



Optimización de la técnica de peinado molecular

Optimization of the DNA combing technique

Sara Palenzuela Batista
Grado de Biología
Septiembre 2016

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2015/2016	ENTRADA Fecha: Núm:
--	--------------------------------------

Datos Personales

Nº DNI o pasaporte: 78640802F	Nombre y Apellidos: Sara Palenzuela Batista
Teléfono: 695400758	Dirección de correo electrónico: sara_icod_15@hotmail.com

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

Optimización de la técnica de peinado molecular

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D. Raimundo Freire Betancor, investigador de la unidad de Investigación del HUC	
y Dña. Teresa Acosta Almeida	
Profesora del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
 Fdo.: Raimundo Freire Betancor	 Fdo.: Teresa Acosta Almeida

La Laguna, a 1 de Septiembre de 2016

Firma del interesado/a



SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLÓGÍA

Documentación a adjuntar:

- Un ejemplar en formato electrónico de la Memoria conforme a las normas de presentación establecidas en el Anexo I del Reglamento para la elaboración y defensa del TFG.
- Informe-evaluación de los tutores en sobre cerrado y firmado.

Índice

1.	Abstract	
2.	Resumen	
3.	Introducción.....	1
	- Técnicas de estudio de la replicación del ADN.....	4
4.	Material y métodos.....	5
	- Cultivos celulares.....	5
	- Procedimiento de obtención y tinción de fibras.....	6
5.	Resultados y discusiones.....	8
	- Protocolo de fibras de DNA en células U2OS	8
	- Optimización de la densidad celular	9
	- Optimización del tiempo de lisis de las células	10
6.	Conclusiones.....	12
7.	Conclutions	13
8.	Referencias.....	14

Abstract

Although much research was performed during the last years, the factors that control DNA replication programs are still not fully understood. Since DNA replication control is linked to genomic maintenance, it is an important subject of research in metazoans, especially in mammalian cells; for example, de-regulations in DNA replication control can be linked to pathological conditions, such as cancer. The objective of this work is to set up in the laboratory a technique, called molecular combing. This technique will allow us the measure of DNA replication parameters in human cells and to our knowledge, it is the first time that is performed in Canary Islands. Thanks to molecular combing, the dynamics of DNA replication can be assessed at the genome-scale level from the cumulative analysis of single DNA fibers. This technique can measure the replication fork speed, fork asymmetry and allow measuring distances separating either DNA replication initiation or termination events. The density of cells to carry out the technique and the fiber length are critical parameters to properly perform this technique. In this work I modified those two parameters in order to achieve the best possible results with this technique and optimize it for the laboratory in the future.

| Key words: DNA replication, molecular combing, dynamics of DNA replication, technique optimization.

Resumen

A pesar de los múltiples avances realizados durante los últimos años, los factores que controlan los programas de la replicación del ADN no están del todo comprendidos. Ya que el control de la replicación está relacionado con el mantenimiento genómico, es un importante objeto de investigación en metazoos, especialmente en células de mamífero y así, por ejemplo, la deregulación del control en la replicación puede estar asociada a condiciones patológicas, como el cáncer. El objetivo de este trabajo es poner a punto en el laboratorio la técnica llamada peinado molecular. Esta técnica permite medir los parámetros de replicación del ADN en células humanas y creemos que es la primera vez que es llevada a cabo en las Islas Canarias. Gracias al peinado molecular, la dinámica de la replicación del ADN se puede evaluar a escala genómica a partir del análisis acumulativo de las fibras individuales de ADN. Esta técnica nos permite la medida de la velocidad de la replicación, la asimétrica de la horquilla y también medir la distancia que separa cada uno de los lugares de iniciación o terminación de la replicación del ADN. El número de células para empezar la técnica y la longitud de la fibra son parámetros críticos a tener en cuenta para la correcta realización de la técnica. En este trabajo modifiqué estos dos parámetros para obtener los mejores resultados posibles y así optimizarla para el laboratorio en un futuro.

Palabras clave: Replicación del ADN, peinado molecular, dinámica de la replicación, optimización de una técnica.

Introducción

La división celular es un proceso inherente a la vida. En metazoos superiores es importante para su funcionamiento normal como, por ejemplo, en la reposición de células deficientes o en procesos en los que se requiera activamente la proliferación celular (durante la embriogénesis o en la generación de células linfoides). Es

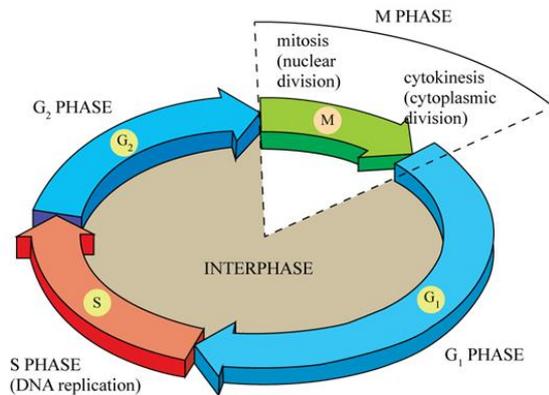


Fig. 1: Esquema de las fases del ciclo celular.

importante que el proceso de división celular se lleve a cabo correctamente y las células hijas sean exactamente iguales a la célula madre, es decir, que lleven el mismo material genético. Para llevar a cabo este proceso de división, las células pasan por varias fases o estadios (**Fig. 1**) de manera ordenada, en lo que se conoce por ciclo celular y en el que la célula madre primero duplica su material genético y luego éste es pasado a las dos células hijas. El ciclo celular, por tanto, se define como una secuencia ordenada de eventos que provoca la proliferación y la división celular en el que una célula madre da lugar a dos células hijas. El ciclo celular se divide en cuatro fases principales: fase G₁, fase S o de síntesis del ADN, fase G₂ y fase M o de mitosis, fase en la que la célula divide el material genético duplicado equitativamente a dos células hijas (**Masai et al, 2010**).

