the Nature of Critical Recombination Intermediates. *Molecular Cell*, 79(4), 689–701.e10. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2020.06.015>
- Huang, Y., & Roig, I. (2023). *Genetic control of meiosis surveillance mechanisms in mammals*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1127440>
- Kuznetsov, S. G., Haines, D. C., Martin, B. K., & Sharan, S. K. (2009). Loss of Rad51c leads to embryonic lethality and modulation of Trp53-dependent tumorigenesis in mice. *Cancer Research*, 69(3), 863. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3057>
- Larose, H., Shami, A. N., Abbott, H., Manske, G., Lei, L., & Hammoud, S. S. (2019). Gametogenesis: A Journey from Inception to Conception HHS Public Access. *Curr Top Dev Biol*, 132, 257–310. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.12.006>
- Lindeboom, R. G., Supek, F., & Lehner, B. (2016). The rules and impact of nonsense-mediated mRNA decay in human cancers. *Nature genetics*, 48(10), 1112–1118. <https://doi.org/10.1038/ng.3664>
- McMahill, M. S., Sham, C. W., & Bishop, D. K. (2007). Synthesis-Dependent Strand Annealing in Meiosis. *PLoS Biology*, 5(11), 2589–2601. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0050299>
- Myers, S., Bowden, R., Tumian, A., Bontrop, R. E., Freeman, C., MacFie, T. S., McVean, G., & Donnelly, P. (2010). Drive Against Hotspot Motifs in Primates Implicates the PRDM9 Gene in Meiotic Recombination. *Science*, 327(5967), 876–879. <https://doi.org/10.1126/science.1182363>
- Nishimura, H., & L'Hernault, S. W. (2017). Spermatogenesis. *Current Biology*, 27(18), R988–R994. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2017.07.067>
- Olson, E. N., Arnold, H. H., Rigby, P. W., & Wold, B. J. (1996). Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell*, 85(1), 1–4. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81073-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81073-9)
- Parra, M. T., Page, J., Yen, T. J., He, D., Valdeolmillos, A., Rufas, J. S., & Suja, J. A. (2002). Expression and behaviour of CENP-E at kinetochores during mouse spermatogenesis. *Chromosoma*, 111(1), 53–61. <https://doi.org/10.1007/S00412-002-0185-5>
