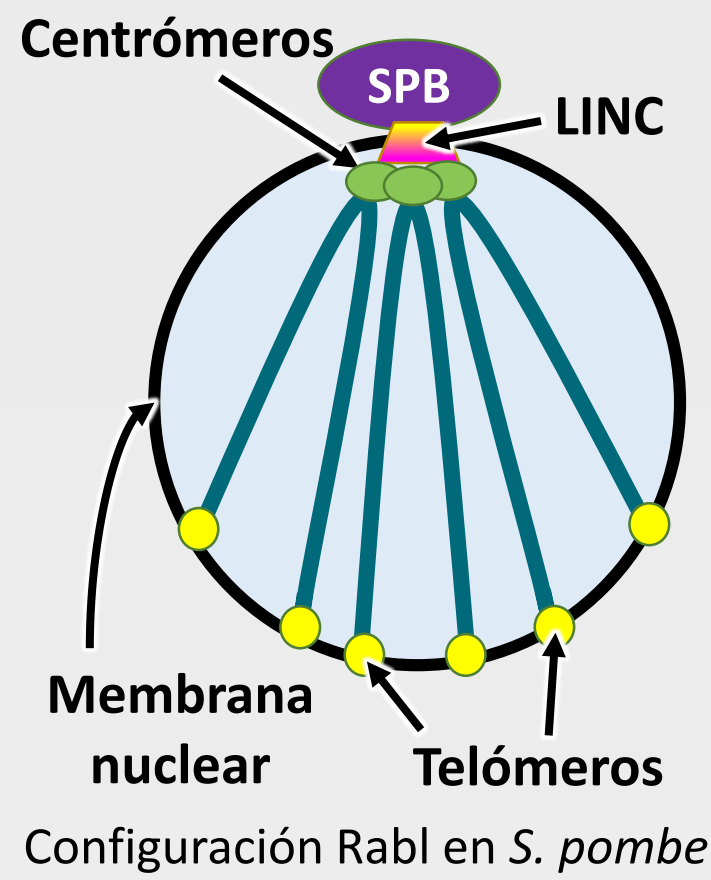


Delgado Gestoso, David (1); Campoy López, Alejandro (1); Brokate, Ana María (1,*) y Fernandez Alvarez, Alfonso (1,*)

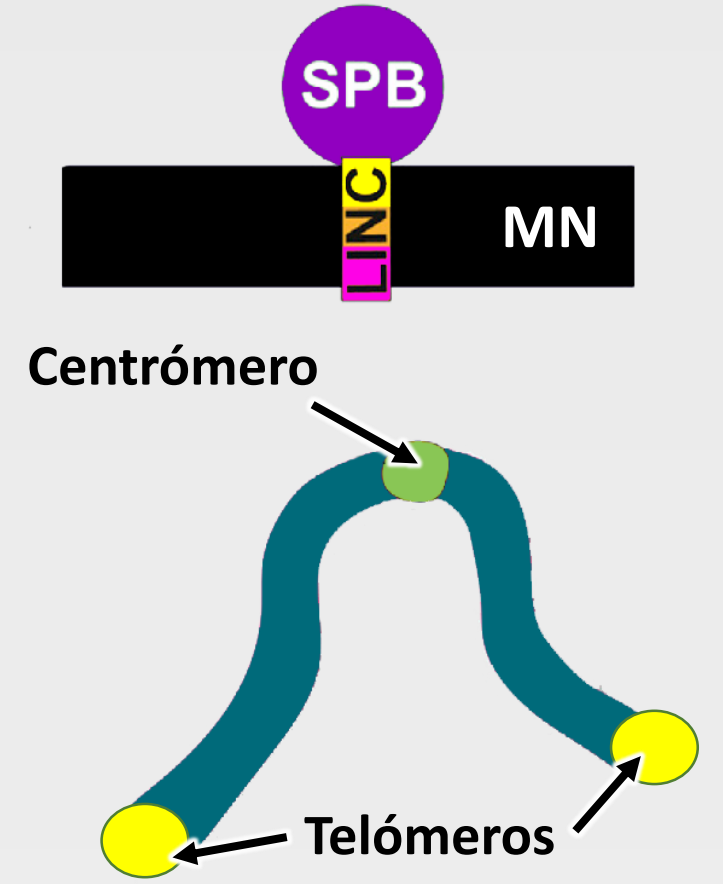
(1) Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Carretera de Utrera Km 1 41013 Sevilla

