

Replicación y Superenrollamiento del DNA en eucariotas: minicromosomas circulares derivados de EBV (Epstein-Bar Virus)

Alicia Castán¹, Vanessa Fernández¹, Pablo Hernández¹, Dora B. Krimer¹, Jorge B. Schwartzman¹, María José Fernández-Nestosa²

¹ Laboratorio de Biología Molecular de los Cromosomas, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, España

² Grupo de Bioinformática, Facultad Politécnica, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay

PROGRAMA DE VINCULACIÓN DE CIENTÍFICOS Y TECNÓLOGOS – CONVOCATORIA 2013 – 14-VIN-11

RESUMEN

Actualmente, la topología del DNA es reconocida como un nivel de regulación, que influye en todos los procesos biológicos que involucran la molécula de DNA, tales como replicación, transcripción, recombinación y reparación. Esta propuesta se enmarca dentro de un amplio proyecto que incluye analizar los cambios topológicos que se producen en células eucariotas de organismos superiores y su posible función reguladora. En este trabajo se propone un análisis topológico de vectores eucariotas circulares, capaces de mantenerse como elementos extracromosómicos de forma estable. En concreto, se utilizan minicromosomas derivados del Epstein Bar Virus (EBV) para analizar su grado de superenrollamiento en células humanas. El origen de replicación de EBV, OriP, consiste de una diada (DS) y una familia de repeticiones (FR) a las que se une la proteína EBNA-1, lo que es esencial para la iniciación de la replicación.

