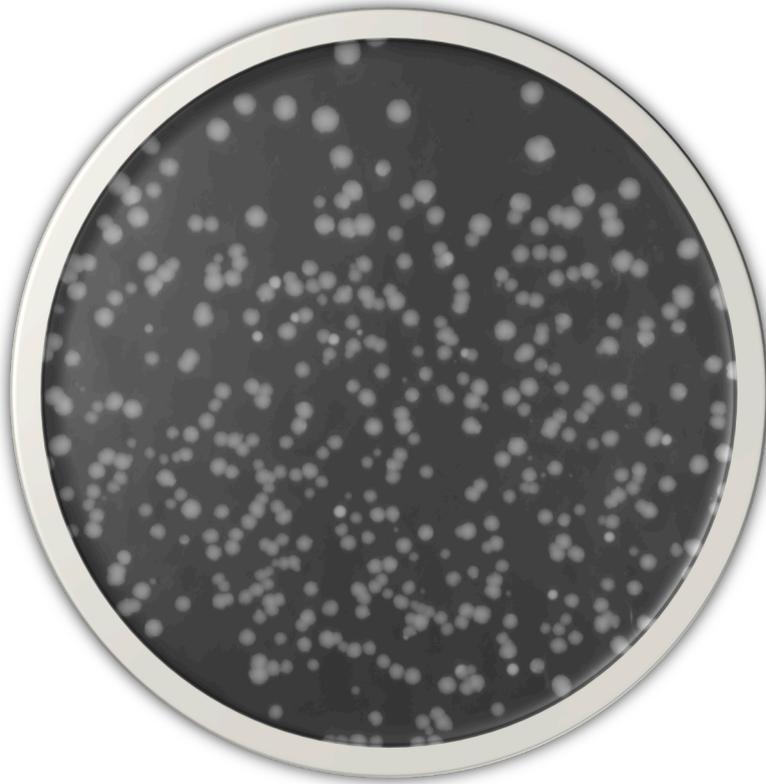




Sección de Biología
Universidad de La Laguna

La inestabilidad genética asociada a un puente de anafase formado por un cromosoma dicéntrico: Aspectos teóricos y estudio preliminar de un caso práctico.

The genetic instability associated to an anaphase bridge formed by a dicentric chromosome: Theory and a preliminary data of a case report.



Trabajo de Fin de Grado

MARCOS JAVIER ZAMORA DORTA

Tutorizado por Félix Machín Concepción y José Antonio Pérez Pérez

Grado en biología. Junio 2020

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Abstract	1
3. Estructura cromosómica normal.	2
3.1. Centrómero	3
3.2. Telómeros	4
3.3. Cromosomas acrocéntricos y ADN ribosomal (rDNA)	6
4. Cromosomas dicéntricos.	7
4.1. Dicéntricos estables.	9
4.1.1. Mecanismos de estabilización de dicéntricos.	9
4.2. Dicéntricos inestables y el ciclo rotura-fusión-puente (BFB)	11
4.2.1 El ciclo BFB en el cáncer y la cromotripsis.	12
5. Modelos de estudio de cromosomas dicéntricos.	13
5.1. Dicéntricos en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
5.1.1. Modelos de dicéntricos constitutivos.	15
5.1.2. Modelos de dicéntricos condicionales.	15
6. Caso práctico de dicéntrico condicional.	16
6.1 Estudio preliminar de un modelo en <i>S. cerevisiae</i> de dicéntrico condicional que flanquea el rDNA.	16
7. Objetivos	18
8. Material y métodos	18
9. Resultados y discusión	20
9.1. Inestabilidad asociada al dicéntrico: Estudio clonogénico.	20
9.1.1. Número de clones supervivientes	20
9.1.2. Variabilidad clonogénica.	21
10. Conclusiones.	27
11. Conclusions	28
12. Bibliografía	29

1. Resumen

Los cromosomas se estructuran en distintas partes, siendo estas los brazos, los telómeros y el centrómero. Lo común es que cada cromosoma disponga de un único centrómero, pero puede darse el caso de que presente dos, pasando a ser un cromosoma dicéntrico. El ciclo rotura-fusión-puente (BFB, en inglés) es uno de los principales mecanismos de inestabilidad genética. Los cromosomas dicéntricos son intermediarios de este ciclo, ocasionando la formación de puentes de anafase que se resuelven con una rotura y posterior fusión restableciendo el dicéntrico y realimentando el ciclo. Gracias a distintos tipos de modelos de dicéntricos en especies como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha podido recabar información sobre este ciclo. El presente trabajo reúne y organiza la información referente a la estructura, funcionamiento y métodos de estudio de los cromosomas dicéntricos. También se han llevado a cabo estudios preliminares sobre un modelo de dicéntrico en *Saccharomyces cerevisiae* en el que el cromosoma dicéntrico afecta a regiones repetitivas en tándem.

Palabras clave: Centrómero, *Saccharomyces cerevisiae*, cromosoma dicéntrico, ciclo BFB, centrómero condicional.

2. Abstract

Chromosomes are structured in different parts. These are arms, telomeres and a centromere. The most common situation, as a rule normally, is that each chromosome has a single centromere, however it can be found some cases where the chromosome presents two centromeres, becoming a dicentric chromosome. The breakage-fusion-bridge cycle (BFB) is one of the main mechanisms of genetic instability. Dicentric chromosomes are intermediaries of this cycle, causing the formation of anaphase bridges that are resolved with a break and subsequent fusion, restoring the dicentric and feeding the cycle back. Thanks to different types of dicentric models in species such as the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, information on this cycle has been collected. This project aims to gather and organize information regarding the structure, functioning and

study methods of the dicentric chromosomes. Preliminary studies on a dicentric model have been also carried out in *Saccharomyces cerevisiae* in which the dicentric chromosome affects repetitive tandem regions.

Keywords: Centromere, *Saccharomyces cerevisiae*, dicentric chromosome, BFB cycle, conditional centromere.

3. Estructura cromosómica normal.

El ADN, en el núcleo de células eucariotas, se encuentra asociado a proteínas formando parte de la cromatina, la cual puede encontrarse en forma de eucromatina o heterocromatina, siendo esta última facultativa o constitutiva. La cromatina es el conjunto de ADN, histonas, proteínas no histonas y ciertas clases de ARN.

El modelo propuesto para explicar cómo se organiza el material genético humano se basa en la existencia de distintos niveles de empaquetamiento. El primer nivel es la doble hélice de ADN dando lugar a la fibra de 2 nm. En el segundo nivel, o cuentas de rosario, la doble hélice de ADN se enrolla alrededor de 8 proteínas globulares, las histonas, dando dos vueltas alrededor de ellas, ayudadas por otra proteína, la histona H1. Esto da lugar a la fibra de 10 nm. El tercer nivel de empaquetamiento, la fibra de 30 nm, presenta dos modelos hipotéticos, el modelo solenoide y el modelo en zigzag. Surge del repliegue de la fibra anterior. En el cuarto nivel de empaquetamiento, la fibra de 300 nm, la fibra de 30 nm comienza a formar lazos o bucles anclándose a los filamentos que forman parte de la matriz nuclear. En el quinto nivel, la fibra de 300 nm vuelve a formar lazos dando lugar a la fibra de 700 nm. El sexto y último nivel, de 1400 nm, es la imagen más familiar que tenemos del cromosoma, cuando la molécula está condensada al máximo al llegar a la metafase (Brooker, 2016).

Los cromosomas constan de dos cromátidas hermanas desde la fase S hasta la anafase, en la mitosis. Están unidas a través del centrómero y ambas poseen la misma información genética. Los cromosomas se pueden dividir en distintas partes. Por un lado tenemos los centrómeros, secuencia que permite el anclaje de los microtúbulos del huso mitótico. Luego los brazos de las cromátidas, pudiendo ser de diferente tamaño,

como el brazo corto (p) y el largo (q). Y por último, los telómeros, los extremos de los brazos del cromosoma.

3.1. Centrómero.

Cada cromosoma nuclear tiene un centrómero. Este es un locus cromosómico complejo, una zona de constricción primaria por la que el cromosoma interacciona con las fibras del huso acromático desde profase hasta anafase, tanto en mitosis como en meiosis, y es responsable de realizar y regular los movimientos cromosómicos que tienen lugar durante estas fases. En la estructura del centrómero intervienen tanto el ADN centromérico, que consta fundamentalmente de heterocromatina constitutiva, como las proteínas centroméricas que aportan esta conformación.

Los centrómeros son fundamentales en los procesos de separación de las dos cromátidas hermanas de los cromosomas durante la división celular. En este locus cromosómico específico se forma el cinetocoro. El cinetocoro es un complejo multiproteico que media la unión del huso mitótico con el cromosoma durante la mitosis y la meiosis, y permite que se tire de las cromátidas hacia polos opuestos de las células (Sato et al., 2012). Es por esto que desempeña un papel fundamental a la hora de una segregación cromosómica correcta.

En los centrómeros de todos los cromosomas encontramos ADN satélite, secuencias de ADN que puede tener en torno a 25-200 pb y se repite a lo largo de unas 100 Kb. Gracias a las técnicas de secuenciación genómica se sabe que las secuencias de ADN centroméricas divergen significativamente entre las especies. En el caso de los humanos el ADN satélite de los centrómeros, que forma el grueso de la heterocromatina centromérica, se denomina α -satélite. Este está formado por unas 171 pb que se repiten en tándem muchas veces (Brown & O'Neill, 2014; Sullivan et al., 2011). El centrómero no viene definido únicamente por las secuencias del ADN sino por modificaciones epigenéticas, estableciéndose sinergias entre las secuencias de ADN, los componentes de las proteínas y las marcas epigenéticas (Plohl et al., 2014). Las histonas en estas regiones están modificadas de forma distinta a las de las regiones adyacentes al centrómero.

