



MARÍA ANTONIA ALONSO FUENTES

DESTINO: Institute of Cell Biology and Neurobiology. Charité- Universitätsmedizin de Berlin. Alemania.

LABORATORIO: Brainstem Research group

Título: **Aprendizaje de las técnicas de biología molecular y celular de secuenciación de ARN de células únicas y núcleos únicos, e inmunoprecipitación de cromatina seguida de secuenciación profunda.**

La técnica de **secuenciación de célula única** se realizó mediante dos aproximaciones: disgregación de las células del tejido de interés, o disgregación de los núcleos de las células de interés. Ambas se realizaron en ratones transgénicos heterocigotos que expresan la proteína fluorescente Tomato bajo el promotor del gen *Krox20*. El objetivo de este constructo genético es hacer un seguimiento de las células generadas en los rombómeros 3 y 5 (en el rombencéfalo) que expresan específicamente el gen *Krox20*, mediante la expresión de la proteína fluorescente Tomato. Estas células emiten fluorescencia roja ($\lambda = 581$ nm), cuando se someten a una luz de $\lambda = 554$ nm. Esta propiedad es la que se utiliza para separar las células de interés en el Cell Sorting para su posterior procesamiento y secuenciación de los RNAs del transcriptoma de cada célula de manera individual.

La técnica consta de 4 partes: disgregación de las células (o núcleos) de la región de tejido de interés y selección y separación de las células (o núcleos) en pocillos individuales (una célula/núcleo por pocillo) mediante la técnica de Cell Sorting; extracción y amplificación de los RNAs de cada célula aislada y su secuenciación; creación de la librería de secuenciación de cada una de las células; y secuenciación del material genético que forma la librería. Posteriormente, estas secuencias se analizaron por parte de un experto (Bioinformático), para su posterior interpretación por el investigador que incluye esta técnica en su pregunta de investigación. Durante mi estancia, aprendí a realizar las dos primeras partes de la técnica, ya que la secuenciación y el análisis bioinformático los realiza el servicio de apoyo a la investigación de la Universidad Charité de Berlín. Además, los ratones transgénicos sólo funcionaron la segunda quincena de la estancia, con lo cual, no dio tiempo de elaborar la librería.

La parte que sí se pudo realizar fue la disgregación de tallos cerebrales de ratones postnatales del estadio P7. Estos tallos se sometieron a la acción de dos mezclas enzimáticas consecutivas, que actuaban sobre la matriz celular, procesos de filtrado y de centrifugación y resuspensión suave, para separar las células individualmente. Una vez separadas, se sometieron a la citometría para separar a las células de interés, que expresaban la proteína fluorescente Tomato, siendo su porcentaje muy bajo (Figura 1). Se testó bajo el microscopio una muestra de las células separadas. La segunda técnica no se llegó a realizar por los problemas con los ratones transgénicos. En su lugar, una formación básica acerca de la técnica de cerebro traslúcido, en la cual se eliminan los lípidos de un cerebro mediante procedimientos poco agresivos que mantengan la integridad del tejido y la estructura cerebral, para poder visualizar, por ejemplo, poblaciones celulares que expresan un determinado gen, que se visualiza con anticuerpos o que expresan una proteína fluorescente (transgénico) (Figura 2).

[incluir imagen alusiva a la estancia investigadora/de formación]

Imagen1

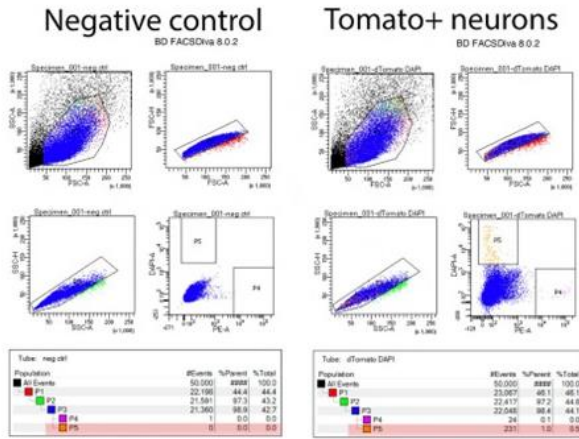
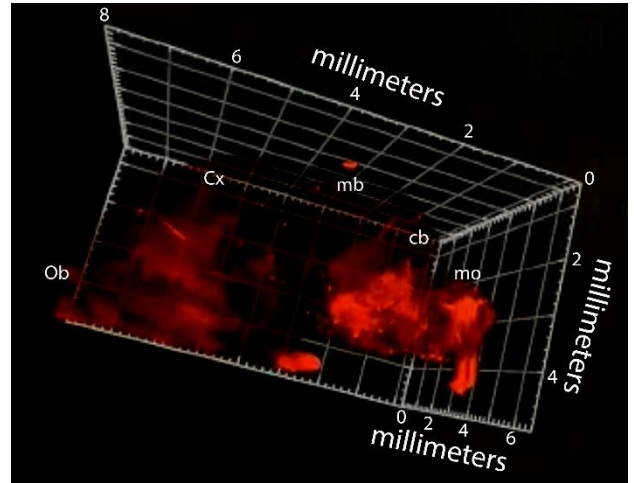


Imagen 2



INVESTIGACIÓN: Edificio Facultad de Medicina – Edif. 23 - Campus de Espinardo 30071 Murcia (España) Tl. +34 868 88 8387
INTERNACIONALIZACIÓN: Edificio Rector Soler – Edif. 18 - Campus de Espinardo 30071 Murcia (España) Tl. +34 868 88 8367