



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

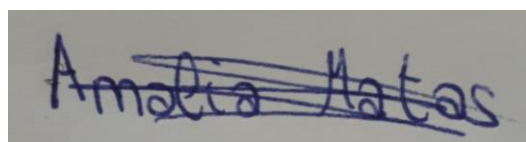
Bases moleculares de la división mitótica

Alumno/a: Amalia Matas Patón

Junio, 2022

Trabajo Fin de Grado

Bases moleculares de la división mitótica



Alumno: Amalia Matas Patón

Jaén, Junio, 2022

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Microscopía confocal	2
<i>1.1.1. Imágenes de microscopia confocal de células vivas</i>	<i>5</i>
1.2. Estudio in vivo de la cromatina	9
<i>1.2.1. DRAQ5 y siR-DNA</i>	<i>11</i>
1.3. Aplicación de análisis in vivo de cromatina a modelos celulares de microcefalia primaria MCPH1	12
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Materiales	15
3.2. Métodos	16
<i>3.2.1. Procedimientos básicos de cultivos celulares</i>	<i>16</i>
<i>3.2.2. Estudio de microscopia confocal “live-cell” con agentes intercalantes para el ADN</i>	<i>17</i>
<i>3.2.3. Análisis de resultados</i>	<i>18</i>
4. RESULTADOS	19
4.1. Aplicación de DRAQ5 para el estudio de la mitosis en tiempo real	19
4.2. Aplicación de SiR-DNA para el estudio de la mitosis en tiempo real	23
5. DISCUSIÓN	32
6. CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	34

RESUMEN

En los últimos años, ha aumentado la necesidad de realizar estudios in vivo de las funciones celulares para avanzar en el estudio de determinadas patologías como la microcefalia humana tipo 1. Por ello, para poder llevar a cabo el estudio in vivo de la progresión mitótica mediante la tinción de cromatina, se necesita hacer uso de tinciones que no sean tóxicas y puedan dañar las células, impidiéndoles llevar a cabo sus procesos biológicos como lo harían en el medio fisiológico. Para ello, sobre un modelo celular RPE-1 se han ensayado distintos compuestos que marcan la cromatina para poder observar el proceso de división mitótica in vivo a través de microscopía confocal. Los resultados que se muestran en este Trabajo Fin de Grado servirán para optimizar el análisis por microscopía confocal in vivo en un modelo celular de microcefalia primaria tipo 1, y poder estudiar así posibles alteraciones en la dinámica del ciclo celular.

Palabras clave: microscopio confocal in vivo, ciclo celular, mitosis, MCPH1, DRAQ5, SiR-DNA.

ABSTRACT

In recent years, the need to carry out in vivo studies of cell functions has increased in order to advance in the study of certain pathologies such as type 1 human microcephaly. Therefore, in order to carry out the in vivo study of mitotic progression by means of chromatin staining, it is necessary to use stains that are not toxic and can damage the cells, preventing them from carrying out their biological processes as they would in the physiological environment. To do this, different compounds that mark chromatin have been tested on a RPE-1 cell model to be able to observe the process of mitotic division in vivo through confocal microscopy. The results shown in this Final Degree Project will serve to optimize the analysis by confocal microscopy in vivo in a cellular model of primary microcephaly type 1, and thereby be able to study possible alterations in the dynamics of the cell cycle.

Keywords: in vivo confocal microscope, cell cycle, mitosis, MCPH1, DRAQ5, SiR-DNA.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Microscopía confocal

Dentro del campo de la microscopía, se han ido mejorando los instrumentos y las técnicas con el fin de obtener resultados más óptimos.

En microscopía de campo claro, la luz de iluminación pasa a través de la muestra de la manera más uniforme posible en el campo de visión. Para muestras más gruesas, donde la lente del objetivo no tiene suficiente profundidad de enfoque, también se detectará la luz de los planos de muestra por encima y por debajo del plano focal. La luz desenfocada agrega desenfoque a la imagen, reduciendo la resolución (Casares-Arias, J. et al., 2021).

En microscopía de fluorescencia, se estimula cualquier fluoróforo en el campo de visión, incluidas las que se encuentran en planos desenfocados. Sin embargo, la microscopía confocal proporciona un medio para rechazar la luz desenfocada del detector. Su principio básico es que las ópticas de iluminación y detección se enfoquen en el mismo punto de difracción limitada, que se mueve sobre la muestra para construir la imagen completa. De manera que no contribuye a la borrosidad, permitiéndonos obtener imágenes de alta resolución en muestras con un grosor mayor y, además, mejora la resolución espacial, en particular en el plano «z» (plano de profundidad), generando información muy precisa.

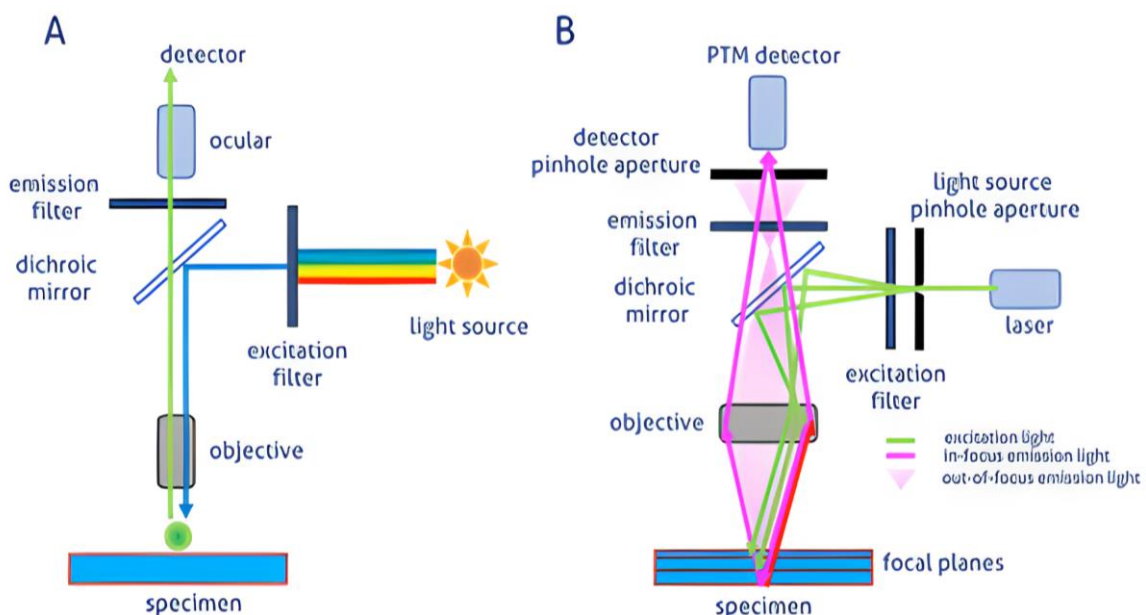


Figura 1.1 Generación de la imagen en: a) Campo Amplio o bien b) Confocal. (Tomada de Inmunofluorescencia: campo amplio versus confocal. (2019). Labclinics.com; weblab.immograf.com).

Las principales funciones de un microscopio confocal son producir una fuente puntual de luz y rechazar la luz desenfocada. Una ventaja importante del microscopio confocal es el corte óptico proporcionado, que permite la reconstrucción 3D de una muestra a partir de pilas de imágenes de alta resolución (Elliott, A. D., 2019). Los componentes básicos de este microscopio son los orificios, las lentes objetivo y los detectores de bajo ruido, también pueden incluir espejos de escaneo rápido, filtros para la selección de longitud de onda e iluminación láser. Dentro de todos estos componentes, lo más importante en el proceso de microscopía confocal es elegir bien la técnica, los fluoróforos, el objetivo, los componentes ópticos y el medio de montaje para llegar a obtener las mejores imágenes.

Para algunos tipos de estudios concretos, las estructuras biológicas deben marcarse con moléculas fluorescentes. Podemos analizar imágenes de secciones de tejidos que contengan moléculas y/o células marcadas con fluoróforos o con capacidad autofluorescente, así como a partir de cultivos celulares. El método de montaje para tejidos fijos y muestras vivas pueden afectar a la forma 3D y la resolución que se puede llegar a obtener. Para imágenes confocales en vivo, se obtienen resultados más óptimos en medios libres de colorantes indicadores de pH.

El proceso de toma de imágenes en microscopía confocal se basa en colocar la muestra en la platina del microscopio e ir moviendo la platina o el objetivo hacia arriba o hacia abajo al siguiente plano focal. Esto nos dará una imagen volumétrica, lo que nos proporciona información espacial en 3D de la muestra, permitiéndonos medir el volumen, la localización y el área de superficie.

Existen muchos tipos de microscopios confocales, el que hemos utilizado en este trabajo es el modelo TCS SP5II de la casa comercial LEICA (<https://www.leica-microsystems.com/es/productos/microscopios-confocales/detalles/leica-tcs-sp5-ii/>).

Éste se encuentra en el edificio A-2 del Campus de las Lagunillas, formando parte de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Jaén. Además de los componentes comentados anteriormente, cuenta con varias clases de láser. En concreto, con tres clases, cada una tiene su propia configuración y longitud de onda. Así, tenemos el láser VIS, con una longitud de onda dentro del espectro visible (400-700 nm); el láser UV, con una longitud de onda dentro de ambos espectros, tanto el visible como el no visible (350-700 nm) y, por último, el láser MP, igual que antes, con longitudes de onda en ambos espectros de luz, (350-1050 nm).

En microscopio confocal, además, es importante escanear, esto nos ayuda a reducir el área de iluminación del espécimen lo máximo posible, para lograr secciones ópticas muy delgadas. Dicho objetivo se consigue cuando el punto de iluminación está limitado por difracción, no se puede hacer más pequeño físicamente.

Las series 3D en Z se pueden realizar porque la alteración de la posición del foco entre capturas nos permite capturar una serie completa de secciones ópticas, quedando representada su estructura como un conjunto de datos 3D. Naturalmente, tal “imagen” tridimensional no se puede observar directamente, pero contiene información espacial relacionada con las estructuras observadas y, en el caso de múltiples manchas, sus conexiones locales (*Leica Microsystems CMS GmbH, 2005*). Ahora, para capturar una serie 3D tenemos que establecer unos límites superiores e inferiores desplazando desde la parte más superior de la muestra que hayamos seleccionado, dejando marcada la ubicación, hasta la última parte inferior que sea de nuestro interés. A continuación, entre ambas posiciones, tenemos que determinar un número de capturas que se irá realizando automáticamente, generando dicha pila.

Finalmente, el sistema también posee una platina motorizada de escaneado, que será donde se deposite el cubreobjetos, mediante la misma, podremos dirigirnos al cuadrante que queramos para observar el espécimen. Para la observación directa de la muestra, contamos con 5 objetivos. Además, está montado sobre una mesa antivibratoria, de manera que, una vez fijada una sección de interés, no vamos a perderla por una posible turbulencia de la mesa. Aparte de todo esto, como también se ha mencionado la necesidad de establecer un medio lo más similar al medio fisiológico para poder observar correctamente determinadas funciones y que las células se mantengan vivas y en buen estado, contamos con el sistema de incubación, desde el cual podemos controlar la temperatura, concentración de CO₂ y humedad.

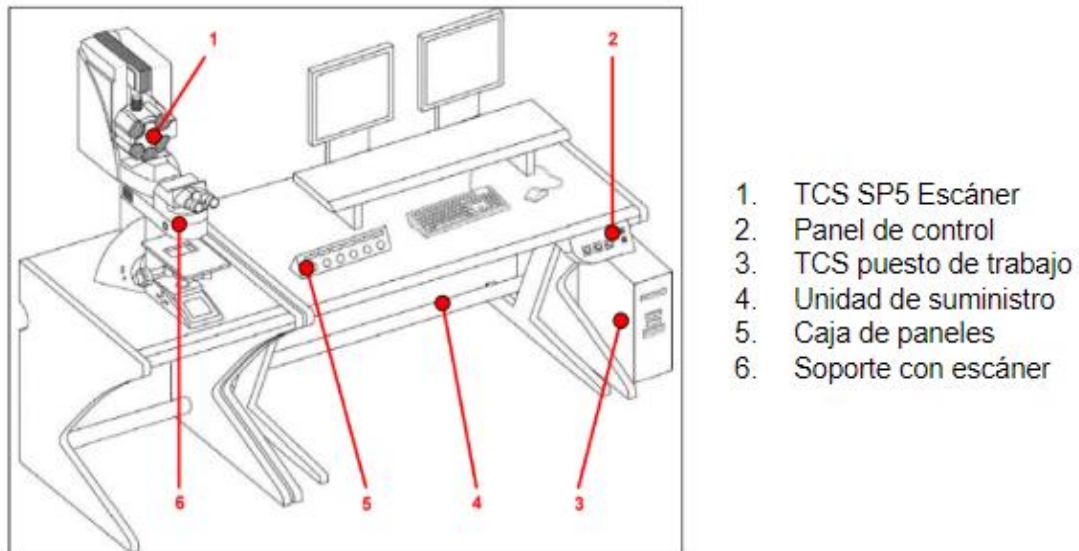


Figura 1.2. Componentes del sistema (resumen). (Tomada de Leica TCS SP5. Manual de usuario).



Figura 1.3. MP06-Microscopio confocal 2. (Tomada de Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación, SCAI. <https://www.ujaen.es/servicios/scai/recursos/mp06-microscopio-confocal-2>).

1.1.1. Imágenes de microscopía confocal de células vivas.

Los dos desafíos experimentales principales en la recopilación de datos significativos de microscopía de células vivas son minimizar el daño que genera la exposición al láser, mientras se mantiene una relación señal-ruido útil, y proporcionar un entorno adecuado para que las células o los tejidos repliquen la dinámica celular fisiológica (Ettinger, A. et al., 2014). La microscopía de fluorescencia es esencial para

una comprensión detallada de los procesos celulares; sin embargo, la conservación de células vivas durante la obtención de imágenes es un tema de debate (*Benard, M. et al., 2021*).