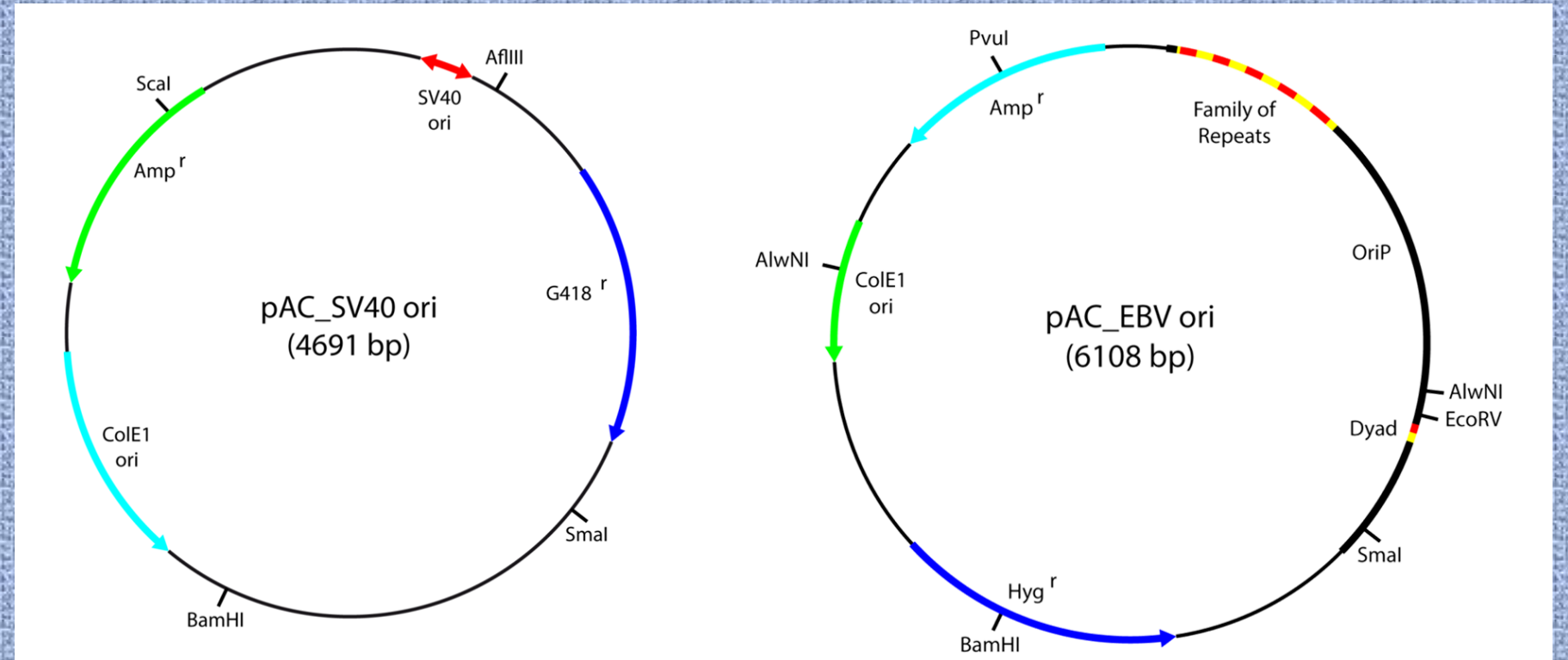


Figura 1: Mapa genético de pAC_EBVoriP y pAC_SV40ori. Se detallan los orígenes de replicación para eucariotas, SV40 ori y OriP, y procariotas, ColE1. Asimismo se representan los genes que codifican para la resistencia a higromicina, genética y ampicilina, los cuales permiten la selección de transfectantes.

INTRODUCCIÓN

Una de las diferencias fundamentales entre procariotas y eucariotas radica en la organización del DNA. En los procariotas el nucleóide no se encuentra aislado dentro de una membrana como ocurre en los eucariotas. Además, en los eucariotas el DNA está asociado con proteínas nucleosomales constituyendo lo que se denomina fibras de cromatina, algo que no ocurre en procariotas. Estas diferencias influyen de manera fundamental sobre la topología del DNA. El estudio de los cambios topológicos en células eucariotas se complica siendo las moléculas circulares el mejor sustrato para cuantificar estos cambios, como son por ejemplo los plásmidos bacterianos o de levaduras. EBV es un minicromosoma circular capaz de replicar en células humanas y por lo tanto constituye un modelo apropiado para cuantificar el superenrollamiento del DNA. El vector pAC_EBVoriP es un derivado del virus de Epstein-Barr desprovisto de los genes que codifican para oncoproteínas. Además de secuencias de pBR322, sólo mantiene el origen de replicación (OriP) que consiste en una diada y una familia de repeticiones y el gen que codifica para la proteína EBNA-1. Esta proteína se une a la familia de repeticiones del FR (*Family of Repeats*) y el DS (*Dyad Symmetry*), lo que es esencial para la iniciación de la replicación.