Introducción

La microscopía de súper resolución (SRM) permite resolver estructuras celulares en el rango de decenas de nanómetros. Puede ser útil para investigaciones biotecnológicas, como el estudio la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* permitiendo definir con mayor precisión la posición de los telómeros y centrómeros que conforman la configuración Rabl de los cromosomas. Esta conformación determina la estructura 3D de la cromatina, con enorme relevancia para la replicación y transcripción de genes. Sin embargo, las técnicas de SRM necesitan una optimización y la preservación de las estructuras de estudio.

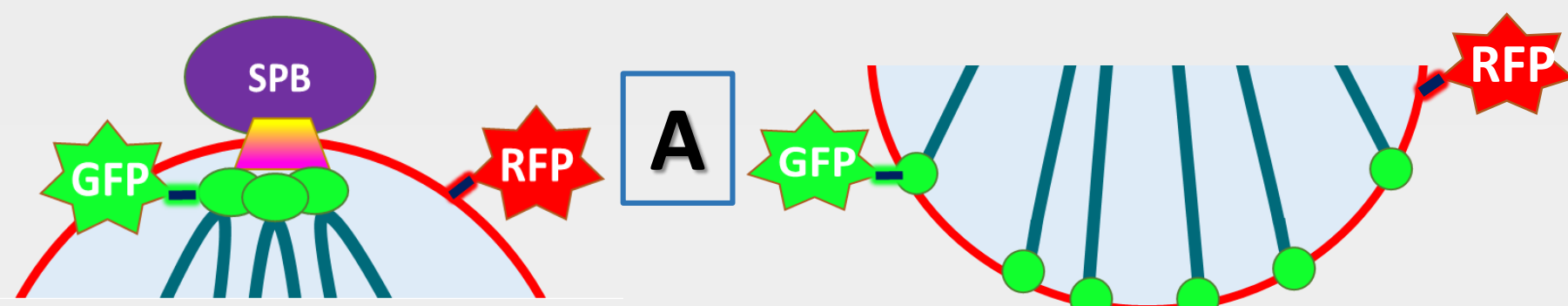
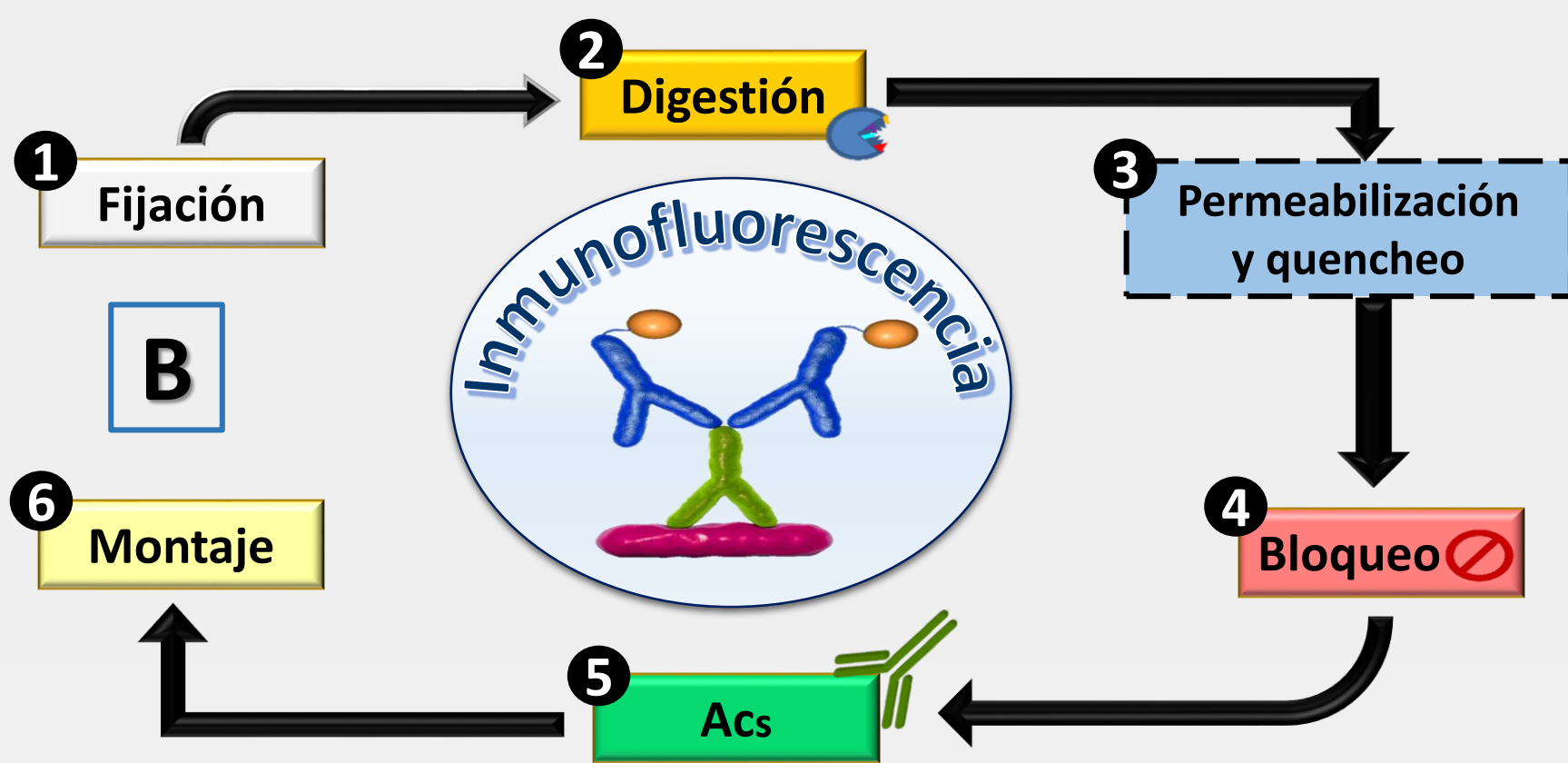