Las imágenes de fluorescencia se basan en la iluminación de biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos) marcadas con fluorescencia en un rango de longitud de onda de luz definida. La emisión de fluorescencia está linealmente relacionada con la intensidad de la luz de excitación siempre que la mayoría de las moléculas fluorescentes de una población no estén en estado excitado. Sin embargo, a tasas más altas de flujo de fotones, una gran proporción de fluoróforos puebla el estado excitado y, por lo tanto, ya no puede absorber fotones adicionales (*Wang, E. et al., 2005*). Esto se conoce como agotamiento del estado fundamental, y la luz de excitación adicional solo producirá aumentos subproporcionales en la señal de fluorescencia, pero continúa contribuyendo al fotodaño.

Aunque la luz de alta intensidad es dañina para las células, los principales efectos fototóxicos en la microscopía de fluorescencia de células vivas se encuentran en el fotoblanqueo que provoca el fluoróforo. Esto se refiere a que cada vez que iluminamos una muestra fluorescente, se destruyen irreversiblemente fracciones de fluoróforos. Además de disminuir la señal de fluorescencia disponible con cada exposición, el fotoblanqueo genera radicales libres y otros productos de degradación altamente reactivos (*Ettinger, A. et al., 2014*). La forma más segura de reducir el fotodaño y el fotoblanqueo es reducir la exposición a la luz de excitación limitando el tiempo de exposición y la intensidad de la misma lo máximo posible.

Si bien, no es posible optimizar todos los componentes de una configuración del microscopio, hay factores importantes que deben tenerse en cuenta:

- **Ruta de luz de excitación y emisión.** Tanto las longitudes de onda de los filtros de excitación como la emisión, deben optimizarse para que coincidan con nuestro fluoróforo. Así, limitaremos exposiciones innecesarias. El aumento de la potencia del láser también puede provocar fotoblanqueamiento o fototoxicidad (*Ranjan, R. et al., 2021*). También hay que tener en cuenta la luz de fondo, que preferiblemente debe permanecer apagada, y minimizar la luz dispersada en imágenes de campo amplio. Esto último lo podemos conseguir cerrando el diafragma tanto como podamos.
- **Lente del objetivo.** Anteriormente mencionamos que la irradiancia de la muestra aumentaba con la ampliación. Para limitar este daño, debemos utilizar

el aumento más bajo que permita nuestro diseño experimental. Las características de los objetivos del microscopio también son parámetros clave para mejorar las condiciones de obtención de imágenes de células vivas (Benard, M. et al., 2021).

- **Cámara.** Para detectar señales fluorescentes tenues, es fundamental utilizar cámaras refrigeradas de grado científico con el ruido de lectura más bajo posible. El ruido más bajo permite la detección de la señal del atenuador. (Ettinger, A. et al., 2014).
- **Enfoque automático de hardware.** La desviación del enfoque puede resultar problemático en imágenes de alta resolución en un determinado lapso de tiempo. Hasta cierto punto, la desviación del enfoque se puede minimizar mediante el uso de prácticas correctas. Pero, en experimentos con una duración mayor a varios minutos, cómo será nuestro caso, esto no es suficiente. Los sistemas de enfoque automático de hardware se basan principalmente en la detección de un reflejo de un haz de luz IR cercano desde la interfaz entre el cubreobjetos de vidrio y el medio de cultivo de tejidos, y utilizan la deriva de este reflejo como retroalimentación para el controlador de enfoque monitorizado. (Ettinger, A. et al., 2014).
- **Etapas monitorizadas.** La adquisición multipunto permite la recopilación de datos paralelos desde muchos campos de visión, lo que es especialmente importante para experimentos de lapso de tiempo más largos o tratamientos farmacológicos que solo se pueden realizar una vez por muestra. (Ettinger, A. et al., 2014). Para experimentos donde sea necesario utilizar grandes aumentos, la precisión con la cual la platina cambie de posición es esencial. Por tanto, a gran aumento, es inevitable cierta imprecisión al volver a la posición anterior y será visible una ligera fluctuación en las secuencias de lapso de tiempo. Sin embargo, esto a menudo se puede corregir mediante algoritmos de alineación de imágenes basados en correlación. (Ettinger, A. et al., 2014).

Además de estos factores a tener en cuenta, también hay que observar el control ambiental del microscopio, necesario para el mantenimiento de las células vivas o tejidos cultivados. Creando así un entorno muy semejante, sino igual, al fisiológico. Los factores más destacados serían:

- **Temperatura.** Es el nivel más básico de control ambiental para poder asegurar una dinámica celular que represente su comportamiento celular in vivo. Muchos

tipos celulares se estancan e incluso invierten el ciclo a 20–22°C (Cole, R. 2014). Hay varios diseños que pueden utilizarse para lograr este control, pero eso ya dependerá de nuestro equipo y el experimento a realizar.

- **Composición y pH de los medios.** El medio no sólo proporciona los nutrientes que necesitan las células, sino que también es su entorno (Cole, R. 2014). La mayoría de los medios de cultivo de tejidos se tamponan a pH fisiológico con bicarbonato de sodio y CO₂ al 5%. Por lo tanto, el pH en una placa de cultivo de tejidos abierta en una platina de microscopio aumentará rápidamente y abandonará el rango fisiológico en cuestión de minutos a medida que el CO₂ se libere a la atmósfera. (Ettinger, A. et al., 2014). Una forma de mantener el control es mediante la adición de HEPES 10-25 mM. Sin embargo, por sí mismo no puede controlar por completo la alcalinización de los medios tamponados con bicarbonato, también hay que tener en cuenta cómo afecta a los resultados de nuestro experimento. Un enfoque mejor, pero técnicamente más complicado, es controlar la concentración de CO₂ de modo que se pueda usar un medio de cultivo tisular normal, lo que puede ser especialmente importante para los experimentos de obtención de imágenes a largo plazo. (Ettinger, A. et al., 2014).
- **Cámaras de imágenes.** Para la microscopía de células vivas, estas son generalmente cultivadas en cubreobjetos. Los cubreobjetos deben limpiarse antes de sembrar las células. También puede llegar a ser necesario cubrir el cubreobjetos con moléculas de matriz extracelular apropiadas para facilitar la adhesión y promover la dinámica celular normal. Es importante tener en cuenta que las cámaras de imágenes con partes inferiores más gruesas que la distancia de trabajo de un objetivo de aceite de NA alto, que normalmente está en el rango de 0'1 a 0'2 mm, deben usarse con mucho cuidado para evitar dañar la lente frontal del objetivo. (Ettinger, A. et al., 2014). Una solución alternativa a este posible problema son las placas de cultivo celular desechables. También, hay que tener en cuenta que una placa de cultivo abierta a 37°C, hará que se evapore una gran cantidad de agua, aumentando la osmolaridad del medio, afectando negativamente a la dinámica celular. Por lo tanto, incluso en experimentos relativamente cortos, deben usarse placas de cultivos cerradas. (Ettinger, A. et al., 2014).

- **Proteínas fluorescentes.** Para proporcionar la longitud de onda de luz correcta y recopilar la mayor cantidad de señal posible, es necesario optimizar los conjuntos de filtros de excitación y emisión. (*Ettinger, A. et al., 2014*). Los filtros de microscopios confocales de disco giratorio tienen más dificultades al adaptarse por ser menos flexibles que los filtros de epifluorescencia. Esto es porque los divisores de haz funcionan a la inversa, la luz de emisión es la que se refleja, haciendo que haya menos opciones disponibles. También, vemos que las longitudes de onda de excitación en confocales de disco giratorio u otros sistemas que utilicen el láser, están limitadas a un pequeño número de líneas láser disponibles con suficiente potencia.

1.2. Estudio in vivo de la cromatina

La cromatina está formada por ADN envuelto alrededor de un octámero de nucleosomas, que están compuestos por las proteínas histonas centrales H2A, H2B, H3 y H4. Las variantes de histonas también pueden sustituir algunas de las histonas centrales (*Lakadamyali, M. et al., 2015*). Los nucleosomas se compactan conjuntamente en la fibra de cromatina y la histona H1 es la que contribuye a dicho empaquetamiento. La organización spatiotemporal de la cromatina está regulada en el núcleo a diferentes niveles. Las modificaciones epigenéticas, como la metilación del ADN, están involucradas en su regulación y juegan un papel en la función del genoma. La visualización en células vivas de la cromatina y sus modificaciones se ha convertido en unas herramientas muy buenas para monitorizar el funcionamiento y regulación de la cromatina de manera dinámica. Para ello, se pueden emplear pequeñas moléculas de unión a la misma, o bien proteínas fluorescentes de unión a la cromatina.

También se ha demostrado que la acetilación de histonas aumenta la accesibilidad de la cromatina a los marcadores fluorescentes (*Görisch, S. M. et al., 2005*).

La visualización de proteínas asociadas a la cromatina requiere el acoplamiento a las mismas de algún “tag” o marca fluorescente. Una de las opciones más empleadas es sobreexpresar de manera transitoria estas proteínas de interés etiquetadas con algún “tag” o “reporter” fluorescente (*Lakadamyali, M. et al., 2015*). Sin embargo, la sobreexpresión transitoria de proteínas etiquetadas puede producir una serie de problemas como una función alterada o una mala localización subcelular de las mismas. Con el advenimiento de las tecnologías de edición de genes, como los dedos

de zinc, TALEN (“transcription activator-like effector nuclease”) y CRISPR/Cas9 (“clustered regularly interspaced short palindromic repeats coupled with the endonuclease Cas9”), es más fácil marcar las proteínas modificando genéticamente los locus de los genes endógenos e insertando los genes “reporter” de interés en el genoma (*Lakadamyali, M. et al., 2015*). Los genes endógenos más empleados para esta aplicación son los de las histonas. También se puede realizar el marcaje de proteínas asociadas a la cromatina mediante el uso de pequeños fluoróforos orgánicos junto con anticuerpos.

Otra aproximación es el uso de dominios de proteínas que se unen débilmente a modificaciones específicas. Además, pueden repetirse para crear una sonda de unión más fuerte que luego se etiqueta con una proteína fluorescente. También se ha demostrado que los fragmentos de unión a antígeno y los fragmentos variables monocatenarios de anticuerpos específicos pueden servir como sondas de unión sin alterar la división celular, desarrollo o diferenciación. Se pueden crear otras sondas usando un sistema de unión bivalente, como la complementación de fluorescencia o la quimioluminiscencia de luciferasa.

Por otra parte, la cromatina también se puede visualizar in vivo mediante la aplicación de moléculas que se unen al ADN y emiten fluorescencia. Algunos ejemplos se recogen en la siguiente tabla.

Tabla 1.1. Algunos tipos de tinciones fluorescentes. De realización propia.

Tinciones	Origen/Función	Longitud de onda (absorción y emisión)
SYBR Green	Es un agente intercalante utilizado en la tinción de ADN para el análisis mediante electroforesis de productos de PCR.	A: 498 nm. E: 522 nm.
TOTO™-1	Tinción de ácido nucleico de alta afinidad, impermeable a las células, basada en un dímero de colorante de cianina simétrico que es esencialmente no fluorescente en ausencia de ácidos nucleicos <i>Thermo Fisher Scientific (2022)</i> .	A: 514 nm. E: 533 nm.
YOYO™-1	Tinción de ácido nucleico de gran afinidad, es impermeable a las células.	A: 491 nm. E: 509 nm.
SYTO™	La tinción puede presentar diferentes comportamientos con varios tejidos y células.	Diverso
PicoGreen	Para obtener mediciones precisas de la concentración de ADNbc.	A: 500 nm E: 525 nm

Además de éstas, a continuación, vamos a hablar más en detalle de otras dos moléculas y su aplicación para el estudio de la división celular *in vivo*.

1.2.1. DRAQ5 y SiR-DNA

La sonda fluorescente DRAQ5 (1,5-bis {[2-(dimetilamino) etil]amino}-4, 8-dihidroxiantraquinona-9,10-diona), es una tinción de ADN de rojo lejano lipofílica para células vivas y de fácil multiplexado con otros fluoróforos (A: 647 nm y E: > 665 nm a infrarrojo > 800 nm). Se suele elegir para la tinción de núcleos y la medición del contenido de ADN en estudios de proliferación celular (*Thermo Fisher Scientific 2010*), debido a que penetra muy rápidamente en el núcleo y tiñe el ADN estequiométricamente sin efectos citotóxicos graves aparentes (*Pierre-Olivier. M. et al., 2010*).

Como características podemos decir que es un tinte fluorescente de rojo a infrarrojo específico para el ADN (núcleos y cuantificación de ADN). Este colorante lipofílico y que permea las membranas resulta eficaz para la tinción del ADN en células vivas, así como células fijas. Posee varias ventajas para visualizar el ADN en células vivas en comparación con otros tintes de ADN como DAPI (A: 350 nm y E: 470 nm) y Hoechst 33258 (A: 346 nm y E: 460 nm), principalmente porque su color rojo intenso no interfiere con otras especies fluorescentes utilizadas para marcar proteínas y al mismo tiempo evita el uso de radiación ultravioleta tóxica como fuente de excitación (*Pierre-Olivier, M. et al., 2010*).

Las aplicaciones son diversas: citometría de flujo, citometría de barrido de flujo y láser, adquisición de imágenes de células vivas, ensayos basados en células.

DRAQ5 es un compuesto antraquinónico y soluble en agua y tampones habituales. Se une al surco menor del ADN mediante la imitación de la estructura de la histona H2B (...) (*Thermo Fisher Scientific (2010)*).

Según un estudio realizado por *Paul J. Smith et al., 1999*, DRAQ5 podría activarse de forma subóptima mediante la línea de 488 nm de un láser de iones de argón (*Smith. J, P. et al., 1999*). Aquí describen la capacidad de este novedoso agente fluorescente rojo lejano/infrarrojo para teñir el ADN de células humanas viables, en comparación con LDS-751, y demostraron su aplicación para el análisis rápido de preparaciones de sangre total y aislada (*Smith. J, P. et al., 1999*). También se ha utilizado en este estudio como un parámetro de discriminación de células de linfoma y leucocitos humanos.