- Peters, A. H. F. M., Plug, A. W., van Vugt, M. J., & de Boer, P. (1997). A drying-down technique for the spreading of mammalian melocytes from the male and female germline. *Chromosome Research*, 5(1), 66–68. <https://doi.org/10.1023/A:1018445520117>
- Pham, C. T., MacIvor, D. M., Hug, B. A., Heusel, J. W., & Ley, T. J. (1996). Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(23), 13090–13095. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.13090>
- Pittman, D. L., Weinberg, L. R., & Schimenti, J. C. (1998). Identification, characterization, and genetic mapping of Rad51d, a new mouse and human RAD51/RecA-related gene. *Genomics*, 49(1), 103–111. <https://doi.org/10.1006/GENO.1998.5226>
- Prakash, R., Freyer, L., Saiz, N., Gavrilov, S., Wang, R. Q., Romanienko, P. J., Lacy, E., Hadjantonakis, A. K., & Jasin, M. (2021). XRCC3 loss leads to midgestational embryonic lethality in mice. *DNA Repair*, 108, 103227. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2021.103227>
- Prasada Rao, H. B. D., Qiao, H., Bhatt, S. K., Bailey, L. R. J., Tran, H. D., Bourne, S. L., Qiu, W., Deshpande, A., Sharma, A. N., Beebout, C. J., Pezza, R. J., & Hunter, N. (2017). A SUMO-ubiquitin relay recruits proteasomes to chromosome axes to regulate meiotic recombination. *Science (New York, N.Y.)*, 355(6323), 403–407. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAF6407>
- Qiao, H., Prasada Rao, H. B. D., Yang, Y., Fong, J. H., Cloutier, J. M., Deacon, D. C., Nagel, K. E., Swartz, R. K., Strong, E., Holloway, J. K., Cohen, P. E., Schimenti, J., Ward, J., & Hunter, N. (2014). Antagonistic roles of ubiquitin ligase HEI10 and SUMO ligase RNF212 regulate meiotic recombination. *Nature Genetics*, 46(2), 194–199. <https://doi.org/10.1038/NG.2858>



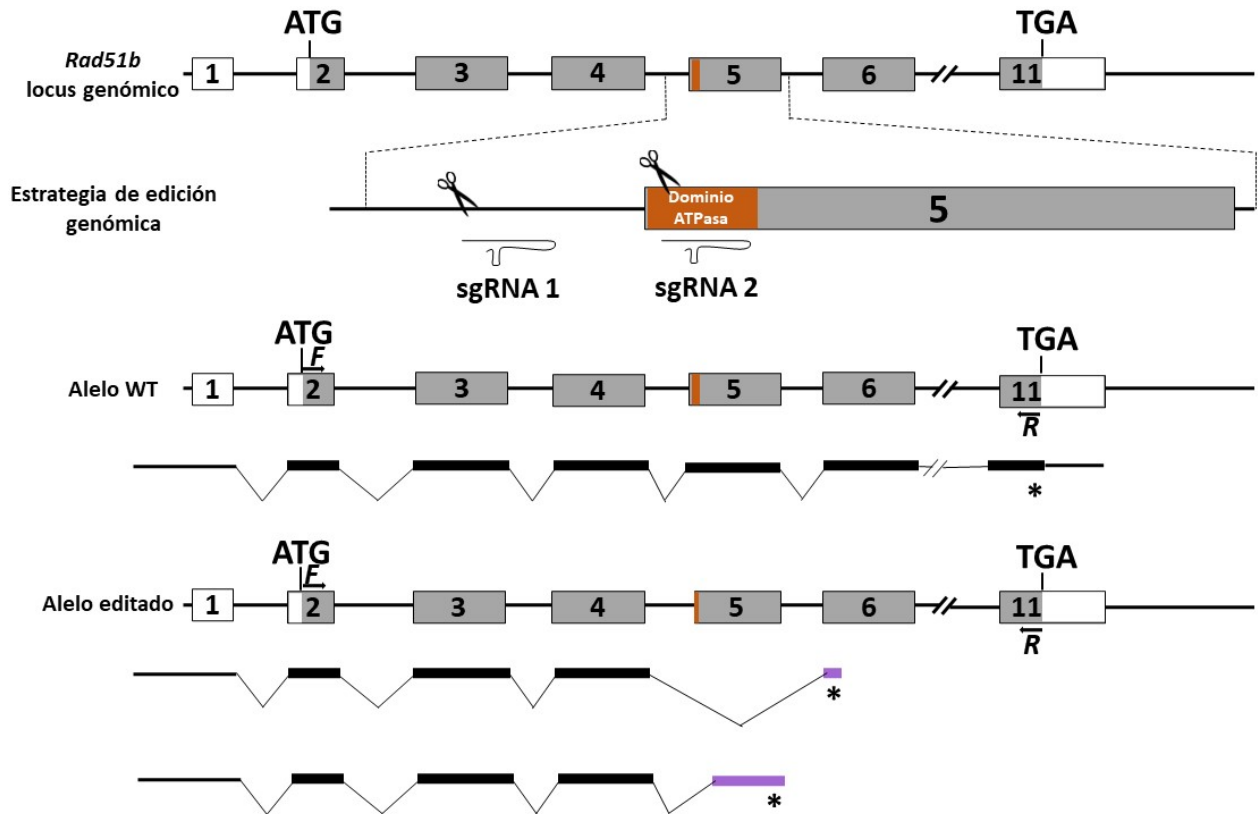
- Qiu, S., & Huang, J. (2021). MRN complex is an essential effector of DNA damage repair. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 22(1), 31. <https://doi.org/10.1631/JZUS.B2000289>
- Raderschall, E., Golub, E. I., & Haaf, T. (1999). Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(5), 1921–1926. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.1921>
- Rafii, S., Lindblom, A., Reed, M., Meuth, M., & Cox, A. (2003). A naturally occurring mutation in an ATP-binding domain of the recombination repair gene XRCC3 ablates its function without causing cancer susceptibility. *Human molecular genetics*, 12(8), 915–923. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg102>