En las células con el Complejo de unión del nucleoesqueleto y el citoesqueleto (LINC) inactivado, la configuración Rabl puede cambiar, liberándose los contactos centrómero-LINC. Este fenotipo se expresa por la mutación puntual del gen *sad1-2* en combinación con la delección del gen *csi1*. Esta separación permitiría discernir más centrómeros con microscopía de fluorescencia (FM) que en las células silvestres (wt). Sin embargo podría afectar a los telómeros, por lo que es necesario estudiar todos los componentes implicados en la configuración cromosómica.



Materiales y métodos

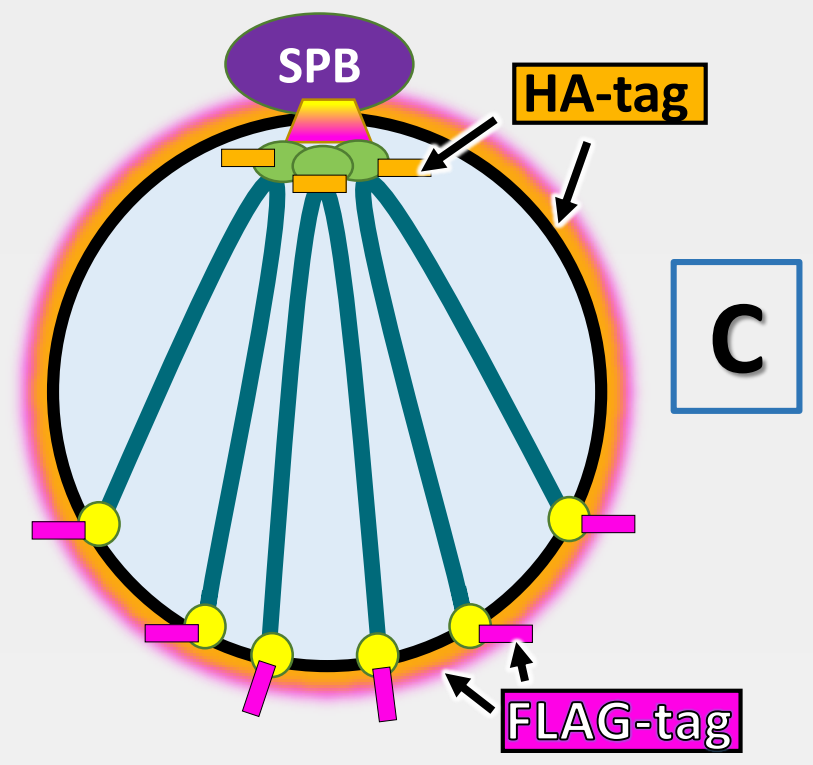
A. Generación de cepas wt y mutantes *sad1-2 csi1Δ* (LINC inactivado) con centrómeros, telómeros y membrana nuclear marcados con GFP o RFP para estudiar mediante FM alteraciones en la configuración Rabl.



B. Uso de las cepas marcadas con GFP para optimizar el protocolo de inmunofluorescencia que posteriormente servirá como aproximación al protocolo de SRM.

C. Para SRM se emplean cepas wt y mutantes con las estructuras de interés marcadas con HA o FLAG en combinación con el protocolo de inmunofluorescencia.