En la fase G₁ ocurren cambios en la célula para prepararla para la duplicación de su genoma (fase S) y en la fase G₂ ocurren cambios para que la célula entre en mitosis. La fase S es de gran importancia, por tanto, en este proceso de ciclo celular, ya que es en ese momento donde ocurre el proceso de la replicación del material genético.

La replicación del ADN comienza en unos sitios específicos del ADN conocidos como “orígenes de replicación” (**Técher et al, 2013**). Se trata de una serie de sitios en el genoma que sirven para atraer complejos proteicos que provocan el inicio de la replicación del ADN en esas regiones y que continúa en forma de horquillas de replicación. Por la gran extensión de los genomas eucariotas, estos orígenes son múltiples en el caso de las células eucariotas mientras que en procariotas solo existe uno. En el caso de los genomas complejos existen muchos orígenes de replicación, que provocan la aparición de múltiples horquillas que al encontrar a otras horquillas, consiguen replicar así todo el genoma.

Cuando el ADN se empieza a replicar, una serie de proteínas se encargan de abrir la doble hélice de ADN, rompiendo los puentes de hidrógeno entre las hebras complementarias. Este paso inicial ayuda a que otras proteínas accedan a esta estructura, entre ellas las ADN polimerasas, que forman parte de la horquilla de replicación produciendo de esta forma el inicio del proceso. También durante la fase de polimerización del ADN por las ADN polimerasas, intervienen complejos proteicos que separan la doble banda para facilitar la actuación de estas enzimas, son las llamadas helicadas. Por tanto, cuando se abre inicialmente el ADN por complejos de helicasa se forma la llamada la burbuja de replicación, con dos horquillas de replicación, que se van extendiendo en las dos direcciones lo que permite una replicación bidireccional ¹. Por tanto, en el proceso de la replicación intervienen una serie de proteínas encargadas de realizar funciones específicas y de regular este evento (**Gasser R et al, 1996**) . Así, por ejemplo, las helicadas rompen los puentes de hidrógeno entre ambas hebras de ADN, las girasas y topoisomerasas alivian las tensiones del desenrollamiento y las proteínas SSB (del inglés Single Strand Binding protein, proteínas de unión a la cadena simple del ADN) evitan que se vuelvan a unir las cadenas sencillas, manteniéndolas separadas (**Fig.2**). También la síntesis de la nueva hebra de ADN ocurre gracias a la incorporación de deoxi-nucleótidos por parte de las ADN polimerasas replicativas.

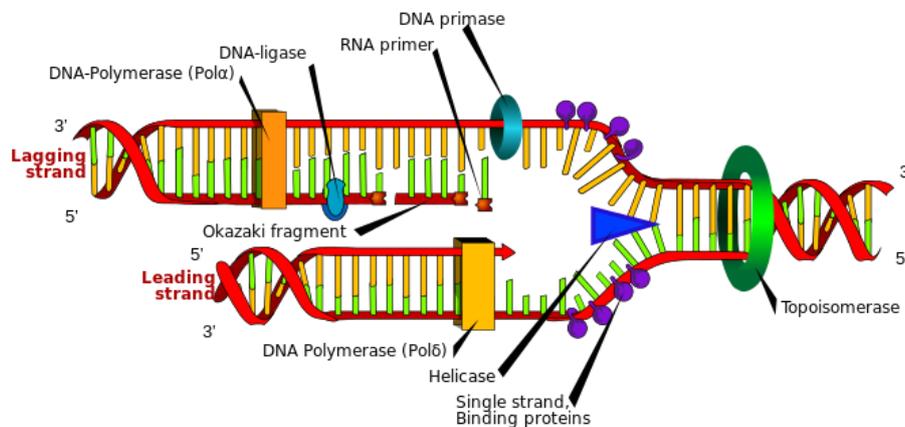


Fig. 2: Esquema general de la replicación celular

La correcta regulación de la replicación del ADN, incluyendo una fase de replicación programada, única y completa durante cada ciclo celular es importante para mantener la integridad del genoma (**Smits y Freire, 2016**). El control de la replicación es logrado en parte por un control estricto de dos pasos diferentes durante la etapa temprana de la replicación: el reconocimiento de orígenes de replicación y en la iniciación de la síntesis del ADN en estos orígenes. Durante la mitosis tardía y la fase G1 temprana, un gran complejo de proteínas

iniciadoras se ensambla en los orígenes de replicación y los prepara para que puedan ser replicados. A este proceso se llama licenciamiento de los orígenes de replicación. Es importante que este licenciamiento, por tanto, ocurra una vez y solo una por cada ciclo celular o de lo contrario el genoma se podría duplicar más de una vez antes de la mitosis y ello, contribuiría a alteraciones cromosómicas. En por ello que el licenciamiento de los orígenes de replicación, es decir, el control de la iniciación de la replicación, es un proceso altamente regulado dentro del ciclo celular. En este proceso, los orígenes de replicación, primero son reconocidos por el complejo ORC (del inglés Origin Recognition Complex, complejo de reconociendo del origen) formado por 6 proteínas (ORC1-6), teniendo la subunidad ORC1 actividad ATPasa (**Magnan y Bates, 2015**). Después de la unión de ORC1-6 a los orígenes de replicación, las proteínas Cdt1 y Cdc6 son atraídas a los orígenes de replicación y junto con otras proteínas, forman el complejo pre-replicative mediante la unión del complejo MCM2-7, una parte fundamental de la helicasa replicativa del ADN. Posteriormente, este complejo de pre-replicación se convierte en un complejo de pre-iniciación activado que desarrolla el origen por la actividad de la helicasa, que carga polimerasas y factores accesorios para iniciar una replicación bidireccional (**Fig. 3**)