Al contrario de lo que ocurre con la secuencia de ADN centromérico, muchas proteínas que componen el cinetocoro se conservan evolutivamente. Cabe destacar de entre ellas a la proteína CENP-A (cenH3), una variante de la histona H3 que reemplaza al H3 canónico para crear nucleosomas centroméricos únicos (Sato et al., 2012). Esta histona tiene un papel fundamental a la hora de que los microtúbulos del cinetocoro reconozcan e interaccionen con esta región. Esta se encuentra únicamente en un cinetocoro funcional.

La cromatina centromérica de eucariotas multicelulares se organiza como subunidades múltiples de nucleosomas CENP-A intercaladas con subunidades de nucleosomas H3 que se dimetilan en lisina 4, una marca epigenética distintiva. Los nucleosomas físicamente distintos y la organización de cromatina crean una plataforma para la formación de cinetocoro y el reclutamiento de proteínas adicionales de centrómero y cinetocoro (Stimpson et al., 2012).

3.2. Telómeros.

Los telómeros fueron identificados por H. J. Muller y B. McClintock durante la década de los años 30 y 40 (Zakian, 1989). Son estructuras de nucleoproteína que se encuentran en los extremos de los cromosomas lineales y que son cruciales para el mantenimiento de la integridad cromosómica (Bhargava et al., 2020). En estas estructuras no se localizan genes codificantes, presentan un alto grado de compactación y heterocromatinización.

Los telómeros tienen en su extremo una secuencia minisatélite de ADN altamente repetitiva. Consiste en repeticiones en tándem de una secuencia que en humanos es de 6 nucleótidos y que se repite en una longitud de entre 10 y 15 Kb, unas 2000 repeticiones. La secuencia de los telómeros está altamente conservada en los vertebrados y es la secuencia “AGGGTT” (Blackburn, 1991). Sin embargo, hay una pequeña variación de estas secuencias entre algunos organismos, siendo heterogénea en *Saccharomyces cerevisiae* o muy larga en *Kluyveromyces lactis* (25 pb).

Al final de nuestros cromosomas siempre va a haber una doble cadena y además un extremo 3' monocatenario, consecuencia directa de la replicación del ADN en los extremos, y es fundamental para dar forma a los telómeros. Este extremo 3' protuberante se asocia con la cadena complementaria en la región de doble cadena del telómero formando los lazos T, como se aprecia en la imagen 1. Este lazo hacia atrás que forma la cadena monocatenaria permite proteger a los telómeros de la degradación y de unirse a otros cromosomas. El ADN telomérico de las células animales se adhiere a un complejo proteínico de seis subunidades llamado shelterina. Este impide que el aparato de reparación de ADN confunda los extremos del ADN telomérico con cadenas dañadas (Karp, 2014). La función de los telómeros, por tanto, es proporcionar estabilidad al cromosoma, de manera que no sea degradado e impedir la fusión con otros cromosomas.

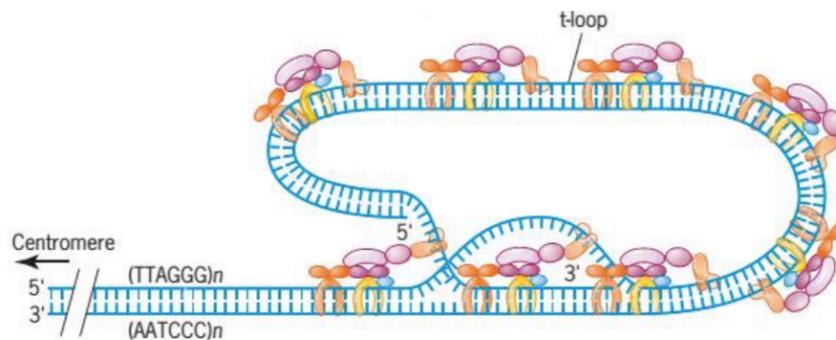


Imagen 1. Representación del brazo T que se forma en los extremos del telómero. Imagen extraída del libro mencionado en la bibliografía (Snustad & Simmons, 2011).

Una característica a destacar de los telómeros es que, debido a la existencia del extremo 3' monocatenario, las repeticiones teloméricas se pierden con cada una de las divisiones celulares (Karp, 2014). De esta manera, la capacidad de proteger los extremos cromosómicos se ve anulada con el tiempo, desencadenando en un proceso de senescencia replicativa. Por este motivo, a no ser que se active algún mecanismo de mantenimiento de telómeros, las células sucumben a la inestabilidad del genoma (Bhargava et al., 2020). Un aspecto importante es que la erosión de los telómeros lleva a las células a identificarlo incorrectamente como ADN roto y a fusionarlos entre sí, siendo una de las causas reconocidas de formación de cromosomas dicéntricos.

3.3. Cromosomas acrocéntricos y ADN ribosomal (rDNA).

Una de las maneras que existen para clasificar cromosomas en distintos tipos se basa en la posición del centrómero, existiendo pues 4 tipos: cromosomas metacéntricos, submetacéntricos, acrocéntricos y telocéntricos. Cada cromosoma se encuentra dividido por el centrómero en dos partes, el brazo p (brazo corto) y el brazo q (brazo largo), excepto en los cromosomas metacéntricos donde ambos brazos son de igual longitud.

Un cromosoma acrocéntrico es un cromosoma en el que el centrómero se encuentra más cercano a uno de los telómeros, dando como resultado un brazo muy corto (p) y el otro largo (q). Los humanos tiene 5 pares de cromosomas acrocéntricos, siendo estos el 13, 14, 15, 21 y 22. Una característica común a todos ellos es que en sus brazos cortos presentan bloques homólogos de secuencias repetitivas, incluyendo en ellas genes de ADN ribosomal. Estos grupos de ADNr aparecen como regiones organizadoras nucleolares (Stimpson et al., 2010).

En algunos experimentos se han observado fusiones acrocéntricas no aleatorias al expresar una versión mutante de la proteína de unión a telómeros TRF2 (Stimpson et al., 2014). Esta proteína mutada intencionadamente logra interrumpir la función de los telómeros e induce la formación de cromosomas humanos dicéntricos de novo, de la misma manera que puede causar otros tipos de defectos nucleolares a gran escala. La proteína sin mutar TRF2 se asocia con el nucleolo y el ADNr. En cambio, cuando el material genético que codifica a esta proteína es alterado provoca la pérdida de funcionalidad de los telómeros, trayendo consigo cambios nucleolares y cromosómicos graves (Stimpson et al., 2014).

Las fusiones cromosómicas se producen de forma no aleatoria después de la expresión de los genes para la proteína TRF2 mutante a corto plazo (36 horas), con casi el 80% de ellas entre los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos humanos 13, 14, 15, 21 y 22. Estas fusiones se denominan translocaciones Robertsonianas. El mecanismo que impulsa la formación de dichas translocaciones depende de la organización genómica de los cromosomas acrocéntricos, pues los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos presentan varios bloques prácticamente idénticos de ADN repetitivo. Esto son unas 400 copias de la unidad de ADNr de 43 kb (Stimpson et al., 2014).

4. Cromosomas dicéntricos.

Lo normal es que cada cromosoma presente una región de ADN centromérico, en la cual se ensamblan el centrómero y el cinetocoro. No obstante, los sucesos de reordenamiento del genoma pueden generar fusiones de dos segmentos cromosómicos diferentes los cuales presentan cada uno un centrómero, dando como resultado un cromosoma dicéntrico. Son estructuras inestables que también pueden derivar de eventos de reparación de ADN erróneos o formación de neocentrómeros epigenéticos anormales (Guérin et al., 2019). Es por ello que un cromosoma dicéntrico puede ser definido como un cromosoma anormal que en lugar de uno tiene dos centrómeros físicamente unidos. La formación de estos cromosomas dicéntricos se atribuye a que son productos del reordenamiento del genoma que colocan dos centrómeros en el mismo cromosoma (Stimpson et al., 2012), ya sea por procesos como la fusión de telómeros o cromosomas rotos, la translocación robertsoniana o la inversión cromosómica paracéntrica.

Las translocaciones robertsonianas son los reordenamientos dicéntricos estructurales más comunes en humanos (Sullivan & Schwartz, 1995). Hace referencia a fusiones o fisiones cromosómicas, donde ocurre una variación en el número de cromosomas. Esto puede surgir por unión de dos cromosomas acrocéntricos en un solo cromosoma metacéntrico, lo que determina una disminución del número haploide, o por fisión de un cromosoma en dos cromosomas acrocéntricos, aumentando el número haploide.

En el caso de las inversiones cromosómicas, son procesos de reordenamiento cromosómico que involucran solo a un cromosoma, donde un segmento de éste se invierte de extremo a extremo. Tiene lugar cuando se producen rotaciones en regiones de un cromosoma causadas por roturas cromosómicas o recombinaciones intracromosómicas. Existen dos tipos de inversiones, las paracéntricas y las pericéntricas, como se observa en la imagen 2.