SiR-DNA (SiR-Hoechst*) es una tinción nuclear de células vivas basada en el ligante del surco menor de ADN bisbenzimidaz, que permite el marcaje en células vivas con alta especificidad y baja señal de fondo. SiR-DNA es fluorogénico, permeable a las células y altamente específico para el ADN (*Spirochrome Probes for Bioimaging*, 2021). Tiñe los núcleos sin necesidad de manipulación genética o sobreexpresión. Su emisión en el rojo lejano (A:652 nm - E:674 nm) minimiza la fototoxicidad y la autofluorescencia de la muestra. Es compatible con GFP y/o proteínas fluorescentes tipo mCherry. Muchos autores lo consideran una alternativa menos citotóxica al compuesto DRAQ5. SiR-DNA se puede utilizar en microscopio de campo amplio, confocal, SIM ("Structured illumination microscopy") o STED ("Stimulated emission depletion"). Este reactivo parece tener múltiples ventajas sobre las sondas existentes como los colorantes como Syto61 (A: 628 nm - E: 645 nm), DRAQ5 o Vybrant DyeCycle Ruby (Infrarrojo cercano), su fluorescencia aumenta con la unión al ADN; es excitado por la luz roja lejana, evitando el daño causado por la luz ultravioleta requerida para los tintes Hoechst tradicionales; y es compatible con la microscopía de superresolución de células vivas (*Sen, O. et al., 2018*).

1.3. Aplicación de análisis in vivo de cromatina a modelos celulares de microcefalia primaria MCPH1

MCPH1 es un gen cuyas mutaciones originan microcefalia primaria humana tipo 1, un síndrome genético raro de carácter autosómico recesivo (*Neitzel, H. et al., (2002); Trimborn, M. et al., 2004*). Se trata de un trastorno del neurodesarrollo caracterizado por un tamaño cerebral más pequeño al nacer, debido a una disfunción en la regulación de la proliferación de las células neuroprogenitoras. (*Kristofova, M. et al., 2022*). Se estima que la falta de función para el gen MCPH1 produciría este fenotipo clínico por algunas de estas vías: orientación alterada del huso mitótico, condensación cromosómica prematura, respuesta alterada al ADN dañado, dinámica de microtúbulos, control transcripcional o algún mecanismo centrosómico alterado. (*Faheem, M. et al., 2015*).

La microcefalia primaria tipo 1 también es alélica del síndrome de condensación cromosómica prematura (PCC, OMIM606858), caracterizado por una alta proporción de células similares a la profase (*Trimborn, M. et al., 2004*). MCPH1 fue el primer locus

identificado en el síndrome de microcefalia primaria y es uno de los genes mutados con mayor frecuencia, junto con ASPM (MCPH5) y WDR62 (MCPH2) (*Kristofova, M. et al., 2022*). En particular, todas las mutaciones sin sentido identificadas en pacientes MCPH1 abarcan la región del dominio BRCT N-terminal de la proteína (codificada por los exones 2 y 3) y dan como resultado cambios no conservativos en los residuos de aminoácidos. (*Kristofova, M. et al., 2022*).

Hasta la fecha, 29 loci han sido identificados como causantes de MCPH, con 28 loci enumerados en la base de datos “Online Mendelian Inheritance in Man” (OMIM) (*Kristofova, M. et al., 2022*). La continua expansión de la lista muestra una alta heterogeneidad genética en el síndrome MCPH. Muchos de estos genes están implicados en diversos procesos moleculares y celulares que contribuyen a la etiología de este síndrome. La gran mayoría de ellos desempeñan un papel en la función del centrosoma y la alineación del huso mitótico (*Jean, F. et al., 2020*). Se sabe que el centrosoma, el cual se encarga de organizar los microtúbulos, regula la posición y dinámica de la estructura de los mismos. Por lo tanto, la microcefalia primaria a menudo se considera una forma de ciliopatía, un grupo de enfermedades caracterizadas por cilios disfuncionales (*Thomas, S. et al., 2019*). Durante el desarrollo del cerebro de los mamíferos, el centrosoma es el responsable de controlar el comportamiento celular polarizado de las células neurales desde la determinación del destino de los progenitores hasta la migración neuronal y la navegación del crecimiento axonal (*Joukov, V. et al., 2019*).

Las mutaciones en el gen MCPH1 producen un fenotipo celular de condensación cromosómica mal regulada (*Trimborn, M. et al., 2004; Gavvovidis, I. et al., 2010*). En concreto, los estudios basados en modelos celulares procedentes de pacientes con mutaciones en el gen MCPH1 muestran un incremento enorme de células con una apariencia similar a profase. La cromatina de estas células se encuentra muy condensada, y esto se debe a la condensación prematura de la misma en la fase G2 del ciclo celular y a la descondensación retardada en la fase G1 temprana (*Neitzel, H. et al., (2002), Arroyo, M. et al., 2017*). Estudios posteriores han confirmado este punto en otros modelos celulares que replican la falta de función de este gen mediante silenciamiento temporal de su expresión por RNAi (*Trimborn, M. et al., 2004; Arroyo, M. et al., 2015*).

Además de este fenotipo celular, se han descrito otros defectos moleculares y celulares asociados con las mutaciones en este gen, que se resumen a continuación:

- **Función del centrosoma y viabilidad celular.** La evidencia indirecta de la localización del centrosoma se obtuvo a través de experimentos que muestran que la pérdida de MCPH1 conduce a la amplificación del centrosoma y al ensamblaje defectuoso del huso. En respuesta al daño del ADN, MCPH1 forma IRIF (“Ionizing radiation-induced foci”) y se colocaliza con γ H2AX en el núcleo (Genin, A. *et al.*, 2012). Se sabe que los niveles de proteína de MCPH1 están estrictamente regulados y que la sobreexpresión prolongada de MCPH1 parece ser tóxica para la célula (Schladitz, A-L. *et al.*, 2007). Por ejemplo, la sobreexpresión de MCPH1 en células de carcinoma de pulmón A549 reprimió la proliferación celular descontrolada mediante la detención del ciclo celular en las fases S y G2/M (Barrera, J. A. *et al.*, 2010).
- **Reparación de ADN.** MCPH1 es una proteína que actúa en respuesta al daño en el ADN al reclutar proteínas sensoras y mediadoras de su reparación (Paramasivam, M. *et al.*, 2007). En este sentido, facilita la reparación por recombinación homóloga (HRR) de roturas de doble cadena (DSB) (Haren, L. *et al.*, 2009). Tras el estrés genotóxico y en el sitio IRIF, MCPH1 se co-localiza con muchas proteínas, incluyendo γ H2AX, mediador del punto de control de daños en el ADN 1 (MDC1), proteína de unión a p53 1 (53BP1), ATM, ATR, CHK1, p-RAD17, y proteína de replicación A (RPA34) (Paramasivam, M. *et al.*, 2007). Además, en respuesta a la radiación UV, la fosforilación de RAD17 y RPA34, efectores aguas abajo de la vía ATR, se reduce en las células deficientes en MCPH1 (Arora, K. *et al.*, 2014).
- **Control del ciclo celular.** Se ha descrito que MCPH1 regula la actividad de CDC25A en la vía de señalización dependiente de ATR-CHK1 que se activa durante la fase G2 del ciclo en respuesta a algunos tipos de daño en el ADN. Además, interacciona con dos ligasas de ubiquitina E3: junto con la subunidad β TrCP2 del complejo SCF, regula la progresión de la fase S y la transición G2-M, mientras que interactúa con dos subunidades de APC/C, CDC27 y CDH1 en la mitosis tardía para asegurar la entrada de la fase G1 (Yao, X. *et al.*, 2000).
- **Papel dentro del metabolismo.** Recientemente, se informó del papel de MCPH1 en la regulación de la actividad y el metabolismo mitocondrial, donde MCPH1 interactúa directamente con VDAC1 y GRP75 en NPC (“neural progenitor cells”) humanos y de ratón para mantener la glutaminólisis, una vía

involucrada en la reposición del ciclo del ácido tricarboxílico y es vital para proliferación celular y supervivencia (*Sudakin, V. et al., 2001*).

- **Alineamiento cromosómico en prometafase.** En relación con la división cromosómica, además de controlar el proceso de condensación cromosómica, también se ha demostrado que el alineamiento cromosómico está retrasado en células sin función para MCPH1. En concreto, algunos cromosomas tardan hasta tres veces más en completar este proceso, lo que implica un incremento en la duración de la mitosis (*Arroyo, M. et al., 2017*)

2. OBJETIVOS

Muchos de los estudios moleculares y celulares que investigan la función de MCPH1 requieren el uso de aplicaciones in vivo. En el caso de la división cromosómica y la progresión del ciclo celular, es de gran utilidad analizar en tiempo real dichos procesos sobre tipos celulares con mutaciones idénticas a las que muestran los pacientes. Para ello, se requiere el uso de alguna metodología experimental que permita visualizar in vivo la cromatina.

El grupo de investigación en el que se ha desarrollado este TFG, dispone en el laboratorio de un modelo de células humanas diploides (RPE-1) editadas mediante metodología CrisprCas9 y que contienen una mutación sin sentido en su genoma similar a la que muestran los pacientes MCPH1. Previamente, el grupo de investigación ha validado la falta de función del gen por análisis de Western blot y también ha visto la aparición del fenotipo de condensación cromosómica prematura. El objetivo de este TFG, por ello, es aplicar y optimizar sobre este tipo celular un protocolo experimental en microscopía confocal “live-cell” combinada con la aplicación de agentes intercalantes de unión a la cromatina, en concreto, DRAQ5 y SiR-DNA.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

El material utilizado para desarrollar este trabajo son líneas celulares del epitelio pigmentario de la retina humana-1 (RPE-1), utilizadas como modelo para estudiar la mitosis porque representan una alternativa no transformada a las líneas celulares cancerosas. Estas líneas han sido originadas en el Laboratorio Felipe Cortés en el

CNIO (Madrid), y presentan una mutación obtenida por edición genética basada en CrisprCAS9 tanto en p53 y MCPH1. De manera que el fondo genético de las dos líneas que hemos usado sería: RPE-1 p53^{-/-} (denominadas wt en este trabajo) y RPE-1 p53^{-/-} MCPH1 ^{-/-} (denominadas MCPH1).

La obtención y manejo de estas líneas celulares humanas cuenta con la aprobación del comité ético de los centros de origen (Laboratorio Felipe Cortés, Madrid) y de destino (Universidad de Jaén). El trabajo con estas líneas se ha llevado a cabo en el laboratorio de cultivos celulares del Centro de Instrumentación Científico-Técnico (CICT) de la Universidad de Jaén. Además, los ensayos de microscopía confocal “live-cell” que hemos desarrollado con ellas se han hecho también en la Unidad de microscopía confocal del CICT de la UJA.

3.2. Métodos

3.2.1. Procedimientos básicos de cultivos celulares

Las líneas celulares RPE-1 crecieron en medio DMEM F12 ((Dulbecco's Modified Eagle Medium, INVITROGEN) suplementado con una mezcla de antibióticos (estreptomicina y penicilina) y suero bovino fetal al 10%, en cámaras de cultivo a 37°C y 5% de CO₂. Antes de llevar a cabo los experimentos, se siguieron unos pasos de mantenimiento idénticos para ambos.

Tres veces a la semana, las células eran subcultivadas. Para ello, las células debían tripsinizarse previamente del siguiente modo: eliminamos el medio del frasco donde se encuentran y lo lavamos con 2ml de tripsina (0.05% Trypsin-EDTA, Gibco). Se añade tripsina una segunda vez e incubamos durante cinco minutos a 37°C, manteniendo un control constante con ayuda del microscopio invertido para determinar cuando el total de las células se separa de la superficie del recipiente. Una vez conseguido este objetivo, recogemos y centrifugamos (10 minutos a 1100 rpm) y, el pellet celular se resuspende en un volumen deseado de medio. A continuación, se realiza el recuento celular con la ayuda de una cámara de Neubauer. Una vez determinada la concentración celular, 500.000 cel./ml, se realiza el pase celular para dejarlas a la concentración óptima de cultivo. De modo general, las células RPE se han subcultivado con pases 1:5.

3.2.2. Estudio de microscopía confocal live-cell con agentes intercalantes para el ADN

Para llevar a cabo estos análisis, hay que realizar la siembra de aproximadamente 80.000 células en plaquitas de cultivo especiales. Se trata de placas de 35mm, divididas en cuatro cuadrantes con una zona tratada óptima para la videomicroscopía (casa comercial “CellVis, plate diameter 35mm, well size 20mm, #1.5 glass (0.16mm-0.19mm)”). De este modo, se pueden realizar hasta cuatro ensayos distintos simultáneamente. A cada pocillo se le añade un volumen de medio de cultivo total de 750 μ l y se incuba durante 24 horas en condiciones estándar.



Figura 3.4. “35 mm Glass bottom dish with 20 mm micro-well #1.5 cover glass”. https://www.cellvis.com/35-mm-glass-bottom-dish-with-20-mm-micro-well-number-1.5-cover-glass/product_detail.php?product_id=17

En el segundo día, se realiza la grabación en el microscopio confocal. Pero, antes debe añadirse el agente intercalante de interés a una concentración determinada y por un periodo de tiempo concreto. En este trabajo se ha usado DRAQ5™ (Biostatus) y SiR-DNA (Spirochrome) como marcadores de cromatina. Para DRAQ5™, los ensayos realizados han sido a 100 nM, manteniéndose solo por media hora o bien durante todo el tiempo de grabación. Para SiR-DNA, se ensayaron concentraciones de 500 nM y 1 μ M, manteniéndose solo por una hora o bien durante todo el tiempo de grabación. Antes de añadir estos compuestos, el medio de cultivo se retira y se reemplaza por un medio DMEM especial para microscopía que no lleva rojo fenol (Invitrogen). Esto se hizo con el objetivo de evitar interferencias de éste en la señal emitida por los fluoróforos estudiados.

Las grabaciones se realizaron en el microscopio confocal Leica TCS SP5, disponible en la unidad de microscopía del CITC de la UJA (descrito anteriormente). En concreto, se empleó el objetivo de 20x y la grabación se prolongó durante 8-12 horas, tomando

una imagen compuesta por 4 planos en Z, distanciados 1.5 μM , cada 10 minutos. este último proceso sí que se realizó de la misma forma en ambos experimentos. El microscopio confocal cuenta con una cámara húmeda que mantiene las células en condiciones de cultivo: temperatura, 37°C, y concentración de CO₂ del 5%. El software que maneja dicho equipo es el LAS AF de Leica.