- Ribeiro, J., Abby, E., Livera, G., & Martini, E. (2016). RPA homologs and ssDNA processing during meiotic recombination. *Chromosoma*, 125(2), 265. <https://doi.org/10.1007/S00412-015-0552-7>
- Robert, T., Nore, A., Brun, C., Maffre, C., Crimi, B., Bourbon, H.-M., & de Massy, B. (2016). The TopoVIB-Like protein family is required for meiotic DNA double-strand break formation. *Science (New York, N.Y.)*, 351(6276), 943–949. <https://doi.org/10.1126/science.aad5309>
- Romanienko, P. J., & Camerini-Otero, R. D. (2000). The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Molecular cell*, 6(5), 975–987. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00097-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00097-6)
- Sánchez-Sáez, F. (2023). Análisis funcional de una variante de SYCE1 causante de Fallo Ovárico Prematuro y de la histona H1FOO en fertilidad. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.
- Shinohara, A., & Shinohara, M. (2004). Roles of RecA homologues Rad51 and Dmc1 during meiotic recombination. *Cytogenetic and Genome Research*, 107(3–4), 201–207. <https://doi.org/10.1159/000080598>
- Shu, Z., Smith, S., Wang, L., Rice, M. C., & Kmiec, E. B. (1999). Disruption of muREC2/RAD51L1 in Mice Results in Early Embryonic Lethality Which Can Be Partially Rescued in a p53^{-/-} Background. *Molecular and Cellular Biology*, 19(12), 8686. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.12.8686>
- Simmler, M. C., Rouyer, F., Vergnaud, G., Nyström-Lahti, M., Ngo, K. Y., de La Chapelle, A., & Weissenbach, J. (1985). Pseudoautosomal DNA sequences in the pairing region of the human sex chromosomes. *Nature* 1985 317:6039, 317(6039), 692–697. <https://doi.org/10.1038/317692a0>
- Sullivan MR, Bernstein KA. (2018) RAD-ical New Insights into RAD51 Regulation. *Genes (Basel)*. 2018;9:629. <https://doi.org/10.3390/genes9120629>.
- Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Fukushima, T., Morrison, C., Albala, J. S., Swagemakers, S. M., Kanaar, R., Thompson, L. H., & Takeda, S. (2000). The Rad51 paralog Rad51B promotes homologous recombinational repair. *Molecular and cellular biology*, 20(17), 6476–6482. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.17.6476-6482.2000>.