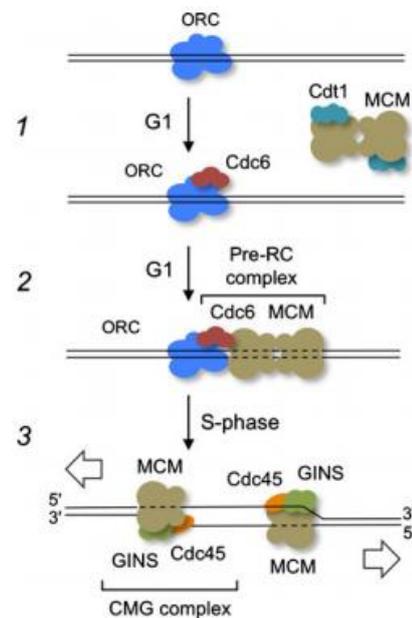


Fig. 3: Formación del complejo de activación de la replicación.

Para que la helicasa se active y pueda abrir el ADN en los orígenes de replicación se requiere también la fosforilación del complejo MCM2-7 por las CDKs y CDC7-DBF4 que promueven la asociación del complejo GINS y CDC45, formando así un complejo estable llamado CMG, la helicasa replicativa (**Fig.3**). El complejo CMG, nuclea la asociación del replisoma que contiene, entre otros, los factores que estabilizan la horquilla y otras proteínas con funciones más especializadas (**MacNeill y Onesti, 2013**). Después de que la helicasa se mueva a lo largo de la fibra del ADN, la proteína A se une y estabiliza la fibra aislada e interacciona con la ADN polimerasa primasa para incrementar la fidelidad de la polimerasa y ello marca el comienzo de la replicación, que es continuada por la sucesiva agregación de otras ADN polimerasas y la asociación de mas factores.

Técnicas de estudio de la replicación del ADN

Hay múltiples técnicas que permiten estudiar la replicación del ADN, siendo una de las más usadas la basada en la incorporación de BrdU², un análogo de nucleótidos que se incorpora al ADN de nueva síntesis. Cuando las células son cultivadas con medio que contiene BrdU (**Fig. 4**), este análogo de la pirimidina se incorpora en lugar de timidina en el DNA recién sintetizado de las células en la fase S. Después de retirar el medio, se fijan las células y el ADN es desnaturalizado con una solución de fijación. Luego, es habitual que se añada un anticuerpo anti-BrdU para detectar el BrdU incorporada (en este protocolo normalmente se desnaturaliza el ADN para mejorar la accesibilidad del anticuerpo al BrdU incorporado al ADN). A

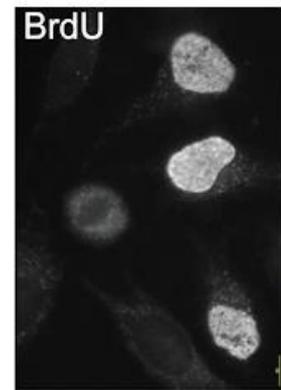


Fig. 4: Marcaje celular con BrdU por inmunofluorescencia. Se observan núcleos sin teñir y teñidos.³

continuación, se añade un anticuerpo secundario para obtener una señal medible por técnicas en el laboratorio. Por ejemplo, se puede incubar con un anticuerpo secundario que tenga acoplado un fluoróforo y estudiar la intensidad de la señal por citometría de flujo. Alternativamente se puede visualizar en el microscopio de fluorescencia como se indica en la Fig 5 y como se visualiza en la Fig 4. El análisis por incorporación de BrdU (u otros análogos) es una potente herramienta para visualizar la replicación global de una célula, pero no da información precisa sobre parámetros replicativos.

El análisis de fibras de ADN por el método de peinado molecular ha demostrado estar entre las herramientas más útiles para medir la replicación en sí y parámetros asociados a esta. En estas técnicas también se usan análogos de nucleótidos que se incorporan al ADN y que se detectan con técnicas inmunológicas pero la diferencia fundamental es que al analizar fibras individuales de ADN se pueden estudiar las dinámicas de replicación mediante la visualización de moléculas individuales de ADN provenientes de células en cultivo. Así, mediante pulsos consecutivos con análogos de timidina marcados (normalmente iododeoxiuridina (IdU) y clorodeoxiuridina (CldU)), es posible medir la velocidad de replicación (estudiando la longitud de la zona donde ha sido incorporado el nucleótido dividida por el tiempo en el que ha sido incubado el análogo de

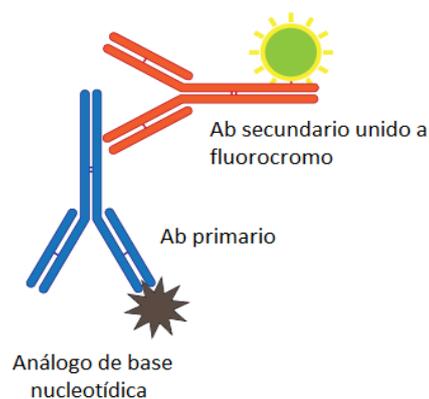


Fig. 5: Inmunodetección indirecta

nucleótidos), la frecuencia en que aparecen las horquillas (densidad de horquillas de replicación), así como identificar los fenómenos de inicio y terminación. El análisis de fibras de ADN es, por tanto, un método para monitorizar con exactitud la replicación y ha sido usado con éxito en variedad de organismos incluyendo células humanas.