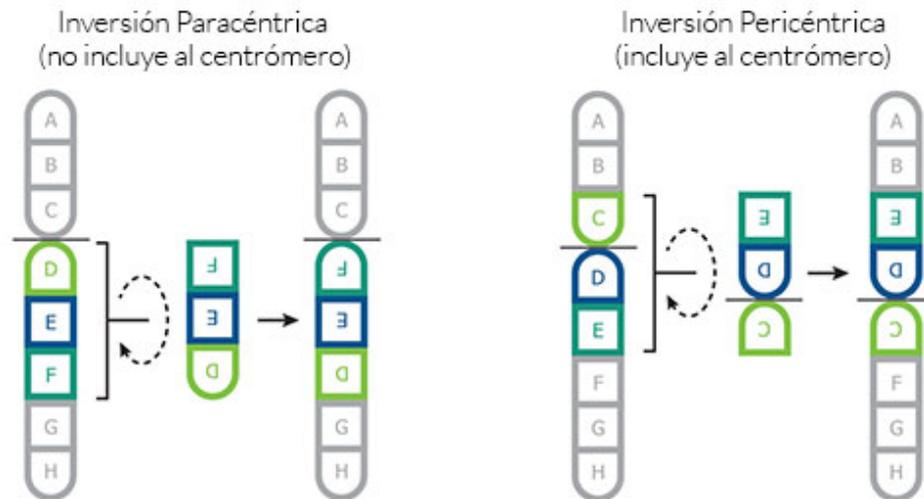


Imagen 2. Esquema explicativo donde se muestra la diferencia de una inversión paracéntrica y una pericéntrica. Imagen extraída de la página web ReproTec (Repro Tec, s.f.)

Las inversiones pericéntricas incluyen el centrómero, habiendo un punto de ruptura en cada brazo. Por otra parte, las inversiones que excluyen el centrómero se conocen como inversiones paracéntricas. En el caso de ser heterocigoto para la inversión, uno de los efectos es el de la semiesterilidad. Durante la profase de la meiosis I, los cromosomas homólogos forman un bucle de inversión, produciéndose un cruce. En el caso de que la inversión fuese del tipo paracéntrica, al final de la meiosis se obtendría un cromosoma de secuencia normal, uno con la secuencia invertida, uno acéntrico y otro dicéntrico. La cromátida dicéntrica se separa durante la anafase de meiosis I tal que el cromosoma se rompe en posiciones aleatorias. Estos fragmentos rotos resultan en deleciones de genes que conducen a gametos genéticamente desequilibrados. Esto puede dar lugar a la extinción de la línea celular.

La fusión de los telómeros puede producirse por el acortamiento que sufren los mismos con las divisiones celulares continuas, de manera que son incapaces de formar el lazo en T que protege a los extremos de fusionarse con otras cadenas de material genético. Al fusionarse pueden acabar formando cromosomas dicéntricos, cromosomas altamente inestables (ver más abajo), dando lugar a translocaciones, deleciones y amplificaciones cromosómicas.

Si se valoran los factores externos que pueden inducir anomalías en los núcleos de las células, uno de los que destacan es la radiación. La radiación aumenta la

probabilidad de que se formen cromosomas dicéntricos. Al crearse puentes físicos entre los cromosomas en anafase, y a medida que estos cromosomas se separan y los puentes cromosómicos se rompen, resulta en la formación de protuberancias de los núcleos hacia el citoplasma, fenotipo útil para cuantificar la irradiación de un organismo (Kravtsov et al., 2000).

4.1. Dicéntricos estables.

Barbara McClintock fue la primera en describir el comportamiento de los dicéntricos en el maíz. Según sus investigaciones, este tipo de cromosomas son de por sí inestables. Suelen experimentar rondas de formación y rotura de puentes anafásicos (McClintock, 1941). En el caso de la levadura o de *Drosophila* los dicéntricos presentan un comportamiento inestable y dan lugar a cromosomas rotos y reorganizados.

Sin embargo, se sabe desde hace algún tiempo que en mamíferos, y más recientemente en varios organismos modelo, los cromosomas dicéntricos pueden ser bastante estables en la mitosis. En humanos, donde los dicéntricos se dan de forma natural en una parte significativa, estos cromosomas son heredables a través de la meiosis, y por lo general se segregan con éxito en ambos tipos de divisiones celulares.

De esta manera, la estabilidad de los cromosomas dicéntricos va a ser diferente después de la formación según el tipo de organismo del que se trate. Dicha estabilidad se ha atribuido al fenómeno de la inactivación de uno de los dos centrómeros (Han et al., 2006). Este consiste en un proceso por el cual uno de los centrómeros se vuelve no funcional o inactivo. El cromosoma, que es estructuralmente dicéntrico, se comporta como un cromosoma funcionalmente monocéntrico, pudiéndose segregar con normalidad durante la división celular (Stimpson et al., 2012).

4.1.1. Mecanismos de estabilización de dicéntricos.

En muchos estudios donde se analiza la supervivencia de células con cromosomas dicéntricos, se observa que la mayoría de estas dejan de dividirse. Sin embargo, una

pequeña porción de células consigue sobrevivir a pesar de su condición dicéntrica inicial. Se puede dividir a esta pequeña porción de células en 3 grupos diferentes. En uno de ellos, las células se habrían estabilizado al descomponer el dicéntrico en dos cromosomas a los que se les añadió telómeros de novo en los extremos. Otro de los grupos consigue sobrevivir gracias a la eliminación física de uno de los centrómeros del dicéntrico mediante reordenamiento del ADN. Y el tercer grupo se mantiene estable con las secuencias del ADN de los centrómeros del cromosoma dicéntrico intactas. Esto indica que el dicéntrico se estabiliza epigenéticamente gracias a un proceso de inactivación de uno de los centrómeros, perdiendo este su función sin necesidad de verse alterada la secuencia de ADN (Sato et al., 2012).

Gracias a los estudios en humanos y otros organismos de estudio se entiende que en el proceso de inactivación del centrómero intervienen mecanismos genómicos y epigenéticos. Se observa que una gran variedad de proteínas esenciales, tanto del centrómero y cinetocoro como proteínas cromosómicas y de la cromatina, están ausentes de los centrómeros inactivos (Stimpson et al., 2012).

En el caso de los dicéntricos en donde uno de los centrómeros ha sido inactivado, se observa que el centrómero inactivado carece de la proteína ya nombrada en apartados anteriores, CENP-A. Aquellos centrómeros carentes de esta proteína no se asocian con el huso, de manera que el complejo cinetocoro se forma únicamente en uno de los dos centrómeros en este cromosoma dicéntrico, funcionalmente monocéntrico (Sato et al., 2012). Todo esto a pesar de que las secuencias de ADN de ambos centrómeros estén intactas.

A la hora de la inactivación del centrómero en un cromosoma dicéntrico, el desmontaje del cinetocoro es uno de los factores clave que desencadenan este proceso (Sato et al., 2012). Distintas mutaciones que afectan en aspectos diferentes del ensamblaje y función del cinetocoro provocan un mayor porcentaje de supervivencia de células con dicéntricos, inactivándose en estos uno de los dos centrómeros. Estudios en maíz ponen de manifiesto que un cromosoma que presenta dos centrómeros de distinto tamaño suele ser el de menor tamaño el que se inactiva. Si se da el caso de que estos se separan por recombinación intracromosómica el centrómero inactivo puede reactivarse (Han et al.,

2009). Esto reafirma la regulación epigenética bajo la que se encuentran estos dicéntricos.

Otra de las diferencias que encontramos entre el centrómero activo y el inactivado de un cromosoma dicéntrico consiste en que, en el centrómero inactivado, el dominio central suele encontrarse heterocromatinizado, mientras que en el centrómero activo esto no se observa. De la misma manera, los niveles de acetilación disminuyeron en esta región del centrómero inactivo (Sato et al., 2012). Las histonas, por lo general, se encuentran hipoacetiladas en la heterocromatina, cosa que se observa en este caso. El estado de heterocromatinización no es condición necesaria para la inactivación del centrómero. El proceso de heterocromatinización tiene como función principal impedir la reactivación del centrómero inactivado.

4.2. Dicéntricos inestables y el ciclo rotura-fusión-puente (BFB).

El ciclo de rotura-fusión-puente (BFB, de sus siglas en inglés) es un mecanismo de inestabilidad cromosómica, descrito por Barbara McClintock (McClintock, 1941). Estos ciclos pueden dar lugar a distintas consecuencias, como la pérdida de heterocigosidad para algunos alelos, aneuploidías de un cromosoma completo o translocaciones no recíprocas (Bhargava et al., 2020).

Uno de los eventos que puede dar pie al comienzo del ciclo BFB consiste en la rotura o erosión de la región telomérica, como se puede observar en la imagen 3. Este suceso va a ocasionar que, tras la replicación, las dos cromátidas hermanas que constituyen dicho cromosoma presenten telómeros dañados. Recordamos que una de las principales funciones de los telómeros consiste en evitar que los extremos de los cromosomas se fusionen con otras cromátidas. La quinasa ATM, una proteína serina/treonina quinasa que se encarga de fosforilar varias proteínas clave que inician la activación del punto de control del daño del ADN, permite activar la vía de unión que puede generar fusiones de extremo a extremo entre las cromátidas hermanas (Bhargava et al., 2020). Las dos cromátidas hermanas, al fusionarse, dan lugar a un cromosoma dicéntrico. Durante la división celular las cromátidas hermanas forman un puente donde un centrómero será atraído hacia una dirección, mientras que el otro centrómero será arrastrado en la

dirección opuesta. Al ser arrastradas hacia estas dos direcciones opuestas, se rompen eventualmente en una ubicación distinta del sitio de fusión, lo que resulta en que las células hijas reciban una cromátida desigual, una con más material genético que la otra. En esta nueva situación, las dos cromátidas resultantes van a carecer de telómeros, por lo que cuando llegue la hora de que ambas se repliquen, el ciclo BFB se repetirá y continuará cada división celular posterior. Este ciclo se continuará produciéndose a no ser que se de la situación de que las cromátidas reciban un telómero de novo. Además, las consecuencias de los ciclos BFB dependen de si se producen fusiones entre diferentes cromosomas o entre cromátidas hermanas (Murnane, 2012; Ta et al, 2013).