- Takeuchi, T., Nomura, T., Tsujita, M., Suzuki, M., Fuse, T., Mori, H., & Mishina, M. (2002). Flp recombinase transgenic mice of C57BL/6 strain for conditional gene targeting. *Biochemical and biophysical research communications*, 293(3), 953–957. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00321-2](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00321-2)
- Thorslund, T., & West, S. C. (2007). BRCA2: a universal recombinase regulator. *Oncogene* 2007 26:56, 26(56), 7720–7730. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210870>
- Tidwell, T., Wechsler, J., Nayak, R. C., Trump, L., Salipante, S. J., Cheng, J. C., Donadieu, J., Glaubach, T., Corey, S. J., Grimes, H. L., Lutzko, C., Cancelas, J. A., & Horwitz, M. S. (2014). Neutropenia-associated ELANE mutations disrupting translation initiation produce novel neutrophil elastase isoforms. *Blood*, 123(4), 562–569. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-513242>
- Toledo, M., Sun, X., Briño-Enríquez, M. A., Raghavan, V., Gray, S., Pea, J., Milano, C. R., Venkatesh, A., Patel, L., Borst, P. L., Alani, E., & Cohen, P. E. (2019). A mutation in the endonuclease domain of mouse MLH3 reveals novel roles for MutLγ during crossover formation in meiotic prophase I. *PLoS Genetics*, 15(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1008177>
- Wang, H., la Russa, M., & Qi, L. S. (2016). CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Https://Doi.Org/10.1146/Annurev-Biochem-060815-014607*, 85, 227–264. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060815-014607>
- Wang, S., Sun, X., Ding, F., Zhang, K., Zhao, R., Li, S., Li, R., Tang, B., Zhang, L., Liu, Y., Li, J., Gao, F., Wang, H., Wang, L., Dai, Y., & Li, N. (2009). Removal of selectable marker gene from fibroblast cells in transgenic cloned cattle by transient expression of Cre recombinase and subsequent effects on recloned embryo development. *Theriogenology*, 72(4), 535–541. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.04.009>

- Wei, K., Clark, A. B., Wong, E., Kane, M. F., Mazur, D. J., Parris, T., Kolas, N. K., Russell, R., Hou, H., Kneitz, B., Yang, G., Kunkel, T. A., Kolodner, R. D., Cohen, P. E., & Edlmann, W. (2003). Inactivation of Exonuclease 1 in mice results in DNA mismatch repair defects, increased cancer susceptibility, and male and female sterility. *Genes & Development*, *17*(5), 603. <https://doi.org/10.1101/GAD.1060603>
- Xu, J., Zhao, L., Peng, S., Chu, H., Liang, R., Tian, M., Connell, P. P., Li, G., Chen, C., & Wang, H.-W. (2021). Mechanisms of distinctive mismatch tolerance between Rad51 and Dmc1 in homologous recombination. *Nucleic Acids Research*, *49*, 13135–13149. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1141>
