



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ESTRUCTURA DE ORDEN SUPERIOR AL  
INTERIOR DEL NÚCLEO CELULAR (NHOS) EN DOS ESPECIES CERCANAS  
DE MAMÍFERO (RATA Y RATÓN)

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

EVANGELINA SILVA SANTIAGO

DIRECTOR DE TESIS

Dr. ARMANDO ARANDA ANZALDO

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México

COMITÉ TUTOR

Dr. ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ

IFC, UNAM

Dr. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ

Facultad de Medicina, UNAM

México, D.F., marzo 2018

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx), bajo la dirección del Dr. Armando Aranda Anzaldo. La presente tesis se realizó dentro del proyecto CONACyT 176794 a cargo del Dr. Armando Aranda Anzaldo.

Los estudios de posgrado en el programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de Evangelina Silva Santiago fueron apoyados por una beca otorgada por el CONACyT (408154).

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo integrado por:

Dr. Armando Aranda Anzaldo, Facultad de Medicina, UAEMéx.

Dr. Rolando Hernández Muñoz, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, Facultad de Medicina, UNAM.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Armando Aranda Anzaldo por dirigir este proyecto.

A mis asesores: Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez y Dr. Rolando Hernández Muñoz.

A la Dra. Myrna Dent por su apoyo para la realización de este trabajo.

A Juan Carlos Rivera Mulia, Rebeca Castillo Mora, Janeth Alva Medina, Edith Segura Anaya y Alejandro Martínez Gómez por su constante asesoría durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Claudia Rivera Cerecedo, y al bioterio del IFC por la donación de los animales de experimentación.

A mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias: David Vilchis García, Rolando Guadarrama Ponce, Erika Martínez Hernández, Ernesto Rojo Salinas, por su crítica a mi trabajo.

Al Dr. Apolinar Maya Mendoza por orientarme en esta carrera.

A mi familia por apoyarme en mis estudios.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	4
ANTECEDENTES .....	9
<b>I. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL NÚCLEO .....</b>	<b>9</b>
Biofísica del núcleo .....	11
El papel del <i>crowding</i> molecular (aglomeración o concentración molecular) .....	13
Biomecánica del núcleo .....	14
<b>II. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DE LA CROMATINA.....</b>	<b>18</b>
Dinámica de la cromatina .....	21
Organización funcional del genoma en 3D .....	22
<b>III. ESTRUCTURA DEL DNA .....</b>	<b>25</b>
a) Efectos de primer orden en la estructura del DNA .....	25
b) Efectos de segundo orden en la estructura del DNA .....	27
c) Efectos de tercer orden en la estructura del DNA.....	29
d) Efectos de cuarto orden: topología del DNA .....	30
<b>IV. ESTRUCTURA DE ORDEN SUPERIOR AL INTERIOR DEL NÚCLEO CELULAR: NHOS (<i>Nuclear Higher Order Structure</i>) .....</b>	<b>38</b>
La matriz nuclear .....	38
El nucleoide .....	38
Regiones de anclaje del DNA a la MN (MARs) y regiones de anclaje de los bucles estructurales de DNA a la MN (LARs) .....	40
Naturaleza de las interacciones entre DNA y MN .....	41
Significado funcional de la asociación DNA-MN.....	42
Estructura de orden superior al interior del núcleo celular: NHOS ( <i>Nuclear Higher Order Structure</i> ) .....	43

Implicaciones de la NHOS.....	44
Tenseguridad y NHOS.....	47
JUSTIFICACIÓN.....	51
OBJETIVO GENERAL.....	54
Objetivos específicos.....	54
MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
a. Animales experimentales.....	55
b. Células primarias.....	56
c. Extracción de nucleoides.....	57
d. Análisis de la integridad de los nucleoides.....	58
e. Obtención de curvas de digestión con DNasa I y recuperación del DNA anclado a la MN.....	58
f. Diseño de <i>primers</i> .....	59
g. Amplificación directa de secuencias blanco a partir de nucleoides.....	60
h. Extracción de proteínas de MN.....	61
i. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	61
RESULTADOS.....	63
Aislamiento de hepatocitos.....	70
Extracción de nucleoides de hepatocitos.....	73
Aislamiento de núcleos neuronales.....	74
Extracción de nucleoides de neuronas.....	75
Caracterización biofísica de la NHOS en hepatocitos y neuronas de rata y de ratón.....	76
Cinéticas de digestión con DNasa I.....	82
Mapeo topológico con respecto a la MN de las ocho secuencias diana en hepatocitos de rata y de ratón.....	96

<b>Mapeo topológico con respecto a la MN de las ocho secuencias diana en neuronas de rata y de ratón .....</b>	<b>102</b>
<b>Perfil genérico de proteínas de MN en hepatocitos y neuronas de rata y de ratón.....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO 1. Caracterización comparativa de los bucles estructurales de DNA del locus multigénico de la familia albúmina entre neuronas, hepatocitos y linfocitos B “naïve” de rata adulta.....</b>	<b>114</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>122</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>138</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>140</b>
<b>Apéndice 1. La tensegridad .....</b>	<b>142</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>145</b>

## ABREVIATURAS

Å	Angström, $1 \text{ Å} = 1 \times 10^{-10} \text{ m}$
<i>Actb</i>	Gen beta-actina
<i>Alb</i>	Gen albúmina
BLAST	<i>“Basic Local Alignment Search Tool”</i>
pb	Pares de bases
CAPs	<i>“Chromatin Architectural Proteins”</i> : proteínas estructurales de la cromatina
CCC	<i>“Chromosome Conformation Capture”</i>
<i>CD23</i>	Gen CD23, codifica una proteína de membrana de linfocitos B que funciona como receptor de la inmunoglobulina E
<i>Cd86</i>	Gen Cd86, codifica una glicoproteína de membrana de linfocitos T
<i>Col1a1</i>	Gen de colágena tipo I alfa 1
D	Zona topológica distal a la MN
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNasa I	Desoxiribonucleasa I
dsDNA	DNA de doble cadena
E	Zona topológica embebida en la MN
EBr	Bromuro de etidio
FISH	<i>“Fluorescence In Situ Hybridization”</i>

FRAP	<i>“Fluorescence Recovery After Photobleaching”</i>
<i>Fyn</i>	Gen <i>fyn</i> , codifica una proteína tirosina-cinasa de la familia src
Gpb	Millones de pares de bases
HiC	<i>“High chromosome conformation capture”</i>
K	Módulo de expansión de área de un material
k	Módulo de flexión de un material
Da	Daltones. Unidad de masa = 1/12 de la masa de un átomo de C-12
kPa	Kilopascales
LARs	<i>“Loop Attachment Regions”</i> : regiones de anclaje de los bucles estructurales de DNA a la MN
LINC	<i>“Linker of Cytoskeleton to Nucleoskeleton”</i>
<i>Lk</i>	<i>“Linking number”</i> , parámetro topológico que indica el número de veces que las dos hebras de la hélice de DNA se entrecruzan entre sí. $Lk = Tw + Wr$
$Lk^0$	<i>“Linking number”</i> correspondiente al estado relajado, corresponde al número de nucleótidos (N) dividido por el periodo de la hélice (10.5 pb para el DNA B)
LMNA	Lámina tipo A
LMNB	Lámina tipo B
MARs	<i>“Matrix Attachments Regions”</i> : regiones de anclaje del DNA a la MN
MC	Zona topológica muy cercana a la MN
MN	<i>“Nuclear Matrix”</i> : matriz nuclear

<i>Nef-l</i>	Gen neurofilamento ligero, es un filamento intermedio de neuronas
<i>Nef-m</i>	Gen neurofilamento medio, es un filamento intermedio de neuronas
NHOS	“ <i>Nuclear Higher Order Structure</i> ”: estructura de orden superior al interior del núcleo celular
NPC	“ <i>Nuclear Pore Complex</i> ”: complejo del poro nuclear
NuMA	“ <i>Nuclear Mitotic Apparatus</i> ”: proteína del aparato mitótico
ORIs	Orígenes de replicación
P	Zona topológica proximal a la MN
Pa	Pascal, unidad de presión usada para cuantificar la rigidez de un material ( <i>modulus de Young</i> ). $1 \text{ Pa} = 1 \text{ N/m}^2$
PCNA	“ <i>Proliferating cell nuclear antigen</i> ”: antígeno nuclear de proliferación celular
PLFs	“ <i>Pore Linked Filaments</i> ”: filamentos vinculados al poro
PML	Cuerpos nucleares definidos por su contenido de <i>promyelocytic leukemia protein</i> , proteína de la leucemia promielocítica
RNA	Ácido ribonucleico
<i>R</i>	“ <i>Roll</i> ”: ángulo de giro en el eje vertical en cada par de bases de la cadena de DNA
<i>S</i>	“ <i>Slide</i> ”: grado de desplazamiento de las bases en el eje horizontal de la cadena de DNA
SARs	“ <i>Scaffold-attachment regions</i> ”: regiones de anclaje al andamio nuclear

$T$	“ <i>Twist</i> ” local. Ángulo de rotación local en el eje horizontal de cada par de bases apiladas en el DNA
$T_m$	Temperatura de <i>melting</i>
$T_w$	“ <i>Twist</i> ”: número de veces que una hebra cruza a través de la otra, su magnitud engloba al <i>twist</i> local ( $T$ ) que hay entre dos pares de bases adyacentes
W-C	Apareamiento tipo Watson-Crick
$W_r$	“ <i>Writhe</i> ”: describe cuántas veces el eje de la hebra de DNA cruza sobre sí misma
$\Delta L_k$	Diferencia de “ <i>linking number</i> ” del DNA: $\Delta L_k = \Delta T_w + \Delta W_r$

## RESUMEN

En los metazoarios el DNA se organiza en bucles hiperenrollados que se estabilizan por su asociación a un compartimento o subestructura nuclear conocida como matriz nuclear (MN). Las interacciones entre el DNA y la MN son más estables que las interacciones entre proteínas de la cromatina y el DNA, y definen una estructura de orden superior al interior del núcleo celular (NHOS por sus siglas en inglés: *Nuclear Higher Order Structure*). El establecimiento de anclajes entre el DNA y la MN es una condición necesaria y fundamental que preserva la integridad y coherencia del genoma al interior del núcleo. Existe evidencia de que esta estructura es necesaria para la viabilidad de la célula y que tiene implicaciones relevantes para la apropiada fisiología nuclear. La evidencia disponible indica que limitantes de tipo estructural y termodinámico dirigen la actualización de las interacciones entre el DNA y la MN. Sin embargo, no se sabe si hay factores biológicos que también determinan esta organización estructural. Para responder esta pregunta se propuso estudiar a la NHOS desde una perspectiva evolutiva. La eventual conservación de la NHOS durante la evolución indica que factores biológicos están implicados en su establecimiento, ya que cualquier carácter funcional determinante para la supervivencia y/o adaptación de la especie es blanco de la selección natural. Siendo así, se realizó un estudio comparativo de las relaciones topológicas entre el DNA y la MN en hepatocitos primarios de dos especies cercanas de mamífero: la rata y el ratón. Para ello se determinó la posición relativa con respecto a la MN de ocho secuencias blanco que corresponden a regiones del genoma muy conservadas en ambas especies y que representan una muestra de diferentes territorios cromosómicos al interior del núcleo en interfase. Nuestros resultados mostraron que el patrón de relaciones topológicas entre el DNA y la MN no está conservado entre especies cercanas y sugieren que la NHOS es especie-específica. Esto indica que los factores de tipo biológico no son determinantes directos de las interacciones entre el DNA y la MN.

Para indagar más sobre la posible relación entre los factores de tipo funcional y la NHOS, se comparó la NHOS de neuronas con la de hepatocitos y linfocitos B *"naive"* en la rata. Las neuronas, a pesar de ser postmitóticas, conservan la capacidad de replicar el genoma bajo ciertas circunstancias y son muy activas en cuanto a la transcripción, por lo tanto, si la NHOS de neuronas es similar a la de hepatocitos o linfocitos B *"naive"*, esto sugeriría que factores de tipo funcional como la replicación o la transcripción participan en el establecimiento de esta estructura. Sin embargo, nuestros resultados indican que la NHOS de las neuronas es completamente diferente a la de los hepatocitos y a la de los linfocitos B *"naive"*, sugiriendo que los factores funcionales no son determinantes de la NHOS.

Por lo tanto, ahora sabemos que la NHOS es tejido-específica y especie-específica, y que no existe relación causal aparente entre los procesos funcionales del núcleo (replicación y transcripción) y la NHOS. Esto sugiere que los factores físicos y termodinámicos son más importantes para el establecimiento de la NHOS. Así, esta estructura constituye un nivel de organización primario sobre el cual deben adaptarse y desplegarse los procesos funcionales del núcleo.

## **ABSTRACT**

In metazoans, DNA is organized in supercoiled loops that are stabilized by their association with a nuclear compartment or substructure known as the nuclear matrix (NM). The interactions between DNA and the NM are more stable than those between DNA and chromatin proteins and define a nuclear higher order structure (NHOS). The establishment of anchorages between DNA and the NM is a necessary and fundamental condition in the organization of the genome, which preserves the integrity and coherence of such a massive genome within the nucleus. There is evidence that the NHOS is necessary for cell viability and that it has relevant implications for the appropriate nuclear physiology. Current evidence suggests that thermodynamic and structural constraints drive the actualization of the interactions between DNA and the

NM. To investigate whether functional factors may also determine the NHOS, we decided to study the NHOS from an evolutionary perspective, since in case that the NHOS is conserved during evolution, this would suggest that biological factors are involved in its establishment, since any functional factor that is determinant for the survival and/or adaptation of the species is a target of natural selection. We carried out a coarse-grained, comparative evaluation of the DNA-NM topological relationships in primary hepatocytes from two closely related mammals: rat and mouse, by determining the relative position to the NM of eight target sequences corresponding to highly-conserved genomic regions that also represent a sample of distinct chromosome territories within the interphase nucleus. Our results indicate that the pattern of topological relationships between DNA and NM is not conserved in two closely related species, suggesting that the NHOS is species-specific. This suggests that biological factors are not direct determinants of the interactions between DNA and the NM.

In order to further investigate whether functional factors may participate in determining the NHOS, we compared the NHOS of neurons with that from hepatocytes and naïve B-lymphocytes in the rat. Neurons retain the capacity to replicate the genome under certain circumstances despite being postmitotic, and remain transcriptionally very active. Therefore, if the NHOS of neurons is similar to that of hepatocytes or naïve B-lymphocytes, this would suggest that functional factors (such as replication and/or transcription) have a role in determining this structure. Our results indicate that the NHOS of neurons is completely different from that one observed in hepatocytes or in naïve B-lymphocytes, suggesting that the NHOS is independent of functional factors.

Therefore, now we know that NHOS is tissue-specific and species-specific, and that there is no obvious causal relationship between the functional processes of the nucleus (replication and transcription) and the NHOS; and this suggests that physical and thermodynamic factors are more important for establishing the NHOS. This structure represents a baseline level of organization on which the functional processes adapted to it unfold.

## INTRODUCCIÓN

La organización que tiene el DNA al interior del núcleo es uno de los temas centrales en el estudio de la estructura nuclear. Gran parte del conocimiento que ahora tenemos sobre dicha organización es por estudios de microscopía electrónica o estudios *in vitro*. El desarrollo de nuevas tecnologías para el estudio de la estructura del cromosoma en interfase como FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), espectroscopía y 3C ha mostrado claramente que el DNA tiene algún tipo de organización al interior del núcleo. Los estudios de espectroscopía, tomografía o crio-tomografía electrónica han permitido el estudio de la organización del cromosoma en su contexto más natural y mostraron que existe una discrepancia entre los resultados *in vitro* que se conocían y la realidad *in vivo* (Fussner et al., 2012). Actualmente se acepta que la fibra de 30 nm no se observa *in vivo* y que el cromosoma en interfase no corresponde a una organización jerárquica de fibras de cromatina de diámetro creciente (Razin y Gavrilov, 2014). El estudio de la estructura del cromosoma en interfase se alienta por una variada evidencia que sugiere una relación entre estructura del cromosoma y su función, específicamente con la transcripción y cambios en el estado o potencial de diferenciación de las células (Jackson, 2006; Cremer y Cremer, 2010; Woodcock y Ghosh 2010; Nora et al., 2012; Bickmore y van Steelsen, 2013). Sin embargo hasta el día de hoy no existe evidencia clara de la relación causal entre la estructura tridimensional y la función del genoma.

Por otro lado, el DNA es un material con propiedades estructurales tales como helicidad, longitud de persistencia, rigidez y elasticidad, lo que plantea varios problemas para la propia molécula en el ambiente intranuclear. La helicidad es el origen del hiperenrollamiento que ocurre de manera natural en el DNA (Mirkin, 2001), a su vez el hiperenrollamiento genera estrés estructural en el DNA toda vez que su estructura primaria se altera (Kramer y Sinden, 1997; Mirkin, 2001; Bates y Maxwell, 2005). El comportamiento natural de los polímeros largos y rígidos es de dos tipos; un polímero fluctuante evolucionará a la conformación de máxima entropía que corresponde a una estructura globular (Neumann, 1977). En el ambiente intranuclear,

un polímero rígido fluctuante tenderá a fragmentarse (Aranda-Anzaldo et al., 2014). La longitud y la rigidez del DNA también generan estrés estructural a la molécula al interior del núcleo (Nelson, 1999). Sin embargo, *in vivo* los problemas del DNA asociados a sus propiedades de carácter físico (estructurales y termodinámicas) son resueltos de alguna manera. Las observaciones hechas por Cook y colaboradores desde 1975 (Cook y Brazell 1975, 1976; Cook et al., 1976), ayudan a comprender el problema del estrés estructural del DNA al interior de núcleo. Ellos mostraron que el DNA se organiza en bucles hiperenrollados que se asocian por su base a una subestructura nuclear conocida como matriz nuclear (MN), a este complejo de DNA-MN, Cook lo llamó "nucleoide". Esta estructura resiste al tratamiento con alta fuerza iónica y con agentes intercalantes como el bromuro de etidio (EBr), poniendo de manifiesto la estabilidad de las interacciones entre el DNA y MN. Los bucles de DNA asociados con la MN se denominan bucles estructurales (Elcock y Bridger, 2008; Maya- Mendoza et al., 2003; Razin, 2001) precisamente por la alta estabilidad de los sitios de interacción con la MN o LARs (*Loop Attachment Regions*).

Se ha acuñado el concepto de estructura de orden superior al interior del núcleo celular (NHOS por sus siglas en inglés: *Nuclear Higher Order Structure*) definida por las interacciones entre el DNA y la MN (Aranda-Anzaldo, 2009; Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García y Aranda-Anzaldo, 2011; 2012). Recientemente se ha propuesto a la NHOS como un modelo de organización del cromosoma en interfase basado en el principio de tensegridad (Aranda-Anzaldo, 2016). En este modelo de organización del cromosoma hay una conciliación entre la estructura del DNA y su función como material genético, ya que la NHOS provee un mecanismo general para preservar la integridad y coherencia del DNA y por lo tanto, la estabilidad del genoma. La NHOS corresponde a un nivel de organización fundamental del genoma al interior del núcleo que es independiente de las proteínas de cromatina (Verheijen et al., 1986; Engelke et al., 2014). Actualmente existe evidencia de que las relaciones topológicas entre DNA y MN es requisito para la viabilidad de la célula (Aranda-Anzaldo y Dent, 1997). La NHOS se comporta como un sistema estructural estable que responde a estímulos mecánicos (Martínez-Ramos et al., 2005), se comporta también como un

sistema físico que evoluciona en el tiempo hacia su estado de máxima entropía, caracterizado por un aumento en el número de LARs actualizadas y por lo tanto mayor número de bucles estructurales de DNA cuyos tamaños son más homogéneos entre sí. En esta conformación, la energía de estrés estructural del DNA al interior del núcleo se distribuye de una manera más homogénea en el estado final comparada con el estado inicial (Maya-Mendoza et al., 2005; Alva-Medina et al., 2010, 2011).

Se ha estudiado la relación entre NHOS y función del genoma, la evidencia disponible sugiere que la transcripción no afecta ni determina la NHOS y viceversa (Iarovaia et al., 2004; Maya-Mendoza et al., 2003; Trevilla Gracia y Aranda-Anzaldo, 2011; 2012). Por otro lado se ha demostrado que los bucles estructurales de DNA asociados con la MN corresponden a los replicones *in vivo* (Rivera-Mulia et al., 2011). La actualización progresiva de los anclajes del DNA con la MN se correlaciona con la pérdida de potencial proliferativo y la diferenciación terminal (Maya-Mendoza et al., 2005; Aranda-Anzaldo, 2009; 2012; Alva-Medina et al., 2010; Aranda-Anzaldo et al., 2014). Se ha propuesto que el número de interacciones entre DNA y MN de células terminalmente diferenciadas como la neurona, alcanza un umbral de estabilidad estructural por encima del cual las células entran en el estado postmitótico (Aranda-Anzaldo, 2009; Aranda-Anzaldo et al, 2014). Sin embargo, la evidencia del carácter tejido-específico de la NHOS pone en duda que la replicación sea un factor que dirija su establecimiento (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010; Aranda-Anzaldo y Trevilla-García, 2011, 2012).

