

Simulación computacional de la movilidad electroforética de intermediarios de replicación

Cristina Parra¹, Victor Martinez¹, María José Fernández-Nestosa¹, Pablo Hernández², Dora B. Krimer² and Jorge B. Schwartzman²
tinaparra@gmail.com

¹Facultad Politécnica, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo. PARAGUAY

²Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid. ESPAÑA

Programa de incentivos para la formación de docentes – investigadores – Convocatoria 2015

RESUMEN

El trabajo presentado constituye un avance de un proyecto que consiste en actualizar y perfeccionar el programa 2D-gel, realizado por Enrique Viguera en el CIB-CSIC, con el fin de analizar la movilidad de moléculas de ADN no lineales sometidas a un proceso de electroforesis bidimensional en geles de agarosa [1]. Las moléculas analizadas son intermediarios de replicación de plásmidos bacterianos que, una vez, linealizados, pertenecen a una de estas tres formas: burbujas, Y-simples, o Y-dobles. Cada una de estas formas exhiben un patrón específico de migración. El objetivo de este proyecto consiste en simular computacionalmente la movilidad electroforética de estos intermediarios de replicación.

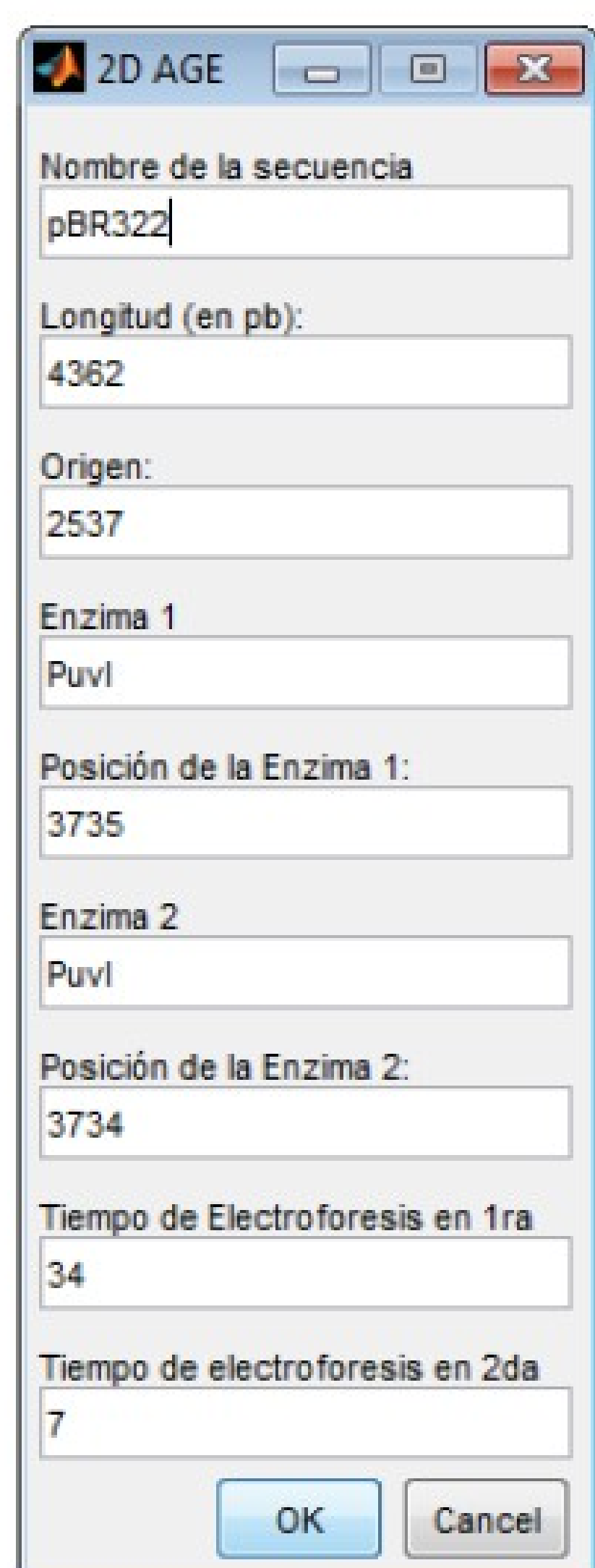
INTRODUCCIÓN

La electroforesis bidimensional en geles de agarosa consiste en dos electroforesis consecutivas, donde la primera dimensión se realiza con baja concentración de agarosa y a bajo potencial electrostático, favoreciendo la separación de las moléculas en función de su tamaño. La segunda dimensión se realiza de forma perpendicular a la primera, en condiciones de alto voltaje y elevada concentración de agarosa. De esta manera, se favorece la separación de las moléculas en función a su forma[2].