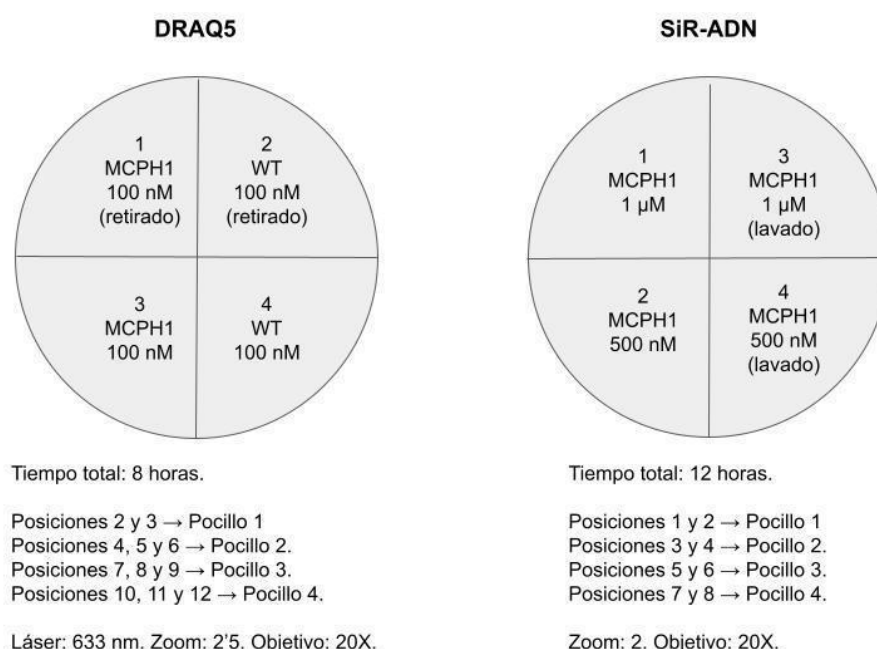


Figura 3.5. Esquema de los experimentos. Realización propia.

3.2.3. Análisis de resultados

Los resultados que contienen todas las imágenes obtenidas se guardan como un archivo. lif, que hemos analizado con el programa de uso gratuito ImageJ-FIJI (Schindelin, J. et al., 2012). En primer lugar, se combinaron las cuatro imágenes de los planos en Z para cada punto temporal en una sola imagen ("Image → stacks → z project → max. Proj"). De este modo obtenemos nuevos stacks compuestos por imágenes únicas tomadas cada 10 minutos. Éstos se analizaron de manera manual siguiendo cada célula a lo largo del desarrollo de la grabación y recogiendo los datos en un archivo excel para su posterior análisis y comparación en gráficas. Los diferentes momentos claves en el inicio y fin de mitosis, así como la ocurrencia de apoptosis, se pueden identificar a través de la morfología y organización de la cromatina y/o cromosomas (condensación cromosómica, alineamiento cromosómico

en placa metafásica, separación de cromátidas anafásicas, fragmentación de cromatina, etc.).

Además, a partir de estas grabaciones, empleando el programa FIJI se realizaron vídeos representativos.

4. RESULTADOS

4.1. Aplicación de DRAQ5 para el estudio de la mitosis en tiempo real.

Con el fin de aplicar y optimizar el análisis por microscopía confocal “*live-cell*” de la dinámica del ciclo celular, hicimos una primera ronda de análisis con el agente intercalante de unión a la cromatina DRAQ5. Los ensayos se hicieron sobre las líneas celulares RPE-1 WT y RPE-1 MCPH1^{-/-}, usando una concentración de 100 nM que se determinó en base a estudios previos. La idea es que esta concentración tan reducida, en comparación con ensayos publicados, resultara lo menos tóxica posible. Además, se aplicaron dos variantes en el uso de DRAQ-5: aplicarlo sólo durante 30 minutos y después mantener las células en medio sin DRAQ-5 o mantener el agente durante todo el tiempo de grabación. Los resultados obtenidos los podemos ver en las siguientes gráficas:

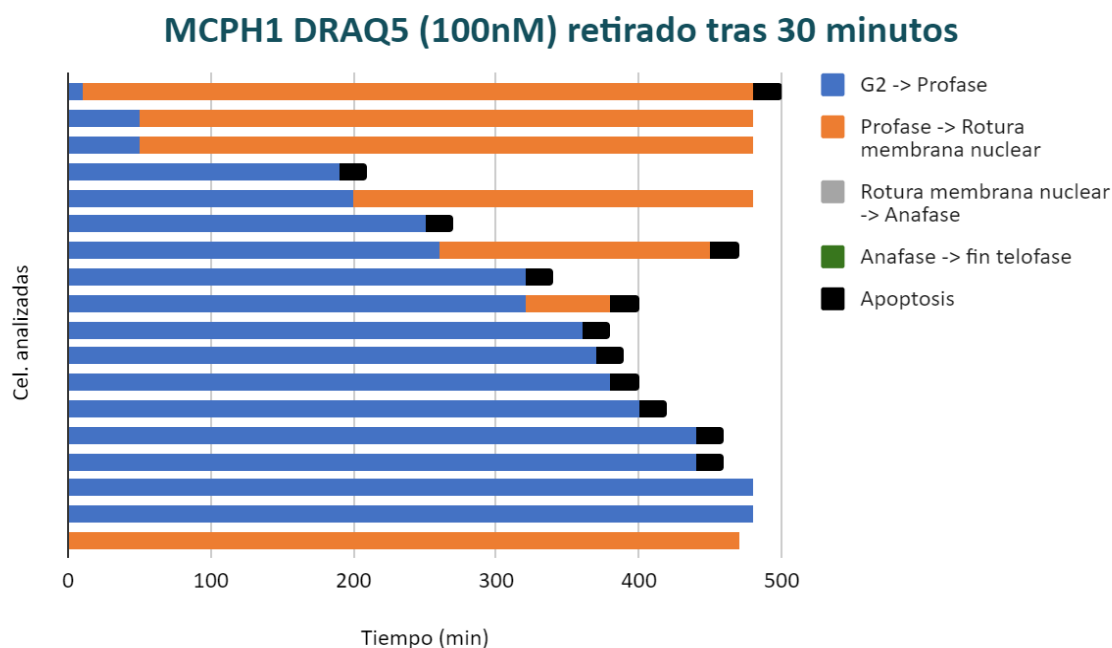


Figura 4.6. Gráfica de células MCPH1 incubadas con DRAQ5 (100 nM) durante 30 minutos. Realización propia.

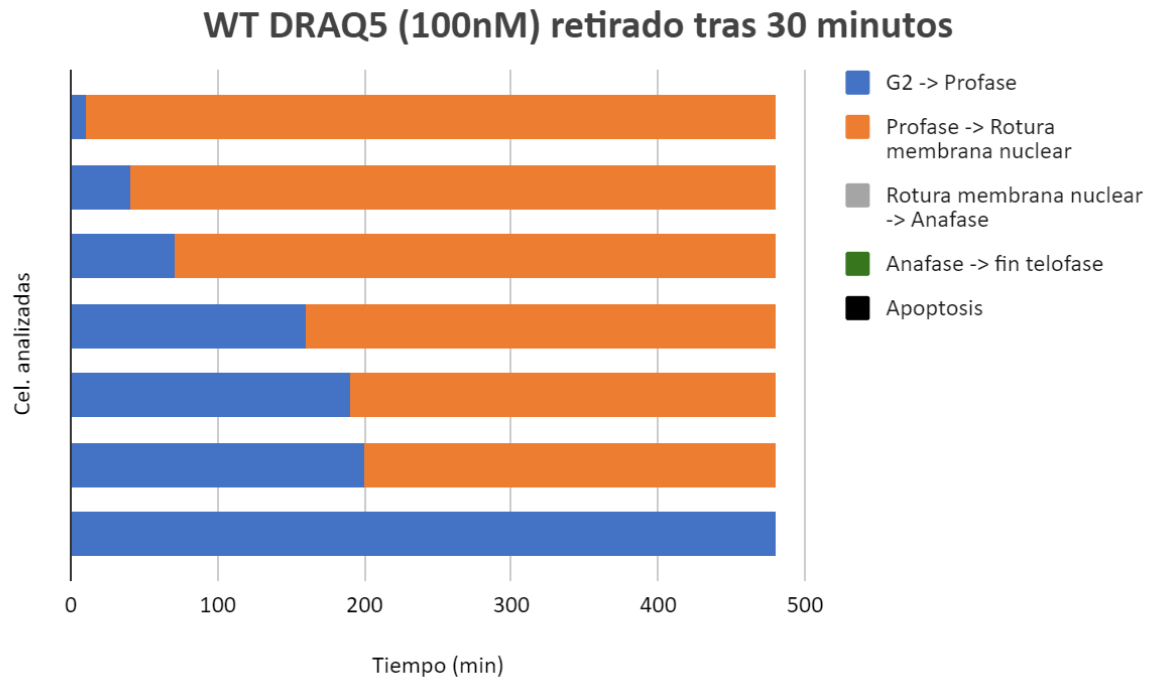


Figura 4.7. Gráfica de células WT incubadas con DRAQ5 (100 nM) durante 30 minutos. Realización propia.

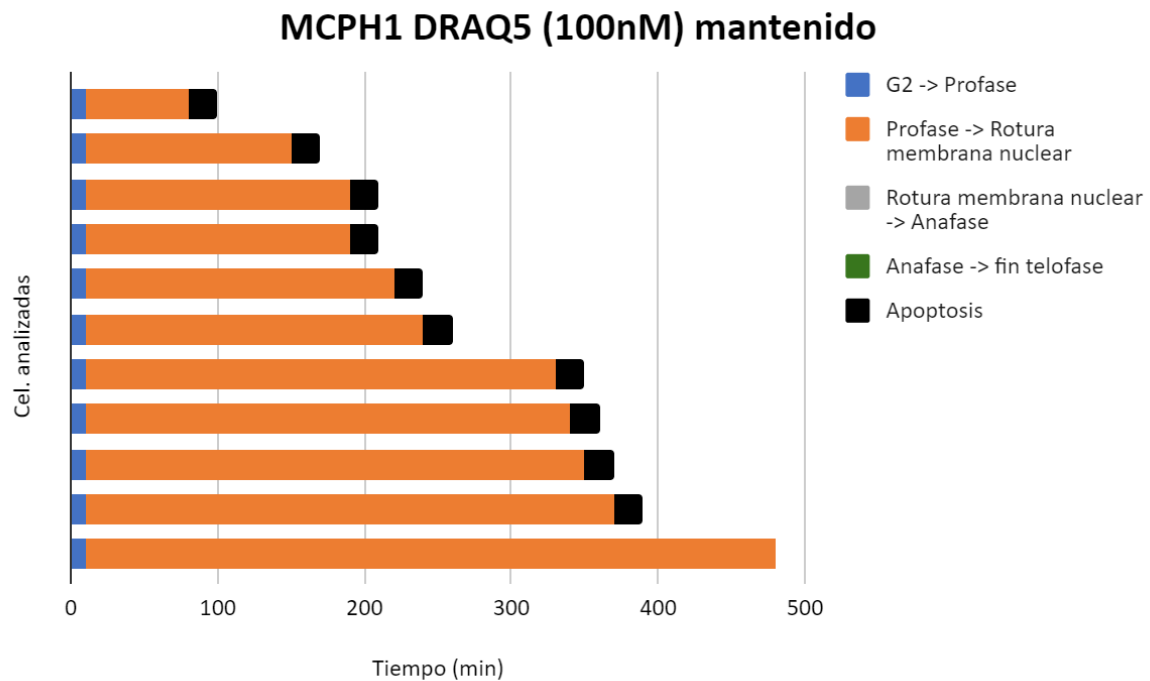


Figura 4.8. Gráfica de células MCPH1 incubadas con DRAQ5 (100 nM) durante toda la grabación. Realización propia.

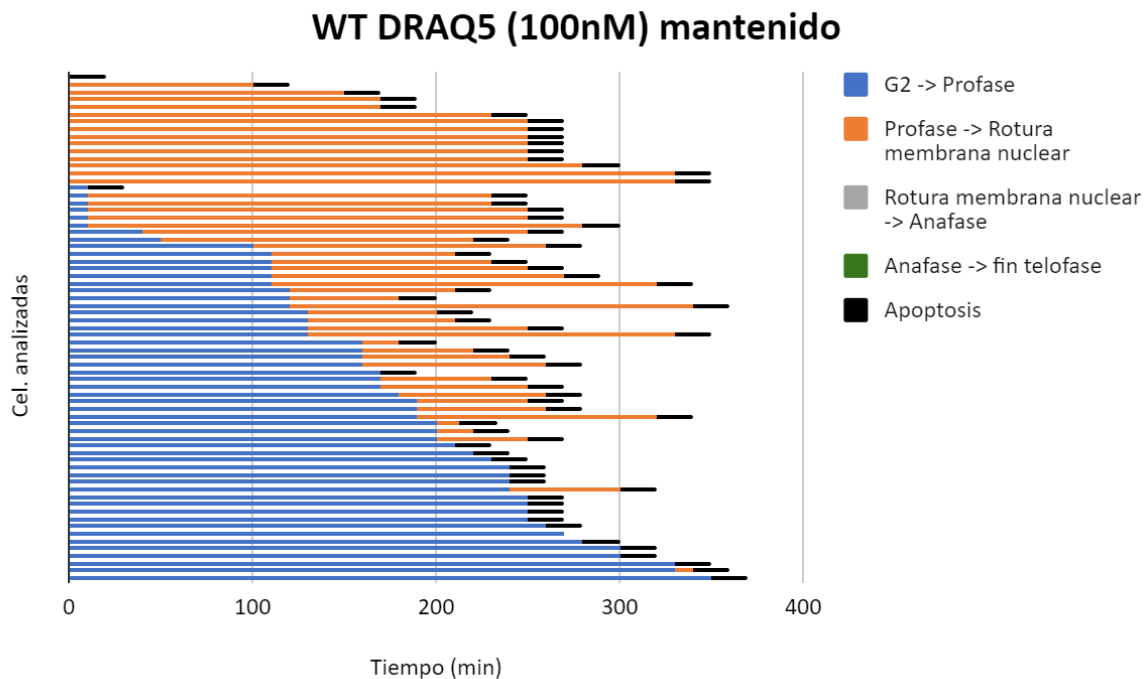


Figura 4.9. Gráfica de células WT incubadas con DRAQ5 (100 nM) durante toda la grabación. Realización propia.