En el establecimiento de la NHOS los factores de tipo físico-termodinámico tienen un papel determinante. Sin embargo, no se sabe si hay factores biológicos que también determinan esta estructura. Para responder esta pregunta se propuso estudiar la NHOS desde una perspectiva evolutiva. Si la NHOS está conservada en la evolución, indica que los factores de tipo biológico están implicados, ya que cualquier carácter determinante para la sobrevivencia y/o adaptación de la especie es blanco de la selección natural. Para ello se realizó un estudio comparativo de las relaciones topológicas entre el DNA y la MN en hepatocitos primarios de dos especies cercanas de mamífero: la rata y el ratón. Para lo cual se determinó la posición relativa con

respecto a la MN de ocho secuencias blanco que corresponden a regiones del genoma muy conservadas en ambas especies y que representan una muestra de diferentes territorios cromosómicos al interior del núcleo en interfase. Los resultados mostraron que el patrón de relaciones topológicas entre el DNA y la MN no se conserva en especies estrechamente relacionadas, sugiriendo que la NHOS es especie-específica (Silva-Santiago et al, 2017a). Esto significa que los factores de tipo biológico no son determinantes directos de las interacciones entre el DNA y MN. Por lo tanto, el establecimiento de la NHOS es el resultado de la interacción de factores estructurales que determinan la conformación del DNA y de factores termodinámicos que dirigen los sistemas físicos hacia el estado de máxima entropía.

En el estudio se usaron a las neuronas como “tejido control”, ya que en estas células la NHOS es más homogénea que en los tipos celulares que conservan el potencial proliferativo, lo cual implica que la distribución de los LARs es más regular en las neuronas (Alva-Medina *et al.*, 2010; 2011), por lo que las relaciones topológicas entre el DNA y la MN tienden a homogenizarse y la probabilidad de encontrar diferencias se reduce. De hecho el patrón de mapeo topológico de las ocho secuencias blanco en las neuronas de la rata y del ratón, resultó altamente semejante.

Ante la evidencia del carácter tejido-específico y especie-específico de la NHOS, y por otro lado de que los bucles estructurales corresponden a los replicones *in vivo*; para indagar sobre el papel de la replicación en la determinación de dicha estructura, se propuso realizar un análisis comparativo de la NHOS de las neuronas contra la de hepatocitos y linfocitos B no activados. Las neuronas conservan la capacidad de replicar el genoma bajo ciertas circunstancias a pesar de ser postmitóticas, por lo que la NHOS neuronal similar a la de los hepatocitos o linfocitos B no activados, sugiere la participación de la replicación en su establecimiento. Los resultados indican que la NHOS de las neuronas es completamente diferente a la de hepatocitos y a la de linfocitos B no activados, este resultado descarta que la replicación sea un determinante de la NHOS. Los resultados de este trabajo permiten hacer una

conclusión muy importante con respecto a la NHOS: no hay relación causal entre los procesos de la fisiología nuclear, específicamente entre la replicación y la NHOS.

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyeron al estudio del núcleo desde una perspectiva estructural. Hasta ahora sabemos que la NHOS es tejido-específica (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García y Aranda-Anzaldo, 2011; Silva-Santiago et al., 2017b) y especie-específica (Silva-Santiago et al., 2017a), y que no existe relación causal aparente entre los procesos funcionales del núcleo (replicación y transcripción) y la NHOS (Iarovaia et al., 2004; Maya-Mendoza et al., 2003; Trevilla Gracia y Aranda-Anzaldo, 2011; 2012; Silva-Santiago et al., 2017b). Por lo tanto, se concluye que los factores físicos-termodinámicos son el componente determinista que gobierna el establecimiento de la NHOS. Así, esta estructura constituye un nivel de organización primario sobre el cual deben adaptarse y desplegarse los procesos funcionales del núcleo.

## ANTECEDENTES

### I. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL NÚCLEO

El núcleo ocupa aproximadamente un tercio del volumen celular, su función es albergar el genoma junto con la maquinaria necesaria para los procesos bioquímicos fundamentales de replicación, reparación del DNA, transcripción, el procesamiento del RNA, la biogénesis de los ribosomas, entre otros; de esta manera su estructura es fundamental para cumplir estas funciones biológicas. El núcleo celular obtiene soporte estructural a través de la lámina nuclear, la cual está unida a la doble membrana nuclear y juntas forman la envoltura nuclear. La envoltura nuclear controla el tráfico de moléculas entre citoplasma y nucleoplasma a través de los complejos del poro nuclear (NPC: *Nuclear Pore Complex*), y asociados a los NPC se extienden los filamentos vinculados al poro (PLFs: *Pore Linked Filaments*) que son elementos esenciales del nucleoesqueleto, ya que mantienen los poros nucleares libres de cromatina para facilitar la difusión dentro y fuera del núcleo (Arlucea et al., 1998; Cordes et al., 1993). La inspección detallada del interior nuclear revela un espacio ocupado por la cromatina y un espacio libre de ésta (Cremer y Cremer, 2010). En la interfase, los cromosomas ocupan regiones discretas al interior del núcleo conocidas como territorios cromosómicos, la posición de los cromosomas al interior del núcleo es tejido-específica (Parada et al., 2004). En mamíferos, un territorio típico cromosómico puede ser representado como una esfera que mide aproximadamente 2.5  $\mu\text{m}$  de diámetro (Jackson, 2006); dentro de este volumen, la cromatina es dinámica únicamente a nivel local (Cremer y Cremer, 2010); para la mayoría de la cromatina es raro observar un movimiento mayor a los 500 nm (Abney et al., 1997). Esto implica que la estructura propia del cromosoma impide movimientos de largo alcance, de manera que la interacción entre cromosomas adyacentes es limitada.

El espacio intercromatínico está libre de cromatina, es rico en ribonucleoproteínas y contiene otros elementos característicos, tales como fibrillas pericromatínicas, gránulos

pericromatínicos y *clusters* de gránulos intercromatínicos (Fakan, 1994; Cremer y Cremer, 2010). Se han descrito otras subestructuras nucleares al interior del núcleo que carecen de membrana (llamadas también complejos macromoleculares, dominios macromoleculares o sub-compartimentos nucleares) que consisten en agregados de moléculas específicas relacionadas funcionalmente (Albiez et al., 2006). El hecho de que existan altas concentraciones de ciertas proteínas específicas en sitios nucleares definidos hace surgir la pregunta sobre la función de tales compartimentos. El nucléolo provee el mejor ejemplo de subestructura nuclear que concentra componentes de la vía de biogénesis de los ribosomas. Otros compartimentos nucleares descritos son los cuerpos de Cajal, los cuerpos PML (definidos por su contenido de *promyelocytic leukemia protein*) (Spector, 2001; Wang et al., 2002) y los “*speckles*” (Matera, 1999). Las funciones específicas de estos dominios subnucleares son poco conocidas; por ejemplo, los *speckles* (estructuras ricas en ribonucleoproteínas de splicing) son grandes estructuras subnucleares que concentran proteínas importantes para el procesamiento del mRNA; algunos genes muy activos se localizan en la periferia de los *speckles* nucleares (Smith et al., 1999). Sin embargo, esto no es una regla, ya que la mayoría de los genes no se localizan en la periferia de los *speckles*. No es claro si la organización de los compartimentos nucleares es un componente esencial de la estructura nuclear. Sin embargo, es razonable pensar que la eficiencia de los procesos biológicos aumenta al concentrar los componentes requeridos en determinados sitios al interior del núcleo (Jackson, 2006).

En el núcleo de mamíferos, la replicación del DNA, la transcripción del RNA y la reparación del DNA dañado ocurre en sitios discretos e independientes (Wei et al., 1998), sugiriendo que existe una organización estructural al interior del núcleo. A los sitios focales de replicación y transcripción se les ha llamado ‘fábricas’, debido a que concentran la ‘maquinaria’ enzimática requerida (Cook, 1999, 2002; Ferrai et al., 2010). Cabe señalar que los procesos de la fisiología nuclear son altamente dinámicos y requieren la participación de múltiples enzimas, proteínas adaptadoras y proteínas remodeladoras de la cromatina (Lukas et al., 2005).

## Biofísica del núcleo

El desarrollo de técnicas de microscopía de fluorescencia ha permitido estudiar tanto la arquitectura como la función de la célula *in vivo* (Lippincott-Schwartz *et al.*, 2003). El análisis de la recuperación de la fluorescencia después de perturbar el estado de equilibrio (metodologías FRAP *Fluorescence Recovery After Photobleaching*), es útil para estudiar los tiempos de difusión, las interacciones y las constantes de asociación de las moléculas. Con estas técnicas se obtiene información espacio-temporal mediante la creación de mapas de concentración y difusión. El estudio del núcleo con estas técnicas ha revelado que la mayoría de las proteínas nucleares son altamente dinámicas, es decir, tienen recambio rápido con los depósitos nucleoplasmáticos (Misteli, 2001a, 2008); los tiempos de residencia (tiempo que las proteínas son retenidas en ciertos compartimentos) típicos de las proteínas en los compartimentos nucleares están en el orden de segundos. Sin embargo, hay un grupo importante de proteínas que muestran un recambio bastante lento o completa inmovilidad (Hemmerich *et al.*, 2011). Estas observaciones sugieren que las proteínas nucleares tienen ciclos repetitivos y rápidos de asociación y disociación entre el nucleoplasma y los compartimentos donde están trabajando, y en consecuencia, los cuerpos nucleares y las fábricas están en perpetuo flujo. Sus estructuras dependen en parte de la proporción de la velocidad de asociación contra la velocidad de disociación de sus componentes, sugiriendo que mecanismos de auto-ensamblaje y/o auto-organización participan en su formación (Misteli, 2001b; Matera *et al.*, 2009). Este comportamiento dinámico también lo tienen ciertas proteínas que forman la envoltura nuclear, proteínas del complejo del poro nuclear y del centrómero, mostrando que las interacciones transitorias son una propiedad general e importante de las proteínas nucleares. Por otro lado, las proteínas nucleares con bajas tasas de recambio o consideradas inmóviles en el núcleo celular, constituyen una evidencia convincente de la presencia de complejos proteicos estables durante la mayor parte del ciclo celular. Estas interacciones estables tienen un papel principal en la organización estructural al interior del núcleo.

Los estudios de los tiempos de recambio de las proteínas intranucleares son consistentes con los estudios de movilidad de marcadores fluorescentes al interior del núcleo (Görisch et al., 2005). La movilidad observada constituye el modo de difusión “anómala”, lo que significa que hay frecuentes colisiones con estructuras relativamente inmóviles o que los marcadores quedan “atrapados” temporalmente en estructuras como sacos.

Entre los complejos más estables del núcleo destacan la envoltura nuclear, que contiene grandes cantidades de proteínas inmóviles (Rabut *et al.*, 2004). Otro ejemplo es la red intranuclear de lámina A, la cual muestra un tiempo de residencia mayor a tres horas, indicando claramente la presencia *in vivo* de una sub-estructura nuclear que contiene lamina A (Moir *et al.*, 2000).

De manera interesante los cuerpos subnucleares tienen tiempos de residencia en el orden de segundos, (Misteli 2007; Matera *et al.*, 2009), aunque ciertas isoformas permanecen establemente asociadas por espacio de horas, tal es el caso de PML V en los cuerpos PML (Weidtkamp-Peters *et al.*, 2008) y coilina p80 en los cuerpos de Cajal. Estos datos indican que la arquitectura de los cuerpos PML y de Cajal puede ser dictada primariamente por interacciones de proteínas que forman andamios estables (Handwerger *et al.*, 2003; Deryusheva y Gall, 2004; Brand *et al.*, 2010). Por otro lado, su funcionalidad involucra encuentros estocásticos de componentes específicos que se intercambian rápidamente (Dundr *et al.*, 2004; Weidtkamp-Peters *et al.*, 2008).

Las fábricas de replicación y reparación poseen elementos estables, sugiriendo que andamios estables de proteínas pueden contribuir funcionalmente en estos procesos (Sporbert *et al.*, 2002; Solomon *et al.*, 2004; Mortusewicz *et al.*, 2008).

La auto-organización y auto-ensamblaje constituyen principios de organización genéricos al interior del núcleo. Mientras que estos tienen un papel principal en la generación de combinaciones de complejos proteicos, deben existir otros mecanismos que den estabilidad a los complejos formados, lo cual es relevante para procesos que requieren sincronización en sitios definidos, en los cuales el auto-ensamblaje

estocástico y las reacciones de auto-organización no son suficientes (Hemmerich *et al.*, 2011). Entre los mecanismos que pueden dar estabilidad a los complejos proteicos se han sugerido modificaciones postraduccionales de las proteínas, la participación de proteínas estructurales que forman andamios supramoleculares y cambios en la estructura de la cromatina inducidos por los complejos que se van ensamblando. Además, las alteraciones de los complejos pueden ser reguladas en una manera dependiente del ciclo celular, como se ha propuesto para muchos componentes del complejo cinetócoro (complejos macromoleculares ensamblados sobre los lados opuestos del centrómero que median la interacción entre los cromosomas y los microtúbulos) (Hemmerich *et al.*, 2008).

### **El papel del *crowding* molecular (aglomeración o concentración molecular)**

Desde el punto de vista biofísico, el núcleo celular es una mezcla concentrada de macromoléculas estructuralmente distintas en solución acuosa (solución polidispersa). La concentración de masa seca en el núcleo está en el orden de 100-200 mg/ml y puede alcanzar hasta 700 mg/ml (Johnston *et al.*, 2012; Lampert *et al.*, 1966; Viola y Puccinelli, 1965). En ambientes concentrados como el núcleo celular, las conformaciones de las moléculas y sus interacciones con otras moléculas están sujetas a dos limitaciones distintas, pero relacionadas. Por un lado, el confinamiento de las macromoléculas dado por la membrana nuclear, ya que los estudios de modelado muestran que los polímeros y las vesículas ajustan su forma en respuesta al confinamiento (Fosnaric *et al.*, 2013). Por otro lado, cada molécula puede acceder sólo a un volumen disponible o libre no ocupado por sus vecinos. En el núcleo celular, el confinamiento y el volumen excluido están presentes y restringen a las moléculas, limitando sus grados de libertad conformacional y configuracional. Los volúmenes que los cuerpos excluyen a otro dependen de las geometrías y configuraciones de los cuerpos. En concentraciones suficientemente altas de una mezcla polidispersa, el volumen excluido total puede tener una forma compleja. En fases fluidas, el volumen

excluido implica una pérdida de volumen disponible para las partículas y por tanto, una disminución en la entropía (Denton, 2014).

En medios celulares concentrados, el efecto de volumen excluido puede dar lugar a fuerzas de atracción de corto alcance llamadas fuerzas entrópicas o fuerzas de depleción (Leckband y Israelachvili, 2001). En una mezcla de partículas de diferente tamaño, las fuerzas entrópicas favorecen el contacto entre partículas grandes, esto permite sus volúmenes excluidos traslaparse entre sí, resultando en una disminución del volumen excluido neto. Esto incrementa el volumen accesible y la libertad configuracional de las moléculas, y de esta manera la entropía neta del sistema aumenta (Oosawa y Asakura, 1954). A concentraciones suficientes, la competencia por el volumen libre puede inducir una transición de fase, de una fase más dispersa a una menos dispersa, lo que se conoce como fenómeno de separación de fases. Las fases son soluciones que difieren en concentración y propiedades físicas (Walter y Brooks, 1995), la fase menos dispersa es estabilizada por una ganancia neta en la entropía.

En el núcleo, el “*crowding*” molecular participa, junto con los mecanismos de auto-organización y auto-ensamblaje, en la formación de los diferentes dominios observados. Sin embargo, dado que son estados sensibles a la perturbación del medio, no son suficientes para explicar por sí mismos la estabilidad de la estructura nuclear (Marenduzzo *et al.*, 2006).

## **Biomecánica del núcleo**

En interfase la estructura nuclear está bien definida, pero el núcleo es un organelo dinámico que continuamente sufre cambios en su forma durante el desarrollo (Thakar, 2006), la diferenciación (Brandt *et al.*, 2006; Meshorer, 2007) y la enfermedad (Zink *et al.*, 2004; Capell y Collins, 2006). Además, la estructura nuclear afecta la migración celular (Lee *et al.*, 2007), la organización del citoesqueleto (Broers *et al.*, 2004) y las propiedades de la célula como un todo.

Cada núcleo embebido en la célula tiene continuidad mecánica con el citoesqueleto, con las células vecinas y la matriz extracelular circundante, de manera que su estructura tridimensional y propiedades físicas pueden sentir las señales desde estos sitios (Ingber, et al., 2014; Maniotis et al., 1997).

La conexión mecánica entre espacio extracelular, citoesqueleto y el núcleo está dada por las proteínas del nucleoesqueleto. El nucleoesqueleto se refiere a todas las estructuras basadas en proteínas en el núcleo en interfase, muchas de las cuales también funcionan en mitosis en la matriz del huso mitótico (Johansen et al., 2011). El nucleoesqueleto confiere la forma específica, propiedades mecánicas y la funcionalidad al núcleo, y también es el elemento 'esqueleto' de las células animales ya que su rigidez es aproximadamente de cinco a diez veces mayor que la del citoesqueleto (Guilak et al., 2000; Dahl et al., 2004).

El principal elemento que provee estabilidad estructural al núcleo es la lámina. Los insectos y vertebrados expresan dos tipos de láminas: lámina tipo A (LMNA) y lámina tipo B (LMNB). *In vivo*, estas proteínas forman una red altamente entrecruzada que se asocia con la membrana nuclear interna, pero también se distribuyen a través del nucleoplasma (Brandt et al., 2006; Dittmer y Misteli, 2011; Dechat et al., 2008). El nucléolo tiene soporte externo dado por la lámina B1 (Martin et al., 2009). Las láminas tipo A de mamíferos incluyen laminas A, C y Ad10 y la lámina de la línea germinal C2, que son importantes para la rigidez mecánica del núcleo. En células madre, las cuales expresan solo lámina tipo-B, los núcleos son blandos (*soft*), flexibles y frecuentemente cambian de forma (Pajerowski et al., 2007). Los estadios tempranos de la diferenciación son acompañados por un incremento en la expresión de LMNA, lo cual ocasiona que el núcleo se convierta en redondo y rígido (Lammerding et al., 2004, 2006).

NuMA (*Nuclear Mitotic Apparatus*) es otra proteína del nucleoesqueleto, casi tan abundante como las láminas; se ha encontrado formando redes al interior del núcleo (Harborth et al., 1999; Radulescu y Cleveland, 2010). NuMA organiza los microtúbulos durante la mitosis en un haz estrecho (Radulescu y Cleveland, 2010), aunque NuMA

también se expresa en células postmitóticas terminalmente diferenciadas (Tang et al., 1993). Los filamentos de lámina se asocian con múltiples proteínas: espectrina, actina, NuMA, proteína 4.1 y emerina (Simon et al., 2010; Holaska et al., 2004; Holaska y Wilson, 2007; Sridharan et al., 2006). Se ha propuesto que esta red contribuye a las propiedades mecánicas de compresibilidad y elasticidad que posee el núcleo (Holaska et al., 2004).

Otros elementos del nucleoesqueleto son los complejos proteicos LINC (*Linker of Cytoskeleton to Nucleoskeleton*), que acoplan mecánicamente al nucleoesqueleto con el citoesqueleto (Crisp et al., 2006; Lombardi et al., 2011) y afectan la expresión génica (Brosig et al., 2010), un fenómeno llamado mecano-transducción (Wang et al., 2009). Se sabe que la rigidez conferida por la lámina tipo-A es importante para la mecano-transducción (Lammerding et al., 2004; Wang et al., 2009). Los complejos LINC pueden ser relativamente estables o transitorios dependiendo de su composición y función.

El grado al cual un material puede soportar el estrés depende de sus propiedades mecánicas y se describen en términos de elasticidad y viscosidad. La elasticidad describe la manera en que un material sólido sufre deformación reversible en respuesta a estrés externo; es la capacidad de un material para resistir la deformación y regresar a su forma original (unidades = Pa = kg m<sup>-1</sup> • s<sup>-2</sup>). La viscosidad es una medida de la resistencia de un fluido a la deformación bajo estrés de cizallamiento (en inglés: *shear stress*) [unidades = Pa • s = Kg m<sup>-1</sup> • s<sup>-1</sup>]. Un material viscoelástico muestra un comportamiento que es tanto viscoso (como un líquido) y elástico (como un sólido). Se observó que los núcleos se comportan como un material viscoelástico (Guilak et al., 2000; Caille et al., 2002).

