

Fuentes Cuesta, María; Jiménez, Juan; Álvarez Tallada, Víctor
Departamento de Genética, laboratorio 122,
Centro Andaluz de Biología del Desarrollo

INTRODUCCIÓN

Los genes implicados en la división celular y nuclear aseguran un reparto equitativo del material genético entre las células hijas. Defectos en su funcionamiento terminan provocando lo que conocemos como inestabilidad genómica, origen molecular en el desarrollo de cáncer y otras enfermedades genéticas.

Entre estas proteínas, son cruciales aquellas que producen los ciclos de cohesión y liberación de las cromátidas hermanas. Esto se consigue gracias a la acción antagonista entre las rutas de carga y descarga del complejo de la cohesina, que se activan o inhiben en coordinación con el progreso del ciclo celular, manteniéndose unidas las cromátidas hermanas hasta el momento de su separación en la anafase. Esta regulación está evolutivamente muy bien conservada y resulta muy similar entre eucariotas multicelulares y la levadura de fisión, *Squizosaccharomyces pombe*, el organismo modelo en este trabajo.

En trabajos previos se aisló el mutante condicional *cwf15.d53c*, que presenta una delección de los últimos 53 aminoácidos, lo que le confiere sensibilidad a formamida (figura 1A) y presenta un patrón anormal de segregación mitótica (figura 1B) asociada a un aumento cuantitativo y cualitativo de la cohesina cargada en los cromosomas.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo consiste en caracterizar un nuevo alelo termosensible de *cwf15* (*cwf15.ts4*).

RESULTADOS

La aproximación que seguimos es revelar los defectos celulares provocados en condiciones restrictivas, por microscopía de fluorescencia en células vivas y fijadas, así como un análisis de la viabilidad celular mediante ensayo en gota a diferentes temperaturas y medio. En la figura 2A se monitoriza respectivamente la cantidad de fluorescencia del alelo silvestre y mutante fusionados a GFP en células vivas a temperatura permisiva (25°) y restrictiva (36°). Como se puede apreciar la cantidad de proteína del alelo silvestre es mucho menor en el alelo mutante desapareciendo por completo a 36°; lo que puede explicar la letalidad en estas condiciones ya que *cwf15* es un gen esencial. Para complementar este estudio se realizó un análisis bioquímico, Western Blot (figura 2B), que nos permitió comprobar que, además de la caída de la fluorescencia, también va disminuyendo la cantidad de proteína hasta desaparecer. Esto puede demostrar que este alelo termosensible provoca inestabilidad en la proteína y, como consecuencia, ésta se degrada.

Referencias:

- Hoyos-Manchado, R., Reyes-Martín, F., Rallis, C. et al. RNA metabolism is the primary target of formamide in vivo. *Sci Rep* 7, 15895 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16291-8>
- Nishima, T. Cohesion and cohesin-dependent chromatin organization. *Current Opinion in Cell Biology*. Vol 58, 8-14 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.11.006>
- Biot A, Tormos-Pérez M, Vaur S, Feytout A, Jaegy J, Alonso Gil D, Vazquez S, Ekwall K, Javerzat JP. The CDK Pef1 and protein phosphatase 4 oppose each other for regulating cohesin binding to fission yeast chromosomes. *Elife*. 2020 Jan 2;9:e50556. doi: 10.7554/eLife.50556. PMID: 31895039; PMCID: PMC6954021.

Por otro lado, en el análisis del fenotipo en células fijadas (figura 3A), podemos observar el defecto de segregación mitótica producido por el crecimiento a una temperatura restrictiva para este alelo comparándose con células crecidas a 25°C en las que la segregación del alelo termosensible no se ve modificada respecto al alelo silvestre. El ensayo de viabilidad (figura 3B) permite observar que este alelo también es sensible a la misma droga que el *cwf15.d53c*.



Figura 1A. Ensayo de crecimiento en gota. Diluciones seriadas (1/5) fueron cultivadas a 30°C en los medios indicados en ausencia (izda) y presencia (dcha) de formamida. La mutación del gen *cwf15* genera sensibilidad a formamida.