Las moléculas analizadas en este proyecto son moléculas circulares en proceso de replicación que, según la localización del sitio de corte de las enzimas de restricción, pueden generar uno de estos patrones: Burbuja, Y doble, o Y simple. La región que contiene un origen de replicación, donde se separan las cromátidas hermanas, genera una burbuja dentro del plásmido, si el corte de las enzimas delimita esta zona, incluyendo al origen de replicación, decimos que tenemos una burbuja de replicación. Si el corte excluye al origen de replicación y solo contiene una horquilla que avanza, se obtiene un fragmento en forma de Y simple. La Y doble se forma cuando dos horquillas avanzan en sentido contrario [3].

La realización de estos experimentos en el laboratorio consumen tiempo y recursos. El desarrollo de un programa computacional que simule una electroforesis bidimensional, disminuyendo costo y tiempo, es un complemento importante para el experimentador.

MATERIALES Y MÉTODOS



2D AGE

Nombre de la secuencia
pBR322

Longitud (en pb):
4362

Origen:
2537

Enzima 1
PvuI

Posición de la Enzima 1:
3735

Enzima 2
PvuI

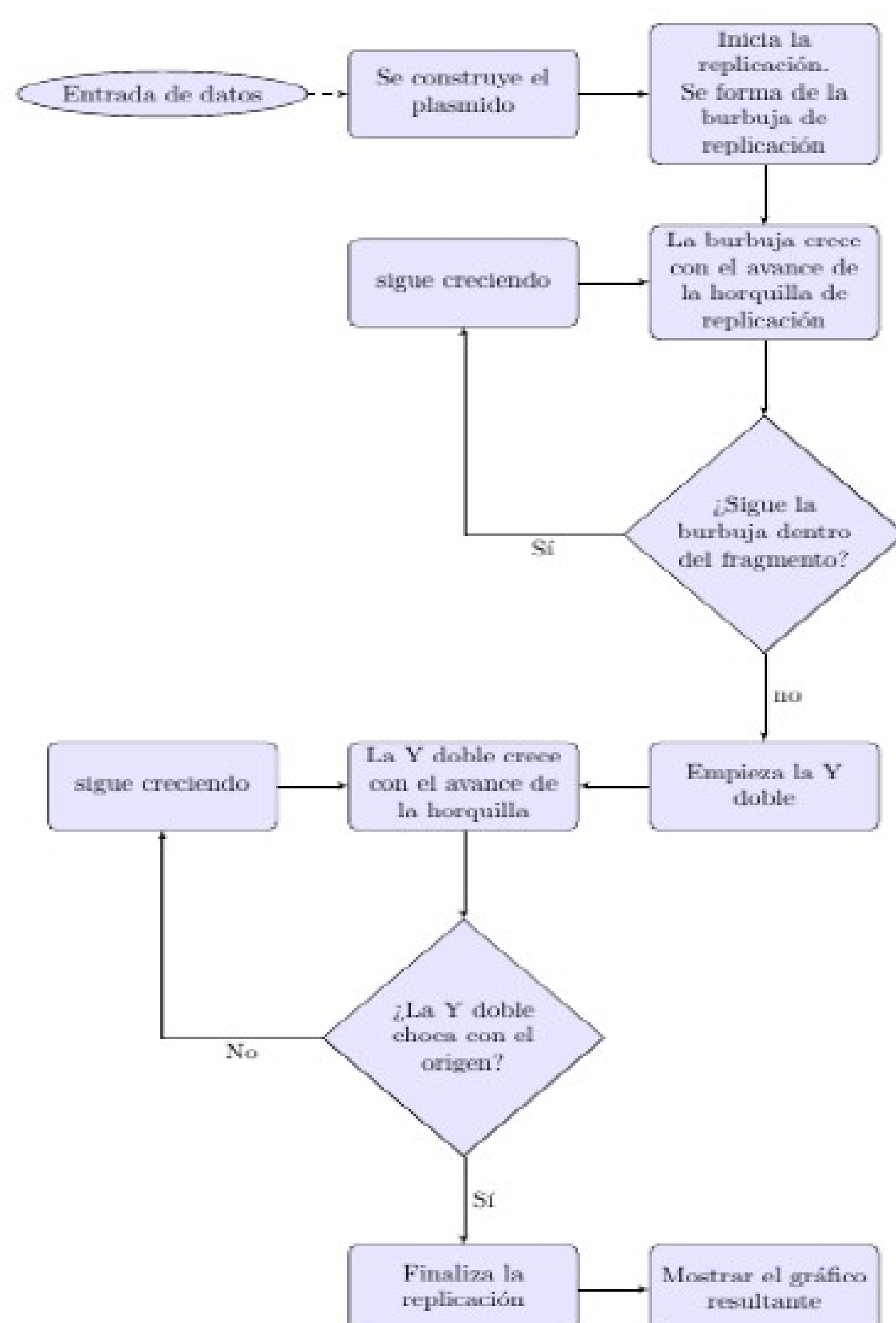
Posición de la Enzima 2:
3734

Tiempo de Electroforesis en 1ra
34

Tiempo de electroforesis en 2da
7

OK Cancel

(a) Interfase para la entrada de datos



(b) Esquema del algoritmo

Figura1 **Funcionamiento del programa 2D-Gel:** a) Vista de la interfase creada para la entrada de datos. b) Esquema del algoritmo en un plásmido con un solo origen de replicación unidireccional: al empezar la replicación se crea la burbuja de replicación, que va creciendo hasta llegar a uno de los extremos del fragmento de ADN. Al entrar nuevamente la horquilla al otro extremo del fragmento se tiene el patrón de Y doble, que crece hasta colisionar con el origen de replicación y termina la simulación.