En estas gráficas, para comenzar, observamos que sólo se pudieron analizar un reducido número de células, principalmente en el ensayo en el que se retiró el DRAQ5 tras una incubación de 30 minutos. El ensayo de la figura 4.9. es el único en el cual tenemos un mayor número de las mismas para analizar, con un total de 68 células. Esto puede deberse a la toxicidad del producto, que pudiera haber matado las células antes de su observación incluso cuando se retiró a los treinta minutos, o bien puede deberse a no haberse seleccionado correctamente las mejores posiciones dentro de los pocillos, de modo que se grabaron regiones con muy poco número de células. Sin embargo, nuestros resultados indican que la toxicidad ha sido muy elevada en todos los casos, debido a que, de todas las células observadas en las posiciones seleccionadas, ninguna de ellas consigue completar el proceso de división mitótica. Además, la gran mayoría terminan muriendo antes incluso de entrar en división (determinado por la ausencia de conformación nuclear profásica). Por lo que haber retirado el producto no ha dado resultados efectivos respecto a la finalidad del experimento, el cual busca mejorar las técnicas de tinción de cromatina para la observación del proceso mitótico in vivo. Los resultados obtenidos en la figura 4.7. han sido los mejores respecto a la supervivencia, ya que de las células observadas

ninguna termina en apoptosis. Sin embargo, su progresión en el ciclo celular se ve detenida ya que ninguna consigue iniciar el proceso de rotura de la envoltura nuclear, que es el punto clave para que se lleva a cabo la división mitótica. En cualquier caso, dado que son muy pocas las que se pudieron analizar, estos resultados no son concluyentes.

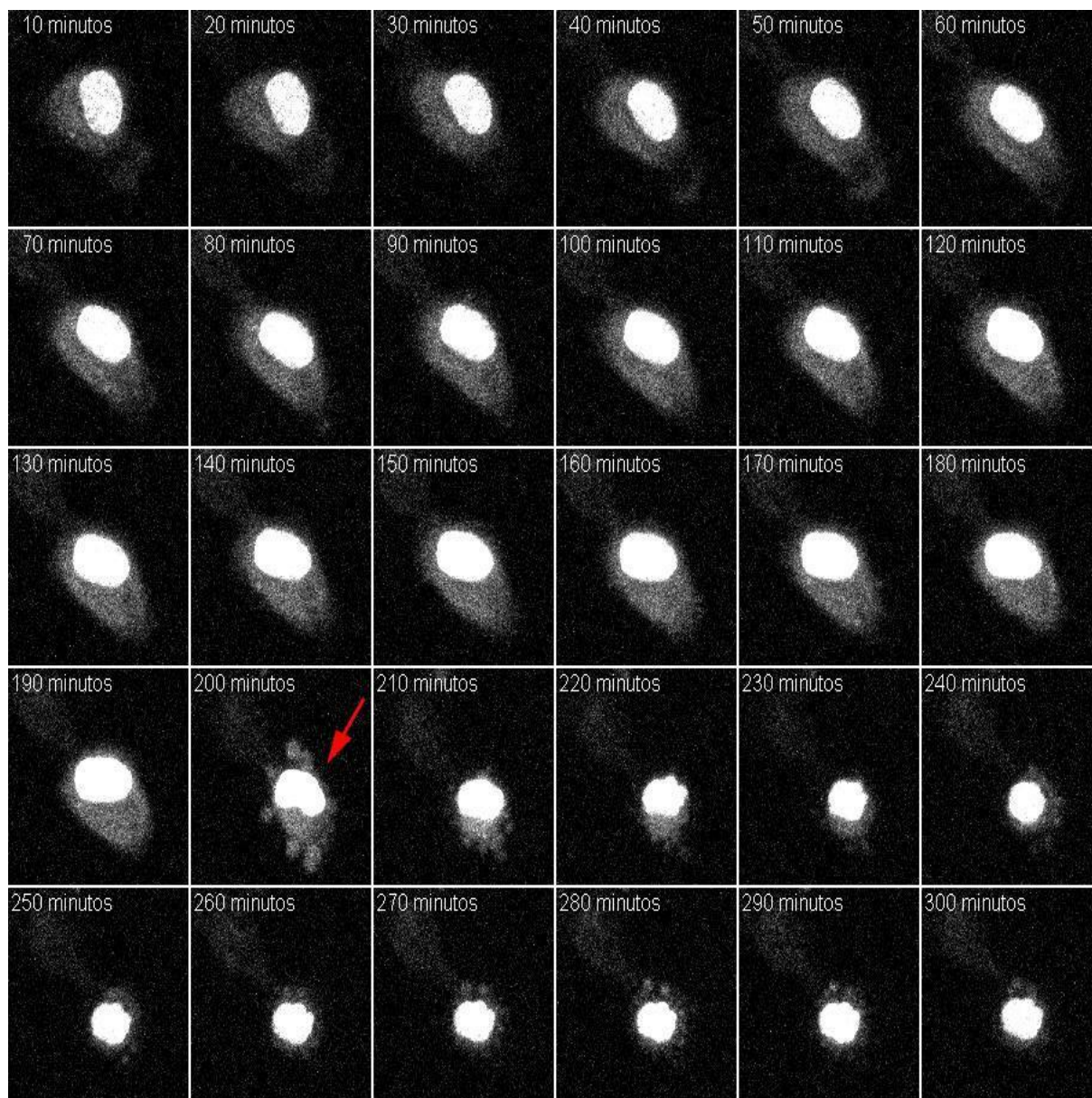


Figura 4.10. Ejemplo de célula MCPH1 incubada por 30 minutos con DRAQ5 100 nM que termina en apoptosis o muerte celular. Realización propia. La flecha marca el momento exacto donde la célula entra en apoptosis.

En la figura 4.10 se muestra una imagen representativa de una de las células que terminan en apoptosis de los experimentos realizados con DRAQ-5.

4.2. Aplicación de SiR-DNA para el estudio de la mitosis en tiempo real.

Dado que DRAQ5, incluso a concentraciones reducidas mostraba una toxicidad elevada, se decidió emplear otro tipo de molécula de reciente desarrollo que a priori provoca menos toxicidad. En concreto, se decidió ensayar dos concentraciones diferentes (500 nM y 1 μ M) de la misma y, hacerlo tanto manteniendo el SiR-DNA todo el tiempo de grabación como lavarlo tras un período de incubación de 1 horas. Dado que el principal interés del proyecto en el que se enmarca este TFG es aplicar esta metodología experimental al estudio de la progresión del ciclo celular en células mutantes para MCPH1, se decidió que los análisis se aplicaron todos sobre células RPE-1 MCPH1 $-/-$. Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes gráficas:

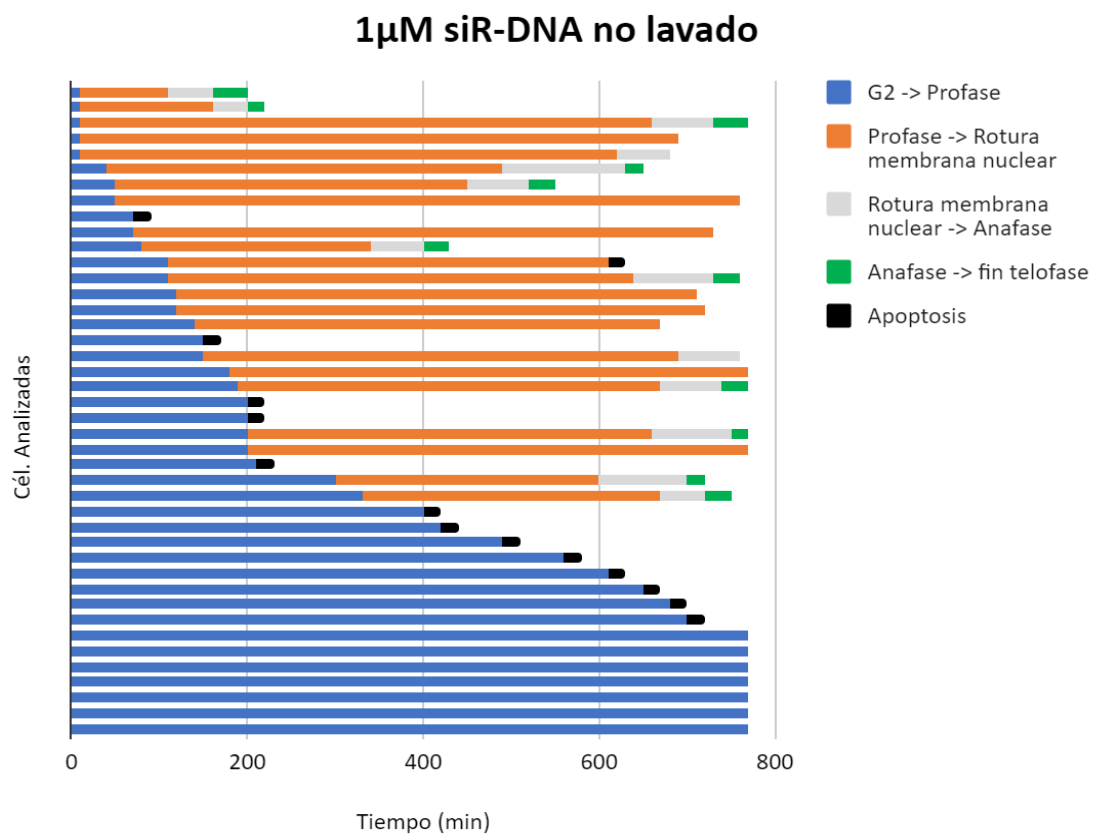


Figura 4.11. Gráfica de células MCPH1 incubadas con SiR-DNA (1 μ M) durante toda la grabación. Realización propia.

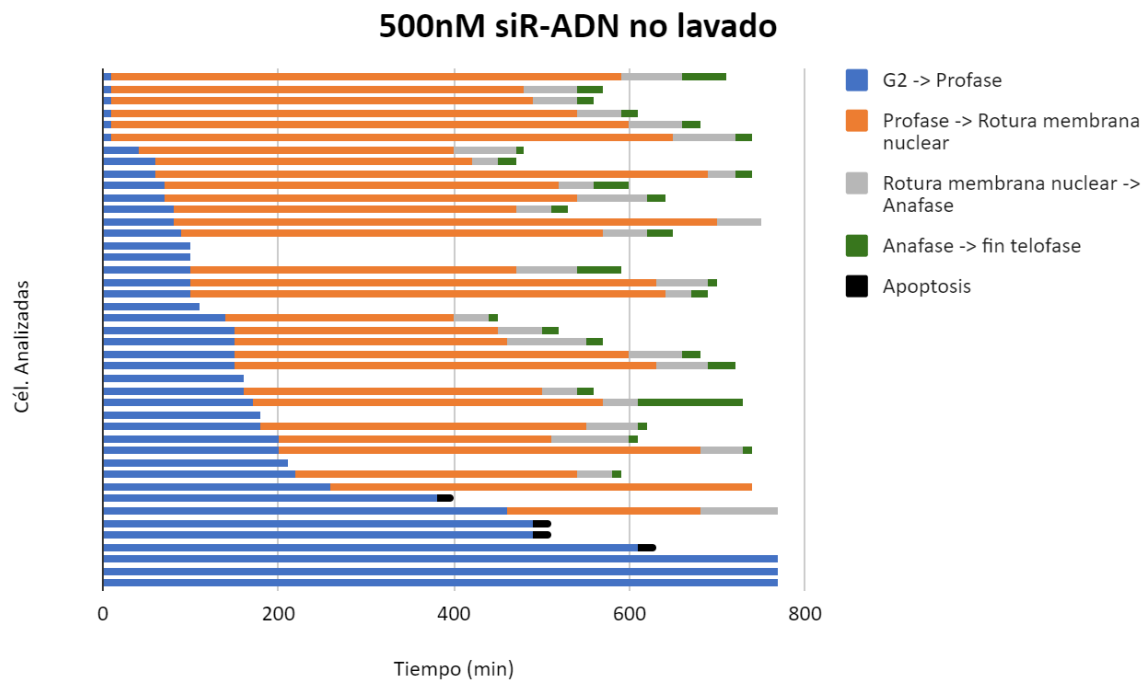


Figura 4.12. Gráfica de células MCPH1 incubadas con SiR-DNA (500 nM) durante toda la grabación. Realización propia.

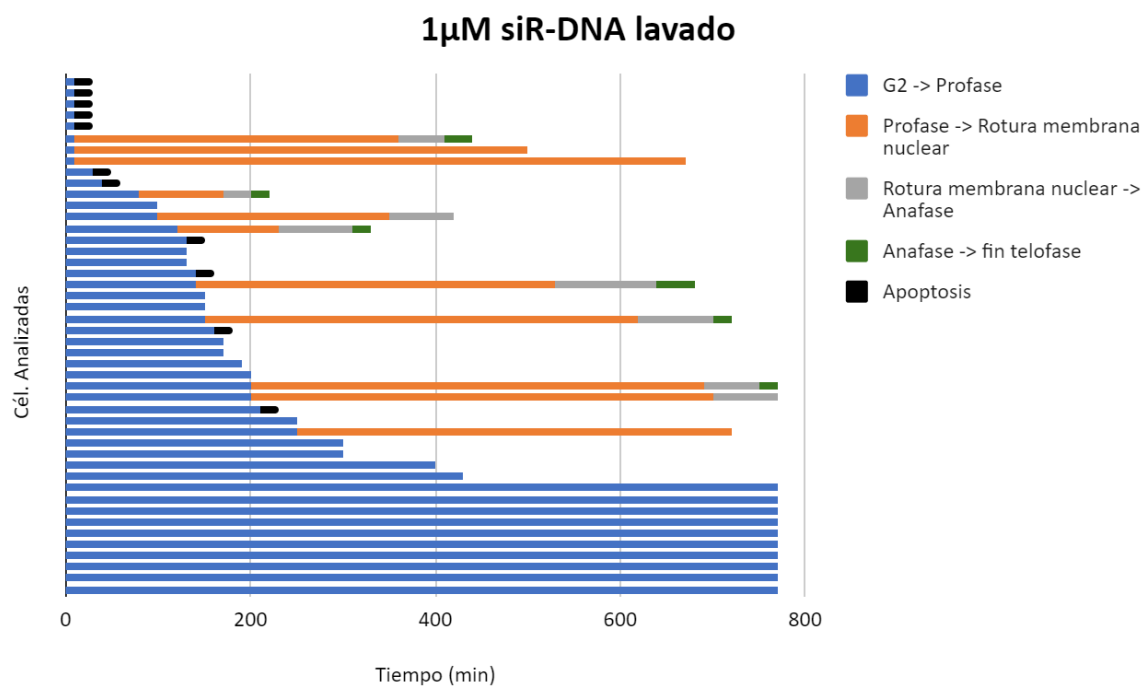


Figura 4.13. Gráfica de células MCPH1 incubadas con SiR-DNA (1 µM) durante 1 hora. Realización propia.