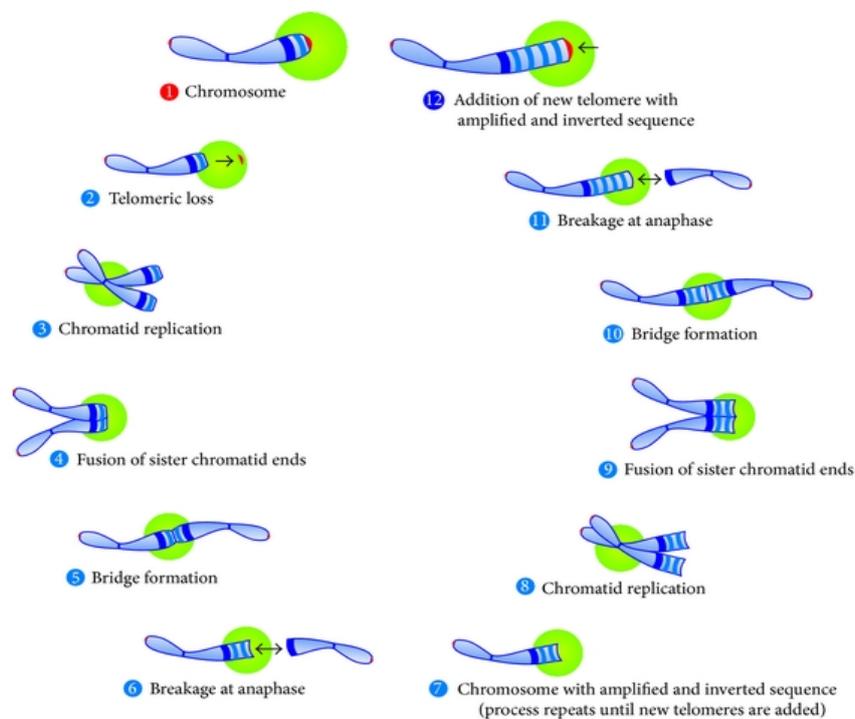


Imagen 3. Esquema donde se explica el ciclo BFB. Extraído del artículo citado en la bibliografía (Ta et al, 2013)

4.2.1 El ciclo BFB en el cáncer y la cromotripsis.

Muchos tumores humanos muestran genomas desorganizados. Esto se produce como consecuencia de una gran cantidad de procesos mutacionales que ocasionan una gran inestabilidad genética, destacando el ciclo rotura-fusión-puente (BFB) y la cromotripsis, ya que ambos producen una gran inestabilidad. Además, ambos fenómenos están interconectados.

Durante el proceso de rotura de un puente cromosómico, en el ciclo BFB, se pueden generar roturas simples y fragmentación local del material genético. La cromotripsis es un proceso en el que se adquieren rápidamente decenas a cientos de reordenamientos estructurales en un corto período de tiempo (Ly & Cleveland, 2017). Dichos reordenamientos, restringidos a algunos cromosomas con puntos de ruptura dispersos o agrupados en algunas regiones, surgen de una cascada de eventos que comienza con la formación del puente cromosómico durante la mitosis. Tras esto, se suceden eventos de fragmentación cromosómica, daño del ADN, desagregación cromosómica y finalmente se produce una formación de micronúcleos. En las células cancerosas se ha correlacionado la aparición de estos micronúcleos con la fragmentación cromosómica y con procesos de cromotripsis (Umbreit et al., 2020).

Un solo error durante la división celular, como la formación del puente cromosómico, puede producir con rapidez una gran cantidad de características típicas de los genomas presentes en el cáncer. Por ello se puede afirmar que los episodios de cromotripsis están intrínsecamente relacionados con los ciclos BFB (Umbreit et al., 2020). Además de que se sabe que estos eventos mutacionales son comunes en el cáncer, probablemente estos pueden producirse a lo largo del desarrollo y vida del organismo y hayan tenido un papel destacado en la evolución.

5. Modelos de estudio de cromosomas dicéntricos.

Ya que fue en plantas donde los cromosomas dicéntricos fueron descritos por primera vez, mucha de la información acerca de estos y de los mecanismos de estabilización de los dicéntricos proviene de estudios en ellas (Stimpson et al., 2012). Ensayos en especies como el maíz y el trigo han permitido a los investigadores estudiar la inestabilidad de estos cromosomas dicéntricos, así como el funcionamiento del mecanismo de inactivación de uno de los centrómeros que otorga estabilidad a las células que contienen cromosomas dicéntricos (Gao et al., 2011; Han et al., 2006; Han et al., 2009).

Sin embargo, uno de los modelos más relevantes o útiles para el estudio de los cromosomas dicéntricos son las levaduras. Los primeros estudios, tras los realizados en

maíz, en los que se pudo demostrar la inestabilidad mitótica y el futuro que podía deparar a los dicéntricos fueron realizados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Stimpson et al., 2012). Esta levadura se puede modificar de diferentes maneras para obtener los dicéntricos deseados, además de insertar múltiples mutaciones en genes de reparación del daño al ADN, con lo que se puede realizar estudios funcionales. La levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* también es un importante modelo de estudio, ya que la organización de los centrómeros de ésta y la de los eucariotas superiores es muy similar. En esta levadura no se ha demostrado que se produzcan de manera natural dicéntricos, sin embargo se ha podido diseñar un cromosoma dicéntrico entre el segundo y tercer cromosoma de los tres que presenta esta levadura.

A partir de la década de los 60 comienzan a hacer acto de presencia los estudios de cromosomas dicéntricos en humanos en relación con los isocromosomas X (De La Chapelle et al., 1966; Fraccaro et al., 1960). Una de las primeras maneras de abordar su investigación fueron los estudios observacionales en pacientes humanos, ya que estos cromosomas se asociaron con defectos congénitos como el síndrome de Turner y el síndrome de Down, así como con anomalías reproductivas. También hay estudios como el de Fisher et al., 1997 donde se estudia una línea celular de dicéntricos de un paciente. Sin embargo, el inconveniente que presentan estos estudios es que los dicéntricos obtenidos de los pacientes son evaluados mucho tiempo después de que se formaran, por lo que el destino del centrómero ya se ha establecido y mantenido en el tiempo. Por esto mismo, y por el hecho de que los dicéntricos obtenidos de pacientes representan la versión más estable de estos cromosomas, no es posible el estudio del espectro entero de los destinos de dicéntricos en humanos desde que surgen en una célula germinal hasta que se estabilizan (Stimpson et al., 2012). Además, se tiene un gran desconocimiento sobre qué ocurre con dicéntricos formados en células somáticas. Para solucionar este inconveniente, se han realizado estudios recientes produciendo cromosomas dicéntricos en células humanas en cultivo (Stimpson et al., 2010).

5.1. Dicéntricos en *Saccharomyces cerevisiae*.

Como ya se comentó en el anterior punto, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los organismos modelo más usados para el estudio de los cromosomas dicéntricos.

Su uso como sistema genético clásico se popularizó gracias a su genética clásica simple y a la facilidad para llevar a cabo transformaciones de ADN recombinante. Es en parte posible estudiar los dicéntricos en este organismo por la capacidad que presenta para tolerar las aneuploidías de todo tipo. En esta levadura, para poder obtener los dicéntricos deseados se pueden emplear distintas técnicas (Stimpson et al., 2012).

Se puede utilizar minicromosomas no esenciales (Koshland et al., 1987), cromosomas endógenos que contienen un centrómero extra condicional codificado en un casete GAL1-CEN integrado y centrómeros condicionales endógenos flanqueados por secuencias promotoras GAL1 (Stimpson et al., 2012).

5.1.1. Modelos de dicéntricos constitutivos.

Los modelos de cromosomas dicéntricos constitutivos en *Saccharomyces cerevisiae* son creados mediante recombinación homóloga. Al aislar la secuencia de un centrómero y mediante el procedimiento correspondiente para llevar a cabo la transformación para integrar la secuencia de ADN deseada, en este caso aquella que incluye la secuencia centromérica, puede modificarse uno de los cromosomas de la levadura para así convertirlo en dicéntrico (Surosky & Tye, 1985).

Una de las maneras que existe para generar este tipo de cromosomas en organismos como *Saccharomyces cerevisiae* consiste en transformar la célula al introducir la secuencia de uno de los cromosomas en un plásmido construido que la contenga, de manera que por recombinación homóloga se consigue introducir la secuencia centromérica nueva en un cromosoma que ya dispone de su propio centrómero (Surosky & Tye, 1985). En algunos estudios, a la hora de transformar las células, se ha observado que los dicéntricos se mantienen durante la meiosis, y en la mitosis este cromosoma se rompe con frecuencia (Haber et al., 1984).

5.1.2. Modelos de dicéntricos condicionales.

El modelo de cromosomas dicéntricos condicionales en *Saccharomyces cerevisiae* se basa en el principio de activación e inactivación del centrómero condicional, utilizando

condiciones de crecimiento que favorecen la inducción transcripcional o la represión del promotor GAL (Hill & Bloom, 1987).

La segunda secuencia centromérica tiene la característica de que está regulada por el promotor GAL. Los genes GAL dan lugar a la producción de enzimas encargadas de metabolizar la galactosa en *Saccharomyces cerevisiae* (Gonzalo Claros, s.f.). El modo en que estaría construido este dicéntrico sería tal que la secuencia específica del segundo centrómero (centrómero condicional) es precedida por el promotor GAL. De esta manera, cuando se incuban estas células utilizando galactosa como fuente de carbono se produce la inducción de la transcripción del promotor GAL y el centrómero no estaría activo al no ser reconocido. De la manera opuesta, cuando crecemos las células en un medio con glucosa como fuente de carbono se produce la represión de promotor GAL de manera que la célula es capaz de reconocer el segundo centrómero como unión al cinetocoro (Hill & Bloom, 1989). Por lo tanto, se puede apreciar la facilidad con la que se manipula la activación o represión de la función del segundo centrómero en el modelo de dicéntrico condicional.