En esta fase del proyecto, el programa desarrollado asume que la replicación ocurre bajo las siguientes condiciones:

- El fragmento consta de un único origen de replicación.
- El origen de replicación es unidireccional.
- La horquilla de replicación avanza en todo momento con velocidad constante.
- No existen barreras que frenen el avance de la horquilla de replicación.

Los datos que deben ser cargados por el usuario a través de una interfase son: nombre del plásmido o secuencia, longitud de la molécula en bp (*base pairs*, pares de base), la posición del origen de replicación, nombres de las enzimas de restricción utilizadas para linealizar el plásmido, posición de las enzimas y los tiempos (en horas) de electroforesis en 1ra y 2da dimensión (ver figura 1a). Una vez cargados estos datos, el programa construye el fragmento y simula el avance de la horquilla de replicación. Luego, según la ubicación de la horquilla en un momento dado, se determina la masa del fragmento y la forma topológica del mismo. Con estos valores, el programa calcula su movilidad electroforética y lo representa en un gráfico bidimensional. Un esquema de este proceso, puede ser visto en la figura (1b).

RESULTADOS

La verificación del programa se realizó simulando la movilidad electroforética del plásmido pBR322, linealizado con las siguientes enzimas de restricción: *StyI*, *PvuI*, *Sall* y *PvuII*. Los gráficos obtenidos se muestran en la figura (2)