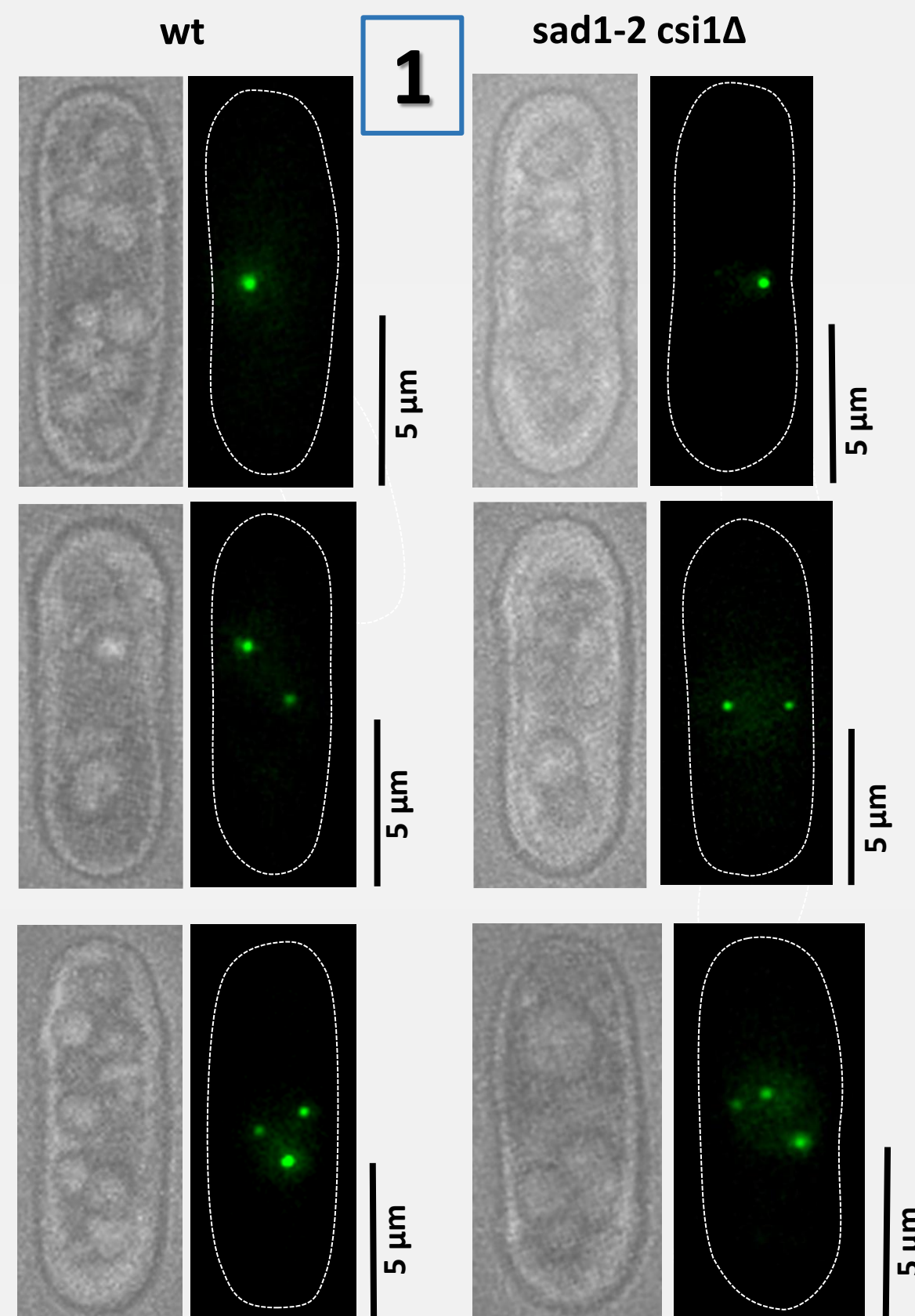
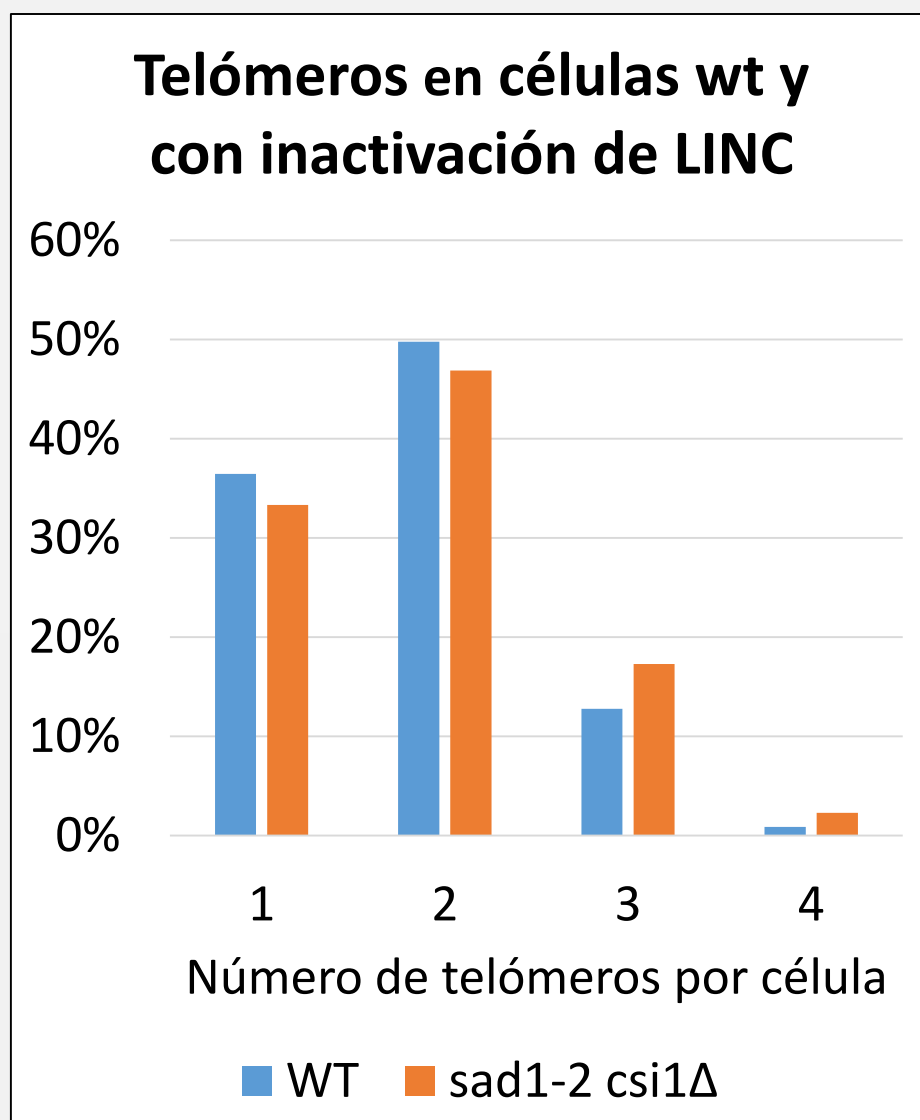
D. Extracción de proteínas y realización de western blots para verificar la eficacia de los anticuerpos.