La estimación de la progresión de la horquilla en el genoma y la activación de origen es usada regularmente para dar una imagen de las dinámicas de replicación del ADN. Todos estos datos dieron las bases para la estimación de la densidad de origen al medir la distancia entre señales de iniciación adyacentes a lo largo de una fibra de ADN, denominado "distancia inter-origen (IOD)". De la misma manera puede medirse la distancia inter-terminación (ITD).

El análisis de fibras de ADN también ha mostrado variaciones en la progresión de las horquillas de replicación en mamíferos, indicando que los factores genéticos y/o epigenéticos influyen en su velocidad.

El objetivo de este estudio se centra en optimizar metodología en un nuevo laboratorio para evaluar las dinámicas de replicación por peinado molecular. Para ello se ha modificado del número y la calidad de las fibras obtenidas (longitud), sobretodo variando dos parámetros: el número inicial de células y el tiempo de lisado de esas células.

Material y métodos

El protocolo que utilizamos para los experimentos fue el desarrollado el laboratorio de Dr. Juan Méndez, CNIO en Madrid. Básicamente se usaron técnicas de cultivos celulares con las recomendaciones del laboratorio del Dr. Méndez y la técnica de peinado molecular en sí misma.

Cultivos celulares

Utilizamos la línea celular U2OS, células derivadas de osteosarcoma. Se cultivaron en medio DMEM (Life Technologies) suplementado con 10% de suero bovino fetal, glutamina y penicilina-estreptomicina (Life Technologies) y para su crecimiento utilizamos placas de 6 centímetros de diámetro.

Primero cultivamos células del tipo U2OS hasta que se encuentren en un estado exponencial de crecimiento. A continuación, dimos un pulso de 50 μ M CldU durante 20 minutos disuelto en medio DMEM completo. Pasado este tiempo lavamos las células con cuidado tres veces con PBS caliente a 37 °C. Posteriormente, dimos otro pulso de 250 μ M IdU durante 20

minutos también disuelto en medio completo. Una vez transcurrido los 20 minutos, lavamos las células 3 veces para retirar el medio con las bases sobrantes.

Las referencias y el modo de almacenaje de estos reactivos se indica a continuación:

- CldU Sigma (número de catálogo c6891). Stock 10mM en H₂O conservado a -20°C.
- IdU Sigma (número de catálogo I7125). Stock 5mM en H₂O conservado a -20°C. (o IdU 10mM: 34,5 mg IdU, 10ml H₂O, 50 µl 10N NaOH).

Una vez hecho esto, añadimos 500 µl de tripsina (Life Technologies) con el fin de despegar las células de la placa e incubamos durante 5 minutos en la estufa (37°C). Una vez despegadas las células son lavadas una vez con PBS (PBS 1x , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄ ajustado a un pH final de 7.4). Después de medir el número de células con la cámara de Neuhauer, añadimos la cantidad de PBS frío adecuada para que la concentración celular sea aproximadamente, $0,25 \times 10^6$ células/ml las células en 1 ml de PBS frío. Dicha suspensión de células puede mantenerse hasta una semana a 4°C, pero la experiencia del Dr. Méndez dice que las fibras se ven mejor cuando las células se procesan al momento.

Procedimiento de obtención y tinción de fibras

Desde un primer momento hay que tener mucho cuidado con el control de factores como temperatura, humedad, suciedad, etc. ya que estos pueden variar los resultados finales. Comenzamos colocando 2 µl de la suspensión de células en un portaobjetos de microscopio (Thermo-Fisher). En cada uno de ellos escribimos el nombre de la condición antes para que al lavarlos con etanol al 70%, quitar los posibles restos de suciedad. Es muy importante intentar no manipular sin guantes. Con frecuencia preparamos 4 láminas por condición, para tener suficiente material en caso de que las fibras no sean de la calidad adecuada. Luego se colocan esos 2 µl de la suspensión de células en dos puntos del portaobjetos, cerca de la zona que rotulamos: próximo al margen y en la mitad del portaobjetos. Para romper las células añadimos 10µl de tampón de rotura fresco (0.5% SDS, 200mM Tris pH 7.4, 50mM EDTA), previamente calentado a 30°C e intentando no tocar la gota de células y no hacer burbujas.

Posteriormente incubamos durante 6 minutos en una cámara húmeda varios portaobjetos. A continuación, inclinamos toda la caja con los portaobjetos a un ángulo de 10-15° para permitir que la suspensión de ADN descienda lentamente por la lámina intentando que sea lo más recto posible, esto hace que el ADN se “estire” y consigamos fibras de ADN. En el caso de que la gota se atasque se puede inclinar un poco más hasta que vuelva a correr y se vuelva a

colocar normal. Cuando la gota llegue al final, secamos con un papel de filtro el resto. En este proceso el ADN se estira y se une al portaobjetos.

Una vez extendidas las fibras, dejamos secar al menos 20 minutos los portaobjetos fuera de la caja, acostados boca arriba sobre una superficie horizontal.

Luego fijamos estos portaobjetos durante 2 minutos en metanol : ácido acético (Sigma Aldrich) en frío 3:1 (-20°C). Este paso del protocolo lo vamos a realizar en una cubeta de tinción y a partir de ahora todos los lavados y bloqueos se van a realizar en este tipo de cubetas y evitando a toda costa aquellas zonas donde se han adherido las fibras.

Una vez pasado este tiempo, dejamos secar las láminas. En este punto, los portaobjetos pueden almacenarse a 4 °C por al menos una semana.