- Yang, H., Wang, H., & Jaenisch, R. (2014). Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Nature Protocols* 2014 9:8, 9(8), 1956–1968. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.134>
- Zakharyevich, K., Ma, Y., Tang, S., Hwang, P. Y. H., Boiteux, S., & Hunter, N. (2010). Temporally and biochemically distinct activities of Exo1 during meiosis: double-strand-break resection and resolution of double-Holliday Junctions. *Molecular Cell*, *40*(6), 1001-1015. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2010.11.032>
- Zhang, C. Z., Spektor, A., Cornils, H., Francis, J. M., Jackson, E. K., Liu, S., Meyerson, M., & Pellman, D. (2015). Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature*, *522*(7555), 179–184. <https://doi.org/10.1038/nature14493>
- Zhang, B., Tang, Z., Li, L., & Lu, L. Y. (2020). NBS1 is required for SPO11-linked DNA double-strand break repair in male meiosis. *Cell Death and Differentiation*, *27*(7), 2176. <https://doi.org/10.1038/S41418-020-0493-4>
- Zhang, F., Liu, M., & Gao, J. (2022). Alterations in synaptonemal complex coding genes and human infertility. *International journal of biological sciences*, *18*(5), 1933–1943. <https://doi.org/10.7150/ijbs.67843>
- Zhang, F. G., Zhang, R. R., & Gao, J. M. (2021). The organization, regulation, and biological functions of the synaptonemal complex. *Asian journal of andrology*, *23*(6), 580–589. <https://doi.org/10.4103/aja202153>
- Zhang, J., Fujiwara, Y., Yamamoto, S., & Shibuya, H. (2019). A meiosis-specific BRCA2 binding protein recruits recombinases to DNA double-strand breaks to ensure homologous recombination. *Nature communications*, *10*(1), 722. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08676-2>
- Zhang, J., Gurusaran, M., Fujiwara, Y., Zhang, K., Echbarthi, M., Vorontsov, E., Guo, R., Pendlebury, D. F., Alam, I., Livera, G., Emmanuelle, M., Wang, P. J., Nandakumar, J., Davies, O. R., & Shibuya, H. (2020). The BRCA2-MEILB2-BRME1 complex governs meiotic recombination and impairs the mitotic BRCA2-RAD51 function in cancer cells. *Nature communications*, *11*(1), 2055. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15954-x>
- Zickler, D., & Kleckner, N. (2015). Recombination, Pairing, and Synapsis of Homologs during Meiosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(6), a016626. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016626>