En el espacio tridimensional, las propiedades elásticas son descritas en términos de módulo de compresibilidad (*bulk modulus*), que describe el grado de deformación en respuesta a una fuerza externa. La unidad de medida es el Pascal (Pa) y se ha estimado que *in vivo* el *bulk modulus* del núcleo está entre 1 y 5 kPa (Guilak et al., 2000; Caille et al., 2002). Los experimentos de micromanipulación de la envoltura nuclear muestran que se comporta como una estructura supramolecular continua con

propiedades de un material viscoelástico (Rowat et al., 2005) cuyas propiedades materiales están caracterizadas en términos de tres módulos que corresponden a las formas en que un material bidimensional se puede deformar: deformaciones de flexión (*bending*), de extensión (*stretching*) y de fricción (*shearing*). Cada una de estas deformaciones requiere energía y está asociada con una constante elástica correspondiente: el módulo de flexión ( $k$ ), el módulo de expansión de área ( $K$ ) y el módulo de fricción ( $\mu$ ) (Rowat et al., 2008). El comportamiento viscoelástico de la envoltura nuclear se ha observado en diferentes tipos celulares (Rowat et al., 2006, 2005; Dahl et al., 2004, 2005), los cuales muestran una envoltura nuclear que se estira y resiste el estrés de fricción, sugiriendo que es una característica universal de la envoltura nuclear de las células de metazoarios.

Hay evidencia de que la forma nuclear cambia si se altera la composición de la envoltura nuclear (Lammerding et al., 2004), esto sugiere que las propiedades de material de la envoltura nuclear tiene un papel principal en la determinación de la estabilidad de la forma nuclear.

La cromatina que se encuentra ocupando distintos dominios dentro del núcleo celular (Cremer et al., 2006) y que mecánicamente forma un continuo (Maniotis et al., 1997), se asocia en múltiples sitios a la envoltura nuclear mediante una red de proteínas altamente interconectada (Simon y Wilson, 2011). Se ha propuesto que la cromatina contribuye de manera importante a las propiedades de elasticidad y viscosidad del núcleo (Dahl et al., 2005). Además de la cromatina, la matriz nuclear también contribuye en la organización nuclear (Berezney y Coffey 1974; Capco et al., 1982; Nickerson, 2001), como se describirá más adelante.

Por último cabe mencionar el hecho de que las células adaptan su forma y la estructura del citoesqueleto en respuesta a la rigidez del sustrato donde se encuentran (Yeung et al., 2005; Jiang et al., 2006; Engler et al., 2006), un factor ambiental que también puede afectar las propiedades mecánicas del núcleo.

Por otro lado el defecto en las láminas y otras proteínas del nucleoesqueleto causan una variedad de enfermedades multisistémicas o tejido-específicas, denominadas laminopatías, incluyendo distrofias musculares, cardiomiopatía dilatada, lipodistrofia, neuropatía, desórdenes cerebelares, desórdenes del hueso, y trastornos de envejecimiento acelerado (Worman et al., 2010); sugiriendo que de alguna manera el nucleoesqueleto puede influenciar el genoma. Se ha propuesto que los cambios estructurales y mecánicos de la envoltura nuclear pueden alterar la mecano-transducción, por lo tanto, alterando los patrones de expresión de los genes tejido-específicos y/o mecanismos epigenéticos por alteración de la estructura de orden superior de la cromatina (Aranda-Anzaldo, 1989; Janin et al., 2017). Estos posibles mecanismos incluyen cambios estructurales en la red de las láminas e interferencia con la unión de proteínas citoplásmicas, tales como nesprinas o actina a la envoltura nuclear (Holaska et al., 2004; Libotte et al., 2005). La pérdida de lámina en la periferia nuclear por mutaciones (Markiewicz et al., 2002; Broers et al., 2005) también puede conducir a cambios en las propiedades mecánicas de la envoltura nuclear (Broers et al., 2004; Lammerding et al., 2004).

## **II. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DE LA CROMATINA**

El volumen nuclear contiene dominios de cromatina morfológicamente distintos, tales como heterocromatina, eucromatina y los territorios cromosómicos. La estructura y dinámica de la cromatina son muy importantes para los procesos fundamentales de la fisiología nuclear: transcripción, replicación, recombinación y reparación del genoma. Los patrones del plegamiento del cromosoma en interfase han sido investigados profundamente cada vez con mayor precisión, sin embargo la identidad y el papel de los actores moleculares subyacentes es pobremente entendido, limitando nuestro entendimiento de la arquitectura del cromosoma en interfase (Nora *et al.*, 2017; Schwarzer *et al.*, 2017; Kubo *et al.*, 2017; Nagano *et al.*, 2017; Flyamer *et al.*, 2017).

La heterocromatina fue originalmente definida como regiones del núcleo que se tiñen fuertemente con colorantes básicos (Heitz, 1928). Heterocromatina y eucromatina, son una indicación cualitativa del estado de compactación de la cromatina (densidad de partículas nucleosomales por unidad de volumen). Debido a que en general la heterocromatina tiende a localizarse en la periferia del núcleo y asociarse con la lámina, se ha sugerido que esta localización es estructural y funcionalmente importante (Woodcock y Ghosh 2010; Nora et al., 2012).

La estructura primaria de la cromatina es la fibra nucleosomal de 10 nm (Olins y Olins, 1974); y las interacciones entre nucleosomas y las estructuras que resultan es la estructura secundaria; la visión clásica de los libros de texto es que la fibra nucleosomal es subsecuentemente plegada en una fibra regular de 30 nm. Niveles superiores de organización de la cromatina han sido tradicionalmente pensados como varios arreglos de bucles formados por una fibra subyacente (Alberts, 2008). La estructura de orden superior de la cromatina se refiere a cualquier ensamblaje de nucleosomas que asume una conformación reproducible en tercera dimensión, el ejemplo más obvio es el cromosoma mitótico (Woodcock y Ghosh, 2010).

En el aislamiento de cromatina para estudios *in vitro* se usan típicamente soluciones hipotónicas, ya que sabe que en un medio hipotónico la cromatina se desdobra hasta la fibra de 10 nm; si posteriormente se aumenta la fuerza iónica del medio, la cromatina se pliega nuevamente (Clark y Kimura, 1990), de manera que en los estudios *in vitro* de la cromatina, se encontró una fibra con diámetro de 30 nm, por lo que el término “fibra de 30 nm” se aplicó de manera general para describir una estructura de orden superior que consiste en fibras de cromatina compactada (van Holde y Zlatanova, 2007; Razin y Gavrillov, 2014). Sin embargo, hasta la fecha, ha sido imposible resolver la estructura de la fibra de 30 nm, y la principal razón es el alto grado de irregularidad intrínseca de la cromatina nativa debido a las variaciones en la longitud del segmento *linker*, las modificaciones de las histonas, el uso diferencial de las variantes de histonas y un nivel variable de la histona H1. La variabilidad en estos factores tiene efectos locales que contribuyen a la irregularidad de la estructura secundaria; por ejemplo, la acetilación de

las histonas disminuye la carga positiva de la histona y debilita la interacción histona-DNA, conduciendo a cromatina menos compacta. Por su parte la metilación de la histona H3 en la lisina 9 crea un sitio de unión para la proteína HP1 que participa en la formación y propagación de la heterocromatina (Fan, et al., 2004). Las diferentes variantes de histonas cumplen funciones específicas en la organización de la cromatina, por ejemplo, las H3 y H2A.Z que favorecen el empaquetamiento alrededor de los centrómeros (Greaves et al., 2007).

Además de estos factores, las proteínas de cromatina no histonas también contribuyen a la organización tridimensional de la cromatina, éstas se clasifican en tres grupos: i) proteínas estructurales de la cromatina o CAPs (*Chromatin Architectural Proteins*) (Luger y Hansen 2005), que son muy diversas en su estructura y en el mecanismo de unión al DNA, algunas contienen más de un sitio de unión al DNA lo cual permite formar puentes inter e intra fibra y favorecer de esta manera la compactación; ii) proteínas de los complejos remodeladores de la cromatina, que tienen la capacidad para reestructurar, sacar o mover nucleosomas en una manera dependiente de ATP (Clapier y Cairns, 2009), y iii) las proteínas del grupo B de alta movilidad (*High Mobility Group*), las cuales cumplen funciones específicamente estructurales sobre la cromatina (Murugesapillai et al., 2014; 2016). Finalmente, la interrupción en la continuidad de la fibra nucleosomal debido a la presencia de regiones libres de nucleosomas también tiene efectos sobre la organización de la cromatina (Diesinger et al., 2010).

El desarrollo de técnicas de microscopía confocal ha permitido observar fibras con diámetros de 120 nm - 170 nm (Kireev et al., 2008). Por su parte, técnicas de espectroscopía (*Electronic Spectroscopic Imaging*) y tomografía (*Electron tomography*), han dado evidencia de que la fibra de 10 nm es la única estructura de cromatina regular en el núcleo de células eucariotas. Las regiones de eucromatina y heterocromatina parecen estar compuestas de fibras de 10 nm estrechamente empaçadas (Fussner et al., 2012; Nishino et al., 2012). El nivel de compactación fue mayor en regiones de heterocromatina, dado por fibras de 10 nm más densamente empaçadas y no por un plegamiento regular. Estos experimentos demostraron que no hay regularidad en el

empacamiento de orden superior de la fibra nucleosomal. La cromatina en interfase parece ser un ensamblaje desordenado de nucleosomas (Gan et al., 2013). Sin embargo, no cabe duda que ciertos niveles de organización superior de la cromatina deben existir, ya que el cromosoma metafásico es el ejemplo más claro.

### **Dinámica de la cromatina**

Los experimentos que usan FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) han permitido observar la dinámica de loci individuales, dominios de cromatina y cromosomas completos al interior del núcleo (Parada et al., 2004; Bolzer et al., 2005; Müller et al., 2010). Por su parte, experimentos con FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) permite la clasificación en movimientos rápidos y lentos. Los rápidos son estocásticos y frecuentes, su alcance es corto  $\sim 0.5 \mu\text{m}$ , mientras que los lentos alcanzan varios micrómetros, son dependientes de ATP y poco frecuentes (Soutoglou y Misteli 2007). De esta manera, en general la cromatina está confinada a regiones sub-micrométricas y sufren difusión limitada (Abney et al., 1997; Chubb et al., 2002; Marshall et al., 1997; Walter et al., 2003). Durante la diferenciación y el desarrollo hay también movimientos globales en la organización del genoma que alcanzan varios micrómetros y duran horas o días (Bridger et al., 2000; Chuang y Belmont, 2007). Ante rupturas de doble cadena de DNA, en ausencia de factores de reparación, se observan movimientos de largo alcance de los extremos rotos (Downs et al., 2004).

Todos los “*loci*” muestran movimiento browniano, con constantes de difusión similares, pero con un amplio intervalo de volumen de confinamiento. Hay una correlación entre el volumen de confinamiento y la distancia de la envoltura nuclear, los “*loci*” más cercanos a la envoltura están más constreñidos. De hecho, la zona cercana a la envoltura nuclear se considera una zona de movilidad intranuclear limitada (Marshall, 2002). Esto se debe en parte a una asociación física con la lámina nuclear (Heun et al., 2001; Chubb et al., 2002; Gartenberg et al., 2004). Los “*loci*” separados por 1-2  $\mu\text{m}$  en el

mismo cromosoma se mueven independientemente (Levi et al, 2005). Así, la cromatina tiene movimientos de difusión acotada constantes.

Las proteínas de la cromatina también tienen recambio continuo; la mayoría de H1 se intercambia en segundos, H2B en minutos y H3 y H4 en horas (Kimura y Cook, 2001). Por lo tanto se ha sugerido que la accesibilidad al DNA en la cromatina depende de la movilidad local de los nucleosomas, más que de la descompactación local del cromosoma (Razin y Gavrillov, 2014).

La estructura global del cromosoma se estabiliza rápidamente después de la mitosis, mientras que la posición de “*loci*” individuales en relación a los territorios cromosómicos se estabiliza progresivamente en el tiempo (Müller et al., 2010). Se observó un comportamiento individual para cada cromosoma, así como variabilidad en la descondensación de las cromátides hermanas. Por otro lado se comprobó que la estructura global del cromosoma es muy resistente al deterioro de las funciones nucleares (Müller et al., 2010).

Dada la irregularidad en la arquitectura de las fibras de cromatina *in vivo*, el resultado final es una organización heteromórfica con una arquitectura predominantemente en zig-zag (Woodcock y Ghosh, 2010; Razin y Gavrillov, 2014). Considerando que la mayoría de estas fuentes de irregularidad son dinámicas, es decir, que están cambiando en diferentes escalas de tiempo, es razonable pensar que definir la estructura de la cromatina con la precisión esperada de otras fibras biológicas sea de poca relevancia (Van Holde y Zlatanova, 1995; Woodcock y Ghosh, 2010).

### **Organización funcional del genoma en 3D**

Los abordajes experimentales que usan las metodologías 3C (*Chromatin Conformation Capture*) y sus variantes han descrito dominios de organización del genoma conocidos como TADs (*Topologically Associating Domains*) y LADs (*Lamin Associated Domains*). Los TADs son descritos como dominios de cromatina formados por bucles de tamaño

menor a una megabase que establecen una organización a nivel local en el mismo cromosoma, con base en que las secuencias de DNA dentro de un TAD interactúan entre ellas con mayor frecuencia que con secuencias localizadas por fuera del TAD. Los LADs son regiones del genoma en el orden de 0.1 – 10 Mb, que se asocian con la lámina nuclear y correlacionan con un ambiente represivo para la transcripción (Guelen *et al.*, 2008). Se ha reportado que el complejo de cohesina y la proteína CTCF participan en la formación y mantenimiento de los LADs y TADs, por lo que se les considera como los principales determinantes del plegamiento del cromosoma en interfase (Zuin *et al.*, 2014; Nora *et al.*, 2017; Schwarzer *et al.*, 2017). Sin embargo, los dominios TADs se infieren a partir de análisis estadísticos en los cuales se promedian las frecuencias de contacto entre diferentes regiones del genoma en millones de células y por lo tanto pueden ser el resultado de interacciones débiles sumadas artificialmente al muestrear muchas células mientras que los contactos intergenómicos a nivel de células individuales pueden en los hechos transgredir los supuestos bordes o límites de los TADs. Consecuencia de lo anterior son los resultados contradictorios de estudios que miden los contactos intergenómicos a nivel de célula individual, pues algunos sugieren que los TADs realmente existen en células individuales (Nagano *et al.*, 2017), y otros sugieren que los TADs son constructos estadísticos ausentes en células individuales (Flyamer *et al.*, 2017). Es importante considerar que las metodologías 3C tienen varias limitaciones técnicas que se deberían resolver antes de ser utilizadas sistemáticamente para definir la organización tridimensional del genoma. Por ejemplo, estas metodologías dependen del uso de agentes "crosslinkers" para fijar en forma artificial las supuestas interacciones o contactos entre diferentes regiones del genoma y se asume de manera ingenua que el "crosslinker" actúa de manera uniforme a lo largo del genoma sin importar las diferencias locales en composición de nucleótidos y en proteínas de la cromatina. Sin embargo, la evidencia experimental indica que diferentes "crosslinkers" producen diferentes mapas de interacciones y por lo tanto cabe la duda de si las interacciones reportadas son genuinas o artificiales (Gavrilov *et al.*, 2013, 2015). Por otra parte, las metodologías 3C se basan en consideraciones simplistas que ignoran aspectos fundamentales de la mecánica

estadística aplicada a la teoría de polímeros que es indispensable para generar modelos consistentes en 3D de polímeros complejos como son el DNA y la cromatina. Por lo anterior los modelos 3D inferidos a partir de los métodos 3C todavía distan de tener una sólida base teórica (O'Sullivan et al, 2013). En años recientes se han utilizado las técnicas de inmuno-microscopía de alta resolución (FISH) en forma comparativa para validar los resultados de las metodologías 3C, y los resultados arrojados por cada técnica fueron contradictorios (Williamson et al., 2014).

Hay un consenso con respecto a la correlación entre la localización intranuclear de los genes y su potencial transcripcional; sin embargo, las transiciones conformacionales que acompañan los cambios en el estatus transcripcional aún no son claras (Ferrai *et al.*, 2010; Kubo *et al.*, 2017). Los estudios de Hi-C han encontrado similitud en los mapas de asociación entre poblaciones celulares tan diversas como células madre, células terminalmente diferenciadas y células en quiescencia, (Lieberman-Aiden et al., 2009; Dixon et al., 2012; Zhang et al., 2012), sugiriendo que la organización espacial del genoma de mamíferos es un estado fundamental sobre el cual se desarrolla la función del genoma. Sin embargo, es difícil imaginar cómo una organización similar en 3D del genoma puede ser compartida por células que en los hechos manifiestan patrones de actividad transcripcional notablemente diferentes.

### III. ESTRUCTURA DEL DNA

#### a) Efectos de primer orden en la estructura del DNA

En la naturaleza el DNA se encuentra normalmente como una doble hélice, en la cual el sentido de las hebras es antiparalelo; la hélice tipo B es la estructura resuelta por Watson y Crick en 1953. Ésta doble hélice del DNA se visualiza en una forma lineal y uniforme; sin embargo, el eje de la hélice es curvado y adopta numerosas conformaciones inusuales bajo ciertas condiciones, como son el tipo de secuencia y las condiciones del medio en que se encuentra.

Los elementos estructurales que constituyen el DNA son bases nitrogenadas púricas: adenina (A) y guanina (G) y pirimídicas: citosina (C) y timina (T). Estas bases forman un apareamiento tipo Watson-Crick (W-C) entre A-T y C-G estabilizado con dos y tres puentes de hidrógeno, respectivamente. La unión covalente entre una 2-desoxirribosa y un grupo fosfato constituye la columna vertebral de cada hélice (Nelson et al., 2008).  
Figura 1.

Los fosfatos y los azúcares son moléculas solubles en agua, pero las bases nitrogenadas son prácticamente insolubles en el ambiente acuoso de las células. La insolubilidad de las bases en el agua no representa un problema para la célula, ya que estas bases adquieren solubilidad en el agua mediante su unión al grupo fosfato y el azúcar para formar un nucleótido. Sin embargo, la insolubilidad de las bases impone restricciones sobre las conformaciones que adopta la fibra de DNA.

La unión química entre dos azúcares adyacentes con el grupo fosfato en la columna vertebral del DNA mide aproximadamente 6 Å. Esta distancia no puede ser mayor a 6.5 Å, ni menor a 5.5 Å, ya que es un enlace rígido. Las bases también se forman por uniones fuertes y rígidas de manera que su grosor de 3.3 Å prácticamente no se modifica. Hay un espacio libre entre cada par de bases de 2.7 Å (El Hassan y Calladine 1997; Calladine et al., 2004a).  
Figura 1.

El hecho de cerrar el espacio que hay entre cada par de bases representa un problema para la molécula dada la poca flexibilidad de los enlaces fosfodiéster entre las pentosas y los grupos fosfato, y de los enlaces glucosídicos entre las pentosas y las bases nitrogenadas. La naturaleza resuelve el problema mediante el apilamiento de una base sobre la otra inclinándose sobre su plano horizontal  $32.3^\circ$ , como si estuvieran girando alrededor de un eje vertical imaginario formando una hélice (Calladine et al., 2004a).  
 Figura 2.

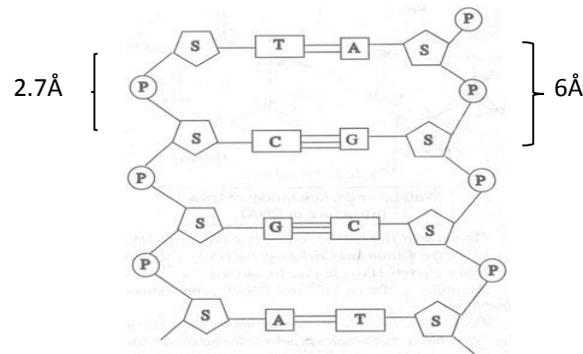


Figura 1. Esquema de la doble hélice de DNA mostrando las dimensiones entre dos pentosas contiguas y el espacio libre entre cada par de bases.

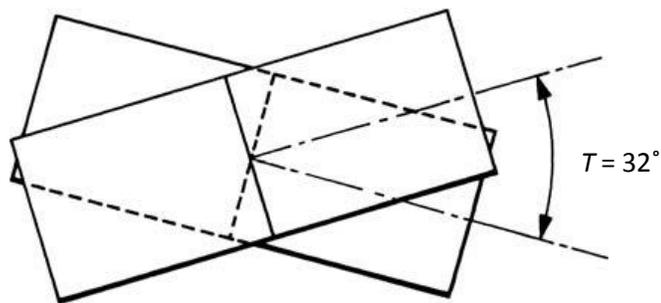


Figura 2. Dos pares de bases apilados entre sí con un giro (*twist*) de  $32^\circ$  entre ellos con respecto a su plano horizontal. Se ilustra el ángulo de giro (*twist*) local:  $T = 32^\circ$ . Modificado de Calladine et al., 2004.

En su estructura primaria, la doble hélice de DNA es una molécula rígida con una flexibilidad muy limitada a nivel de las uniones interatómicas de la columna vertebral azúcar-fosfato (Packer y Hunter, 1998). Por otro lado, el grado de movilidad entre las bases nitrogenadas es también limitado, pero suficiente para permitir el apilamiento entre ellas. De esta manera la insolubilidad de las bases en el agua da la fuerza termodinámica para que el DNA forme una hélice (Calladine et al., 2004a); el apilamiento o *stacking*, junto con los puentes de hidrógeno, constituyen las principales fuerzas de interacción que dan coherencia y estabilidad a la doble hélice.