A continuación, se incuban las preparaciones en 2.5 M HCl durante 30 minutos para posteriormente, lavar los portaobjetos 3 veces con PBS para retirar bien el HCl a fin de proteger que los anticuerpos usados en los siguientes pasos estén en condiciones nativas. En este paso se desnaturaliza la doble hebra de ADN, haciendo accesible los análogos de nucleótidos incorporados a los anticuerpos que los reconocerán en pasos sucesivos. Los portaobjetos se deben mantener en PBS hasta incubarse con la solución de bloqueo ya que a partir de este punto es muy importante no dejar que se sequen las fibras.

Luego se incuban los portaobjetos con unos 50ml de una solución de bloqueo (% BSA, 0.1% Triton X-100 en PBS), durante una hora en una cubeta de tinción. Posteriormente se incuban durante otra hora en cámara húmeda con los siguientes anticuerpos primarios que se detallan a continuación, diluidos en solución de bloqueo. Para ellos se coloca parafilm debajo, se añade 75µl de los anticuerpos primarios y se coloca otro parafilm encima sin apretar e intentando no dejar ninguna burbuja. Estos son los anticuerpos usados y su dilución:

- anti-CldU= anti-BrdU monoclonal de rata (Santa Cruz 56258 o Abcys C117-7513), clone BU1/75 (ICR1) 1:50
- anti-IdU: anti-BrdU monoclonal de ratón (BD 347580) 1:100 .
- anti-ssADN: IgG2a monoclonal de ratón (Millipore MAB3034) de 1:100 a 1:300 (la concentración depende del lote de anticuerpos). Se utiliza para comprobar la continuidad de las fibras de ADN.

Si hay fallos de marcaje puede ser un problema del lote de cualquier anticuerpo primario y hay que tenerlo en cuenta ya que nos comentan que ocurre a menudo.

Una vez pasado este tiempo se lavan los portaobjetos 3 veces en PBS en una cubeta de tinción para posteriormente incubarlos en una cámara húmeda durante 30 minutos. Los anticuerpos secundarios que se usarán se diluyen 1:300 en solución de bloqueo, y no porque se necesite para bloquear, sino porque la solución de bloqueo es más espesa y es mejor para repartir los anticuerpos por todo el portaobjetos. Se realiza el mismo procedimiento que con el anticuerpo primario: añadimos 75µl y con mucho cuidado, colocamos el parafilm encima. Estos son los anticuerpos secundarios usados:

- anti-rat IgG Alexa Fluor 594, de cabra (Filtro Texas Red), color rojo. Molecular Probes A-11007 - Para CldU.
- anti-mouse IgG1 Alexa Fluor 488, de cabra (Filtro FITC) color verde. Molecular Probes A-21121 - para IdU.
- Anti-mouse IgG2a Alexa Fluor 647, de cabra (Filtro Cy5) Color azul. Molecular Probes A-21241 - para ADN. También se puede usar un pacific blue etc.

Pasada la hora de incubación, lavamos los portaobjetos con PBS 3 veces en una cubeta de tinción. Una vez hecho esto, los dejamos secar en oscuridad para evitar que la luz dañe los fluorocromos unidos con los anticuerpos secundarios y montamos los portas con un medio de montaje llamado Prolong (sin DAPI) (Invitrogen). Para prepararlo hacemos alícuotas de 500µl de Prolong a -20°C. Con una punta cortada se añade al cubre 40µl de este compuesto dibujando una línea de arriba abajo sin burbujas sobre el cubreobjetos. A continuación, colocamos el portaobjetos en un extremo y vamos bajándolo lentamente hasta que todo el medio de montaje entre en contacto con él. Una vez tengamos unidos el portaobjetos con el cubreobjetos le damos la vuelta colocándolo al derecho y lo dejamos secar mínimo dos horas. En el caso de que queden burbujas no es recomendable manipularlas para intentar quitarlas ya que el resultado sería peor.

Resultados y discusión

1- Protocolo de fibras de DNA en células U2OS.

Una vez realizado el experimento sugerido por el protocolo inicial pasamos a observar los portaobjetos a con un microscopio de fluorescencia (Cell Observer, Zeiss). Este microscopio cuenta con una serie de filtros específicos para cada uno de los fluorocromos unidos a los anticuerpos secundarios que reconocen a primarios y a su vez a los análogos de las bases. Nos centramos en buscar aquellas zonas donde la densidad de fibras no era demasiado alta con el

fin de que estén lo suficientemente aisladas como para poder distinguir el inicio y el fin de cada fibra (que estudiamos con el fluoróforo Alexa647/Cy5 y que en las fotos aparece de color azulado). Esto nos va a permitir poder hacer un recuento corrector de éstas y no subestimar el número real debido a la superposición de las fibras.

Al estudiar la imagen (**Fig. 6**) observamos que la señal emitida por los anticuerpos utilizados que reconocen tanto IdU y CldU y también con los que reconocieron el ADN, además comprobamos como el tiempo de lisis descrito en el protocolo de 6 minutos ha sido bastante bueno permitiendo en la mayoría de los casos la distinción de ambos extremos de la fibra, pero debido a la gran densidad de estas, el recuento era complicado.