- Zur, H., & Tuller, T. (2013). New universal rules of eukaryotic translation initiation fidelity. *PLoS computational biology*, *9*(7), e1003136. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003136>

8. ANEXOS



Anexo 1. Generación del modelo murino *Rad51b*^{ΔExon3/ΔExon3}. Representación esquemática del locus *Rad51b* y la estrategia de edición genómica llevada a cabo. Se muestran los sgRNAs localizados en el exón 3 e intrón 3 y el ssODN dirigido a esta región en el que se ha eliminado el sitio donador del splicing del exón 3 (representado con un triángulo amarillo). El brazo de homología 3' presenta homología con el final del intrón 2 y principio del exón 3, mientras que el 5' presenta homología con el intrón 3. Las regiones codificantes (cajas grises) y no codificantes (cajas blancas) se representan en los diagramas alélicos. Las líneas finas (secuencias no codificantes) y gruesas (secuencias codificantes) ubicadas bajo los exones representan los transcritos esperados. Con un hexágono rojo se representa la segunda metionina en el exón 3, donde tiene lugar el reinicio de la traducción en el mutante *Rad51b*^{c.92delT/c.92delT} (Franca et al., 2022). Los codones de terminación se indican con un "*". Los oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR de la ORF (F y R) aparecen en el esquema como flechas en los alelos. Elaboración propia.



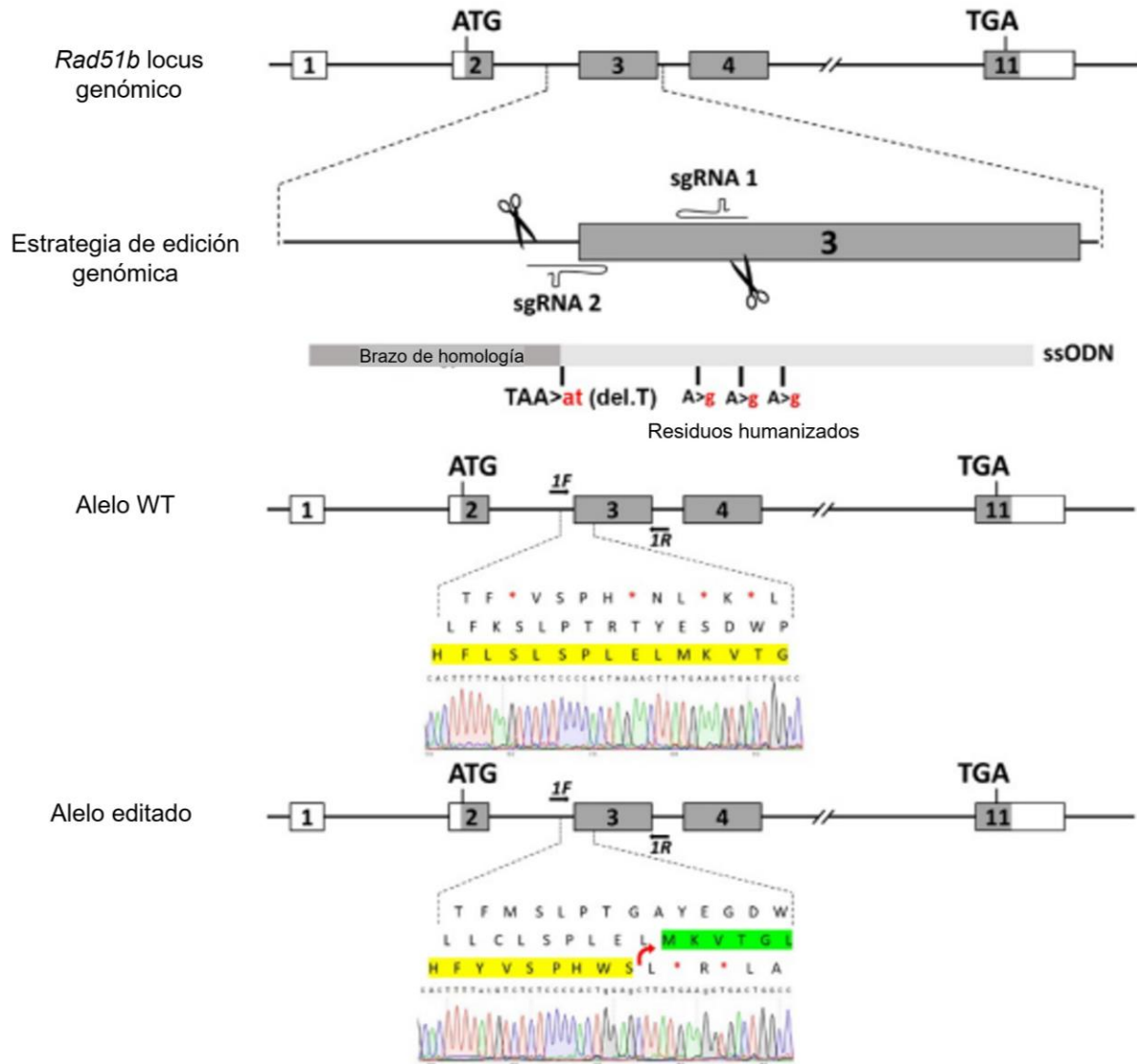
Anexo 2. Generación del modelo murino *Rad51b*^{SAE55/SAE55}. Representación esquemática del locus *Rad51b* y la estrategia de edición genómica llevada a cabo. Se muestran los sgRNAs localizados en el intrón 4 y exón 5. Las regiones codificantes (cajas grises) y no codificantes (cajas blancas) se representan en los diagramas alélicos. Las líneas finas (secuencias no codificantes) y gruesas (secuencias codificantes) ubicadas bajo los exones representan los transcritos esperados. Las líneas gruesas negras corresponden a exones verdaderos y las violetas a exones con una secuencia de nucleótidos diferente a la silvestre. Con un rectángulo naranja se representa la secuencia codificante del dominio ATPasa en el exón 5. Los codones de terminación se indican con un "*". Los oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR de la ORF (F y R) aparecen en el esquema como flechas en los alelos. Elaboración propia.

Proteína detectada	Especie (<i>Host</i>)	Tipo	Dilución	Referencia	Proveedor
ACA	<i>Human</i>	IgG	1:15	15-235	Antibodies Incorporated
BRME1	<i>Rabbit</i>	IgG	1:100	R1	Proteogenix
	<i>Rabbit</i>	IgG	1:200	R2	Proteogenix
DMC1	<i>Rabbit</i>	IgG	1:500	R1	Proteogenix
	<i>Rabbit</i>	IgG	1:500	R2	Proteogenix
	<i>Rabbit</i>	IgG	1:300	A-11122	Life Technologies