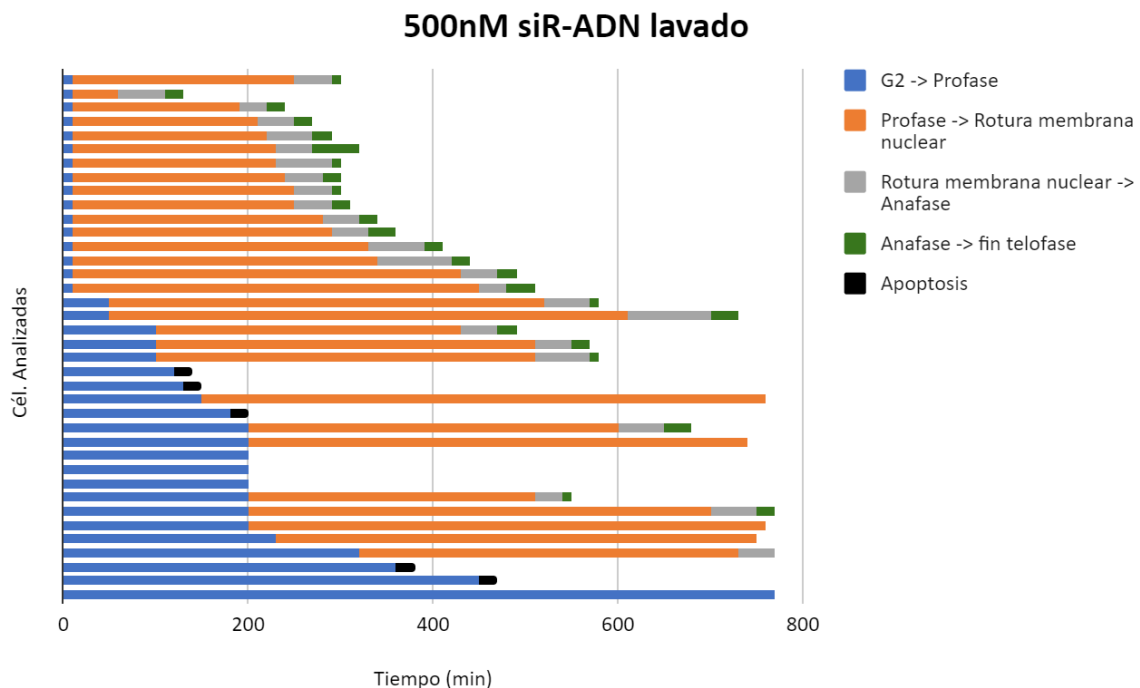


Figura 4.14. Gráfica de células MCPH1 incubadas con SiR-DNA (500 nM) durante 1 hora. Realización propia.

En estos experimentos, a diferencia de los resultados anteriores, observamos una menor toxicidad dado que un gran número de células se mantienen vivas y son capaces de dividirse. Para comenzar, en la figura 4.11., podemos apreciar que una buena proporción de células llega al final de la división mitótica. Algunas sufren apoptosis sin haber comenzado a dividirse y sólo unas pocas sufren apoptosis tras haber comenzado la mitosis, lo que son resultados mucho más positivos que con la tinción de DRAQ5.

Si reducimos la cantidad de Sir-ADN, como vemos en la figura 4.12., la cantidad de células que entran en apoptosis disminuye significativamente, sucediendo sólo a unas pocas de ellas. Respecto al proceso mitótico, también son más las que consiguen salir de la profase y avanzar a la siguiente fase de la división mitótica.

En la siguiente figura 4.13., volvemos a tener la concentración de 1 μ M, pero, en este caso, hemos retirado la tinción tras una hora. En este caso, ha disminuido el número de células que entran en apoptosis con respecto a la concentración 1 μ M no lavada. Aun así, el número de células que entran en división y pasan más allá de la profase ha disminuido.

Finalmente, en la figura 4.14., es donde tenemos a simple vista mejores resultados, el número de apoptosis se encuentra reducido y, gran cantidad de células ha conseguido completar el proceso de división mitótica. Por lo tanto, para llevar a cabo la tinción, esta concentración y posterior lavado serían los más indicados.

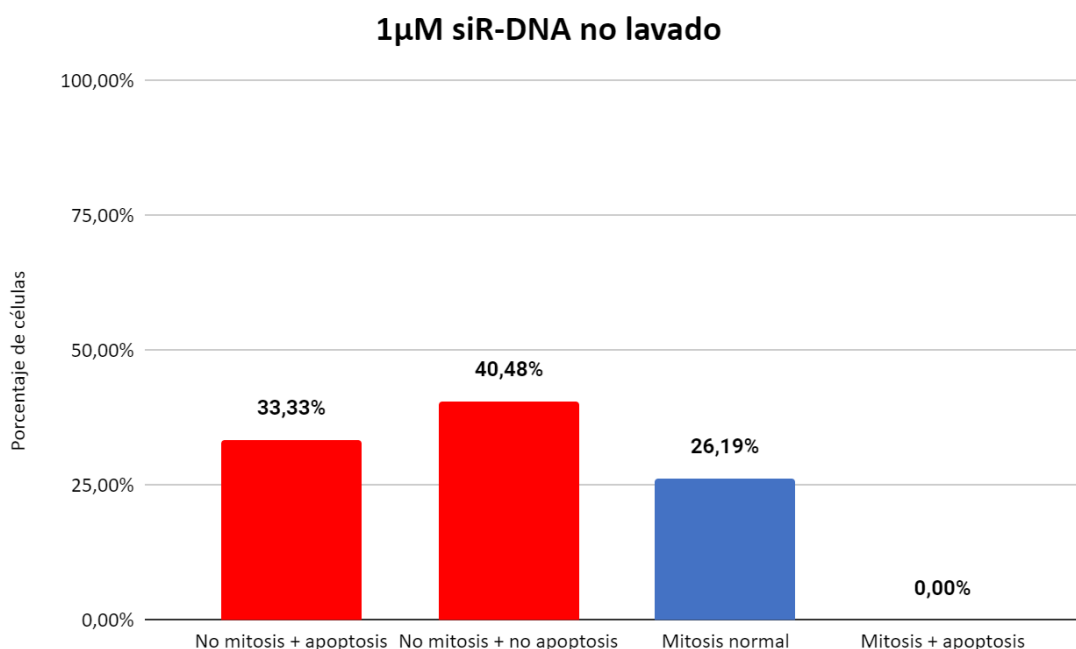


Figura 4.15. Gráfica de MCPH1 con Sir-ADN (1 μ M) mantenido. Realización propia.

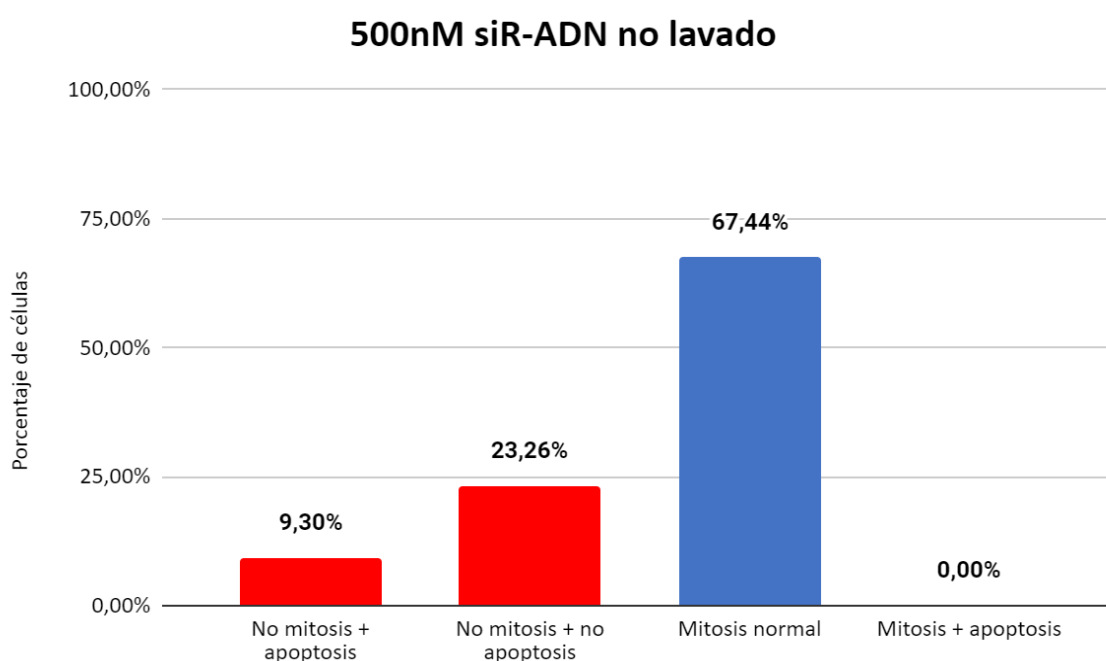


Figura 4.16. Gráfica de MCPH1 con Sir-ADN (500 nM) mantenido. Realización propia.

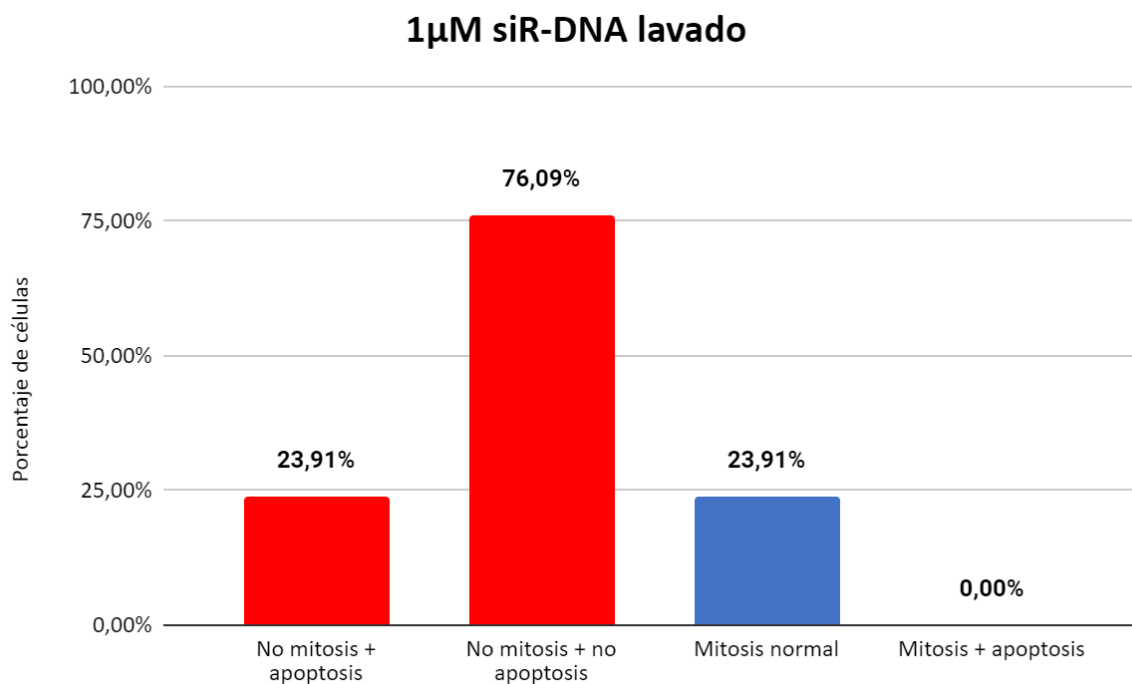


Figura 4.17. Gráfica de MCPH1 con Sir-ADN (1 μ M) lavado. Realización propia.

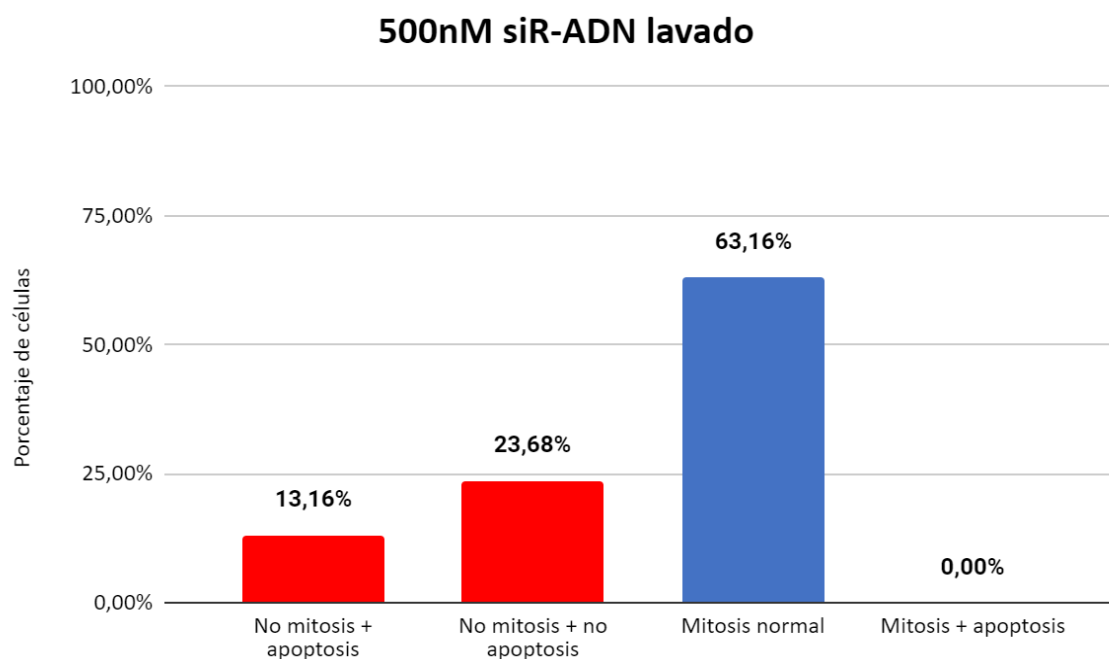


Figura 4.18. Gráfica de MCPH1 con Sir-ADN (500 nM) lavado. Realización propia.