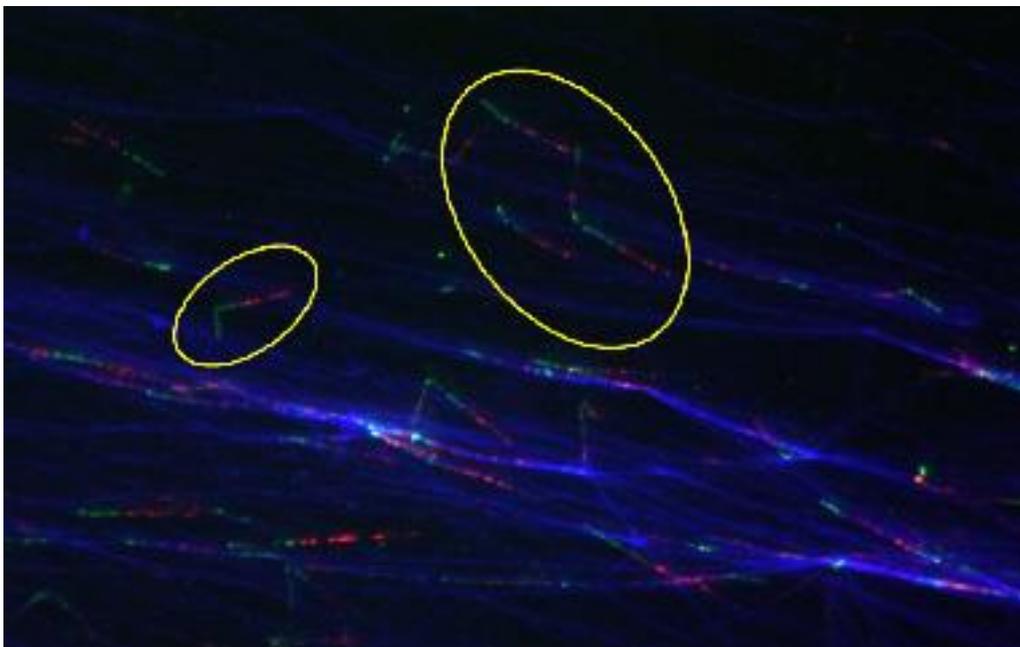


Fig. 6: Fibras de ADN marcadas con los fluorocromos de los análogos de base con una concentración de células inicial expuestas a 6 minutos de tampón de lisis. Se resalta en los círculos varias fibras que están replicando activamente (señal verde y roja en la misma fibra).

Tras analizar este resultado, realizamos diferentes modificaciones sobre el protocolo inicial a fin de optimizarlo para obtener mejores imágenes donde podamos encontrar una información más clara sobre la replicación celular.

2-Optimización de la densidad celular

Ya que, en el experimento anterior, la cantidad de las fibras era buena pero excesiva, lo cual impide un recuento correcto de estas por lo que decidimos variar la concentración inicial de células a la hora de producir su lisis. Esta concentración inicial es de $0,25 \times 10^6$ células/ml a

partir de la cual vamos a tomar $\frac{1}{4}$ de la concentración inicialmente probada ($0,625 \times 10^7$ células/ml) para realizar el experimento. Como se muestra en la Fig.7, en la condición que presenta una concentración de $\frac{1}{4}$ de células, las fibras se pueden observar mejor y, por tanto, podríamos realizar un contaje fiable de estas disminuyendo así el error que supondría la superposición de fibras. Para comparar la densidad de fibras vamos a comparar la imagen con una imagen tomada de una muestra con concentración inicial donde vemos la excesiva presencia de fibras.

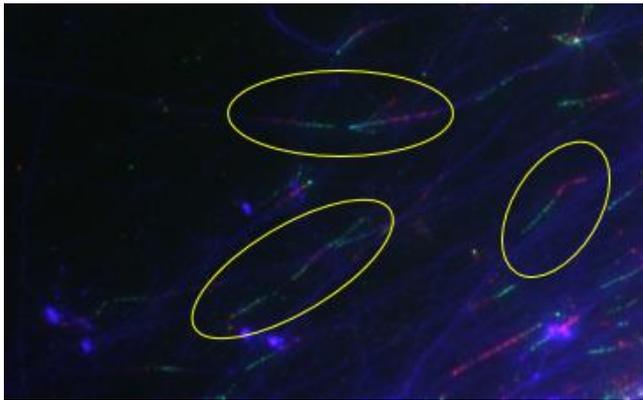


Fig. 7: Fibras de ADN con una concentración de células de $\frac{1}{4}$ de la inicial expuestas a 8 minutos de tampón de lisis.

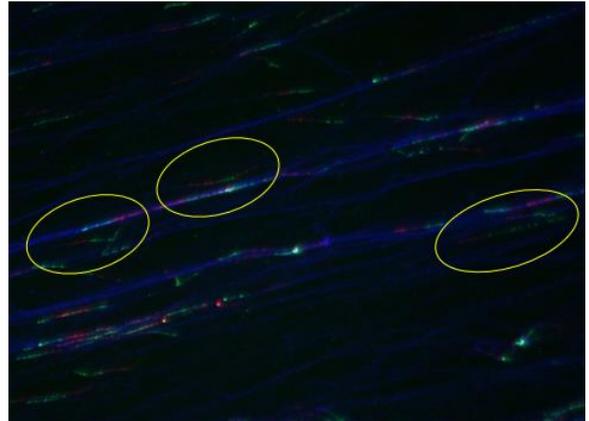


Fig. 8: Fibras de ADN con una concentración inicial de células expuestas a 8 minutos de tampón de lisis.

3- Optimización del tiempo de lisis de las células

Una vez observado que la cantidad óptima de células para obtener una buena tinción de fibras de ADN es de $0,625 \times 10^7$ células/ml, nos propusimos variar otro parámetro para optimizar aún más la calidad de las fibras: el tiempo de exposición al que se veían sometidas las células con el tampón de lisis de 6 minutos. Este parámetro nos permitirá optimizar la calidad de las fibras ya que esperamos que a tiempos de lisis largos el aislamiento de fibras sea mejor, pero que estas aparezcan más rotas (fibras cortas) y que, en tiempos cortos, no se aíslen bien las fibras, pero manteniéndose de forma más intactas.