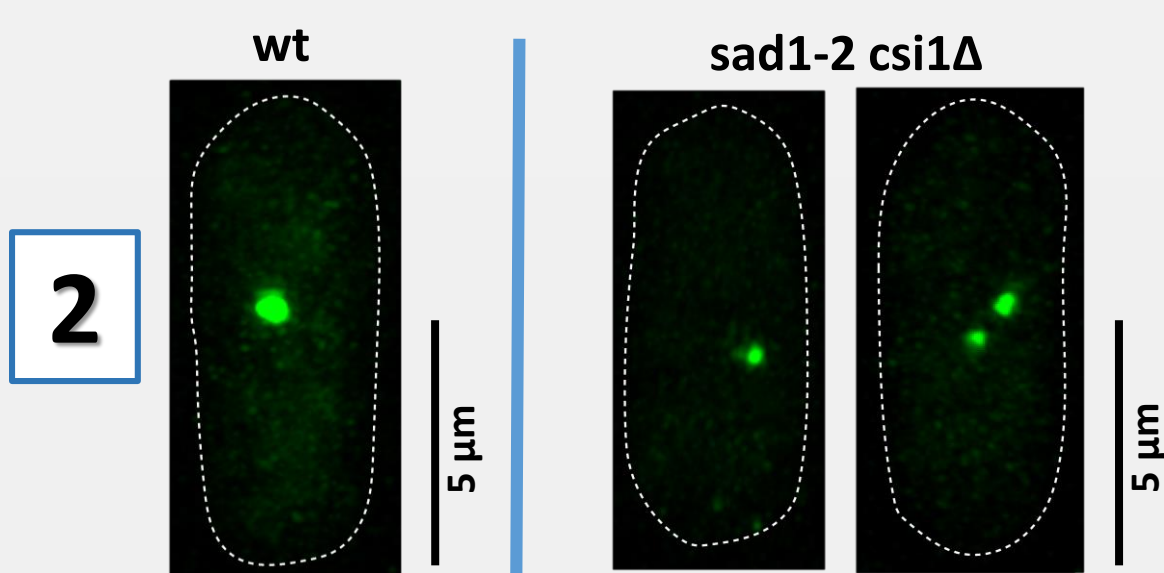
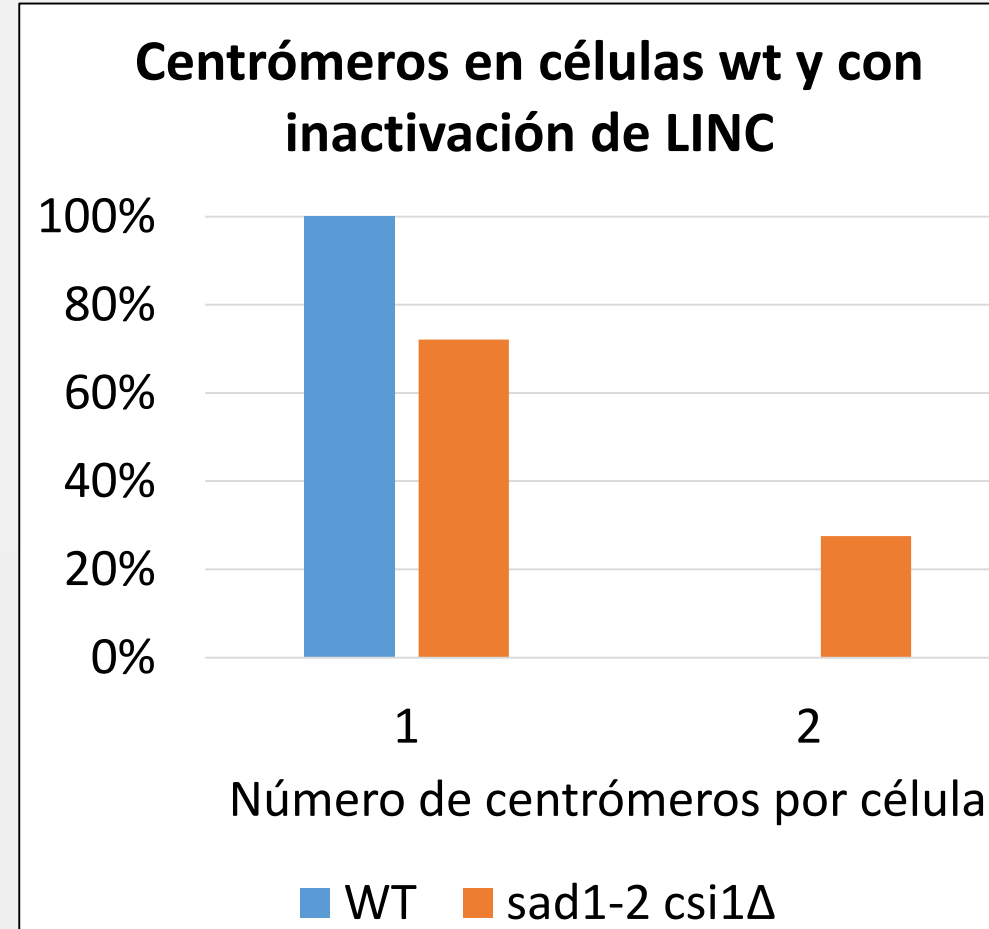
Resultados