6. Caso práctico de dicéntrico condicional.

6.1 Estudio preliminar de un modelo en *S. cerevisiae* de dicéntrico condicional que flanquea el rDNA.

La cepa de levadura dicéntrica condicional seleccionada para este estudio presentaban una segunda secuencia centromérica en el brazo largo del cromosoma 12. A la derecha de la secuencia centromérica propia del cromosoma, a 200 kb, se encuentra una región de rDNA (1-2 Mb), y a 200 kb de esta región está la secuencia centromérica condicional junto con el promotor Gal que la regula.

Como se dijo en el apartado anterior, estas células, debido al promotor Gal, cuando crecen en un medio YPD (la fuente de carbono es la glucosa) van a comportarse como células dicéntricas, y al hacerlas crecer en YPGal (la fuente de carbono es la galactosa) van a tener el segundo centrómero inactivado, actuando como células normales. De esta manera, se cultivaron en ambas placas la misma concentración de células y se tomaron fotografías de las dos placas a los días 3, 4, 5, 6 y 7, para luego analizar y extraer la información (área, morfología y cantidad de colonias) que se requiere para comprobar si

se cumplen las predicciones mencionadas a continuación y elaborar una conclusión en consecuencia.

La hipótesis que se plantea para este trabajo es que, con este modelo de dicéntrico donde los centrómeros flanquean la región repetitiva de ADN_r y por lo tanto el ciclo BFB se estaría produciendo sobre estas regiones repetitivas en tándem, dichas células dicéntricas muestren una mayor estabilidad que modelos de dicéntricos donde el ciclo BFB se produjese sobre regiones únicas. Esta hipótesis se basa en que las células disponen de un mecanismo de reparación de roturas del ADN conocido con el nombre de “single strand annealing (SSA)” que podría impedir la pérdida de viabilidad a costa de la reducción del número de copias. Este mecanismo interviene en regiones repetitivas en tándem, en cluster o en regiones dispersas. En estas últimas sería altamente mutagénico, pero en las regiones en cluster como el rDNA solo causaría pérdida de copias que se podrían compensar por otros medios (Kobayashi, 2011). Esto supone que nuestro modelo dicéntrico puede ser totalmente viable, aun sufriendo los ciclos BFB continuos.

Para comprobar nuestra hipótesis, analizaremos las placas de ambos medios (donde en una las células tendrán inactivo el segundo centrómero y en la otra actuarán como dicéntricas) para comparar el efecto que tiene el dicéntrico sobre la formación de las colonias y ver si muestra los fenotipos típicos de un cultivo de células con cromosomas dicéntricos. A continuación, se mencionan los fenotipos de las colonias que esperamos para cada placa según su condición de células normales o dicéntricas.

Predicciones para la placa de YPGal:

- El número de células (o unidades formadoras de colonias, CFU de sus siglas en inglés) se espera que sea igual al número de células sembradas/esperadas.
- El tamaño de las colonias sea homogéneo.
- La velocidad de crecimiento sea homogénea.
- Presenten una morfología esférica de las colonias.

Lo que podríamos esperar para la placa de YPD si estos cromosomas dicéntricos afectaran a regiones únicas sería alguna de las siguientes condiciones:

- El número de CFU sea inferior al número de células sembradas o esperadas. Esto sería así ya que las células estarían muy dañadas dada la esperada letalidad de los puentes de anafase que se formen y el efecto del ciclo BFB.
- El tamaño de las colonias sea heterogéneo.
- La velocidad de crecimiento sea inferior a lo previsto.
- La morfología de las colonias sea más diversa (la pérdida de circularidad es un indicativo de aneuploidías en general).

7. Objetivos

El objetivo principal de este proyecto consistió en llevar a cabo el estudio preliminar de un modelo de dicéntrico en *Saccharomyces cerevisiae*, en el que los centrómeros del dicéntrico flanquean regiones repetitivas en tándem de ADNr.

Como objetivos individuales, para el estudio de la inestabilidad asociada al dicéntrico analizamos el número de clones supervivientes, la variabilidad clonogénica, el periodo de latencia de surgimiento de colonias, tamaño y velocidad de crecimiento de las colonias y la morfología que éstas presenten.

8. Material y métodos

El material que se utilizó para este estudio fue un ordenador con los programas Fiji/ImageJ, CellProfiler, GIMP, Microsoft Excel, Prism 8 y GraphPad.

El estudio realizado en este proyecto consistió en el análisis de dos secuencias de fotografías de colonias en placas de Petri en el tiempo. Inicialmente, las 10 imágenes, que fueron proporcionadas para este estudio correspondientes a los ensayos en placa de YPD e YPGal durante los 7 días de experimento, serían analizadas con el programa CellProfiler siguiendo el protocolo descrito en uno de los artículos citados en la bibliografía (Bray et al., 2015) y el GIMP para adecuar las imágenes al formato correctamente.

En vistas de que este programa no permitía un correcto análisis de las colonias que se encontraban unidas, las imágenes se analizaron con el ImageJ apoyándonos en el manual que se obtiene de la página web adjuntada en la bibliografía (Labno, s.f.) y de varios tutoriales de YouTube. En primer lugar, al abrir la imagen con este programa se ha de establecer una escala para determinar la cantidad de píxeles que equivalen a un milímetros en dicha imagen. Para ello se calcula el diámetro de la placa de Petri y sabiendo que éste es igual a 90 mm podemos establecer la escala.

A continuación, se selecciona el máximo cuadrado dentro de la placa de Petri sobre el que se llevará a cabo el análisis de las colonias. Esto es así porque el programa no nos deja analizar imágenes circulares, por lo que no se analizan todas las colonias de la placa, pero si una cantidad bastante representativa de ellas. Una vez se selecciona la región a estudiar se debe tener en cuenta que para las siguientes imágenes seleccionaremos la misma región que contiene estas colonias, para así estudiar correctamente los efectos a través del tiempo que puedan presentar.

La imagen es convertida a binario, de forma que sobre un fondo negro las colonias aparecen en blanco. Se aplica tras esto un procedimiento semiautomático para separar las colonias que se hayan unidas y se eliminan algunas imperfecciones del paso a binario de la imagen si las hubiera. A continuación, se procede a analizar propiamente la imagen. Lo que interesa analizar en este punto del estudio es obtener los valores de las áreas de las colonias y el valor de la circularidad de las mismas. Además, el programa permite obtener una imagen donde las colonias analizadas son numeradas, y estos números aparecen al lado de cada valor de área y circularidad para identificar a la colonia que pertenece.

Con el dato del número de colonias por día en cada placa se pueden obtener los resultados acerca del número de clones supervivientes por placa. Los valores de las áreas se agrupan en rangos y se grafican los datos para analizar si la distribución de estos datos es unimodal o bimodal. Se dividirán los valores de las áreas de las colonias de YPD e YPGal en 3 grupos, pequeñas, medianas y grandes, en las dos placas del días 3 del experimento. Luego se toman aproximadamente los valores de unas 25 colonias aisladas para cada grupo por placa, y se estudia el crecimiento que experimentan desde

el día 3 al 5. En cuanto a los valores de circularidad, solo serán utilizados los valores pertenecientes a colonias aisladas de las placas a día 7.

9. Resultados y discusión

9.1. Inestabilidad asociada al dicéntrico: Estudio clonogénico.

9.1.1. Número de clones supervivientes

Tras contabilizar la cantidad de colonias por placa mediante el programa anteriormente mencionado, se debe tener en cuenta que puede existir un pequeño error de manera que tras el análisis no se detecten las colonias que son muy pequeñas. En la tabla 1 se dan a conocer los datos referentes a este análisis.

Tabla 1. En esta tabla se muestran el número de colonias según el día en las placas de YPD e YPGal, así como la media y desviación típica de cada placa. También se incluye el % de colonias de YPD frente a las de YPGal.

	YPD	YPGal
Día 3	356	430
Día 4	364	436
Día 5	383	431
Día 6	377	438
Día 7	394	443
Media	374,8	435,6
SD	15,1	5,3
% (ref YPGal) (Día 3)	82,79	100
% (ref YPGal) (Día 7)	86,04	100

Es posible observar que a día 3 del experimento el número de colonias existentes en la placa de YPD es un 17,21% menor que el de la placa de YPGal. Y si nos fijamos en el séptimo día, las colonias que crecen en medio YPD reducen la diferencia en el número de clones supervivientes con YPGal en relación al tercer día, siendo el número de clones supervivientes en YPD un 14% menor que en YPGal. La diferencia entre el número de clones supervivientes según el tipo de medio empleado es algo que se puede visualizar fácilmente en el gráfico de la imagen 4.

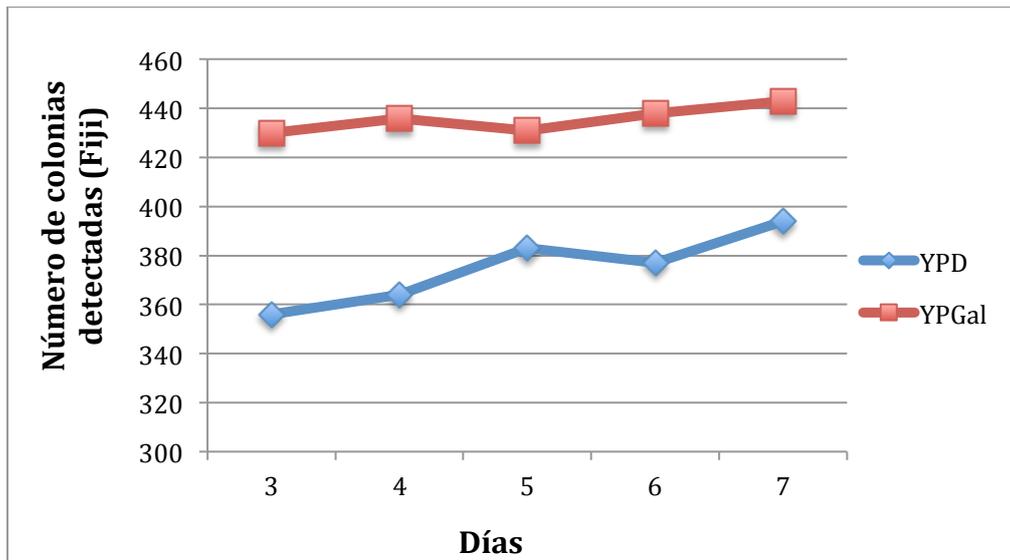


Imagen 4. Gráfico donde se representan los valores del número de colonias de las placas de YPD e YPGal para cada día.