γ -H2AX (ser139)	<i>Mouse</i>	IgG	1:500	05-636	Millipore
MLH1	<i>Mouse</i>	IgG	1:20	51-1327GR	Biosciences
RAD51	<i>Rabbit</i>	IgG	1:50	PC130	Calbiochem
SYCP1	<i>Rabbit</i>	IgG	1:200	Ab15090	Abcam
SYCP3	<i>Mouse</i>	IgG	1:1000	sc-74569	Santa Cruz Biotechnology
	<i>Rabbit</i>	Suero	1:500	K921	Dr. J. L. Barbero

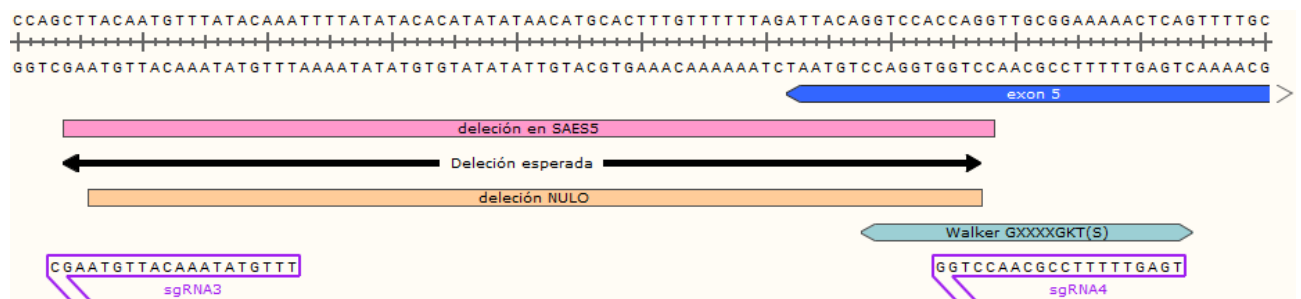
Anexo 3. Anticuerpos primarios utilizados para los protocolos de IF.

Anticuerpo	Fluorocromo	Referencia	Especie (<i>Host</i>)	Dilución	Proveedor
α -human	TRITC	709-025-149	<i>Donkey</i>	1:100	Jackson Immuno Research
α -mouse	Alexa 555	A-32727	<i>Goat</i>	1:200	Thermo Fisher Scientific
	Alexa 488	A-11001	<i>Goat</i>	1:200	Thermo Fisher Scientific
	TRITC	515-025-003	<i>Sheep</i>	1:100	Jackson Immuno Research
	FITC	115-095-146	<i>Goat</i>	1:100	Jackson Immuno Research
α -rabbit	Alexa 555	A-31572	<i>Donkey</i>	1:200	Thermo Fisher Scientific
	Alexa 488	A-32731	<i>Goat</i>	1:200	Thermo Fisher Scientific
	TRITC	711-025-152	<i>Donkey</i>	1:100	Jackson Immuno Research
	Alexa 488	111-547-003	<i>Goat</i>	1:100	Jackson Immuno Research

Anexo 4. Anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos utilizados en los protocolos de inmunofluorescencia. FITC: Isotiocianato de fluoresceína, TRITC: Rodamina



Anexo 5. Estrategia de edición genómica del modelo murino *Rad51b*^{c.92delT/c.92delT}. Representación esquemática del locus *Rad51b* y la estrategia de edición genómica llevada a cabo en (Franca et al., 2022). Se muestran los sgRNAs localizados en el intrón 3 y exón 3. El ssODN proporcionado contiene los residuos humanizados para estudiar la variante de *RAD51B* de la familia consanguínea con *POI*. Las regiones codificantes (cajas grises) y no codificantes (cajas blancas) se representan en los diagramas alélicos. Debajo se muestra la secuencia y la predicción in silico de como la traducción reiniciaría en la metionina 64 como consecuencia de la deleción en el alelo de *Rad51b* y el desplazamiento del marco de lectura que genera un codón de parada prematuro. Figura adaptada de (Bejarano-Condezo, 2022)



Anexo 6. Esquema realizado con SnapGene en el que se muestra el final del intrón 4 y principio del exón 5. La flecha negra muestra la deleción que se esperaba que se produjera con la edición. El rectángulo rosa representa la deleción del mutante *Rad51b*^{SAES5/SAES5} y el naranja la deleción del mutante *Rad51b*^{NULO/NULO}. El hexágono azul muestra la localización del dominio Walker A en el exón 5 y las guías de RNA empleadas para la edición se representan en flechas violetas. Elaboración propia.