Análisis de la configuración Rabl mediante FM

1. Los **telómeros** en las células wt y las LINC-inactivado mostraron una distribución similar, siendo las más comunes las células con 2 telómeros, seguidas por 1 y 3 telómeros.



2. Los **centrómeros** mostraron diferencias entre mutante y wt, el 27% de los mutantes de LINC muestran 2 centrómeros frente al wt que solo presenta 1 centrómero.

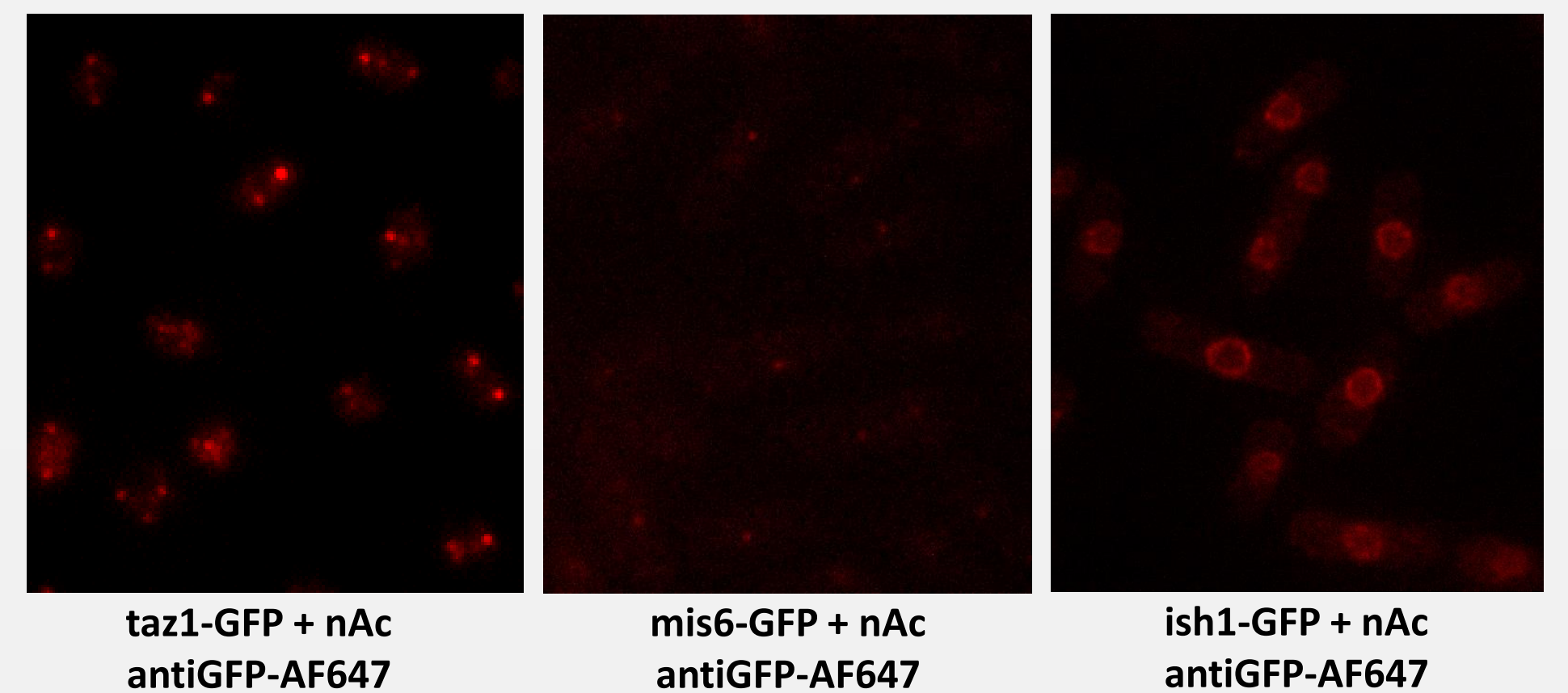


Optimización del protocolo para SRM

La optimización del protocolo de **inmunofluorescencia** en FM se ha logrado con el marcaje sobre GFP.

Usando para ello células fijadas con **paraformaldehído** al 4% y etiquetadas con **nanoanticuerpos (nAc)**, siendo innecesaria la digestión de la pared celular. Demostrando su efectividad marcando *taz1*-GFP (telómero), *mis6*-GFP (centrómero) e *ish1*-GFP (membrana nuclear).

El marcaje del centrómero es menos intenso por ser más inaccesible y encontrarse en menor cantidad.



Conclusiones

- En SRM se deberán fijar las células con paraformaldehído al 4% y usar nanoanticuerpos anti-HA o anti-FLAG para marcar las estructuras de interés sin necesidad de tener GFP.
- Mediante FM se ha comprobado que los telómeros no se ven afectados en los mutantes LINC.
- Con FM se observa el descuelgue de los cromosomas al inactivar el complejo LINC, permitiendo distinguir varios centrómeros.

Bibliografía

- Reeve, E. (2014). Encyclopedia of Genetics. Hoboken: Taylor and Francis.
 Fernández-Álvarez, A., and Cooper, J. (2017). The functionally elusive Rabl chromosome configuration directly regulates nuclear membrane remodeling at mitotic onset. *Cell Cycle*, 16(15), 1392-1396.
 Kaplan, C., and Ewers, H. (2015). Optimized sample preparation for single-molecule localization-based superresolution microscopy in yeast. *Nature Protocols*, 10(7), 1007-1021.