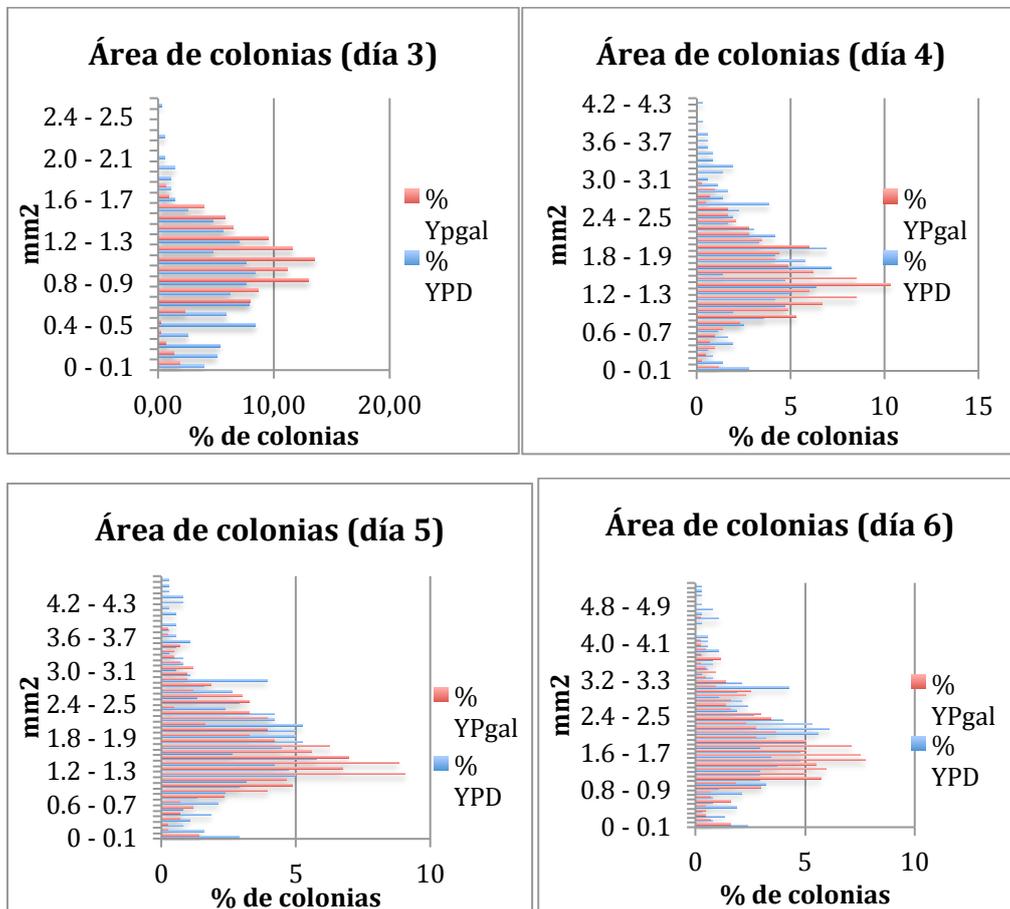
En base a estos datos, lo que podemos afirmar es que el número de CFU es menor en la placa de YPD (colonias dicéntricas) que en la de YPGal (colonias con el segundo centrómero inactivado), y por tanto menor al número de células sembradas. Por lo que lleva a pensar que la condición de dicéntrico en este modelo puede estar reduciendo la capacidad de supervivencia de las células, aunque esto requiere de más ensayos para confirmarlo del todo.

9.1.2. Variabilidad clonogénica.

Para el estudio de la variabilidad clonogénica se comenzó analizando la distribución que presentaba la medida de las áreas de las colonias de las placas de YPD e YPGal.

Se obtuvieron los datos de las áreas de las colonias de cada placa y posteriormente en Excel se agruparon en rangos dando lugar a las gráficas de la imagen 5. Al mismo tiempo, los valores de todas las áreas se representaron en gráficos de cajas y bigotes (imagen 6). En estas gráficas podemos apreciar a simple vista que en ambas placas las áreas de las colonias presentan una distribución normal. La diferencia existente entre las áreas de las colonias de YPGal e YPD es que, en el caso de las primeras, los valores de las áreas para cada día están más agrupados entorno a la media en comparación a los valores de la placa de YPD, donde se aprecia que la curva de la distribución normal es

más suave. A medida que pasan los días se aprecia como el área de las colonias de YPD va superando las de YPGal, como cabría esperar porque las células crecen mejor en glucosa que en galactosa. El dato más importante es la presencia de un mayor porcentaje de colonias pequeñas en YPD a día 3. Un 20,79% de las colonias en YPD son pequeñas frente a un 4,65% en YPGal. Tras realizar el test de Fisher sobre estos datos y obtener un valor de P inferior a 0,0001 podemos decir que la diferencia entre ambos valores es estadísticamente significativa. Estos datos se obtuvieron al calcular el número de colonias inferiores a la mitad del valor de la mediana y dividir este número entre el total de colonias y multiplicar por 100. Luego el test de Fisher se obtuvo mediante el programa GraphPad.



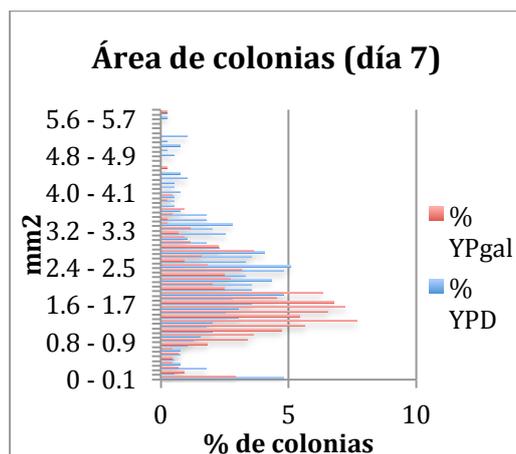


Imagen 5. Cada uno de los 5 gráficos corresponde con la representación de los valores del porcentaje de colonias que existen para cada uno de los rangos de las áreas establecidos para las colonias de YPD e YPGal por día del experimento.

En la imagen 6 los gráficos de cajas y bigotes permiten visualizar que en el caso de las colonias de la placa de YPGal los valores de las áreas de estas concentrados entorno a la mediana, y los de YPD están más dispersos al ser las cajas más grandes.

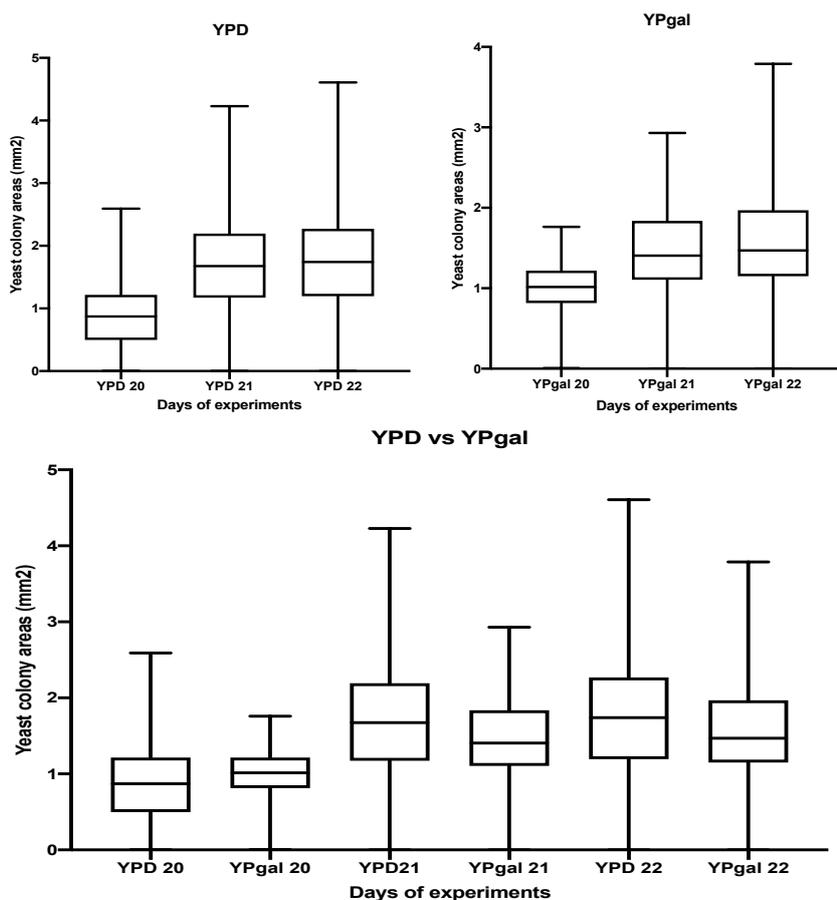


Imagen 6. En los dos primeros gráficos de cajas y bigotes se representan, para cada placa, las áreas de las colonias en los días 3, 4 y 5 (días 20, 21 y 22 de Enero de 2020) para apreciar el efecto del paso del tiempo por placa. En último gráfico, los valores de ambas placas se representan a la vez para comparar los resultados de los medios YPD e YPGal.