Al aumentar el tiempo de lisis a 10 minutos (**Fig. 9**) tomando la concentración inicial de células vemos que no ha sido satisfactorio ya que, a la hora de visualizar las fibras, la mayoría de ellas son muy cortas, lo que implica no poder realizar un análisis con ellas, ya que, si existen marcajes de IdU y CldU, no sabremos si el tamaño de la marca es real o se corresponde a que las fibras se han roto. Si comparamos esta imagen con la de 6 minutos

(Fig. 6) que presenta la misma concentración celular, las fibras se ven mucho más separadas en esta última.

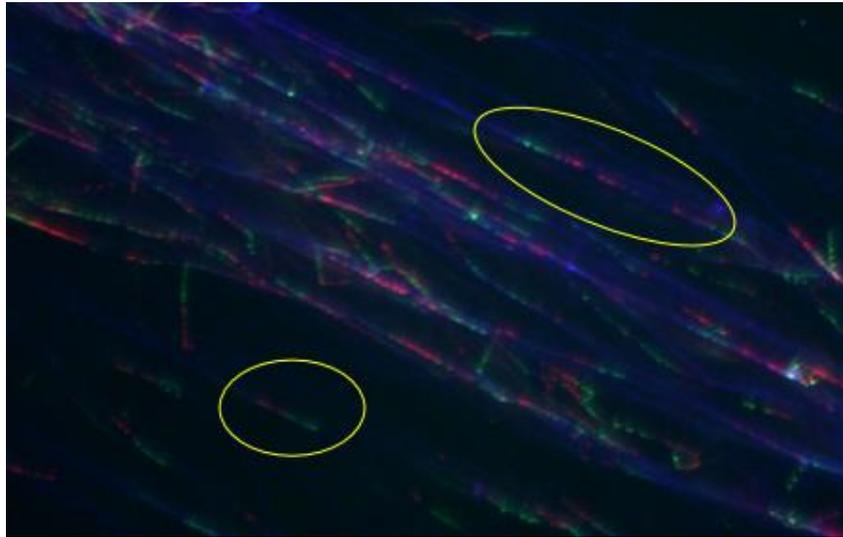


Fig. 9: Fibras de ADN con una concentración inicial de células expuestas a 10 minutos de buffer.

Si probamos con el caso contrario, es decir, aplicando menos tiempo de lisis (4 minutos) del propuesto en el protocolo inicial, observamos como este no ha sido suficiente debido (Fig. 10) a que únicamente encontramos un gran acúmulo de fibras en el lugar donde colocamos la cantidad inicial de ADN. Además, utilizamos un tiempo intermedio de 8 minutos (Fig. 11) donde los resultados de la calidad de las fibras era mejor que los de 10 minutos pero pensamos que la mejor condición de todas era la del tratamiento de los 6 minutos.

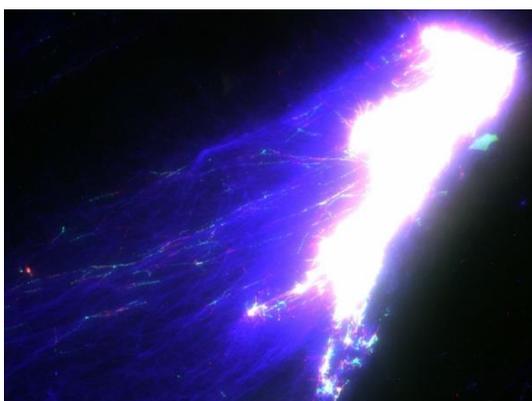


Fig. 10: Fibras de ADN con una concentración de células de $\frac{1}{4}$ de la inicial expuestas a 4 minutos de buffer



Fig. 11: Fibras de ADN con una concentración de células de $\frac{1}{4}$ de la inicial expuestas a 8 minutos de buffer

Conclusiones

El objetivo de este estudio fue poner a punto la técnica de análisis de fibras de ADN para poder realizar en el futuro mediciones de parámetros replicativos en distintas condiciones en el laboratorio. Después de varios intentos en lo que tuve problemas para visualizar alguna señal en el microscopio de fluorescencia, conseguí ver fibras individuales de ADN en células (**Fig. 6**) Gracias a esto pudimos visualizar mejor las fibras en lugares donde se encuentran de forma aislada para poder así hacer un recuento de estas, poder localizar tanto el origen de las fibras como su final y el número de los orígenes de replicación entre otros parámetros.

Si analizamos cada una de las fotos mostradas anteriormente por separado, se puede observar que las que presentan una concentración inicial de células (**Fig. 8**), la densidad de ADN es demasiado elevada como para poder visualizar las fibras de forma individual. También que, en las muestras sometidas a un menor tiempo de exposición al tampón de lisis, no se ha producido su correcta separación y por tanto, no ha sido posible su análisis (**Fig. 10**).

Por estos motivos, y basándome en los resultados obtenidos, llego a la conclusión que la cantidad de células inicial idónea es de $0,625 \times 10^7$ células/ml o lo que es lo mismo, $\frac{1}{4}$ de células con respecto al densidad inicial propuesta en el protocolo que seguimos en el laboratorio (proveniente del laboratorio Dr. J. Méndez), siendo expuestas a exactamente seis minutos de tampón de lisis. Es en esta condición donde se observan los mejores resultados ya que las fibras se encuentran lo suficientemente enteras y extendidas tras este proceso de lisis moderado. Además, la concentración diluida nos permite encontrar zonas con una densidad lo suficientemente baja de fibras donde podemos hacer un contaje bastante fidedigno sin tener superposiciones de otras fibras. Esto nos facilita la labor a la hora de localizar tanto el origen como el final de las fibras. Junto con esto, también seremos capaces de determinar la velocidad de replicación del ADN a la medida de muchas fibras y a la división por el tiempo de incubación con el análogo de nucleótido que en nuestro caso fue de 20 minutos.