Figura 1B. Observación *in vivo* de los defectos de segregación de los alelos silvestre (izda) y *cwf15.d53c* (dcha). En este último se observa un reparto desigual de la carga genética en comparación con el silvestre.

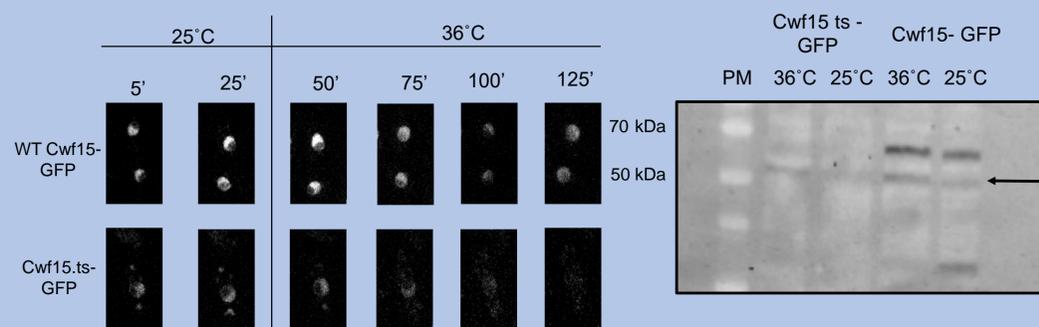


Figura 2A. Monitorización de la fluorescencia de alelo silvestre y mutante fusionados a GFP a diferentes tiempo y temperatura.

Figura 2B. Análisis Western Blot para el estudio de los niveles de proteína Cwf15 fusionada a GFP en el alelo termosensible y silvestre, respectivamente.

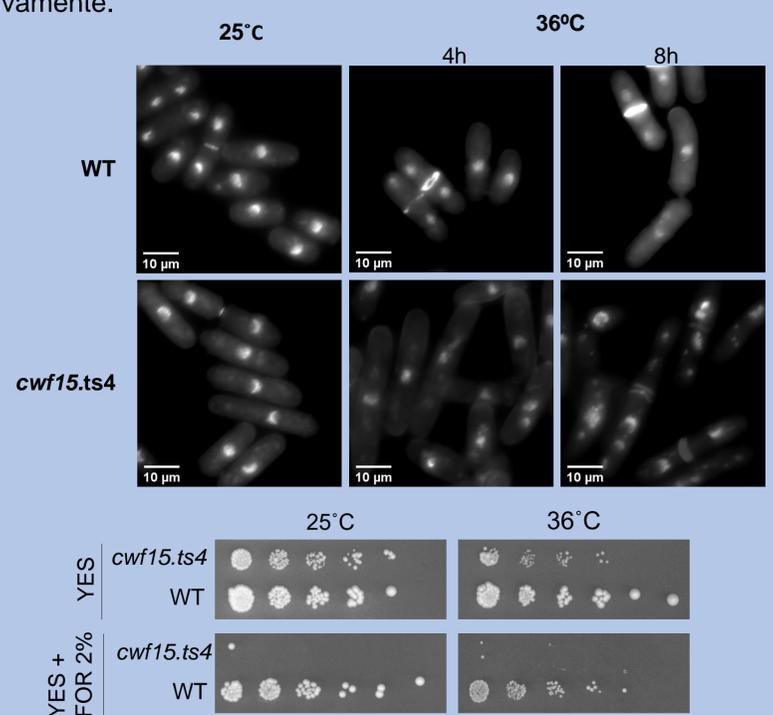


Figura 3A. Análisis fenotípico de células fijadas y teñidas con DAPI-Calcoflúor crecidas en YES a 25°C y 36°C del control silvestre y la estirpe mutante. El alelo termosensible muestra un patrón de segregación anormal en comparación con el alelo silvestre, sobre todo en la segunda división después del cambio de temperatura (8h).

Figura 3B. Ensayo en gota en ausencia y presencia de formamida 2%. Los resultados demuestran que el alelo *cwf15.ts4*, además de ser termosensible también es hipersensible a formamida.