Se puede observar que las colonias de YPGal presentan un tamaño más homogéneo que las de YPD, cuyo tamaño parece ser más heterogéneo. Esto se confirma con el mayor número de colonias pequeñas que crecen a día 3 en la placa de YPD en comparación con la de YPGal, y con la interpretación del gráfico de cajas y bigotes, donde los datos de las áreas de las colonias de YPGal están más agrupados en torno a la mediana que los de YPD.

Esta heterogeneidad puede ocurrir porque el dicéntrico, antes de ser resuelto y formar la colonia, causa daños en las células que podrían ralentizar la velocidad de crecimiento de las colonias y por eso tenemos más colonias de distintos tamaños en función de la cantidad de daño acumulado. También puede que simplemente el dicéntrico cause que algunas células se queden estancadas temporalmente en la fase Lag de crecimiento, fase previa a la de crecimiento exponencial donde las células aun tratan de adaptarse al medio y se mantienen sin mostrar crecimiento global, y tarden más que otras en alcanzar la fase exponencial. Esto se comprobará en los siguientes apartados.

9.1.2.1. Periodo de latencia de surgimiento de colonias.

En cuanto al análisis del periodo de latencia de surgimiento de las colonias, inicialmente se pensó que a día 5 y 7 en la placa de YPD habrían nuevas colonias con respecto a las observadas a día 3. Además, el análisis de las colonias mediante el programa anteriormente mencionado nos indicaba que cada vez habían más colonias surgiendo en las placas con el paso de los días. Sin embargo, tras analizar las placas de YPD a día 3 y 7 contando colonia por colonia se vio que no había ninguna colonia de nuevo surgimiento a día 7. Es cierto que algunas de las colonias iniciales eran muy pequeñas y casi imperceptibles, y lo más probable es que esto causara el error que observamos inicialmente en el análisis con el ImageJ. Dado que las imágenes se pasan a binario, al ser tan pequeñas las colonias a día 3 algunas no se detectaron y por eso vemos este falso aumento de colonias con los días.

Estos datos llaman la atención nuevamente, ya que se podía esperar que con el paso de los días las células que presentaban el cromosoma dicéntrico activado y que en un

principio hubiesen detenido la división celular, tras resolver la condición de dicéntricas (por inactivación de un centrómero, delección...), comenzaran a dividirse adecuadamente formando nuevas colonias. Pero lo que puede haber ocurrido es que la condición de dicéntrico se resuelve antes de el día 3, y lo que nos lleva a pensar que estas células pueden formar colonias a un ritmo más lento que las normales o que tardan más en empezar a crecer, aunque esto se verá con más precisión en el siguiente apartado.

9.1.2.2. Tamaño y velocidad de crecimiento de las colonias.

La velocidad de crecimiento de las colonias parece estar relacionada con el tamaño de las mismas. Basándonos en los datos que aportan las gráficas de la imagen 7, se puede observar que las colonias pequeñas, que durante los dos primeros días tardan más en crecer, a partir del día 3 su crecimiento es más lento que el de las colonias medianas o grandes. Por lo que descartamos que la condición de dicéntrico en la placa YPD pueda causar un estancamiento del crecimiento de las colonias más pequeñas en la fase previa a la exponencial.

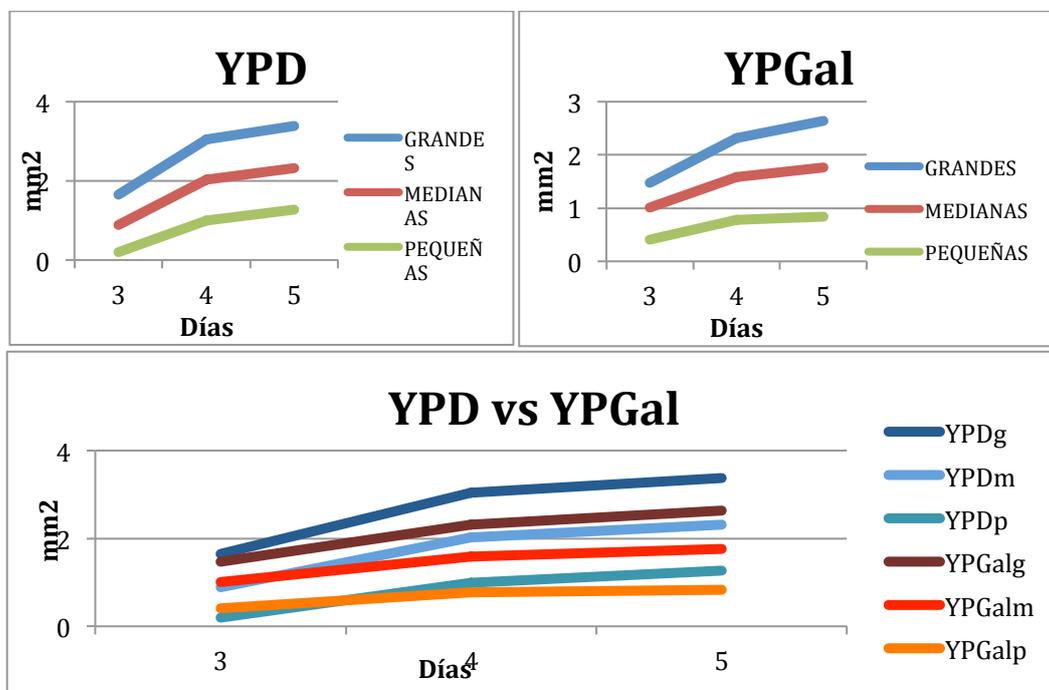


Imagen 7. Los dos primeros gráficos muestran los valores de las medias de las áreas, para los días 3, 4 y 5, pertenecientes a 3 grupos de colonias (grandes, medianas y pequeñas) en las placas de YPD e YPGal. La tercera gráfica enfrenta los valores anteriores para las placas de YPD e YPGal y así poder comparar ambos.

Esto anterior se puede confirmar de manera cuantitativa al calcular el incremento diario del área. Con los datos de las medias de las áreas de las colonias por día se calculó este valor y se confirmó que efectivamente las colonias pequeñas incrementaban su área por día de manera más lenta que las colonias medianas y grandes.

Si observamos la gráfica donde se compara las colonias de YPD e YPGal observamos un comportamiento similar, viendo que las de YPD a día 5 suelen tener un mayor valor medio de su área. Esto seguramente se debe a que las células de levadura crecen mejor con la presencia de glucosa en el medio.

Lo interesante a continuación sería aislar células de las colonias pequeñas para poder seguir estudiando su crecimiento comparándolas con otras, y poder concretar de esta manera el tipo de crecimiento que llegan a experimentar con mayor claridad.

6.3.2.3. Morfología de colonias.

Para estudiar la morfología de las colonias, se analizaron las colonias aisladas de las placas de YPD e YPGal a día 7 del experimento. Mediante el programa ImageJ se extrajo el parámetro de circularidad y se calculó la media del mismo para cada placa. Para la placa de YPD la media fue de 0,888 y para la de YPGal fue de 0,869.

La circularidad hace referencia a la cercanía, en este caso de las colonias, a un círculo perfecto. De manera que cuanto más cercano sea el valor a 1 más se aproxima a un círculo perfecto. Por lo tanto, tal y como se puede apreciar en el gráfico de la imagen 8, las colonias de la placa de YPGal son un poco menos circulares que las colonias de la placa YPD. Tras realizar la prueba T de Student sobre estos datos, el valor de P nos da que es inferior a 0,0001, por lo que la diferencia entre ambas medias es estadísticamente muy significativa. Sin embargo, la diferencia entre los valores 0,89 y 0,87 es pequeña para una la escala de 0 a 1, por lo que no podríamos concluir si presenta significado biológico.

Esto choca con las predicciones iniciales, donde se creía que las colonias dicéntricas de la placa YPD presentarían una morfología diversa (y por lo tanto un menor índice de circularidad) en contraposición con la morfología esférica que se esperaba de las colonias de la placa YPGal.

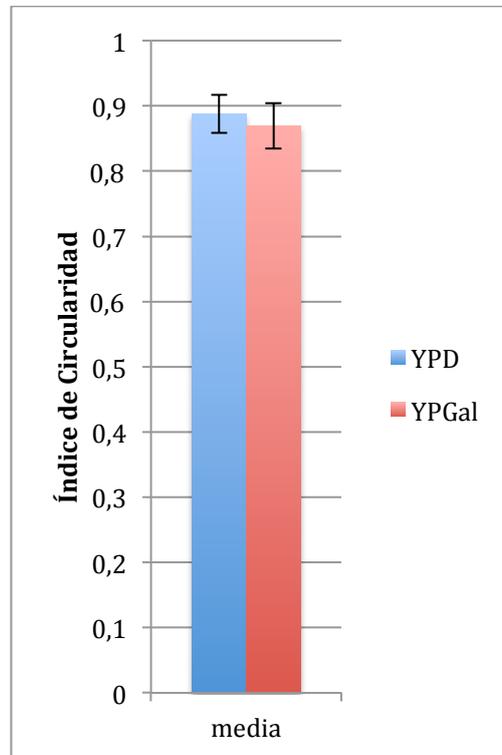


Imagen 8. Gráfico donde se muestra la media de los valores de circularidad de todas las colonias aisladas en la placa de YPD e YPGal a día 7.