Esta técnica ha demostrado ser bastante útil a la hora de estudiar el estado de la replicación de las células, ya que, en el caso de existir alguna anomalía en la maquinaria, este proceso sería lo suficientemente sensible y lo podríamos detectar a la hora de visualizar la muestra al microscopio.

Asociado a aberraciones en el control de la iniciación de la replicación del ADN (por ejemplo, la sobreexpresión de las proteínas Cdt1 o Cdt6), puede producirse una situación en la que la maquinaria de replicación vuelva a replicar determinados fragmentos dos veces, es un proceso que se denomina re-replicación. Dicho suceso puede originarse utilizando esta técnica con algunos cambios en el protocolo a fin de observar aquellos tramos donde haya ocurrido este proceso apareciendo coloreados con la mezcla de ambos fluorocromos utilizados en los análogos de las bases, es decir la mezcla de color rojo y verde sobre la misma fibra. En mi estancia en el laboratorio intenté observar eventos de re-replicación en mis muestras, pero sin éxito alguno, ya que son eventos muy raros.

Tras todos los experimentos realizados, mi conclusión es que es indiscutible la utilidad de esta técnica tanto para medir parámetros del proceso de replicación como para encontrar situaciones patológicas moleculares, siempre y cuando sea optimizada para poder ver las fibras enteras y de forma individual, además de ser una técnica complicada y que requiere mucha atención en sus múltiples pasos.

Conclusions

The objective of this study was to fine-tune the of DNA fibers technique to perform in the future replicative parameters measurements under different conditions in the laboratory. After several attempts I had trouble viewing some signal in the fluorescence microscope, but finally I could observe individual fibers of DNA (**Fig. 6**). Since then we could observe better the fibers to count them, locate the origin the termination of the fibers and the number of replication origins among other parameters.

If we analyze each of the images displayed above separately, it can be seen that having an initial concentration of cells, DNA density is too high as to visualize the fibers individually (**Fig. 8**). Also, in the samples subjected to a shorter exposure time to the lysis buffer, it has not produced proper separation and therefore has not been possible analysis. (**Fig. 10**)

For these reasons, and based on the results, I conclude that the amount of suitable initial cell is $0,625 \times 10^7$ cells/ml (or $\frac{1}{4}$ of the initial cell density), being exposed to exactly six minutes of lysis buffer is the best condition to visualize fibers in my experience. It is in this condition where best results are seen because the fibers are sufficiently entire and extended after a moderate lysis.

In addition, the concentration of $\frac{1}{4}$ allows us to find areas with low fiber density where we can make a fairly reliable counting without overlays other fibers. This enables us to work when locating the origin and the end of the fibers. Along with this, we will also be able to determine the rate of DNA replication to the extent of many fibers and dividing by the incubation time with the nucleotide analogues, which in our case, was 20 minutes.

This technique has proven to be quite useful for viewing the status of the replication of cells, as in the case of any abnormality in the machinery, this process would be sufficiently sensitive and we could detect when viewing sample microscopically.

One of the aberrations in controlling the initiation of DNA replication is the process called re-replication. Re-replication can occur, for example, by overexpression of Cdt1 or Cdt6 proteins and is a situation in which the replication machinery replicates certain fragments. This event can be seen using this technique with some changes in the protocol to observe those sections where this process has occurred appearing coloured with the mixture of the two fluorophores used to detect each the bases analogue (the mixture of red and green on the same fiber). In my time in the laboratory I tried to observe re-replication events in my samples, but without success, because they are very rare events.

After all experiments, my conclusion is that it is a very usefulness technique for measuring parameters of the replication process to find molecular pathological situations, as long as it is optimized to see the whole and individual fibers, though it is also a complicated technique that requires a lot of attention in its many steps.

Referencias

Artículos científicos:

- Dorn S., Chastain II P., Hall J. and Cook J. 2009 *Analysis of re-replication from deregulated origin licensing by DNA fiber spreading*. Nucleic Acids Res. Jan;37(1):60-9.
 - Gasser R, Koller T, Sogo JM. 1996 *The stability of nucleosomes at the replication fork*. J Mol Biol. May 3;258(2):224-39.
 - Técher H., Koundrioukoff S., Azar D., Wilhelm T., Carignon S., Brison O., Debatisse M. and Le Tallec B. 2013 *Replication Dynamics: Biases and Robustness of DNA Fiber Analysis*. J Mol Biol. Nov 29;425(23):4845-55.
 - Masai H., Matsumoto S., You Z., Yoshizawa-Sugata N. and Oda M. 2010 *Eukaryotic Chromosome DNA Replication: Where, When, and How?* Annu Rev Biochem.;79:89-130.
 - Magnan D y Bates D. 2015 *Regulation of DNA Replication Initiation by Chromosome Structure*. J Bacteriol ;197(21):3370-7.
 - Onesti S. y MacNeill S. 2013 *Structure and evolutionary origins of the CMG complex*. Chromosoma. 122(1-2):47-53. doi: 10.1007/s00412-013-0397-x. Epub 2013 Feb 15
 - Smits V. and Freire R. 2016 *USP7/HAUSP: A SUMO deubiquitinase at the heart of DNA replication* Bioessays ;38(9):863-8. doi: 10.1002/bies.201600096. Epub 2016 Jul 4.
- Páginas webs:

1. <http://pendientedemigracion.ucm.es/info/genetica/grupod/Replicacion/Replicacion.htm>
2. <https://www.cellsignal.com/products/cellular-assay-kits/brdu-cell-proliferation-assay-kit/6813>
3. http://www.abcam.com/brdu-antibody-iib5-ab8152.html#description_images_1