### **b) Efectos de segundo orden en la estructura del DNA**

Los apareamientos A-T y C-G son geoméricamente isomorfos, y su tamaño global es el mismo en las cuatro posibles combinaciones: A-T, T-A, C-G, G-C; siendo así se pensó que se podrían reemplazar entre ellos sin distorsionar demasiado el esqueleto de la hélice, pero en realidad no ocurre así. Esto se basa en que los ángulos típicos de *twist* en un par de bases en moléculas de DNA reales abarcan un rango de 20° a 50° con una media de 34° y no un valor específico (Calladine et al. 2004b). Por otro lado, aunque el tamaño global de ambos tipos de apareamiento es el mismo para las cuatro posibles combinaciones, el tamaño de las bases púricas es mayor al de las pirimídicas; de modo que el apilamiento (*stacking*) entre bases púricas y pirimídicas no es perfecto. Figura 3.

En la doble hélice cada par de bases representa un escalón, por analogía con los peldaños de una escalera; cada escalón es denotado con una diagonal entre las bases correspondientes, la diagonal indica el salto entre cadenas. Por ejemplo, un salto 'CA/TG' indica una C apilada con una A en una cadena y sus bases complementarias T y G en la otra cadena, dicho de otra manera, es un apareamiento C-G y debajo de este par un par A-T.

El apilamiento entre las bases nitrogenadas en el DNA se describe mediante los seis grados de libertad de Euler: tres traslaciones y tres rotaciones. En el DNA real sólo tres

de los seis grados posibles de libertad de Euler son realmente posibles (Calladine et al. 2004c). Figura 4.

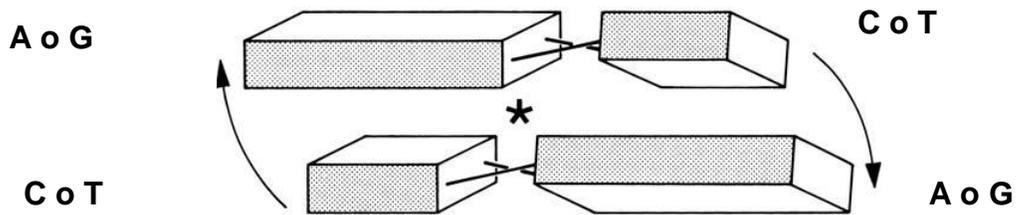


Figura 3. Un paso típico base purínica (A o G)/base pirimídica (C o T), nótese que el apilamiento entre estas bases no es perfecto. El asterisco indica la rotación que se da entre los apareamientos de las bases complementarias conocido como *propeller twist*. Modificado de Calladine et al. 2004.

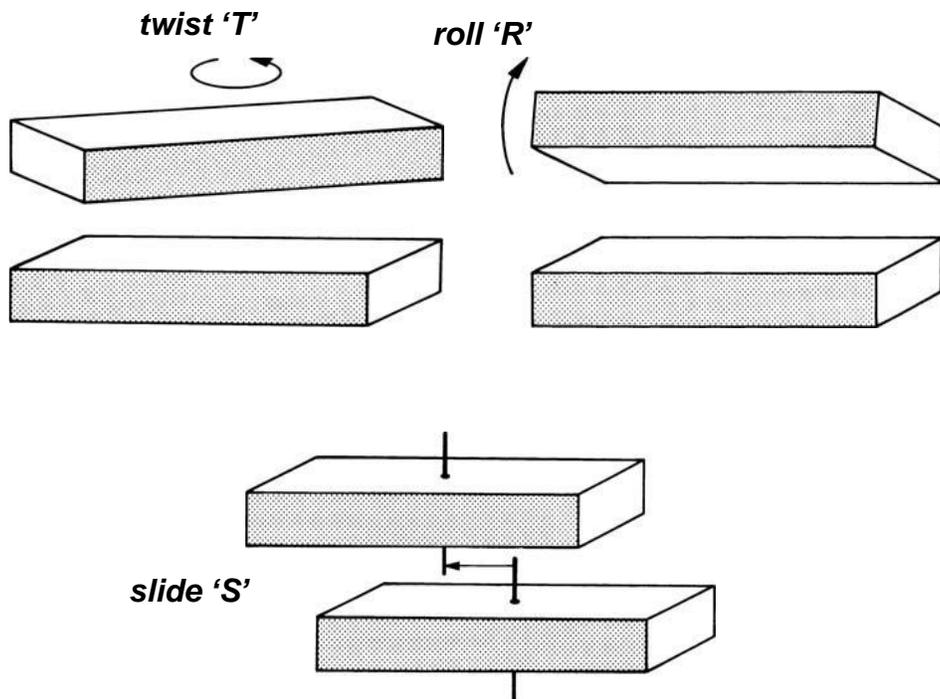


Figura 4. Tres tipos de movimiento en un paso de la doble hélice. *Twist*, *Roll* y *Slide*. Tomado de Calladine et al. 2004.

*Roll (R)*, *slide (S)* y *twist (T)*; son los parámetros más importantes para entender las diferentes conformaciones que se dan en el apilamiento de las bases.

En el apilamiento de las bases operan tres tipos de interacciones físico-químicas: fuerzas de van der Waals, efectos hidrofóbicos y efectos de carga parcial. Estas interacciones permiten un buen apilamiento de dos bases en proporción al área de contacto de sus superficies insolubles en el agua (Hunter, 1993).

Todas las características globales del DNA dependen del apilamiento en el centro de la molécula, a menos que el DNA sea distorsionado por el contacto con otras moléculas. Sin embargo, es importante considerar que la clasificación de la doble hélice en formas 'A' y 'B' es una idealización de un promedio amplio de muchos pasos sucesivos que tienen diferente *roll* y *slide* (Dickerson, 2001).

Además existen otros factores que pueden afectar las conformaciones locales de la doble hélice, y entre los más relevantes están la fuerza iónica del medio y la interacción con proteínas u otras moléculas, los cuales pueden producir mayor curvatura y distorsiones en la geometría de la molécula de DNA.

### **c) Efectos de tercer orden en la estructura del DNA**

Los principales determinantes de la estabilidad del DNA son el número de puentes de hidrógeno entre las bases y el grado de extensión del apilamiento. En los pares A-T hay sólo dos puentes de hidrógeno, mientras que los pares C-G tienen tres. Por otro lado, los apilamientos púrica/pirimídica tienen la menor estabilidad, éstos son T/A, T/G, C/A, C/G (Calladine et al. 2004c).

Las secuencias que son más fácil de desenrollar en el DNA son aquellas que combinan las dos características descritas, pocos puentes de hidrógeno como en el apareamiento A-T y bajo *twist* como en los pasos púrica/pirimídica. Es decir, el DNA se desenrollará más fácilmente en regiones ricas en A/T. El prototipo de secuencia débil es del tipo 'TATATATA' o 'TAATAATAA'. En la levadura y el humano, alrededor de 30 % de los

promotores contienen una secuencia TATA o una secuencia relacionada cerca del sitio de inicio donde las hebras se separan y tiene un papel muy importante en el inicio de la transcripción (Yang et al., 2007).

La curvatura del DNA depende de los ángulos de *roll* en todos sus pasos sucesivos. En el DNA real, cuya secuencia de bases es aleatoria, la curvatura no sigue un patrón de curva continua, con ángulos de *roll* exactos.

Como todas las moléculas, el DNA adopta la conformación de mínima energía libre, que corresponde a la forma B para DNA de secuencia aleatoria. Cualquier cambio en su estructura aumentará su energía. La hélice de DNA se hiperenrolla en el espacio tridimensional para disipar el estrés estructural que surge de modificar la estructura secundaria de la doble hélice. De esta manera se forman hélices de orden superior (hiperenrollamiento o *supercoiling*), y así la molécula vuelve al estado de mínima energía (Bowater, 2005; Aranda-Anzaldo et al. 2014).

#### **d) Efectos de cuarto orden: topología del DNA**

En el espacio tridimensional el DNA se conforma como una espiral, más que como una línea recta o una curva plana. La trayectoria espiral del DNA se describe como una superhélice o *supercoil* debido a que la hebra de DNA en sí misma tiene una estructura helicoidal.

En general, un segmento corto de DNA se comportará como una fibra rígida, mientras que un segmento más largo se comportará más flexible, siendo capaz de deformarse. La longitud de persistencia del DNA es la longitud por encima de la cual las correlaciones en la dirección de la tangente se pierden. Cuando la longitud del DNA es igual o menor a la de persistencia, el DNA se comporta como una fibra rígida. Cuando la longitud es significativamente mayor a la de persistencia, el DNA se comporta como fibra flexible. La longitud de persistencia del DNA depende de la secuencia de nucleótidos de la fibra. Para el DNA real, cuya secuencia de nucleótidos es aleatoria,

esta longitud es en promedio igual a 150 pb (50 nm) (Bednar et al., 1995). El parámetro más utilizado en el campo del estudio de la estructura del DNA es la longitud de Kuhn o longitud de persistencia estructural, que es dos veces la longitud de persistencia, esto es 300 pb (100nm); se considera que segmentos de DNA con longitud mayor a 300 pb son deformables al grado de poder formar círculos (Bates y Maxwell, 2005). Un segmento de DNA de secuencia aleatoria nunca es perfectamente lineal, siempre tiene una pequeña pero significativa curvatura local intrínseca debido a su secuencia misma, cerca de  $1^\circ - 3^\circ$  por vuelta de la hélice (Calladine et al. 2004d). Objetos que tienen curvatura intrínseca como un cable de teléfono se dice que poseen estrés torsional (Bowater, 2005). De la misma manera ocurre en el DNA, por tener una estructura de hélice queda sometido a estrés torsional intrínseco. El estrés estructural representa un problema para la integridad de la molécula, ya que siendo un polímero rígido y muy largo, del orden de centímetros en metazoarios, por las fluctuaciones en las conformaciones que adopta en el núcleo a  $37^\circ\text{C}$ , el DNA se rompería en fragmentos con tamaños cercanos o por debajo de su longitud de persistencia. Para preservar la integridad de la molécula, el DNA se organiza formando bucles hiperenrollados que se estabilizan por su asociación con proteínas (Aranda-Anzaldo et al., 2014). Figura 5.

Los aspectos topológicos de la estructura del DNA surgen primariamente del hecho de que las dos hebras de DNA se encuentran repetidamente entrelazadas entre sí (Lindsley, 2005).

En la naturaleza la rotación de los extremos del DNA está restringida o prohibida del todo. Un segmento de DNA cuyos extremos libres no pueden rotar libremente se denomina dominio topológico (Figura 5). Un ejemplo canónico de un dominio topológico es el DNA circular, el cual es típico de bacterias, de las mitocondrias, cloroplastos y de los virus. En estos casos los extremos de la molécula están covalentemente unidos entre sí. En eucariontes los cromosomas son lineales, pero ellos se organizan en bucles hiperenrollados asociados con una subestructura nuclear conocida como matriz nuclear. Estos bucles representan dominios topológicos, equivalentes al DNA circular desde un punto de vista topológico (Mirkin, 2001). Figura 5.

El hiperenrollamiento es la consecuencia física del entrecruzamiento topológico de las dos hebras de DNA, que es menor al entrecruzamiento estructuralmente más estable (Figura 6). Es decir, si modificamos la estructura secundaria del DNA quitando vueltas a la hélice, la molécula es estresada y no permanece como un anillo abierto, sino que adopta un nuevo estado de mínima energía que corresponde a un círculo hiperenrollado.

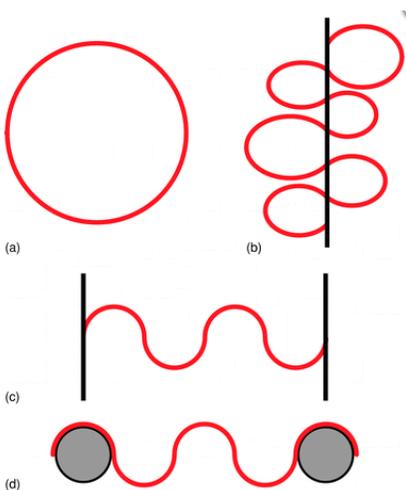


Figura 5. Ejemplos de dominios topológicos. (a) DNA circular, (b) bucles de DNA cromosómico, (c) DNA lineal unido a la membrana, (d) DNA lineal unido a proteínas. Tomado de Mirkin 2001.

El hiperenrollamiento se describe en términos de *Twist* ( $Tw$ ) y *Writhe* ( $Wr$ ). El concepto de *twist* describe el número de veces que una hebra cruza a través de la otra, su magnitud engloba al *twist* local que hay entre dos pares de bases adyacentes. El *Writhe* ( $Wr$ ) describe cuántas veces el eje de la hebra cruza sobre sí misma (Calladine et al. 2004e; Cozzarelli et al. 2006). Figura 7.

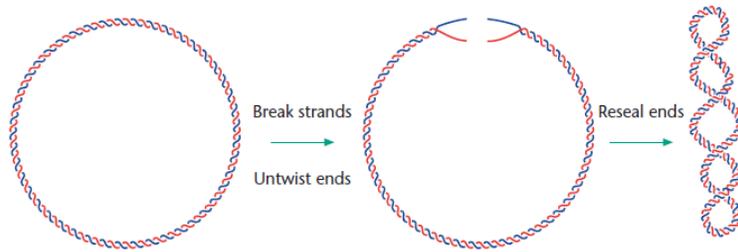


Figura 6. Reduciendo el número de veces que las dos hebras se entrelazan crea un hiperenrollamiento negativo. Si las hebras de un círculo de DNA se rompen y desenrollan varias veces antes de volver a unir las, el círculo resultante tendrá hiperenrollamiento negativo. Tomado de Lindsley 2005.

La suma del *Twist* y *Writhe* no dependen de la forma geométrica del círculo, sino únicamente de la integridad de las dos hebras de DNA; es un parámetro topológico conocido como *linking number* (Lk).

$$Tw + Wr = Lk \quad (1)$$

Lk es un concepto estrechamente relacionado al número de veces que las dos hebras de la hélice se entrecruzan una sobre la otra o se relacionan ('link' en inglés). El *linking number* correspondiente al estado relajado se denomina  $Lk^0$  y corresponde al número de nucleótidos N dividido por el periodo de la hélice (10.5 pb para el DNA B). Un DNA organizado en un círculo que descansa sobre un plano, de manera que las hebras quedan perfectamente alineadas, satisface las condiciones en las cuales  $Lk = Lk^0$ . En los hechos, ningún DNA natural tiene un  $Lk^0$ . El cambio en el Lk con respecto al  $Lk^0$  es una medida del grado de hiperenrollamiento de una molécula y se denota como diferencia de *linking number* del DNA o  $\Delta Lk$  (Bowater, 2005). Es una medición del exceso o déficit total de vueltas en la doble hélice en una molécula determinada.

Cuando el DNA tiene un exceso de vueltas (hiperenrollamiento positivo), de modo que Lk es mayor a  $Lk^0$ , su  $\Delta Lk$  será positivo. Por el contrario, la remoción de vueltas de la doble hélice (hiperenrollamiento negativo) dará lugar a Lk menor a  $Lk^0$ , en este caso

$\Delta Lk$  será negativo. En el DNA de procariontes y eucariontes se encontró que en general el DNA tiene un déficit de vueltas de *Twist*, esto es, un hiperenrollamiento negativo (Calladine et al., 2004e). El DNA con exceso de vueltas en la hélice (con hiperenrollamiento positivo) sólo se encuentra en bacterias extremófilas que viven a temperaturas elevadas (López-García y Forterre, 1997). En un dominio topológico,  $Tw$  y  $Wr$  son parámetros geométricos complementarios.

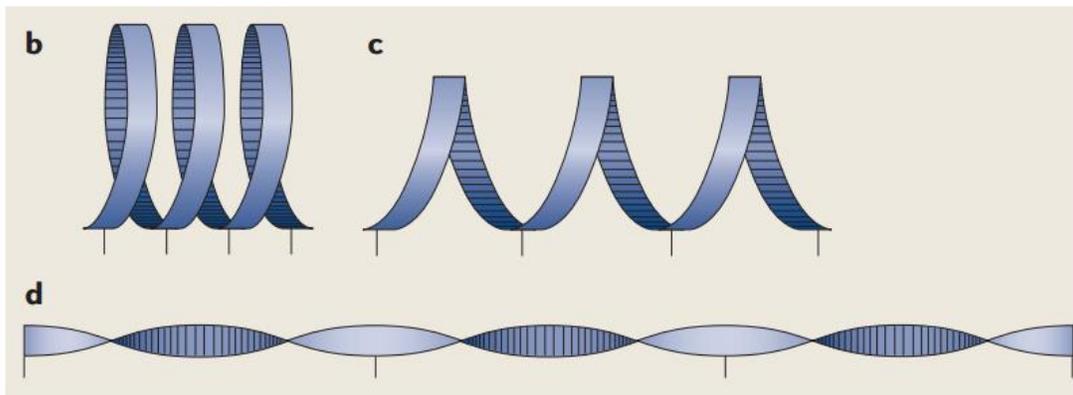


Figura 7. Para cualquier DNA de doble cadena (dsDNA) circular, cualquier cambio en  $Wr$  es acompañado por un cambio exacto en el  $Tw$ . De modo que  $Lk = Tw + Wr$ . Por lo tanto, cualquier cambio en  $Lk$  debido a actividad enzimática se manifestará geoméricamente como un cambio en el  $Tw$  y  $Wr$ , de modo que  $\Delta Lk = \Delta Tw + \Delta Wr$ . En la parte b de la figura, la mayor parte del hiperenrollamiento es condensado como *Writhe* ( $Wr \sim -3$ ). Conforme los extremos del DNA son jalados el valor absoluto de  $Wr$  disminuye y el de  $Tw$  incrementa, parte c. En d, el hiperenrollamiento ha sido completamente convertido en *Twist* de modo que la hélice de DNA no está más enrollada en tres dimensiones y  $Tw = -3$  y  $Wr = 0$ . Tomado de Cozzarelli et al. 2006.

El estrés torsional causado por una diferencia en el  $Lk$  en una molécula circular de DNA, cambia el *Twist* de sus valores óptimos e introduce *Writhe*. El estudio de DNA con hiperenrollamiento negativo en condiciones fisiológicas ha demostrado que  $Wr$  representa tres cuartas partes de la diferencia del “*linking number*” y la otra cuarta parte

se debe a cambios en el  $Tw$ . Esto significa que es energéticamente más favorable responder a mayor hiperenrollamiento modificando el *Writhe*, que alterar el *Twist* (Lindsley, 2005). Como todas las moléculas, el DNA en solución debe ser capaz de vibrar o fluctuar de formas de alto *Writhe* a formas con alto *Twist* y viceversa. Se sabe que el DNA con hiperenrollamiento negativo vibra de manera más eficiente que el DNA 'relajado'. Pero aún se tienen pocos datos experimentales que sugieran cómo la molécula de DNA fluctúa en solución a gran escala.

Considerando que los extremos de un segmento de DNA no pueden rotar libremente debido a su asociación con proteínas, el DNA puede adoptar dos formas de hiperenrollamiento, (a) una serie de espirales enrolladas alrededor de un anillo imaginario o toroide, conocido como hiperenrollamiento tipo toroidal, o (b) si el DNA se enrolla sobre su propio eje una y otra vez se conoce como hiperenrollamiento tipo plectonómico (Figura 8).

En el DNA real ambos tipos de hiperenrollamiento ocurren simultáneamente. A una pequeña escala dentro de un bucle, el hiperenrollamiento es toroidal, pero a gran escala, en toda la longitud del DNA, ocurre un hiperenrollamiento tipo plectonómico (Calladine et al. 2004e). Figura 8.

El hiperenrollamiento tipo plectonómico en general es más estable que el toroidal; de forma natural el DNA adopta preferencialmente esta forma de hiperenrollamiento en ausencia de otras fuerzas; mientras que cuando se asocia con proteínas como las histonas, se favorece el hiperenrollamiento tipo toroidal; en esta conformación, el DNA se curva mucho más y es mayormente estresado al doblarse.