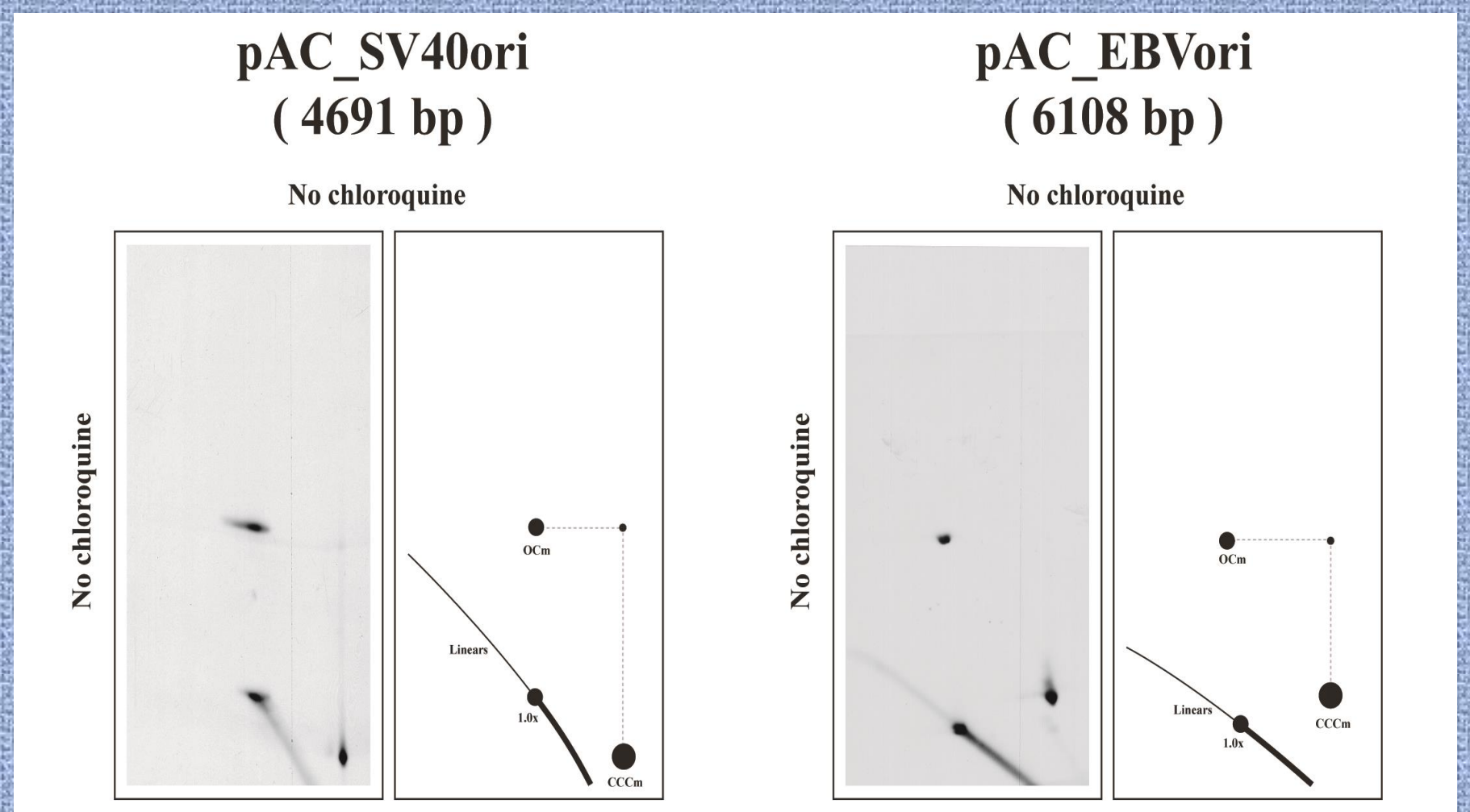


Figura 2: Aislamiento de formas intactas de pAC_EBVoriP y pAC_SV40ori. Aislamiento y purificación de minicromosomas a partir de células 293T HEK (expresan el antígeno T de forma constitutiva) que permiten la replicación de pAC-SV40ori y de células 293E HEK (expresan EBNA-1 de manera constitutiva). En las inmunodetecciones se identificaron tanto moléculas intactas superenrolladas (CCCm, *covalently closed circles*) como moléculas relajadas (OC, *open circles*), además de moléculas lineales que corresponden a moléculas que rompen durante el proceso de purificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tarea 1. Construir los minicromosomas pAC_EBVoriP y pAC_SV40ori a partir de pHEBo y pEco3'Δ, respectivamente (cedidos por C. Schildkraut, Albert Einstein College of Medicine, USA) mediante PCR y las técnicas de clonaje convencionales.

Tarea 2. Realizar transfecciones transitorias (48 horas) con los minicromosomas células 293T HEK y 293E HEK, mediante lipofección.

Tarea 3. Aislar los minicromosomas de los transfectantes derivados de células en proliferación mediante la técnica de Hirt diseñada para separar DNA de bajo peso molecular del DNA cromosómico.

Tarea 4. Calcular el grado de superenrollamiento de cada uno de los minicromosomas mediante geles bidimensionales de agarosa conteniendo concentraciones diferentes de cloroquina.