Para tener una visión de conjunto hemos comparado el porcentaje de células que completan mitosis de un modo normal, o bien que mueren por apoptosis tanto sin entrar previamente en mitosis cómo una vez inician este proceso, en los cuatro

ensayos (figuras 4.15 - 4.18). Los datos sugieren que la concentración de 500 nM es mucho menos lesiva y no parece haber grandes diferencias entre el hecho de mantenerlo presente durante todo el proceso de grabación o bien retirarlo tras 30 minutos de incubación.

Cuando comparamos estos datos con los obtenidos tras el experimento con DRAQ5 se observa claramente que la viabilidad celular, así como la progresión en el ciclo se ven mucho menos afectados. (Tabla 4.2.).

Tabla 4.2. Análisis de tinción de cromatina. Para obtener estos valores, se ha calculado la media entre todas las concentraciones, esto indicaría el hecho de que en algunos puntos de un experimento concreto sean mayores o inferiores a los expuestos en esta tabla dependiendo de la concentración o tiempo de exposición.

	DRAQ5	SiR-DNA
No mitosis + apoptosis	83,3%	19,93%
No mitosis	100%	40,88%
Mitosis normal	0%	45,18%
Mitosis + apoptosis	0%	0%

Como podemos observar y teniendo en cuenta que nuestro objetivo era mejorar la tinción de cromatina in vivo para estudiar el proceso de división mitótica, DRAQ5 a las concentraciones utilizadas no da buenos resultados, teniendo en cuenta que ninguna de las células que se analizaron con este compuesto consigue completar la mitosis. Sin embargo, con las concentraciones estudiadas de SiR-DNA, aunque algunas fueron menos tóxicas para las células que otras, podemos ver que casi la mitad de las células consigue completar la mitosis y, ninguna de ellas muere durante o tras el proceso.

A continuación, veremos varios ejemplos ilustrativos de células que bien completan mitosis de manera satisfactoria o entran en apoptosis o muerte celular tras incubarlas con SiR-DNA. Al final se ha adicionado un enlace con acceso a un documento compartido donde se podrán ver los vídeos originales de donde proceden estos montajes.



Figura 4.16. Ejemplo de célula MCPH1 completando la división mitótica tras incubación con SiR-DNA. La flecha blanca indica el último momento temporal en que se visualiza como profase, en el minuto 680, a continuación, tendría lugar la rotura de la membrana nuclear. La flecha azul marca la segregación anafásica, que determinará la generación de dos células independientes. Realización propia.

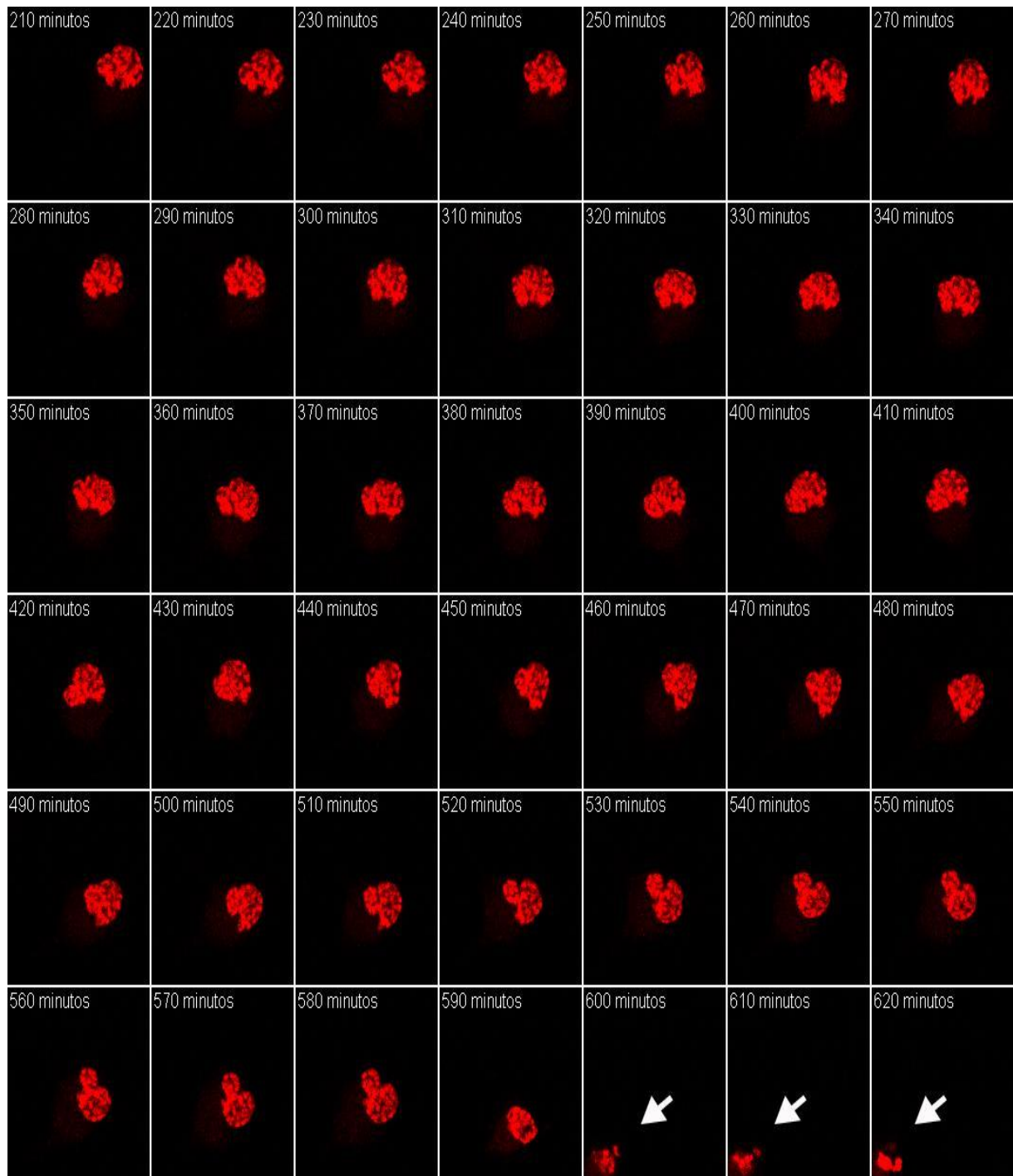


Figura 4.18. Ejemplo de célula MCPH1 que termina en apoptosis sin que llegue a ocurrir rotura de la envoltura nuclear. En este caso, vemos cómo la célula que se encuentra al principio de la mitosis en una conformación similar a profase, algo esperable dado que este fenotipo de condensación cromosómica es característico. La flecha blanca marca el punto donde se visualiza la muerte celular, caracterizada por una fragmentación de la cromatina. Los minutos indican el tiempo transcurrido desde que se inició la grabación. Realización propia.

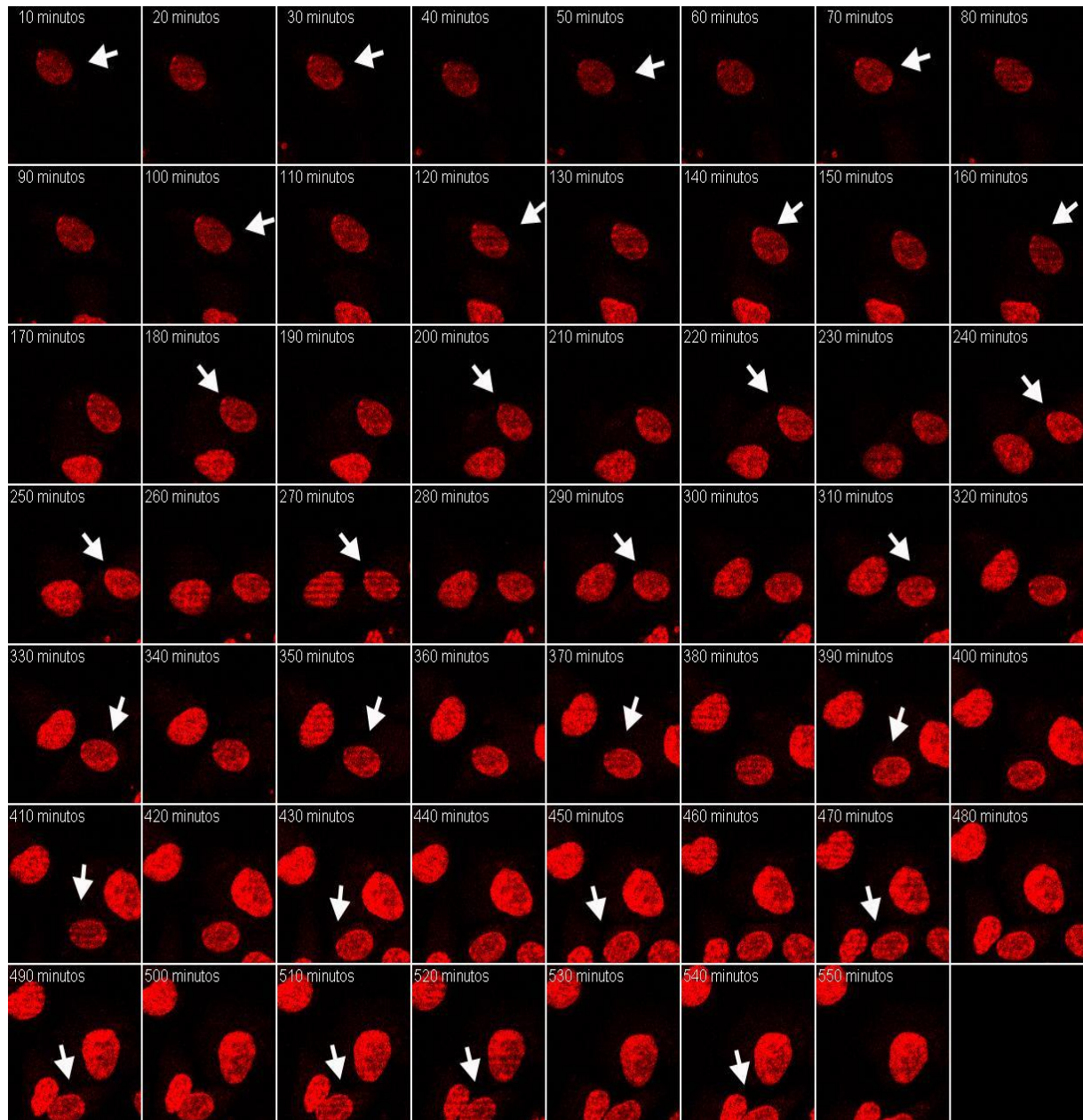


Figura 4.20. Ejemplo de célula MCPH1 que no presenta ningún proceso de división. En este caso, la flecha blanca la utilizamos para indicar la célula que se está siguiendo. Realización propia.

A continuación, se inserta un enlace desde el cual se puede acceder al vídeo de los montajes realizados anteriormente:

<https://drive.google.com/drive/folders/1DS1v-wj5GRXrprumjMFQRM6dfl-kD51D?usp=sharing>

5. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo de fin de grado nos indican que la tinción de cromatina con el compuesto DRAQ5 para estudiar el proceso de división celular mediante microscopía confocal “live-cell” en un modelo de células RPE-1 no es apropiado. Usando unas concentraciones bastante bajas en comparación con estudios previos (*Martin, R. M. et al., 2005*), que ensayaban concentraciones de 1 μ M, las células RPE detienen su progresión en el ciclo mayoritariamente y terminan muriendo. Las diferencias respecto a estudios previos pueden estar influidas por el tipo celular concreto, para el trabajo citado fueron células HeLa humanas y mioblastos de ratón C2C12.

Para mejorar estos resultados, habría que realizar futuros experimentos probando con concentraciones aún menores, o disminuir aún más el tiempo de incubación con el DRAQ5, para intentar reducir lo máximo posible la toxicidad. Otras alternativas es minimizar lo máximo posible la intensidad y exposición al láser empleado en el microscopio confocal. De todas formas, este compuesto podría resultar muy útil para alguna aplicación que no requiera que las células se mantengan viables, dado que la calidad y resolución eran muy buenas.

Por otro lado, el uso de SiR-DNA si resultó mucho más adecuado para esta aplicación. De las condiciones ensayadas, una concentración de 500 nM permitió que un número elevado de células RPE-1 MCPH1 completaran la mitosis y sin que hubiera una elevada tasa de muerte celular. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios previos, como por ejemplo (*Cremer, M. et al., 2020*) sobre el modelo celular HCT116 (cáncer de colon) o (*Ramsden, D. A. et al., 2022*) sobre células RPE-1 mutantes para el gen DDX11. Por tanto, se puede observar de manera relevante que Sir-ADN tiene una toxicidad mucho más baja comparada con la de DRAQ5.

En cualquier caso, sería interesante ensayar algunas concentraciones aún más bajas para poder conseguir reducir al máximo posible el número de (1) células que no progresan y terminan muriendo por apoptosis (9.3% del total analizadas) y (2) células que detienen su progresión (23.6 %). Otro ensayo que debería llevarse a cabo para confirmar estos resultados es repetir los mismos experimentos sobre células RPE-1 WT sin mutación alguna en el gen MCPH1.