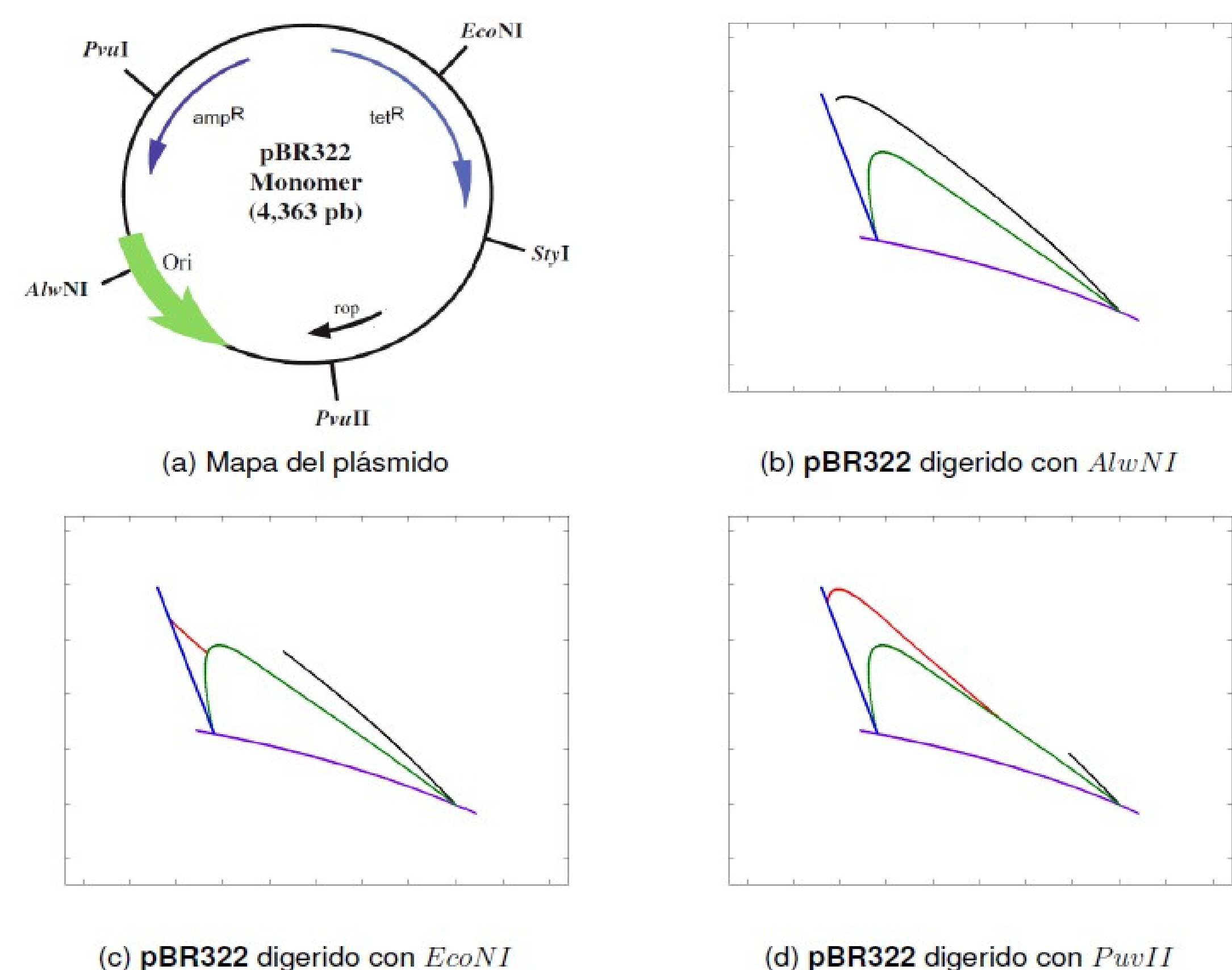


Figura2: a) **Mapa de restricción del plásmido**, donde se indican la posición de origen de replicación y de las enzimas de restricción utilizadas. b),c) y d) **Gráficos obtenidos con Programa 2D-Gel** donde se representa la electroforesis bidimensional en geles de agarosa de los intermediarios de replicación. Las líneas negras representan a las burbujas, las líneas verdes a las Y simples, las rojas a las Y dobles, las diagonales azules representan a moléculas recombinantes, mientras que las líneas de color lila corresponden a fragmentos lineales.

CONCLUSIONES

Las simulaciones computacionales pueden ser de mucha utilidad en el laboratorio, ya que además de reproducir experimentos, nos permiten predecir los resultados de experimentos aún no realizados. En este trabajo se ha logrado reproducir la movilidad electroforética de moléculas de ADN de varias formas topológicas, bajo ciertas condiciones, nos queda aún por verificar y mejorar su exactitud.

REFERENCIAS

- [1] E. Viguera et al. A computer model for the analysis of DNA replication intermediates by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Gene*, 217:41-49, 1998.
- [2] B.J. Brewer and W.L. Fangman. The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell*, 51:463-471, 1987.
- [3] J.B. Schwartzman et al. Plasmid DNA replication and topology as visualized by twodimensional agarose gel electrophoresis. *Pasmid*, 63:1-10, 2010.