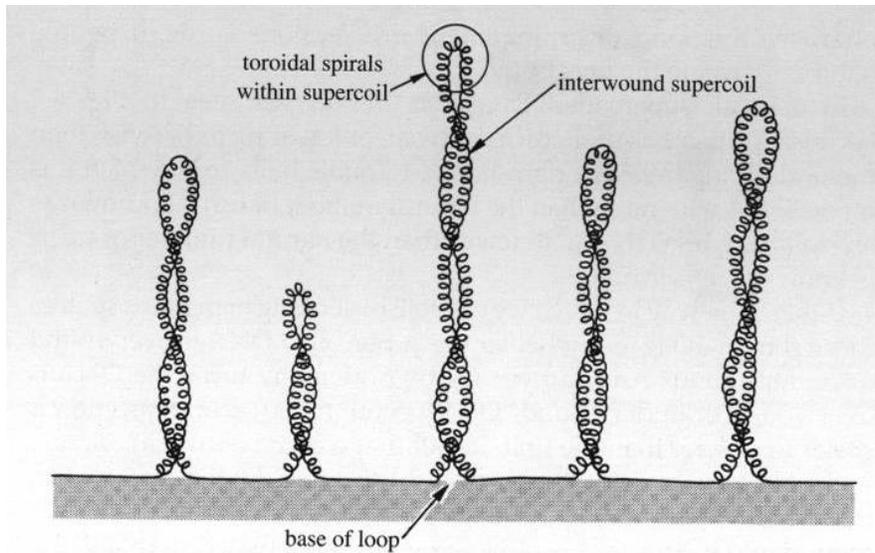


Figura 8. División de una molécula larga de DNA lineal en bucles restringidos por su base mediante su unión a un 'scaffold'. Se muestra el hiperenrollamiento toroidal y el hiperenrollamiento plectonómico (interwound). Tomado de Calladine et al. 2004.

Cuando se eliminan las histonas del DNA, éste sale expulsado de la forma altamente enrollada, debido a que ha perdido el octámero de histonas que lo estabilizaba, y después se colapsa en un hiperenrollamiento tipo plectonómico, siempre y cuando los extremos de la molécula se encuentren anclados a proteínas que limiten la libre rotación de las hebras (Calladine et al., 2004e).

Desde el punto de vista de la estructura del DNA, se ha propuesto que el genoma se organiza en unidades operacionales que corresponden a los dominios topológicos. Estos pueden ser círculos de DNA simples, como es el caso de los cromosomas bacterianos, el DNA mitocondrial y el DNA de los cloroplastos. En el caso de los cromosomas eucariontes, dichos dominios corresponden a grandes bucles de DNA unidos a la matriz nuclear. Finalmente en los virus de DNA, los extremos libres de sus genomas pueden fijarse a la membrana celular (Mirkin, 2001).

Debido a que el estrés de hiperenrollamiento negativo está constreñido, los cambios locales en el DNA que conllevan a su relajación se convierten en energéticamente favorables. El hiperenrollamiento negativo tiene dos características importantes: a) un cambio en un segmento de DNA que represente una pequeña proporción de la longitud total de la molécula es suficiente para conservar el resto de la molécula relajada, y b) bajo la influencia del hiperenrollamiento negativo, el DNA tiende a desenrollarse. El efecto contrario se tiene con el hiperenrollamiento positivo (Bowater, 2005).

Cambios locales en la estructura secundaria del DNA que resultan en desenrollamiento del DNA (reducción en el *twist*) son energéticamente favorables en el hiperenrollamiento negativo. Sabemos que el punto de *melting* de la doble hélice es un proceso que requiere energía. Un ejemplo donde ocurre este fenómeno es en la formación de cruciformes, donde se necesita  $20 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , y esto representa una barrera energética para su formación en la célula. Sin embargo *in vivo*, estas estructuras existen, ya que la formación de cruciformes implica el desenrollamiento del DNA, de modo que su formación libera estrés torsional del hiperenrollamiento negativo, lo que aporta la energía necesaria para su formación (Mirkin, 2001).

El DNA hiperenrollado es un estado estresado (*strained*) de alta energía y el quitar hiperenrollamiento es un proceso energéticamente favorable. Muchos procesos biológicos toman ventaja de la energía libre disponible del hiperenrollamiento negativo del DNA; por ejemplo, se requiere mucha menos energía para desnaturalizar una región de DNA negativamente hiperenrollado. Por otro lado, la energía del hiperenrollamiento puede transmitirse a lo largo del DNA o focalizarse en un sitio determinando si está restringido por medio de la unión a proteínas (Mirkin, 2001).

El hiperenrollamiento es importante en la biología porque éste ayuda al DNA a desenrollarse, lo cual es necesario para la replicación y transcripción. Muchos procesos en la célula tendrán alta probabilidad de ocurrir sobre un DNA hiperenrollado negativamente. La energía libre del hiperenrollamiento es la que lo hace de suma relevancia biológica (Cozzarelli et al., 2006).

#### IV. ESTRUCTURA DE ORDEN SUPERIOR AL INTERIOR DEL NÚCLEO CELULAR: NHOS (*Nuclear Higher Order Structure*)

##### **La matriz nuclear**

La matriz nuclear (MN) es una subestructura o compartimento nuclear que actualmente se define operacionalmente como la estructura que se obtiene después de tratar a la célula utilizando altas concentraciones de sal, detergentes no iónicos y DNasa I (Nickerson, 2001; Tsutsui et al. 2005). Recientemente se ha determinado el proteoma de la MN y se encontró que hay un 'core' de aproximadamente 300 proteínas común a todas las células independientemente del método específico de extracción utilizado para obtener la MN (Engelke et al., 2014). Sin embargo, existe también un número considerable de proteínas de MN que son específicas de cada tipo celular (Stuurman et al, 1990; Dent et al, 2010). Esta estructura tiene un papel en la organización estructural y compartimentalización del metabolismo del DNA y RNA dentro del núcleo (Markaki et al., 2010; Wilson y Coverley, 2013).

##### **El nucleoide**

Los estudios de Cook y Brazell permitieron la descripción y caracterización del nucleoide de metazoarios, que es la estructura que se obtiene después de tratar a la célula con detergentes no iónicos y alta fuerza iónica (2 M NaCl). Consiste en el DNA desnudo, formando bucles hiperenrollados asociados con una subestructura proteica que corresponde a la MN (Cook y Brazell, 1975; 1976; Cook et al., 1976). El fenómeno de la formación y expansión de un halo de DNA en nucleoides tratados con bromuro de etidio es una evidencia de que el hiperenrollamiento en los bucles se preserva porque están anclados a la subestructura nuclear (Figura 9). Estos bucles poseen las propiedades de dominios cerrados, y desde un punto de vista topológico son análogos al DNA circular unido de manera covalente (Mirkin, 2001; Calladine et al., 2004e). Al interior del núcleo la formación de bucles de DNA desnudo y bucles de cromatina son

fenómenos distintos que se distinguen por sus diferencias en términos de estabilidad estructural (Woodcock y Ghosh, 2010).

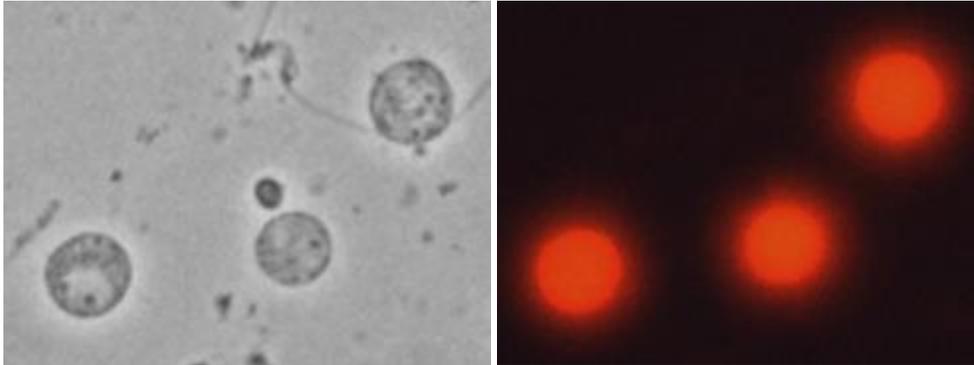


Figura 9. Nucleoides de neuronas extraídos con 2 M de NaCl. Se muestra la foto de la matriz nuclear en contraste de fases y en fluorescencia el nucleoide tratado con 80  $\mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio.

Las interacciones que se establecen entre el DNA y la MN se consideran de mayor estabilidad que las que ocurren entre el DNA y las proteínas de la cromatina debido a que las primeras resisten las condiciones de lisis empleadas para extraer los nucleoides donde el DNA retenido permanece intacto, mientras que la estructura nucleosomal se pierde debido a la disociación de las histonas y demás proteínas de la cromatina (Cook et al, 1976; Aranda-Anzaldo y Dent, 1997; Razin, 2001).

El tratamiento de cromosomas mitóticos para remover las histonas y demás proteínas de la cromatina, también reveló un halo de DNA que rodea una estructura más densa con la forma y tamaño comparable a los cromosomas iniciales. Esta estructura central fue llamada andamio cromosómico y se propuso que constituye la base estructural de la arquitectura del cromosoma. El tratamiento con DNasa I puede ser usado para aislar el andamio, el cual contiene secuencias de DNA conocidas como SARs (*Scaffold-*

*Attachment Regions*), y se piensa que las proteínas del andamio son esenciales para la integridad estructural del cromosoma (Earnshaw y Laemmli, 1983).

### **Regiones de anclaje del DNA a la MN (MARs) y regiones de anclaje de los bucles estructurales de DNA a la MN (LARs)**

El DNA se ancla a la MN por medio de secuencias no codificantes denominadas MARs (*Matrix Attachment Regions*). Se estima que decenas de miles de secuencias por genoma pueden operar como MARs (Tsutsui et al., 2005; Ottaviani et al., 2008). En estudios *in situ*, los MARs se han clasificado operacionalmente como constitutivos-estructurales, si resisten el tratamiento de extracción con alta fuerza iónica y en facultativos, posiblemente funcionales, si no resisten la extracción con alta fuerza iónica (Razin, 2001; Maya-Mendoza et al. 2003; Ottaviani et al. 2008). Aquellos MARs que resisten el tratamiento con alta fuerza iónica constituyen los verdaderos sitios de anclaje del DNA a la MN o LARs (*Loop Attachment Regions*); los cuales definen los bucles estructurales de DNA asociados con la MN (Elcock y Bridger, 2008; Ottaviani et al. 2008; Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010). Por otro lado, cualquier MAR potencial podría establecer asociaciones dinámicas con la MN en estados específicos de la fisiología celular como la transcripción (Razin, 1997; 2001).

Se ha estimado que en el genoma de mamíferos la densidad promedio de MARs es 1 MAR/30kpb (Boulikas, 1995). El genoma haploide de rata tiene un tamaño de 2.75 Gpb (*Rat Genome Sequencing Project Consortium*, 2004), por lo que debe haber aproximadamente 180,000 MARs potenciales en el genoma diploide (Maya-Mendoza et al., 2005). Sin embargo, el tamaño promedio del bucle de DNA en hepatocitos de rata adulta es de 80 - 90 kpb (Berezney y Buchholtz, 1981) y es compatible con un total de 66,000 bucles de DNA por genoma diploide de la rata, indicando que el número de LARs actualizados en la rata adulta es aproximadamente un tercio de los MARs potenciales presentes en el genoma (Maya-Mendoza et al. 2005).

## **Naturaleza de las interacciones entre DNA y MN**

La flexibilidad del DNA juega un papel importante en su unión a las proteínas; a su vez, la flexibilidad depende de la secuencia del DNA. El marco teórico que explica los aspectos en el reconocimiento DNA-proteína involucra consecutivamente dos procesos, el primero de acoplamiento o ensamble y el otro de prueba. En el acoplamiento se ensamblan a gran escala las proteínas y el DNA. Si el ensamble global ocurre, entonces la calidad de los puentes de hidrógeno entre las zonas de contacto puede ser probada localmente; y generar enlaces de unión específicos entre la proteína y el DNA. La fase de acoplamiento demanda cierta capacidad del DNA para doblarse en cierta manera; si el DNA es demasiado rígido o prefiere doblarse en una forma que no permite el contacto, el acoplamiento no puede ocurrir fácilmente. Por el contrario, si el DNA tiene el grado de flexibilidad adecuado, entonces los pares de bases en las regiones de contacto pueden probar y formar suficientes puentes de hidrógeno con los aminoácidos para permitir que la segunda etapa de la unión ocurra. Por ejemplo, la DNasa I es una enzima que puede ensamblarse con el DNA sólo si la anchura y profundidad de la hendidura menor están dentro de cierto intervalo; posterior a este reconocimiento la enzima detecta a nivel local una configuración (geometría) específica de la cadena pentosa-fosfato y es entonces cuando ocurre el corte de cadena sencilla. Nótese como la enzima reconoce una característica global, como lo es la forma de la hendidura (lo cual constituye efectos de lectura indirecta); así como características locales (efectos de lectura directa) en el sustrato (DNA). Durante el reconocimiento molecular se generan diferentes grados de afinidad entre el DNA y las proteínas que interactúan, por lo que la interacción de mayor afinidad favorecerá ciertas uniones sobre otras (Calladine et al. 2004f).

De manera interesante en las interacciones entre DNA y MN, se conocen pocas proteínas cuya unión esté dada por un reconocimiento específico de secuencia. Las proteínas que han sido identificadas participan en interacciones DNA-MN de tipo transitorias-funcionales, tal es el caso de SATB1 en el timo (Tsutsui et al. 2005). Por su parte las interacciones DNA-MN de tipo permanentes parecen ser resultado de efectos

de lectura indirectos entre el DNA y las proteínas de la MN y no equivalen a interacciones de lectura directos entre proteínas y grupos funcionales del DNA específicos. Tales efectos de lectura indirectos dependen de la estructura tridimensional del DNA y la MN, así como de sus propiedades mecánicas generales (Zhang et al. 2004; Calladine et al. 2004f). Así, dentro del genoma eucarionte hay secuencias no codificantes con un amplio intervalo de afinidad por la MN (Aranda-Anzaldo, 1989). Por ejemplo, en el dominio génico de los genes alfa-globina del pollo se mapearon tres MARs, de estos sólo uno co-localiza con un sitio de unión permanente del DNA a la MN (LAR). Por lo tanto, es claro que el MAR con mayor afinidad por la MN puede constituir parte de la región de anclaje, pero la presencia de un MAR no es suficiente para la creación de un anclaje estructural (Razin, 2001).

### **Significado funcional de la asociación DNA-MN**

Desde un punto de vista lógico, parece obvio que para permitir una diversidad de funciones, el genoma deba estar organizado como un conjunto de dominios estructurales-funcionales cuasi-independientes (Razin, 2001). Ha sido bien estudiado si los dominios topológicos en que se organiza el DNA corresponden a dominios funcionales del genoma. Hay evidencia experimental que sugiere que los bucles estructurales de DNA corresponden a los replicones *in vivo*; por ejemplo, se sabe que el DNA recién replicado se encuentra asociado a la MN (Pardoll et al. 1980; McCready et al. 1980). Los componentes básicos de las maquinarias de replicación, tales como DNA polimerasas, las primasas, el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y la topoisomerasa-II se localizan en sitios discretos en la MN (Anachkova et al., 2005; Wilson y Coverley, 2013). También los orígenes de replicación (ORIs) se ubican en o cerca de los sitios de anclaje del bucle a la MN (Razin, 2001). Se ha reportado la correlación que existe entre el tamaño promedio de los bucles de DNA y el tamaño típico de los replicones (Buongiorno-Nardelli et al., 1982). Trabajo de nuestro laboratorio, en el que se utilizó un modelo de replicación *in vivo*, dio evidencia de que los bucles estructurales de DNA anclados a la MN se acercan de manera secuencial

hacia la MN durante la fase S y se alejan recuperando su conformación basal pasado el estímulo proliferativo (Rivera-Mulia et al., 2011). Estos datos apoyan el modelo de carrete como mecanismo de replicación del DNA, el cual propone que el DNA pasa a través de las fábricas de replicación fijas sobre la MN para ser replicado. De esta manera, la organización en bucles estructurales del DNA constituye la base estructural para la replicación del genoma en metazoarios (Rivera-Mulia et al., 2011). Sin embargo, la replicación del genoma no parece ser un determinante crítico en el establecimiento de dicha estructura, ya que la subdivisión de un mismo genoma en unidades de replicación resultó claramente diferente entre tipos celulares con potencial proliferativo: hepatocitos y linfocitos B (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010).

### **Estructura de orden superior al interior del núcleo celular: NHOS (*Nuclear Higher Order Structure*)**

La longitud lineal del cromosoma uno, que es el más grande en humanos, es aproximadamente de ocho centímetros. Al interior del núcleo celular la fibra de DNA está sujeta a fluctuaciones aleatorias, conduciendo de manera espontánea a la formación de bucles que se estabilizan mediante su asociación con proteínas de la NM. La formación de bucles y el hiperenrollamiento disipan el estrés estructural a lo largo de la fibra de DNA y de esta manera se preserva la integridad cromosómica, mientras se crean dominios topológicos independientes (Figura 10). Desde una perspectiva estructural, se ha propuesto que la organización topológica del DNA en bucles estructurales anclados a la MN crea un sistema físico estable y constituye el punto de partida para futuros refinamientos o modificaciones de tal configuración por proteínas de la cromatina y mecanismos epigenéticos que afectan la estructura de la cromatina. Este conjunto de interacciones entre el DNA y la MN definen una estructura de orden superior en el núcleo celular (NHOS) (Aranda-Anzaldo, 2009; Alva-Medina, et al. 2010, Trevilla-García y Aranda-Anzaldo, 2011; Castillo-Mora y Aranda-Anzaldo, 2012). La cromatina como tal no desempeña una función en la determinación de la organización del DNA en bucles estructurales, dado que las proteínas de la cromatina son

completamente eliminadas por la extracción con altas concentraciones de sal y sin embargo las interacciones entre DNA y MN se mantienen (Razin, 1997; Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010).

Un modelo para explicar cómo se regulan y actualizan las uniones entre DNA y MN, sugiere que la unión de MARs a la MN dependerá de tres factores básicos: primero, el grado de afinidad mutua entre la secuencia de DNA y el sitio de unión potencial a la MN. Segundo, el grado de impedimento estérico impuesto por la relativa densidad de sitios de unión potenciales por unidad de longitud de la MN y el grado de deformabilidad o rigidez del DNA. Tercero, el grado de estrés estructural a lo largo de la fibra de DNA que modula la deformabilidad general del DNA que transita entre estados donde se pliega, se abre o se hiperenrolla (Aranda-Anzaldo, 2009). La composición de la MN varía entre tejidos (Fey y Penman, 1988; Stuurman et al., 1990; Engelke et al. 2014). Por lo tanto, se crean condiciones específicas del tipo celular para desarrollar interacciones estables entre el DNA y la MN. De hecho, existe evidencia de que la estructura de orden superior en el núcleo es tejido-específica (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García y Aranda-Anzaldo, 2011). Se ha sugerido que la selectividad dinámica en el uso de los MARs como anclajes del DNA puede modular tanto el tamaño promedio del bucle y la estabilidad de las relaciones topológicas entre el DNA y la MN durante el desarrollo y la diferenciación celular (Aranda-Anzaldo, 1989; Aranda-Anzaldo, 2012).

## **Implicaciones de la NHOS**

Una característica importante de la fórmula (1) es que para un dominio topológico de DNA, cualquier cambio en la estructura secundaria ( $T_w$ ) se refleja inmediatamente en un cambio en su forma tridimensional ( $W_r$ ). Así, un cambio local en un dominio topológicamente cerrado de DNA, por ejemplo el desenrollamiento causado por la unión de una proteína, será inmediatamente transmitido a lo largo de la molécula, lo cual se reflejará por un cambio en el hiperenrollamiento de toda la molécula y viceversa. Esto trae dos beneficios importantes, por un lado, la integridad topológica del

dominio es un mecanismo general de garantizar que no hay roturas en la hebra, ya que un solo corte de hebra sencilla conduce inevitablemente a la relajación del hiperenrollamiento. Por lo tanto, siempre que el DNA esté hiperenrollado, significa que la fibra está íntegra. De modo que no es sorprendente que los replicones estén topológicamente definidos (Mirkin, 2001). En bacterias está demostrado que el hiperenrollamiento es un prerrequisito para el inicio de la replicación. El segundo beneficio es que cambiando la estructura del DNA en un segmento, este puede ser detectado instantáneamente en un segmento de DNA remoto, de manera que puede darse comunicación a distancia. Considerando que el DNA está organizado en dominios topológicos independientes, la difusión o modificación del hiperenrollamiento puede ser al mismo tiempo restringida a un solo dominio en particular (Bowater, 2005; Cozzarelli et al., 2006).

Como se ha dicho, el hiperenrollamiento negativo hace que el desenrollamiento sea energéticamente favorable, esto es, la desnaturalización del dsDNA, de modo que todos los procesos celulares deben ser facilitados por esta forma de energía potencial en la fibra de DNA. Hay amplia evidencia que sugiere que la replicación, transcripción y recombinación son estimulados por hiperenrollamiento negativo, así como la asociación del DNA en un hiperenrollamiento toroidal al octámero de histonas (Lindsley, 2005).

Considerando que el hiperenrollamiento del DNA es una propiedad intrínseca de la molécula, es poco probable que siendo muy universal pueda dar una regulación fina; por ejemplo, en el control diferencial de la expresión génica. Sin embargo, la organización primaria de los cromosomas de metazoarios, cuya magnitud es del orden de centímetros, define dominios topológicos cuasi-independientes, que garantizan la integridad, así como la coherencia del DNA que opera en un ambiente altamente dinámico (Aranda-Anzaldo, 2009; Alva-Medina, et al. 2010, Trevilla-García y Aranda-Anzaldo, 2012; Aranda-Anzaldo et al. 2014). Figura 10.