Lo que si podemos sacar en claro es que las células inicialmente dicéntricas de nuestro modelo resuelven esta condición y se estabilizan de forma que a la hora de formar las colonias no se aprecia el fenotipo de morfología diversa esperado.

10. Conclusiones.

En base a los resultados que se han obtenidos de este estudio, podemos plantear que la hipótesis inicial se cumple. Como se planteaba inicialmente, se observa que en este modelo de dicéntrico donde las dos secuencias centroméricas flanquean una región repetitiva en tándem de rDNA las colonias inicialmente dicéntricas presentan una mayor estabilidad a la larga que otros modelos de dicéntricos (como se aprecia al comparar los

datos obtenidos con las predicciones iniciales). Esto se confirma ya que en los resultados vemos que la morfología de las colonias dicéntricas apenas se ve afectada, cuando lo normal sería esperar una morfología diversa. La velocidad de crecimiento es algo menor que la de las células normales, y con el número de CFU ocurre lo mismo. Sin embargo, el único fenotipo que permite con mayor facilidad diferenciar a los dicéntricos de las células normales (cultivadas en el medio YPGal) es el tamaño, homogéneo en las células no dicéntricas y más heterogéneo en las dicéntricas.

Para concluir, como ya se mencionaba inicialmente, este modelo de dicéntrico aparentemente presenta una mayor estabilidad que otros ya que el ciclo BFB estaría ocurriendo sobre regiones repetitivas en tándem, y el posible daño que este proceso causara sobre las células podría ser solventado por el mecanismo de single strand annealing, impidiendo la pérdida de viabilidad de las células.

11. Conclusions

According to the results obtained from this study, we can think that the initial hypothesis is fulfilled. As we mentioned, it is observed that in this dicentric model where two centromeric sequences flank a tandem repetitive region of rDNA, the initially dicentric colonies are more stable than other dicentric models. This can be confirmed with the results, where we see that the morphology of dicentric colonies is not affected, when it would be normal to expect a different morphology. The growth rate is somewhat slower than the rate of normal cells, and the same occurs with the number of CFUs. However, the phenotype that makes it easier to differentiate between the dicentric cells and the normal cells is the size distribution, homogeneous in the monocentric cells and more heterogeneous in the dicentric ones.

Finally, as already mentioned initially, this dicentric model apparently presents greater stability than others since the BFB cycle would be occurring over repetitive tandem regions, and the possible damage that this process may cause to cells could be solved by the single strand annealing mechanism, that can prevent the loss of cell viability.

12. Bibliografía

- Bhargava, R., Fischer, M., & O'Sullivan, R. J.** (2020). Genome rearrangements associated with aberrant telomere maintenance. *Current Opinion in Genetics & Development*, 60, 31-40.
- Blackburn, E. H.** (1991). Structure and function of telomeres. *Nature*, 350(6319), 569-573.
- Bray, M. A., Vokes, M. S., & Carpenter, A. E.** (2015). Using CellProfiler for automatic identification and measurement of biological objects in images. *Current Protocols in Molecular Biology*, 109(1), 14-17.
- Brooker, R.** (2016). *Concepts of genetics* (2ª edición ed.). New York: McGraw-Hill.
- Brown, J. D., & O'Neill, R. J.** (2014). The evolution of centromeric DNA sequences. *eLS*.
- De La Chapelle, A., Wennström, J., Hortling, H., & Ockey, C. H.** (1966). Isochromosome-X in man. Part I. *Hereditas*, 54(3), 260-276.
- Fisher, A. M., Al-Gazali, L., Pramathan, T., Quaife, R., Cockwell, A. E., Barber, J. C., ... & Tyler-Smith, C.** (1997). Centromeric inactivation in a dicentric human Y; 21 translocation chromosome. *Chromosoma*, 106(4), 199-206.
- Fraccaro, M., Ikkos, D., Lindsten, J., Luft, R., & Kaijser, K.** (1960). A new type of chromosomal abnormality in gonadal dysgenesis. *The Lancet*, 276(7160), 1144.
- Gao, Z., Fu, S., Dong, Q., Han, F., & Birchler, J. A.** (2011). Inactivation of a centromere during the formation of a translocation in maize. *Chromosome research*, 19(6), 755.
- Guérin, T. M., Béneut, C., Barinova, N., López, V., Lazar-Stefanita, L., Deshayes, A., y otros.** (2019). Condensin-Mediated Chromosome Folding and Internal Telomeres Drive Dicentric Severing by Cytokinesis. *Molecular cell*, 75 (1), 131-144.
- Haber, J. E., Thorburn, P. C., & Rogers, D.** (1984). Meiotic and mitotic behavior of dicentric chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 106 (2), 185-205.
- Han, F., Gao, Z., & Birchler, J. A.** (2009). Reactivation of an inactive centromere reveals epigenetic and structural components for centromere specification in maize. *The plant cell*, 21(7), 1929-1939.
- Han, F., Lamb, J. C., & Birchler, J. A.** (2006). High frequency of centromere inactivation resulting in stable dicentric chromosomes of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(9), 3238-3243.
- Hill, A., & Bloom, K.** (1987). Genetic manipulation of centromere function. *Molecular and cellular biology*, 7 (7), 2397-2405.
- Hill, A., & Bloom, K.** (1989). Acquisition and processing of a conditional dicentric chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 9 (3), 1368-1370.
- Karp, G.** (2014). *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. México D.F.: McGraw-Hill.
- Kobayashi, T.** (2011). Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(8), 1395-1403.
- Koshland, D., Rutledge, L., Fitzgerald-Hayes, M., & Hartwell, L. H.** (1987). A genetic analysis of dicentric minichromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 48(5), 801-812.
- Kravtsov, V. Y., Fedortseva, R. F., Starkova, Y. V., Yartseva, N. M., & Nikiforov, A. M.** (2000). Tailed nuclei and dicentric chromosomes in irradiated subjects. *Applied Radiation and Isotopes*, 52 (5), 1121-1127.
- Ly, P., & Cleveland, D. W.** (2017). Rebuilding chromosomes after catastrophe: Emerging mechanisms of chromothripsis. *Trends in cell biology*, 27 (12), 917-930.
- McClintock, B.** (1941). The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics*, 26 (2), 234.
- Murnane, J. P.** (2012). Telomere dysfunction and chromosome instability. *Mutation research/Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 730 (1-2), 28-36.
- Plohl, M., Meštrović, N., & Mravinac, B.** (2014). Centromere identity from the DNA point of view. *Chromosoma*, 123 (4), 313-325.

- Sato, H., Masuda, F., Takayama, Y., Takahashi, K., & Saitoh, S.** (2012). Epigenetic Inactivation and Subsequent Heterochromatinization of a Centromere Stabilize Dicentric Chromosomes. *Current Biology*, 22 (8), 658-667.
- Snustad, D. P., & Simmons, M. J.** (2011). *Principles of Genetics* (6ª edición ed.). (J. W. Sons, Ed.)
- Stimpson, K. M., Matheny, J. E., & Sullivan, B. A.** (2012). Dicentric chromosomes: unique models to study centromere function and inactivation. *Chromosome Research*, 20 (5), 595-605.
- Stimpson, K. M., Song, I. Y., Jauch, A., Holtgreve-Grez, H., Hayden, K. E., Bridger, J. M., y otros.** (2010). Telomere disruption results in non-random formation of de novo dicentric chromosomes involving acrocentric human chromosomes. *PLoS genetics*, 6 (8).
- Stimpson, K. M., Sullivan, L. L., Kuo, M. E., & Sullivan, B. A.** (2014). Nucleolar Organization, Ribosomal DNA Array Stability, and Acrocentric Chromosome Integrity Are Linked to Telomere Function. *PLoS One*, 9 (3).
- Sullivan, B. A., & Schwartz, S.** (1995). Identification of centromeric antigens in dicentric Robertsonian translocations: CENP-C and CENP-E are necessary components of functional centromeres. *Human molecular genetics*, 4(12), 2189-2197.
- Sullivan, L. L., Boivin, C. D., Mravinac, B., Song, I. Y., & Sullivan, B. A.** (2011). Genomic size of CENP-A domain is proportional to total alpha satellite array size at human centromeres and expands in cancer cells. *Chromosome research*, 19(4), 457.
- Surosky, R. T., & Tye, B. K.** (1985). Resolution of dicentric chromosomes by Ty-mediated recombination in yeast. *Genetics*, 110 (3), 397-419.
- Ta, L., Zordan, A., Mercer, B., Campbell, L. J., & MacKinnon, R. N.** (2013). The Breakage-Fusion-Bridge Cycle Producing MLL Amplification in a Case of Myelodysplastic Syndrome. *Journal of Cancer Research*, 2013.
- Umbreit, N. T., Zhang, C. Z., Lynch, L. D., Blain, L. J., Cheng, A. M., Tourdot, R., y otros.** (2020). Mechanisms generating cancer genome complexity from a single cell division error. *Science*, 368 (6488).
- Zakian, V. A.** (1989). Structure and function of telomeres. *Annual review of genetics*, 23(1), 579-604.

Páginas web:

- Gonzalo Claros, M.** (s.f.). *SEBBM*. Recuperado el 15 de 04 de 2020, de https://www.sebbm.es/BioROM/contenido/av_bma/apuntes/T12/t12_gal4.htm
- Labno, C.** (s.f.). *Unige.ch*. Recuperado el 05 de 04 de 2020, de University of Geneva: <https://www.unige.ch/medecine/bioimaging/files/3714/1208/5964/CellCounting.pdf>
- Repro Tec.** (s.f.). *Repro Tec. Diagnóstico y tratamiento reproductivo*. Recuperado el 04 de 06 de 2020, de <https://www.repro-tec.com/laboratorio-de-genetica-en-el-embrion-pgd-translocaciones/>