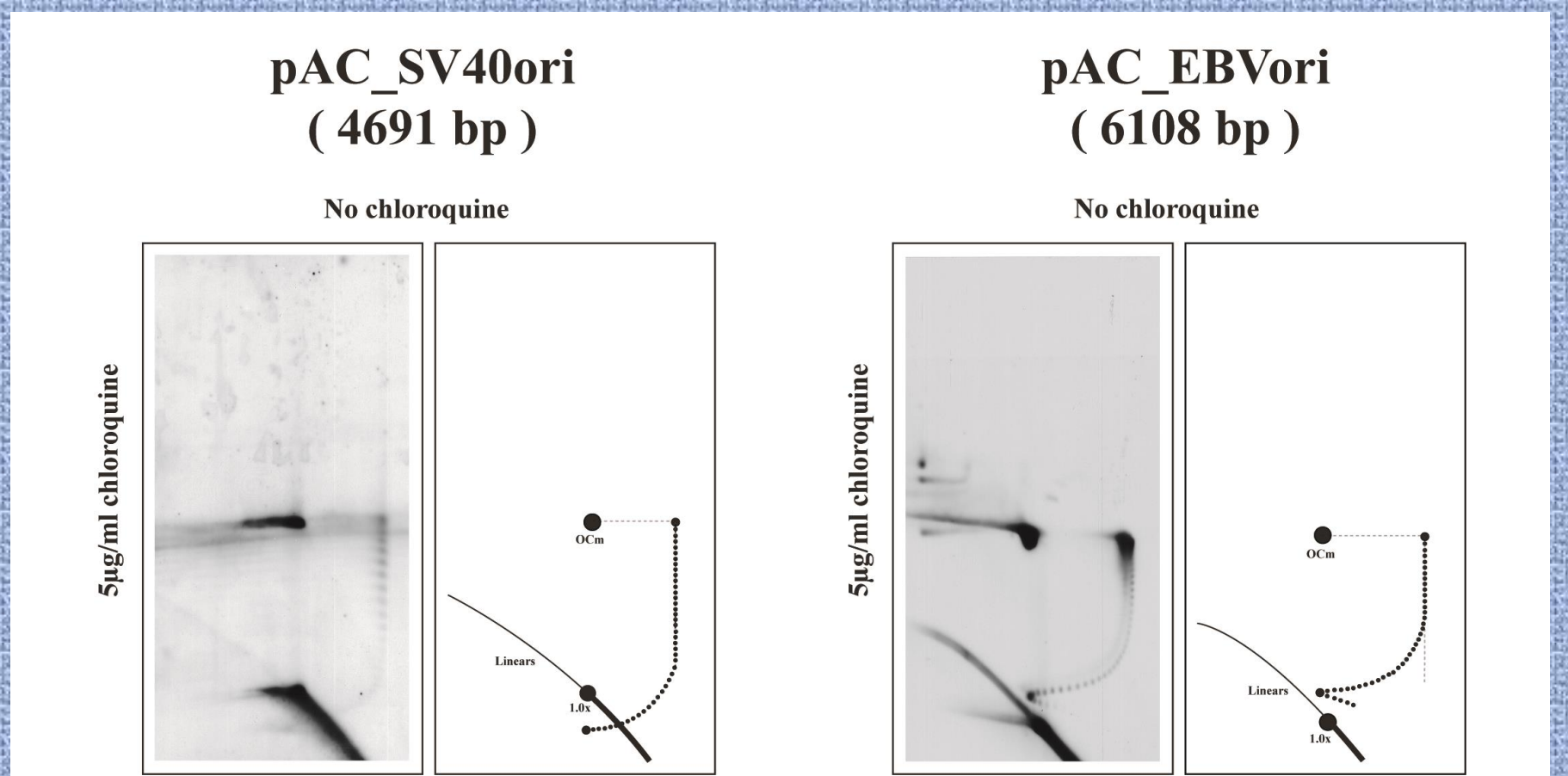


Figura 2: Análisis del nivel de superenrollamiento de formas intactas de pAC_EBVoriP y pAC_SV40ori. Inmunodetecciones correspondientes a geles bidimensionales con cloroquina en la segunda dimensión. Se separaron moléculas intactas con distintos grados de superenrollamiento, además de moléculas relajadas (OC, *open circles*) y moléculas lineales.

CONCLUSIONES

- La transfección transitoria de células 293 HEK con pAC_EBVoriP y pAC_SV40ori y el posterior aislamiento mediante la técnica de Hirt permiten analizar la topología de los minicromosomas mediante electroforesis bidimensionales en geles de agarosa.
- Los resultados obtenidos sugieren que el minicromosoma pAC_EBVoriP presenta un mayor grado de superenrollamiento que el plásmido pAC_SV40ori, derivado de virus SV40, lo cual podría estar relacionado con la unión de la proteína EBNA-1 al OriP.