6. CONCLUSIONES

1. Las concentraciones y procedimientos seguidos con DRAQ5 han producido una alta toxicidad en células RPE analizadas por microscopía “live-cell”, siendo incompatible con la vida de las células y la progresión del su ciclo celular.
2. Respecto a Sir-ADN, resulta una molécula eficaz a una concentración de 500 nM para el estudio de los procesos de división celular por “live-cell imaging” en ese mismo tipo celular. Aunque, sería recomendable perfeccionar la metodología para obtener resultados más óptimos.

BIBLIOGRAFÍA

- a35 mm Glass bottom dish with 20 mm micro-well #1.5 cover glass | Cellvis. (2022). Cellvis. https://www.cellvis.com/35-mm-glass-bottom-dish-with-20-mm-micro-well-number-1.5-cover-glass/product_detail.php?product_id=17
- Arora, K., Talje, L., Asenjo, A. B., Andersen, P., Atchia, K., Joshi, M., Sosa, H., Allingham, J. S., & Kwok, B. H. (2014). KIF14 Binds Tightly to Microtubules and Adopts a Rigor-Like Conformation. *Journal of Molecular Biology*, 426(17), 2997–3015. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.05.030>
- Arroyo, M., Kuriyama, R., Trimborn, M., Keifenheim, D., Cañuelo, A., Sánchez, A., Clarke, D. J., & Marchal, J. A. (2017). MCPH1, mutated in primary microcephaly, is required for efficient chromosome alignment during mitosis. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12793-7>
- Arroyo, M., Sánchez, A., Cañuelo, A., Heredia-Molina, R. F., Martínez-Molina, E., Clarke, D. J., & Marchal, J. A. (2020). MCPH1 Lack of Function Enhances Mitotic Cell Sensitivity Caused by Catalytic Inhibitors of Topo II. *Genes*, 11(4), 406. <https://doi.org/10.3390/genes11040406>
- Arroyo, M., Trimborn, M., Sánchez, A., Hirano, T., Neitzel, H., & Marchal, J. (2015). Chromosome structure deficiencies in MCPH1 syndrome. *Chromosoma*, 124(4), 491–501. <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0512-2>
- Barrera, J. A., Kao, L. R., Hammer, R. E., Seemann, J., Fuchs, J. L., & Megraw, T. L. (2010). CDK5RAP2 Regulates Centriole Engagement and Cohesion in Mice. *Developmental Cell*, 18(6), 913–926. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.017>
- Bénard, M., Schapman, D., Chamot, C., Dubois, F., Levallet, G., Komuro, H., & Galas, L. (2021). Optimization of Advanced Live-Cell Imaging through Red/Near-Infrared Dye Labeling and Fluorescence Lifetime-Based Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11092. <https://doi.org/10.3390/ijms222011092>
- Casares-Arias, J., Alonso, M. A., San Paulo, L., & González, M. U. (2021). Correlative confocal and scanning electron microscopy of cultured cells without using dedicated equipment. *STAR Protocols*, 2(3), 100727. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100727>
- Cole, R. (2014). Live-cell imaging. *Cell Adhesion & Migration*, 8(5), 452–459. <https://doi.org/10.4161/cam.28348>
- Cremer, M., Brandstetter, K., Maiser, A., Rao, S. S. P., Schmid, V. J., Guirao-Ortiz, M., Mitra, N., Mamberti, S., Klein, K. N., Gilbert, D. M., Leonhardt, H., Cardoso, M. C.,

Aiden, E. L., Harz, H., & Cremer, T. (2020). Cohesin depleted cells rebuild functional nuclear compartments after endomitosis. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19876-6>

Elliott, A. D. (2019). Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Current Protocols in Cytometry*, 92(1). <https://doi.org/10.1002/cpcy.68>

Ettinger, A., & Wittmann, T. (2014). Fluorescence live cell imaging. *Methods in Cell Biology*, 77–94. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-420138-5.00005-7>

Faheem, M., Naseer, M. I., Rasool, M., Chaudhary, A. G., Kumosani, T. A., Ilyas, A. M., Pushparaj, P. N., Ahmed, F., Algahtani, H. A., Al-Qahtani, M. H., & Saleh Jamal, H. (2015). Molecular genetics of human primary microcephaly: an overview. *BMC Medical Genomics*, 8(S1). <https://doi.org/10.1186/1755-8794-8-s1-s4>

Farooq, M., Baig, S., Tommerup, N., & Kjaer, K. W. (2010). Craniosynostosis-microcephaly with chromosomal breakage and other abnormalities is caused by a truncating MCPH1 mutation and is allelic to premature chromosomal condensation syndrome and primary autosomal recessive microcephaly type 1. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 152A(2), 495–497. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33234>

Gavvovidis, I., Pöhlmann, C., Marchal, J. A., Stumm, M., Yamashita, D., Hirano, T., Schindler, D., Neitzel, H., & Trimborn, M. (2010). MCPH1 patient cells exhibit delayed release from DNA damage-induced G2/M checkpoint arrest. *Cell Cycle*, 9(24), 4893–4899. <https://doi.org/10.4161/cc.9.24.14157>

Genin, A., Desir, J., Lambert, N., Biervliet, M., van der Aa, N., Pierquin, G., Killian, A., Tosi, M., Urbina, M., Lefort, A., Libert, F., Pirson, I., & Abramowicz, M. (2012). Kinetochore KMN network gene CASC5 mutated in primary microcephaly. *Human Molecular Genetics*, 21(24), 5306–5317. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds386>

González-Martínez, J., Cwetsch, A. W., Martínez-Alonso, D., López-Sainz, L. R., Almagro, J., Megías, D., Boskovic, J., Gilabert-Juan, J., Graña-Castro, O., Pierani, A., Behrens, A., Ortega, S., & Malumbres, M. (2020). Lack of adaptation to centriolar defects leads to p53-independent microcephaly in the absence of Cep135. *Lack of adaptation to centriolar defects leads to p53-independent microcephaly in the absence of Cep135*. <https://doi.org/10.1101/2020.05.07.082032>

GöRisch, S. M., Wachsmuth, M., TóTh, K. F., Lichter, P., & Rippe, K. (2005). Histone acetylation increases chromatin accessibility. *Journal of Cell Science*, 118(24), 5825–5834. <https://doi.org/10.1242/jcs.02689>

Haren, L., Stearns, T., & Lüders, J. (2009). Plk1-Dependent Recruitment of γ -Tubulin Complexes to Mitotic Centrosomes Involves Multiple PCM Components. *PLoS ONE*, 4(6), e5976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005976>

Invitrogen™ Yoduro YOYOTM-1 (491/509) - Solución de 1 mm en DMSO - Ver productos Inicio. (2022). fishersci. <https://www.fishersci.es/shop/products/molecular-probes-yoyo-1-iodide-491-509/10594233>

Jean, F., Stuart, A., & Tarailo-Graovac, M. (2020). Dissecting the Genetic and Etiological Causes of Primary Microcephaly. *Frontiers in Neurology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.570830>

Joukov, & de Nicolo. (2019). The Centrosome and the Primary Cilium: The Yin and Yang of a Hybrid Organelle. *Cells*, 8(7), 701. <https://doi.org/10.3390/cells8070701>

Kristofova, M., Ori, A., & Wang, Z. Q. (2022). Multifaceted Microcephaly-Related Gene MCPH1. *Cells*, 11(2), 275. <https://doi.org/10.3390/cells11020275>

L. (2021, 2 septiembre). Inmunofluorescencia: campo amplio vs. confocal. weblab.immograf.com. <https://www.labclinics.com/2019/04/30/inmunofluorescencia-campo-amplio-versus-confocal/>

Lakadamyali, M., & Cosma, M. P. (2015). Advanced microscopy methods for visualizing chromatin structure. *FEBS Letters*, 589(20PartA), 3023–3030. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.012>

Leica Microsystems CMS GmbH (2005). Leica TCS SP5. User Manual [Archivo PDF]. <https://www.research.uky.edu/uploads/leica-sp5-user-manual>

Manual de Usuario del programa Confocal Uniovi ImageJ | Manualzz. (2022). manualzz.com. <https://manualzz.com/doc/5378139/manual-de-usuario-del-programa-confocal-uniovi-imagej>

Martin, R. M., Leonhardt, H., & Cardoso, M. C. (2005). DNA labeling in living cells. *Cytometry Part A*, 67A(1), 45–52. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20172>

Minsky, M. (1988). Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*, 10(4), 128–138. <https://doi.org/10.1002/sca.4950100403>

MP06-Microscopio confocal 2. (2015). Universidad de Jaén | Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI). <https://www.ujaen.es/servicios/scai/recursos/mp06-microscopio-confocal-2>

Neitzel, H., Neumann, L. M., Schindler, D., Wirges, A., Tönnies, H., Trimborn, M., Krebsova, A., Richter, R., & Sperling, K. (2002). Premature Chromosome Condensation in Humans Associated with Microcephaly and Mental Retardation: A

Novel Autosomal Recessive Condition. *The American Journal of Human Genetics*, 70(4), 1015–1022. <https://doi.org/10.1086/339518>

Paramasivam, M., Chang, Y., & LoTurco, J. J. (2007). ASPM and Citron Kinase Co-Localize to the Midbody Ring during Cytokinesis. *Cell Cycle*, 6(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.4161/cc.6.13.4356>

Potts, P. R., Porteus, M. H., & Yu, H. (2006). Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks. *The EMBO Journal*, 25(14), 3377–3388. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601218>

Pulvers, J. N. (2015). MCPH1: a window into brain development and evolution. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00092>

Ramsden, D. A., Carvajal-Garcia, J., & Gupta, G. P. (2021). Mechanism, cellular functions and cancer roles of polymerase-theta-mediated DNA end joining. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(2), 125–140. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00405-2>

Ranjan, R., & Chen, X. (2021). Super-Resolution Live Cell Imaging of Subcellular Structures. *Journal of Visualized Experiments*, 167. <https://doi.org/10.3791/61563>

PicoGreen™ (500/525) - 1 mM Solution in DMSO. (2022). Thermo Fisher Scientific. <https://www.fishersci.es/shop/products/quant-it-picogreen-dsdna-assay-kits-dsdna-reagents/10398702>

Sato, Y., Nakao, M., & Kimura, H. (2021). Live-cell imaging probes to track chromatin modification dynamics. *Microscopy*, 70(5), 415–422. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfab030>

Schlaitz, A. L., Srayko, M., Dammermann, A., Quintin, S., Wielsch, N., MacLeod, I., de Robillard, Q., Zinke, A., Yates, J. R., Müller-Reichert, T., Shevchenko, A., Oegema, K., & Hyman, A. A. (2007). The C. elegans RSA Complex Localizes Protein Phosphatase 2A to Centrosomes and Regulates Mitotic Spindle Assembly. *Cell*, 128(1), 115–127. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.050>

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

Sen, O., Saurin, A. T., & Higgins, J. M. G. (2018). The live cell DNA stain SiR-Hoechst induces DNA damage responses and impairs cell cycle progression. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26307-6>

Smith, P. J., Wiltshire, M., Davies, S., Patterson, L. H., & Hoy, T. (1999). A novel cell permeant and far red-fluorescing DNA probe, DRAQ5, for blood cell discrimination by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 229(1–2), 131–139. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(99\)00116-7](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(99)00116-7)

Spirochrome. (2021, 25 noviembre). SiR-DNA kit - Live cell DNA stain - spirochrome. <https://spirochrome.com/product/sir-dna-kit/>

Sudakin, V., Chan, G. K., & Yen, T. J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *Journal of Cell Biology*, 154(5), 925–936. <https://doi.org/10.1083/jcb.200102093>

SYBR_Green. (2022). Química.es. https://www.quimica.es/enciclopedia/SYBR_Green.html

SYTOTM Blue Fluorescent Nucleic Acid Stain Sampler Kit (SYTOTM dyes 40, 41, 42, 45). (2022). Thermofisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S11350?SID=srch-srp-S11350>

Thermo Fisher Scientific Inc. (2010). DRAQ5™ Fluorescent Probe Solution (5 mM). Solución de Sonda Fluorescente DRAQ5™ (5 mM). <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/62251>

Thomas, S., Boutaud, L., Reilly, M. L., & Benmerah, A. (2019). Cilia in hereditary cerebral anomalies. *Biology of the Cell*, 111(9), 217–231. <https://doi.org/10.1111/boc.201900012>

TOTOTM-1 Iodide (514/533) - 1 mM Solution in DMSO. (2022). Thermo Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/T3600>

Trimborn, M., Bell, S. M., Felix, C., Rashid, Y., Jafri, H., Griffiths, P. D., Neumann, L. M., Krebs, A., Reis, A., Sperling, K., Neitzel, H., & Jackson, A. P. (2004). Mutations in Microcephalin Cause Aberrant Regulation of Chromosome Condensation. *The American Journal of Human Genetics*, 75(2), 261–266. <https://doi.org/10.1086/422855>

WANG, E., BABBEY, C. M., & DUNN, K. W. (2005). Performance comparison between the high-speed Yokogawa spinning disc confocal system and single-point scanning confocal systems. *Journal of Microscopy*, 218(2), 148–159. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2005.01473.x>

- Wood, J. L., Liang, Y., Li, K., & Chen, J. (2008). Microcephalin/MCPH1 Associates with the Condensin II Complex to Function in Homologous Recombination Repair. *Journal of Biological Chemistry*, 283(43), 29586–29592. <https://doi.org/10.1074/jbc.m804080200>
- Wu, Y., Han, X., Su, Y., Glidewell, M., Daniels, J. S., Liu, J., Sengupta, T., Rey-Suarez, I., Fischer, R., Patel, A., Combs, C., Sun, J., Wu, X., Christensen, R., Smith, C., Bao, L., Sun, Y., Duncan, L. H., Chen, J., . . . Shroff, H. (2021). Multiview confocal super-resolution microscopy. *Nature*, 600(7888), 279–284. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04110-0>
- Xu, X., Lee, J., & Stern, D. F. (2004). Microcephalin Is a DNA Damage Response Protein Involved in Regulation of CHK1 and BRCA1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(33), 34091–34094. <https://doi.org/10.1074/jbc.c400139200>
- Yao, X., Abrieu, A., Zheng, Y., Sullivan, K. F., & Cleveland, D. W. (2000). CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint. *Nature Cell Biology*, 2(8), 484–491. <https://doi.org/10.1038/35019518>