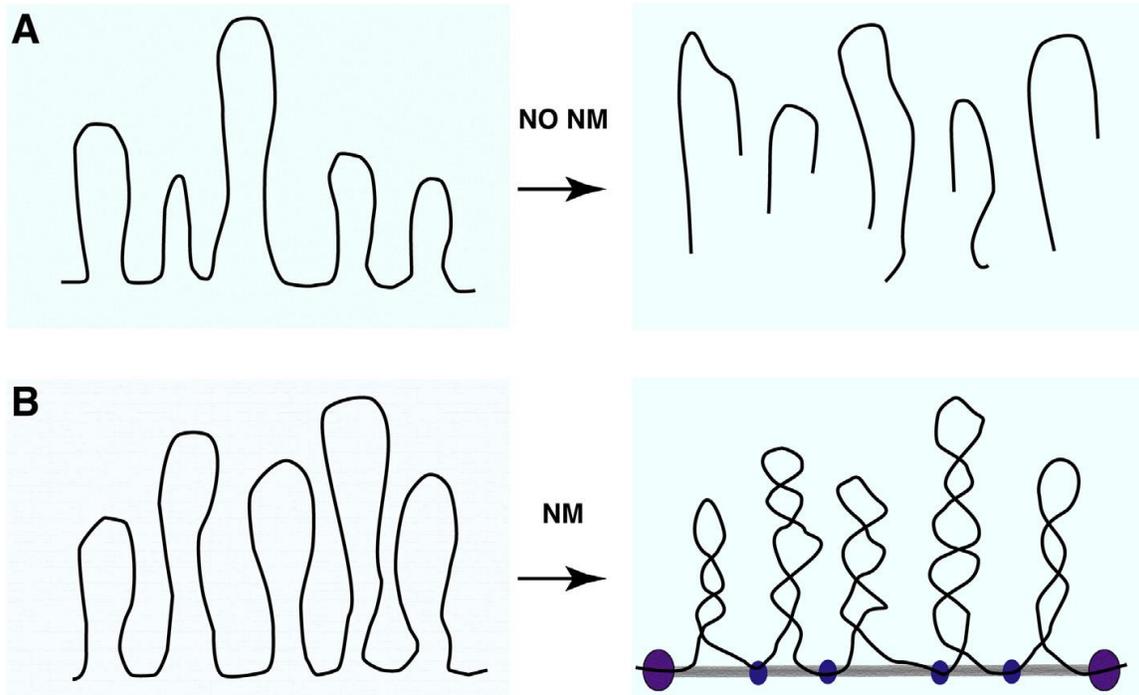


Figura 10. Estrés estructural a lo largo del DNA cromosomal. A) Una molécula de DNA de un cromosoma largo está sujeto a fluctuaciones aleatorias a temperatura ambiente, conduciendo de manera espontánea a la formación de bucles. Eventualmente el DNA podría fragmentarse debido al movimiento. B) Dentro del núcleo celular, los bucles que se forman de manera espontánea se estabilizan mediante su asociación con proteínas de la MN. Los telómeros del cromosoma se unen a proteínas de la MN en la envoltura nuclear (círculos morados), mientras que los bucles se asocian con proteínas de la MN en el interior del núcleo (círculos azules) así, se convierten en dominios topológicos hiperenrollados. La formación de bucles y el hiperenrollamiento disipan el estrés estructural a lo largo de la fibra de DNA, de esta manera preserva la integridad cromosómica mientras crea dominios topológicos independientes que pueden experimentar más transiciones estructurales locales sin afectar los dominios vecinos o la estructura global del cromosoma. Tomado de Aranda-Anzaldo et al. 2014.

## Tensegridad y NHOS

El concepto de tensegridad define estructuras compuestas por elementos continuos de tensión y elementos discontinuos de compresión. En este sistema la fuerza de los elementos de compresión es minimizada y distribuida entre los elementos de tensión que pueden ser esbeltos y ligeros (Galli et al. 2005). Un gran número de interacciones DNA-MN pueden crear un complejo estructural basado en tensegridad, en el cual los elementos de compresión discontinuos (proteínas) y tensores (DNA) interactúan para crear una estructura global muy estable (Figura 11). Desde una perspectiva estructural, una configuración topológica en la cual la mayoría de MARs se encuentren realmente asociados a la MN, representa un atractor estructural más simétrico (Aranda-Anzaldo, 2012; Aranda-Anzaldo et al. 2014). Hay evidencia de que la tensegridad es una realidad biológica, por ejemplo, los telómeros están unidos a la MN (Ludérus et al. 1996), y se sabe que proteínas de la MN participan en la formación del andamio cromosómico que constituye el núcleo estructural del cromosoma mitótico (De, 2002; Sheval y Polyakov, 2006). Por otro lado, se sabe que la NHOS, determinada por las interacciones entre DNA y MN, constituye un sistema estructural dinámico que responde a fuerzas mecánicas (Martínez-Ramos et al. 2005) y que naturalmente evoluciona en el tiempo hacia estados de mayor estabilidad caracterizados por una reducción y homogenización en el tamaño promedio de los bucles de DNA y un aumento en el número de LARs actualizadas (Aranda-Anzaldo, 1989; Maya-Mendoza et al. 2005; Martínez-Ramos et al. 2005; Aranda-Anzaldo, 2009; Alva-Medina et al. 2010, 2011). Esto significa que *in vivo*, la NHOS se comporta como un sistema físico que evoluciona en el tiempo hacia atractores estructurales más simétricos. Este comportamiento de la NHOS guarda relación con el fenómeno de diferenciación celular terminal y el estado postmitótico (Maya-Mendoza et al. 2005; Aranda-Anzaldo, 2009; Alva-Medina et al. 2010; 2011; Aranda-Anzaldo et al., 2014).

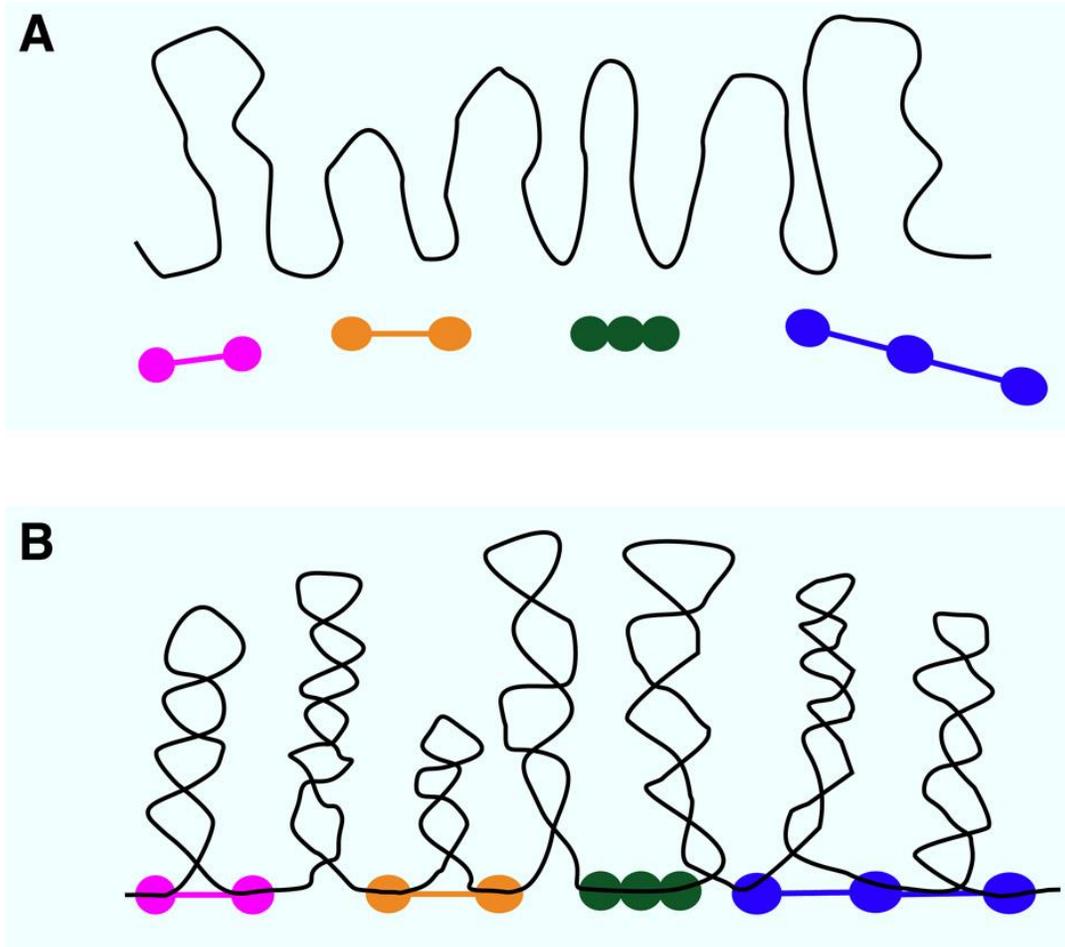


Figura 11. Tensegridad y EOSN. Tensegridad estructural implica que elementos discontinuos de compresión y elementos continuos de tensión interactúan constituyendo una estructura global muy estable. Un elemento básico en la tensegridad es la presencia de pre-estrés, una tensión isométrica equilibrada, sea por haces de compresión dentro de la estructura, por elementos externos o por una combinación de ambos. En el presente ejemplo proteínas de MN (líneas y esferas de colores) corresponden a elementos de compresión, mientras que los bucles de DNA corresponden a los elementos continuos de tensión. La asociación de los bucles de DNA con la MN causa pre-estrés isométrico y por lo tanto hiperenrollamiento. El DNA cromosómico interconecta centros de proteínas de MN creando una estructura de orden superior considerablemente estable que se extiende a través de todo el volumen nuclear. Este modelo es consistente con la evidencia que muestra que el DNA es el conector que une las proteínas del andamio cromosómico (Poirier y Marko, 2002). Tomado de Aranda-Anzaldo et al. 2014.

Para que una célula se divida se requiere un gasto de energía considerable, que es necesario para los eventos que ocurren durante la mitosis, tales como el desensamble de la envoltura nuclear, la condensación de los cromosomas, la separación de los telómeros de la envoltura nuclear y la segregación cromosómica. Todos estos eventos involucran la desestabilización de la NHOS en interfase (Aranda-Anzaldo et al., 2014). Si el número de interacciones entre DNA-MN incrementa en el tiempo, ellas pueden alcanzar un umbral en el cual la energía necesaria para desestabilizar la NHOS supera la capacidad de la célula. Una NHOS muy estable requiere una energía de activación muy grande para que pueda ser desestabilizada. Dado que la energía metabólica en la célula es limitada, cuando la estabilidad de la NHOS alcanza cierto umbral, puede representar una barrera energética insuperable para la cariocinesis en la célula, dado que el aporte energético es insuficiente para desestabilizar la NHOS. Una vez que la célula alcanza dicho umbral se convierte en una célula establemente postmitótica y terminalmente diferenciada (Aranda-Anzaldo et al. 2014). Figura 12.

Dado que este proceso obedece a limitantes termodinámicas, ya que la energía de estrés estructural se encuentra dispersada de una manera más uniforme en el volumen del núcleo celular en un estado final respecto a un estado inicial, según la segunda ley de la termodinámica (Lambert, 2002), este debe seguir un comportamiento estocástico que sin embargo incrementa su probabilidad en función del tiempo.

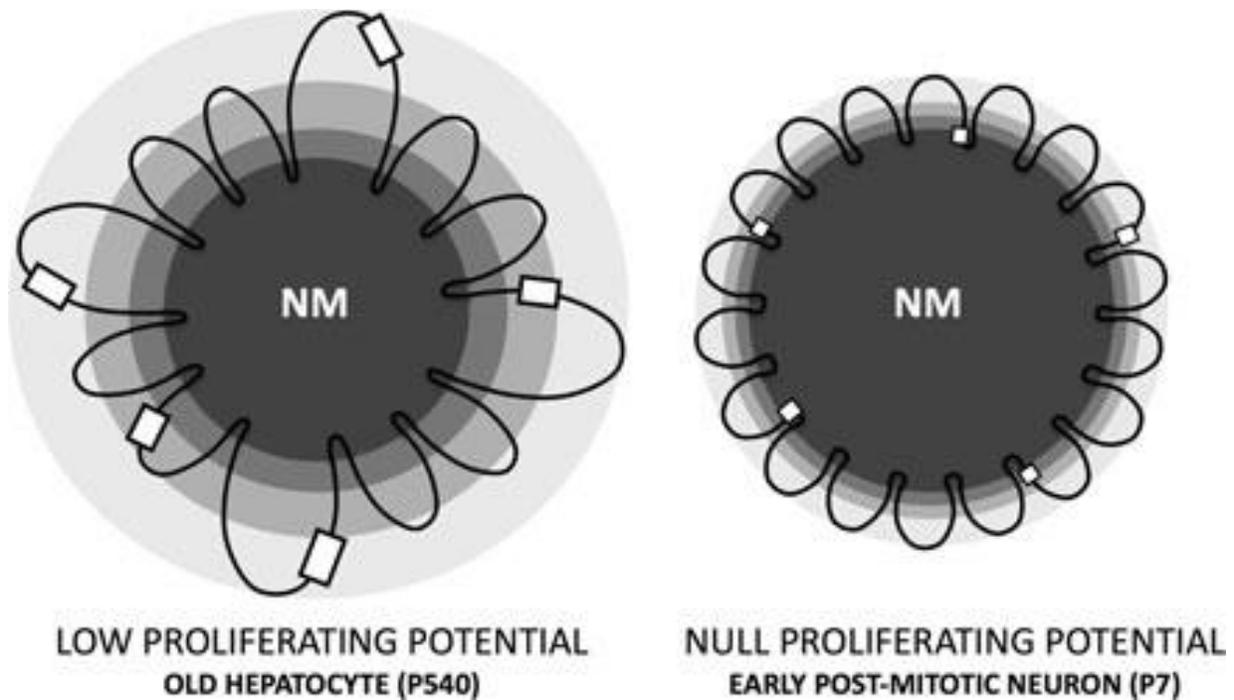


Figura 12. Modelo que representa la estructura de orden superior en el núcleo celular (NHOS) que resulta de las interacciones entre DNA y MN en nucleoides de hepatocitos P540 y neuronas P7. Las zonas topológicas con respecto a la MN correspondientes están representadas por una escala de grises de intensidad creciente donde el gris más oscuro representa a la MN (observe el tamaño promedio de la MN más grande, así como el tamaño del halo reducido en neuronas en comparación con el de hepatocitos). Los cuadros blancos representan secuencias blanco que corresponden a ciertos genes en los bucles. Observe que los bucles en nucleoide P7 son más cortos, más numerosos y más homogéneos en tamaño, en comparación con los nucleoides P540, los cuales todavía muestran heterogeneidad en el tamaño. Por lo tanto, la cantidad relativa del DNA que interactúa directamente con la MN como LARs es significativamente mayor en los nucleoides de neuronas P7 postmitóticas que en los nucleoides de hepatocitos P540 los cuales en promedio muestran un bajo potencial proliferativo. La mayor estabilidad global en las neuronas P7 podría constituir una barrera física definitiva para la mitosis ya que bajo una configuración estable y no dinámica, el costo de energía de activación de la condensación del cromosoma, cariocinesis y desensamble nuclear puede volverse limitante para la célula. Tomado de Alva-Medina et al., 2010.

## JUSTIFICACIÓN

En los metazoarios el DNA nuclear está organizado en bucles hiperenrollados anclados a una subestructura proteica denominada matriz nuclear (MN) (Cook et al., 1976; Nickerson, 2001; Tsutsui et al., 2005). El DNA se ancla por medio de secuencias que no codifican denominadas MARs (Ottaviani et al., 2008). Sin embargo, no existen secuencias consenso que definan *a priori* a los MARs que han sido clasificados en forma operacional en estructurales-permanentes, resistentes a la extracción con alta concentración de sal, y en temporales-funcionales, que no resisten dicha extracción (Razin, 2001; Maya-Mendoza et al., 2003). A los primeros también se les conoce como LARs y es un hecho que no todos los MARs potenciales están unidos a la MN formando LARs (Heng et al., 2004). Se ha especulado que los bucles de DNA pueden corresponder a unidades funcionales del genoma (Razin, 2001). En nuestro laboratorio se ha obtenido evidencia de que los bucles estructurales no corresponden a unidades de transcripción (Maya-Mendoza et al., 2003, 2004, 2005; Alva-Medina et al., 2010; Trevilla-García y Aranda-Anzaldo 2011) y que en realidad corresponden a los replicones (unidades de replicación) *in vivo* (Maya-Mendoza et al., 2003; Rivera-Mulia et al., 2011). Las interacciones DNA-NM definen una estructura de orden superior al interior del núcleo celular (NHOS) la cual no es estática sino que evoluciona en el tiempo hacia un máximo de estabilidad estructural, caracterizado por la reducción y homogenización en el tamaño promedio de los bucles y un incremento significativo del número de LARs actualizados (Maya-Mendoza et al., 2003; Alva-Medina et al., 2010) que al parecer está relacionado con el fenómeno de diferenciación celular definitiva (estado post-mitótico) y con la senescencia replicativa (Aranda-Anzaldo, 2009; Aranda-Anzaldo et al., 2014). Con el método desarrollado en nuestro laboratorio es posible determinar la configuración en bucles estructurales de cualquier región genómica con secuencia conocida (Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo, 2003; Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010). Con este método se ha determinado la organización en bucles estructurales de varias regiones genómicas específicas, en células primarias de rata de origen endodérmico y mesodérmico. Estos resultados han permitido establecer que la

organización en bucles estructurales es tejido específica tanto a gran escala como a nivel local, y que dicha organización no es dependiente de la transcripción, ni la afecta (Trevilla-García y Aranda-Anzaldo 2011; Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010). Por otro lado, considerando que la replicación ocurre en complejos macromoleculares organizados sobre la MN (Cook, 1999; Anachkova, et al., 2005) y que los bucles estructurales corresponden a los replicones *in vivo* (Buongiorno-Nardelli et al., 1982; Maya-Mendoza et al., 2003; Rivera-Mulia et al., 2011) resulta paradójico que la subdivisión de un mismo genoma en replicones (bucles estructurales) sea tejido-específica.

La NHOS constituye un sistema estructural que puede responder a fuerzas mecánicas (Martínez-Ramos et al., 2005) y al parecer su organización está condicionada por limitantes de orden físico-termodinámico (Aranda-Anzaldo, 2009, 2016). Sin embargo, no está claro si hay factores biológicos que también determinan esta NHOS (Trevilla-García y Aranda-Anzaldo, 2011).

Por lo anterior es importante estudiar en forma comparativa la NHOS en dos especies cercanas (rata y ratón) para contribuir a establecer si existen factores de tipo biológico-funcional que determinen su establecimiento (si este es el caso dicha NHOS estará muy conservada entre especies) o si por el contrario los factores de orden físico-termodinámico son los principales determinantes de la NHOS (en cuyo caso será especie-específica).

Este proyecto permitirá determinar si existen limitantes evolutivas (factores biológicos) que obligan a conservar la NHOS entre especies cercanas o si por el contrario, dicha NHOS no se conserva entre especies y sólo está determinada por factores termodinámicos y fisicoquímicos. Considerando que los LARs corresponden a secuencias que no codifican, si la NHOS resulta significativamente conservada entre especies cercanas, esto implica que los LARs utilizados corresponden a regiones equivalentes del genoma en ambas especies y por lo tanto, la selección natural de alguna manera actúa sobre dichas LARs evitando su variación en secuencia de nucleótidos y/o en ubicación genómica, para permitir que la NHOS sea conservada entre especies. Por el contrario, si la NHOS es claramente diferente entre dos especies

cercanas, esto indica que dicha organización sólo depende de factores físicos y locales sin significado evolutivo. En este último caso una función muy importante: la replicación del DNA, resultaría en el nivel estructural completamente dependiente de una NHOS que se establece en forma circunstancial sin influencia de las prioridades de naturaleza biológica.

## OBJETIVO GENERAL

Hacer un análisis comparativo de la NHOS entre el ratón y la rata.

### Objetivos específicos

En nuestro laboratorio ya fueron mapeadas diferentes secuencias diana en hepatocitos de rata adulta (Wistar). Para este trabajo se eligieron ocho secuencias diana que constituyen una muestra representativa de diferentes territorios cromosómicos al interior del núcleo. Estas secuencias se localizan en regiones codificantes o regiones regulatorias de los siguientes genes: albúmina (*Alb*), beta-actina (*Actb*), *Fyn*, colágena tipo I alfa 1 (*Col1a1*), *CD23*, *Cd86*, neurofilamento ligero (*Nef-l*) y neurofilamento medio (*Nef-m*). Por lo tanto en el presente proyecto se plantean los siguientes objetivos:

1. Determinar el patrón de mapeo topológico con respecto a la MN de las ocho secuencias diana arriba mencionadas en neuronas de corteza cerebral (origen ectodérmico) de rata adulta.
2. Determinar el patrón de mapeo topológico con respecto a la MN de las ocho secuencias diana arriba mencionadas en hepatocitos (origen endodérmico) de ratón adulto (Swiss).
3. Determinar el patrón de mapeo topológico con respecto a la MN de las ocho secuencias diana arriba mencionadas en neuronas de corteza cerebral (origen ectodérmico) de ratón adulto (Swiss).
4. Caracterización biofísica de la NHOS (hiperenrollamiento, distribución y tamaño promedio de los bucles de DNA, estabilidad de interacciones DNA-MN) en hepatocitos y neuronas de ratón, misma que ya ha sido reportada por nuestro laboratorio para el caso de la rata.
5. Determinar mediante PAGE el perfil genérico de la composición proteica de la MN en hepatocitos y neuronas de ratón para compararlos con los ya reportados en el caso equivalente de la rata.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### a. Animales experimentales

Se utilizaron ratas Wistar macho adultos (250-300 g de peso) alimentadas *ad libitum*. Se utilizaron ratones CD1 macho adultos (20-30 g de peso) alimentados *ad libitum*. El manejo de los animales se realizó conforme a la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Se utilizaron animales adultos con el fin de eliminar variaciones en los resultados debido al desarrollo del organismo; esto es relevante debido a que la NHOS es una estructura dinámica que sufre cambios en función del tiempo. La esperanza de vida máxima entre rata y ratón es similar (Tabla 1 y Figura 13), sin embargo no existe una correspondencia lineal entre las historias de vida de ambas especies (Andreollo et al., 2012; <https://www.jax.org/research-and-faculty/researchlabs/theharrisonlab/gerontology/life-span-as-a-biomarker>). Se utilizaron ratas de 250-300 g (2-3 meses de edad) y ratones de 25-30 g (1-2 meses) y de 30-45 g (3 meses de edad).

Tabla 1. Tabla comparativa de las historias de vida entre rata y ratón

ETAPA	Rata	Ratón
Desarrollo y maduración	0 – 6 meses	0 – 3 meses
Adulto	1.5 – 6 meses	3 – 6 meses
Viejo	6 – 48 meses	18 – 24 meses
Esperanza de vida promedio	2 – 3 años	2 años
Maduración reproductiva	42 días	35 días

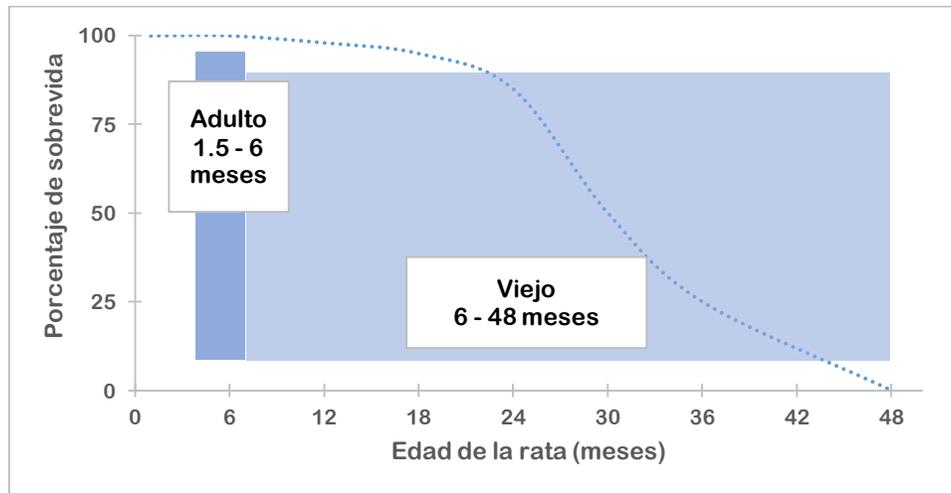
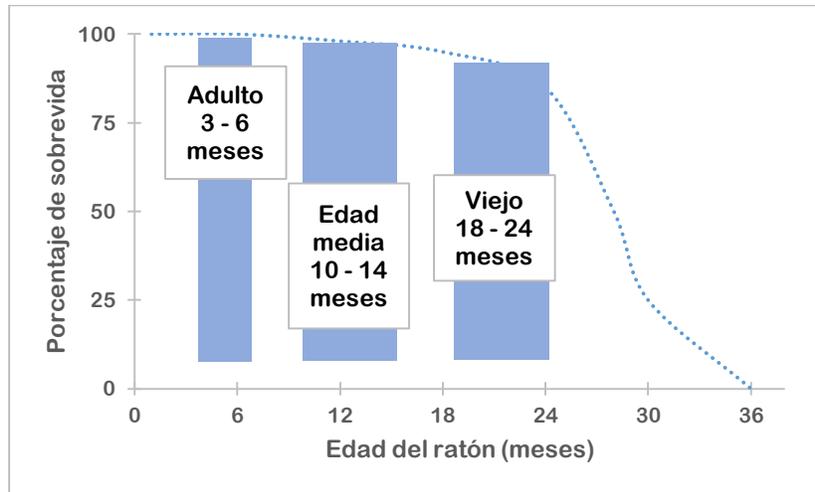


Figura 13. Historias de vida de la rata y el ratón (Tomado y modificado de Life span as a biomarker: referencia 108).

### b. Células primarias

Se aislaron hepatocitos primarios tanto de rata como de ratón, mediante el método descrito por Maya-Mendoza (Maya-Mendoza et al., 2003). Bajo anestesia general, el hígado fue perfundido *in situ* con PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$ , ni  $\text{Mg}^{2+}$  (PBS-A), a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 3-5 minutos, y posteriormente con colagenasa IV, Sigma (0.01-0.25% colagenasa con 0.075%  $\text{CaCl}_2$  en HEPES, pH 7.6) durante 3-8 minutos. De esta manera se obtienen

hepatocitos viables en solución que fueron cuantificados mediante hemocitómetro y usados inmediatamente para la extracción de nucleoides.

Se aislaron núcleos neuronales de rata y de ratón mediante el método descrito por (Alva-Medina et al., 2010), con este método se obtiene una población de núcleos neuronales mayor al 90 %. Los animales fueron sometidos a eutanasia, el tejido cerebral fresco fue homogenizado con 1 ml de sacarosa 2 M (1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM PMSF) con tres golpes del vástago. El homogenado se transfirió a un volumen de 8 ml de sacarosa 2 M y se centrifugó a 49,500 g durante 60 minutos a 4°C. Se recuperó la fracción que contiene los núcleos neuronales y se realizó un lavado con 10 ml de sacarosa 10 mM. Los núcleos neuronales se centrifugaron a 1,500 g durante 3 minutos, y finalmente el botón fue resuspendido en 300 µl de PBS-A. Se cuantificaron los núcleos neuronales mediante un hemocitómetro y se utilizaron inmediatamente para la extracción de nucleoides. Para la extracción de núcleos neuronales de ratón se utilizaron dos animales por experimento.

El rendimiento de hepatocitos y núcleos neuronales con los métodos antes descritos fue similar en ambas especies, de 10 - 20 millones por mililitro, con un rendimiento promedio de 15 millones por mililitro.

### **c. Extracción de nucleoides**

Se aislaron los nucleoides con el método descrito por (Maya-Mendoza et al., 2003). Se tomaron alícuotas de 50 µl con  $3 \times 10^5$  células, se mezclaron con 150 µl de buffer de lisis (2.6 M NaCl, 1.3 mM EDTA, 2.6 mM Tris, 1.2% Triton-X100, pH 8) y se incubaron por 20 minutos a 4°C. Para la extracción de nucleoides neuronales; se tomaron alícuotas de 50 µl con  $3 \times 10^5$  núcleos neuronales, se mezclaron con 150 µl de buffer de lisis (2.6 M NaCl, 1.3 mM EDTA, 2.6 mM Tris, 0.6% Triton-X100, pH 8) y se incubaron por 10 minutos. Al cabo del tiempo de lisis se sometieron las preparaciones a un lavado con PBS-A a 4°C con una relación 1:70 vol:vol a 1,500 g durante 5 minutos

para eliminar restos celulares producto del tratamiento de lisis. Los botones se resuspendieron en un volumen de 200  $\mu$ l.

#### **d. Análisis de la integridad de los nucleoides**

Se tomaron muestras de nucleoides de hepatocitos y nucleoides neuronales de ratón (10  $\mu$ l) y se tiñeron con bromuro de etidio (80  $\mu$ g/ml). Las preparaciones fueron visualizadas inmediatamente bajo un microscopio Olympus de epifluorescencia BX60; se capturaron imágenes y secuencias en tiempo real con una cámara QiClick/QIMAGING, a los 0 y 30 segundos de expansión del halo fluorescente. Mediante la microscopía de contraste de fases se examinó la morfología de las matrices nucleares, mientras que con la microscopía de fluorescencia se realizó un análisis de la integridad de los nucleoides y del hiperenrollamiento de los bucles de DNA anclados a la MN (Aranda-Anzaldo y Dent, 1997). Se determinó el tamaño promedio del halo de fluorescencia (en  $\mu$ m) de los nucleoides, a partir del contorno de la MN al límite exterior del halo de DNA, mediante una herramienta del software Image J (Auto Local Threshold v.1.16.1) usando el método Median; para ver los detalles del método ir a: <http://homepages.inf.ed.ac.uk/rbf/HIPR2/adpthrsh.htm>. El tamaño promedio de los bucles correspondientes a nucleoides de hepatocitos y de neuronas en kpb se estimó a partir del tamaño del halo como previamente se describe (Maya-Mendoza et al., 2005; Alva-Medina et al., 2011).

#### **e. Obtención de curvas de digestión con DNasa I y recuperación del DNA anclado a la MN**

Aproximadamente  $1.8 \times 10^6$  nucleoides de hepatocitos tanto de rata como de ratón, en un volumen de 1.2 ml, se digirieron con 0.5 U/ml de DNasa I (Sigma) en 5.1 ml de buffer de digestión (10 mM  $MgCl_2$ , 0.2 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 50 mM Tris, pH 7.2) a 37°C durante 60 minutos. Se tomaron alícuotas de nucleoides digeridos a los tiempos

0, 5, 15, 30 y 60 minutos, y en estas muestras la digestión se detuvo con 200 µl de buffer de paro (0.2 M EDTA, 10 Mm Tris, pH 7.5). Las muestras fueron sometidas al protocolo de lavado descrito por Maya-Mendoza (Maya-Mendoza et al., 2003) para la recuperación del DNA residual anclado a la MN. El botón que contiene los nucleoides parcialmente digeridos se resuspendió en 200 µl de agua doblemente destilada (dd-H<sub>2</sub>O), y se usó directamente como templado para la PCR. La concentración final de DNA asociado a la MN en cada tiempo de digestión se cuantificó por espectrofotometría.

La digestión de nucleoides neuronales de rata y de ratón se realizó bajo las mismas condiciones que en hepatocitos, excepto en la cantidad de enzima utilizada conforme a lo reportado (Alva-Medina et al., 2010). Para la digestión de nucleoides neuronales de rata,  $1.8 \times 10^6$  nucleoides neuronales en un volumen de 1.2 ml se incubaron con 0.9 U/ml de DNasa I (Sigma) en 5.1 ml de buffer de digestión a 37°C durante 60 minutos. Se tomaron alícuotas de nucleoides parcialmente digeridos a los tiempos 0, 5, 15, 30 y 60 minutos, en las cuales la digestión se detuvo con 200 µl de buffer de paro. Las muestras se sometieron al protocolo de lavado descrito (Maya-Mendoza et al., 2003) para la recuperación del DNA residual anclado a la MN. El botón final resultante se resuspendió en 200 µl de dd-H<sub>2</sub>O, el cual fue usado directamente como templado para la PCR. La concentración final de DNA asociado a la MN en cada tiempo de digestión se cuantificó por espectrofotometría.

#### **f. Diseño de *primers***

Se diseñaron pares de oligonucleótidos, 'oligos o *primers*', para las ocho secuencias blanco utilizadas en el mapeo topológico en hepatocitos y neuronas de ratón. Los parámetros que se usaron en el diseño fueron los siguientes: contenido de GC de 50-55%, longitud del oligo entre 18-24 pb, T<sub>m</sub> de 55-58°C, diferencia de T<sub>m</sub> de 0-1.2°C, diferencia de GC de 0-5%; ΔG de formación de estructuras secundarias, dímeros y dúplex > -2 Kcal/mol, tamaño de producto de PCR 250-500 pb. El diseño de

los oligos, utilizando el software Vector NT1, fue exitoso para las ocho secuencias blanco; sin embargo, cabe mencionar que los oligos equivalentes diseñados sobre el genoma de la rata fueron probados en el ratón. De estos solo albúmina y beta actina tuvieron eficiencia en la amplificación, y de esta manera se decidió usar los mismos oligos de la rata para el mapeo topológico en el ratón; para el resto de las secuencias blanco mapeadas se utilizaron oligonucleótidos específicos de ratón. El diseño de oligonucleótidos bajo los mismos parámetros permitió una amplificación eficiente utilizando el mismo programa de PCR reportado para todas las secuencias blanco (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo 2010, Trevilla-García y Aranda-Anzaldo 2010, Alva-Medina et al., 2011). Finalmente, se probó la especificidad de cada oligo utilizando el algoritmo de búsqueda de alineamientos de NCBI (*BLAST, Basic Local Alignment Search Tool*).

#### **g. Amplificación directa de secuencias blanco a partir de nucleoides**

Se utilizaron 10 ng de DNA para amplificación por PCR estándar. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ l: 0.7 U GoTaq DNA polimerasa (Promega), 2 mM  $MgCl_2$ , 0.2 mM de cada dNTP y 0.1  $\mu$ M de cada oligo; para *Nef-l* y *Nef-m* se usaron 0.6  $\mu$ M y 0.36  $\mu$ M de cada oligo, respectivamente. La amplificación de todas las secuencias se realizó utilizando el mismo programa: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, desnaturalización durante los ciclos a 94°C por 45 segundos, alineamiento a 56°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto, esto por 35 ciclos con un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos. Se confirmó la identidad de todos los amplicones mediante análisis de restricción. Los productos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (0.28  $\mu$ g/ml). Se capturaron imágenes y se analizaron utilizando el programa Kodak 1D Image Analysis Software 3.5 system. Los amplicones se consideraron como presentes o ausentes sobre las muestras de nucleoides parcialmente digeridos, según fue detectado por el software usando los parámetros default.

#### **h. Extracción de proteínas de MN**

Se extrajeron proteínas de nucleoides de MN de hepatocitos y de neuronas de rata y de ratón, de la siguiente manera. Se extrajeron nucleoides (10-15 millones) de hepatocitos y de núcleos neuronales. Posterior a la obtención de los nucleoides y al lavado de los mismos, se recuperaron los botones y se centrifugaron a 9,000 g por 10 minutos a 4°C, finalmente se recuperó el botón.

Cada muestra de nucleoides se homogenizó mediante pipeteo con 100 µl de buffer de extracción de proteínas (2% SDS, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 5 mM Tris pH 7.2), más inhibidores de proteasas (800 nM apoprotinina, 40 µM bestatina, 100 µM leupeptina, 1 µg/ml pepstatina y 1 mM PMSF). Este concentrado de inhibidores de proteasas se adiciona al buffer de extracción al momento de la extracción de las proteínas. El homogenado se hirvió durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 9,600 g durante 10 minutos a 4°C. Se recuperaron el sobrenadante y el botón, y se almacenaron las muestras a -70°C hasta su uso.

Para la cuantificación de las proteínas se empleó el kit Pierce BCA Protein Assay de Thermo Scientific. Se mezclaron 10 µl de cada muestra con 200 µl de la solución de trabajo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se cuantificó la concentración de proteína mediante espectrofotometría, determinando la absorbancia a 562 nm.

#### **i. Electroforesis en gel de poliacrilamida**

Para la electroforesis de las proteínas de nucleoides se preparó un gel de poliacrilamida al 10% (10% acrilamida, 0.375 M Tris pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% AMPS y 0.04% TEMED) en un volumen de 10 ml y 2 ml de gel concentrador al 4% (4% acrilamida, 0.126 M Tris pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% AMPS, 0.01% TEMED). El gel polimerizado se colocó en la cámara de electroforesis con el buffer de corrida (0.025 M Tris, 0.192 M glicina, 0.1% SDS, pH 8.5 - 8.7). Las muestras fueron tratadas con buffer

de carga (0.125 M Tris, 4% SDS, 20 % glicerol, 10% mercaptoetanol). Se cargaron 30  $\mu$ g de proteína de nucleoides en cada pozo. El gel se corrió a 40 mA durante 1 a 1.5 horas. Al finalizar el tiempo de corrida el gel se tiñó con azul de Coomassie (0.06% azul de Coomassie R-250, 30% etanol y 10% ácido acético) durante toda la noche. Se destiñó el gel con una solución al 10% de ácido acético durante toda la noche.

Se capturaron imágenes de los geles y se analizaron utilizando el programa Kodak 1D Image Analysis Software 3.5 system.

## RESULTADOS

El presente trabajo es un estudio comparativo de la estructura de orden superior al interior del núcleo celular (*NHOS* por *Nuclear Higher Order Structure*), entre dos especies evolutivamente cercanas, como lo son la rata y el ratón. Se utilizaron como modelo de estudio dos tipos celulares que tienen diferente origen embrionario: hepatocitos de endodermo y neuronas de ectodermo.

La rata y el ratón son especies estrechamente relacionadas, por lo que comparten la mayoría del genoma y también la mayoría de los puntos de re-arreglo (*break points*) en la organización de sus genomas (Zhao et al., 2004).

El tamaño del genoma de la rata (2.87 Gb) es prácticamente el mismo que el del ratón (2.8 Gb); la pequeña diferencia se debe en parte al contenido de secuencias repetidas. La identidad de secuencia entre sus genomas completos es del 70%. La porción de genoma que se conserva entre ambas especies contiene 94-95% de las regiones codificantes y regiones regulatorias (Gibbs et al., 2004). El 90% de los genes de la rata tienen sus ortólogos en el ratón (proporción 1:1). Hay genes en la rata que no tiene el ratón, y los análisis comparativos entre los genomas de rata y ratón muestran que surgieron por expansión de familias génicas, algunos de estos incluyen genes involucrados en la inmunidad y la quimiorrepción (Gibbs et al., 2004). La estructura de los genes (número y longitud, tanto de intrones como de exones) está bastante conservada entre ambas especies (Zhao et al., 2004).

La rata tiene 21 cromosomas, mientras que el ratón tiene 20. El análisis comparativo del cariotipo entre humano, rata y ratón mostró que los cromosomas de estas especies comparten alrededor de 280 regiones muy grandes (> 40 Mb) con alta similitud de secuencia denominadas bloques sinténicos que se distribuyen en diferentes patrones a lo largo de los cromosomas de los tres organismos (Zhao et al., 2004).

Debido al elevado grado de conservación de los genomas entre ambas especies es posible elegir secuencias génicas en el genoma del ratón que corresponden a

secuencias génicas equivalentes en el genoma de la rata, no obstante la diferencia en sus cariotipos y las diferencias finas en la estructura de los genes (Tabla 2).

En este estudio se incluyeron secuencias diana correspondientes a genes localizados en cromosomas diferentes, de esta manera constituyen una muestra representativa de diferentes territorios cromosómicos al interior del núcleo. El mapeo topológico permitió el estudio a nivel global de la organización del genoma en bucles estructurales al interior del núcleo en ambas especies. Los genes elegidos fueron: albúmina (*Alb*), beta-actina (*Actb*), colágena tipo I alfa 1 (*Col1a1*), *fyn* (*Fyn*), *CD23*, *Cd86*, neurofilamento ligero (*Nef-l*) y neurofilamento medio (*Nef-m*). Se eligieron estos genes debido a que son homólogos en la rata y el ratón, además en nuestro laboratorio ya han sido analizados en hepatocitos de rata adulta (Wistar).

Tabla 2. Localización de las secuencias diana utilizadas en el estudio.

GEN	Localización en el cromosoma		Localización de la secuencia diana	Tamaño total del gen (kb)		Identidad de secuencia (%)
	rata	ratón		rata	ratón	
<i>Alb</i>	14p22	5G2	Exón 1	15.51	15.73	86
<i>Actb</i>	12p11	5G2	Exón 4	2.97	3.63	100
<i>Col1a1</i>	10q31	11D	5' UTR	16.98	16.81	98
<i>Fyn</i>	20q13	10B1	Exón 2	19.39	19.56	100
<i>CD23</i>	12p12	8A1	Exón 3	11.55	14.03	90
<i>Cd86</i>	11q22	16B5	Exón 2	57.68	97.12	100
<i>Nef-l</i>	15p12	14D3	5' UTR	3.87	3.86	100
<i>Nef-m</i>	15p12	14D1	Exón 1	5.29	5.45	94

Tabla 3. Pares de *primers* que definen a ocho secuencias diana tanto en la rata como en el ratón.

Gen	Primer sentido rata	Primer antisentido rata	Longitud del amplicón (bp)
<i>Alb</i>	TGGCAAACATACGCAAGGGA	GCGAAACACACCCCTGGAAA	275
<i>Actb</i>	AACACCCCAGCCATGTACG	ATGTCACGCACGATTTCCC	254
<i>Col1a1</i>	CATACCTGGGCCACACCAT	CTTGCACTTTCCTTCTGGGA	261
<i>Fyn</i>	ACACAATGCTGATCTAGTCGTGGC	CACATCTGTGTTCACTGTCCG	340
<i>CD23</i>	TAGGAGACGATGCTGCTGTGCA	CGTGGGAAGAGGATCAGACAAGAA	284
<i>Cd86</i>	CCACTCTCAGATCCCACATTCCCT	CCAGGCTCTACGACTTCACAATGT	284
<i>Nef-l</i>	TCCCCCTTGAGTCCTCTTGA	ACTTGTCCCTTCACGGGAGA	249
<i>Nef-m</i>	CGGAGCAATCACGAAGAGGA	TCGGCGATCTCTTCTTTAGCG	254
Gen	Primer sentido ratón	Primer antisentido ratón	Longitud del amplicón (bp)
<i>Alb</i>	TGGCAAACATACGCAAGGGA	GCGAAACACACCCCTGGAAA	264
<i>Actb</i>	AACACCCCAGCCATGTACG	ATGTCACGCACGATTTCCC	254
<i>Col1a1</i>	AAGGTGTGTCTGGCATGGCA	CCCCTTGACTTTCTTTCTGGGAC	367
<i>Fyn</i>	ATCCTGTGCCTTGTGCGTTAGA	CATCCCTCAGCCGTTCCATT	308
<i>CD23</i>	GCTACCAACAGGATACTGGGAACC	CAGCGGCAGGAAAATGACAG	449
<i>Cd86</i>	CATATCTGCCGTGCCATTTAC	GACCCACATTCCCTCCAAA	445
<i>Nef-l</i>	CTTTTTTTCTCTGTCCCACCTCCC	CGCTGGCTTGCTGATTCCTTTA	444
<i>Nef-m</i>	TTTCCTGCGGAGCAATCACG	TTCCTTGGCAGAGCGAATGG	250

El nivel de identidad de secuencia de las regiones donde se localizan las secuencias blanco es alto entre la rata y el ratón (Tabla 2); sin embargo, los *primers* que se diseñaron para la rata (Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo, 2003; Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García y Aranda-Anzaldo, 2011; Alva-Medina et al., 2011) (Tabla 3) mostraron eficiencia de amplificación sólo para las secuencias de *Alb*, *Actb* y *Nef-m* en el ratón (Figura 14). Los *primers* de *Nef-m* generaron un producto de alrededor de 300 pb; el análisis de restricción generó dos fragmentos cuyos tamaños son de aproximadamente 150 pb, indicando que corresponde a un amplicón diferente al de la rata (Figura 15).

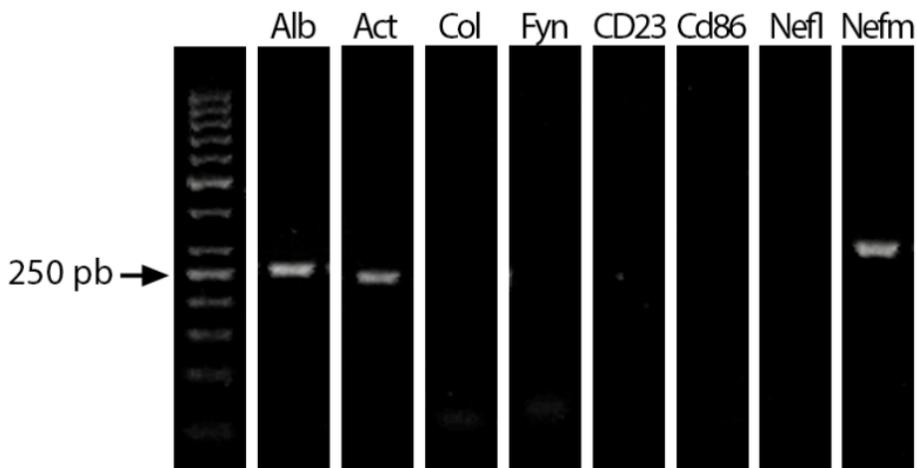


Figura 14. Amplificación de las ocho secuencias blanco en hepatocitos de ratón. Los *primers* empleados corresponden a los diseñados sobre el genoma de rata. La amplificación fue exitosa para las secuencias *Alb* y *Actb*, *Nef-m* rindió un amplicón de alrededor de 300 pb que no corresponde al esperado. El resto de las secuencias diana no pudieron ser amplificadas. Gel de agarosa 2%, teñido con bromuro de etidio (0.28 µg/ml).

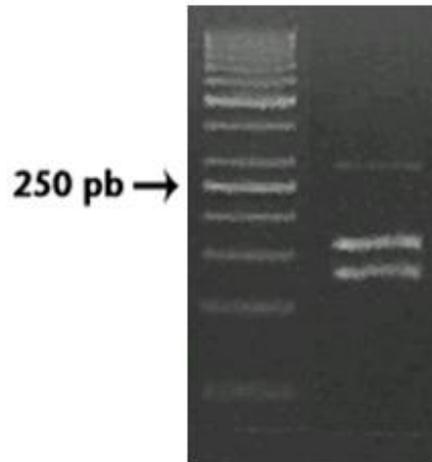


Figura 15. Amplificación de la secuencia blanco del gen *Nef-m* en el ratón. Se usaron los *primers* diseñados sobre el genoma de la rata, se obtuvo una banda de alrededor de 300 pb. El producto fue restringido con la enzima *Ava I* de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se obtuvieron dos fragmentos de aproximadamente 150 pb. Primer carril escalera de peso molecular (50 pb).

Debido a que los *primers* de la rata no funcionaron en el ratón fue necesario diseñar *primers* específicos para el ratón (Tabla 3). Se emplearon para su diseño criterios muy similares a los utilizados en la rata, lo cual permitió obtener *primers* que funcionan con eficiencia semejante bajo las mismas condiciones de amplificación (Figura 16). La fidelidad de la *Taq* polimerasa sin actividad de corrección (como la *GoTaq* polimerasa utilizada en el presente trabajo) es de  $1 \times 10^{-5}$  errores/bp/duplicación. Por lo tanto, en principio, después de 35 ciclos de PCR, podría haber un error cada 2,857 bp. Por lo tanto, tomando en cuenta el tamaño de los amplicones utilizados en el presente estudio ( $\leq 500$  bp) es poco probable que incluso un solo error de copia única pueda ocurrir en amplicones tan cortos. Además, análisis experimental reciente sobre las tasas de error de las *Taq* polimerasas indica que solo  $3 \times 10^{-5}$  errores/bp ocurren después de 20 duplicaciones promedio efectivas en la reacción de PCR, lo que apoya la improbabilidad de que ocurran errores de copia significativos en amplicones dentro del

rango de tamaño usado en nuestro estudio (McInerney, P. et al., 2014). Por lo tanto, la identidad de los amplicones usados en el presente estudio se verificó mediante análisis de restricción que es un enfoque barato y confiable (Tabla 4 y Figura 17).

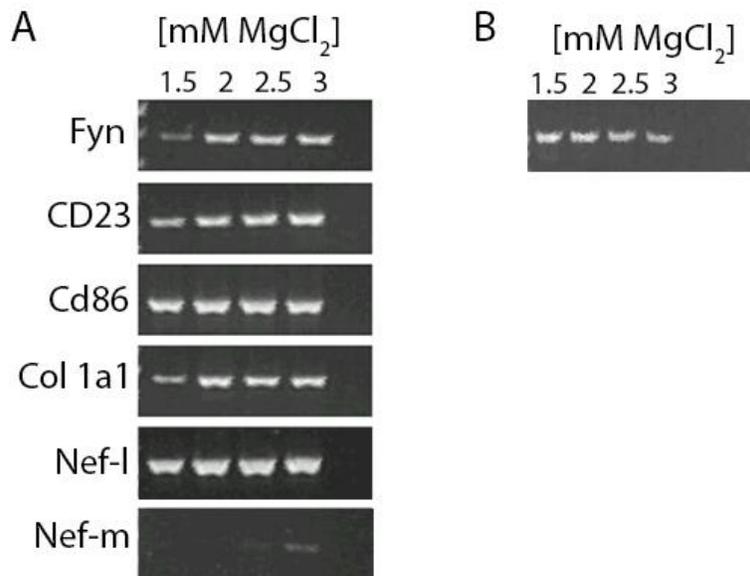


Figura 16. Estandarización de los *primers* diseñados para el ratón. (A) Se muestra una escalera de 1.5 a 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, no se incluyeron albúmina y actina debido a que estos *primers* ya fueron probados (Figura 1). La concentración óptima de MgCl<sub>2</sub> empleada fue de 2 mM. Los parámetros de la PCR fueron: templado 10 ng, Taq polimerasa 0.7U, dNTPs 0.2 mM, *primers* 0.1 μM para *Fyn*, *CD23*, *Cd86*, *Col 1a1* y *Nef-m*, 0.2 μM para *Nef-l*. *Nef-m* no pudo ser amplificado usando estas condiciones, por lo que se aumentó la concentración de *primers* a 0.36 μM (B). Gel de agarosa 2%, teñido con bromuro de etidio (0.28 μg/ml).

Tabla 4. Enzimas usadas para el análisis de restricción de los amplicones correspondientes. Se indica el tamaño de los amplicones, las enzimas usadas y el tamaño de los fragmentos generados por la restricción.

Amplicón	Tamaño del amplicón (pb)	Enzima	Fragmentos
Albúmina	264	Hinf I	142/122
Actina b	253	Mbo I	192/61
Colágena 1a1	367	Alu I	192/175
Fyn	308	Ava II	163/145
CD23	449	Mbo I	253/196
Cd86	445	Ava II	376/69
Nef-I	444	Hind III	292/152
Nef-m	250	Ava I	135/115

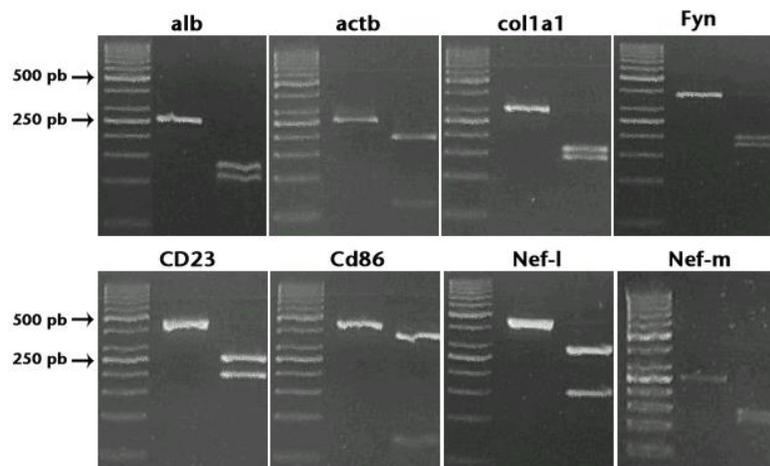


Figura 17. Análisis de restricción de los amplicones correspondientes a las ocho secuencias diana utilizadas en el mapeo topológico en el ratón. Los amplicones fueron restringidos con las enzimas correspondientes de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes (Tabla 3). Gel de agarosa 3%, teñido con bromuro de etidio (0.28 µg/ml). Primer carril: escalera de peso molecular (50 pb). Segundo carril: amplicón sin restringir. Tercer carril: fragmentos generados por la restricción.

## Aislamiento de hepatocitos

Se usaron ratas de 250-300 g para el aislamiento de los hepatocitos con el método descrito por Maya-Mendoza et al., 2003 (ver materiales y métodos). Estos animales son considerados adultos luego de haber alcanzado la maduración reproductiva. Para el caso de los ratones, la bibliografía refiere que se consideran animales adultos hasta los tres meses de edad (<https://www.jax.org/research-and-faculty/research-labs/the-harrison-lab/gerontology/life-span-as-a-biomarker>), aunque la maduración reproductiva se alcanza a las cuatro semanas, por lo que para esta especie se utilizaron ratones de 20-30 g (1-2 meses) y de 30-45 g (3 meses) por separado. Con base en el criterio de haber alcanzado la maduración reproductiva, el estudio comparativo se realizó con los ratones de 20-30 g. La morfología de los hepatocitos aislados resultó ser bastante similar entre rata y ratón (Figura 18).

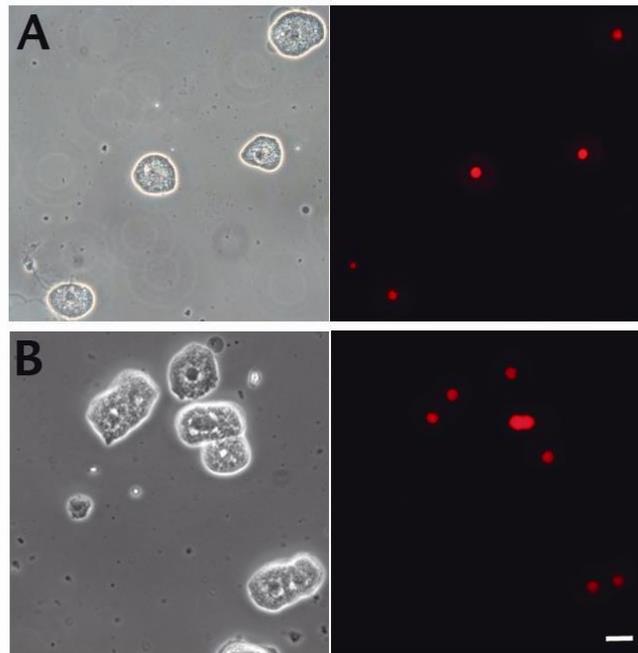


Figura 18. Aislamiento de hepatocitos de rata (A) y ratón (B). Micrografía 40X en contraste de fases (panel izquierdo) y fluorescencia (panel derecho) teñidos con 80  $\mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio. Barra=15  $\mu\text{m}$ .

En los hepatocitos de ratón se notó un aumento importante en la cantidad de lípidos presente en las preparaciones (Figura 19), lo cual dificultó en gran medida la extracción de los nucleoides. Otra diferencia fue la presencia de hepatocitos binucleados en ratones de tres meses de edad; el conteo de una muestra representativa (n=109), mostró que la población de hepatocitos binucleados fue del 83.4% (Figura 19). Se observó que la población de hepatocitos binucleados aumenta aproximadamente hasta el 80 % durante los primeros dos meses de edad del ratón. La acumulación de lípidos en el hígado y la presencia de hepatocitos binucleados son cambios que también se observan en el hígado de la rata, pero a una edad cronológica mayor (6 meses). Estos cambios se han asociado con la senescencia de los hepatocitos (Sigal et al., 1995; Celton-Morizur et al., 2010).

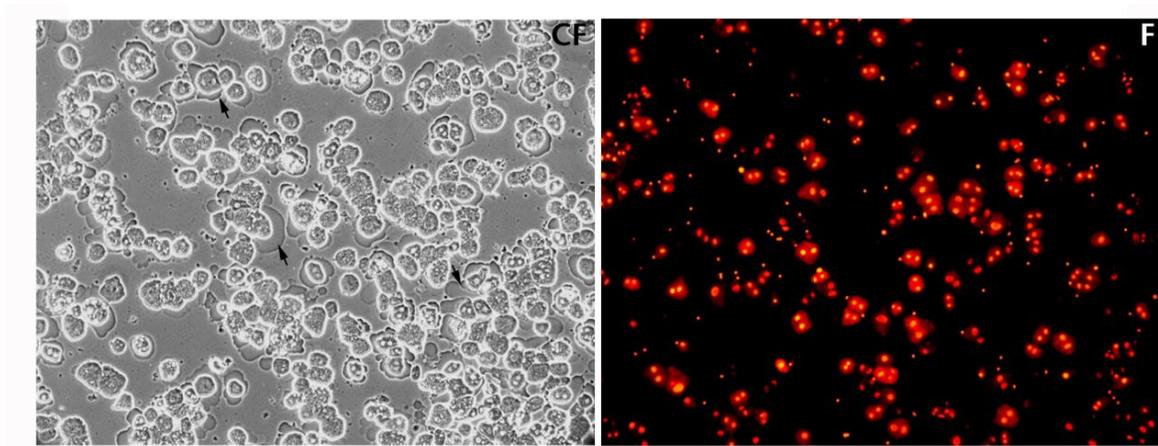


Figura 19. Aislamiento de hepatocitos de ratón. Micrografía 10X en contraste de fases (CF) y fluorescencia (F). Los hepatocitos fueron teñidos con 80  $\mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio. La población de hepatocitos binucleados corresponde al 83.4% (n=109). Las flechas indican la abundancia de lípidos presente en las preparaciones.

Debido a que probablemente la alimentación de los animales con dietas hipercalóricas induce la acumulación de lípidos en los hepatocitos y también el aumento en la población de hepatocitos binucleados, se sometió a los ratones a una dieta con restricción calórica a partir del destete (aporte del 60 % del consumo calórico típico diario). De manera interesante, se encontró que bajo restricción calórica la población de hepatocitos binucleados disminuyó del 83% a  $\leq 60\%$  de la población celular total (Figura 20).

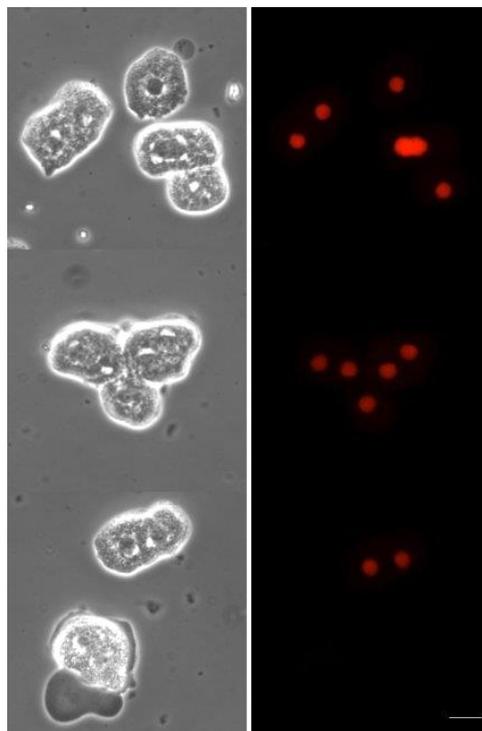


Figura 20. Aislamiento de hepatocitos de ratón. Micrografía 40X en contraste de fases (panel izquierdo) y fluorescencia (panel derecho) teñidos con 80  $\mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio. A las cuatro semanas de edad y bajo restricción calórica, disminuye notablemente la cantidad de lípidos en los hepatocitos, así como los hepatocitos binucleados. Barra=15  $\mu\text{m}$ .

## Extracción de nucleoides de hepatocitos

Un nucleoide es la estructura que se obtiene después de lisar a la célula usando altas concentraciones de sal (2 M NaCl) y detergente no iónico, de esta manera se obtiene el DNA organizado en bucles hiperenrollados asociados a una subestructura conocida como matriz nuclear (MN) (Cook et al., 1976). Se usaron los nucleoides extraídos para la caracterización biofísica de los mismos, así como para la realización de cinéticas de digestión con DNasa I.

La presencia de lípidos en el hígado de los ratones dificultó en gran medida la extracción de los nucleoides; para solucionar este problema fue necesario aumentar la concentración de detergente (Triton X-100) en la solución de lisis de 0.6% a 1.2%, y de esta manera la extracción de los nucleoides fue adecuada (Figura 21).

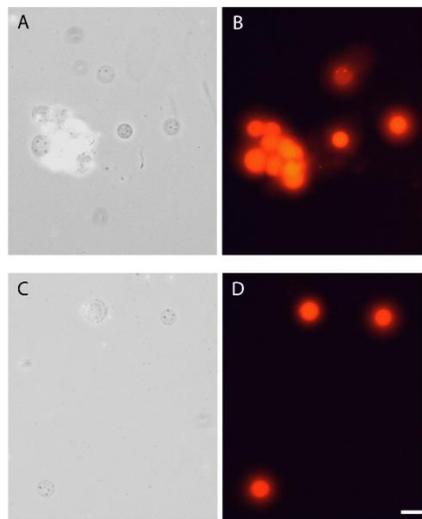


Figura 21. Extracción de nucleoides de hepatocitos de ratón. Micrografía 40X en contraste de fases y fluorescencia teñida con 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de bromuro de etidio. En A y B se observa la agregación de los nucleoides durante la extracción debido a la presencia excesiva de lípidos en los hepatocitos lo que impide la lisis adecuada de las células y en consecuencia los nucleoides se extraen de manera incompleta. C y D: nucleoides extraídos con 1.2% de Triton X-100, se observan los nucleoides correctamente extraídos, sin restos celulares y sin agregaciones. Barra=15  $\mu\text{m}$ .

## Aislamiento de núcleos neuronales

Para la extracción de los núcleos neuronales se utilizó el método descrito por Alva-Medina et al., 2010 (ver materiales y métodos). No se observaron diferencias entre los núcleos neuronales de la rata y del ratón (Figura 22). El rendimiento de núcleos neuronales fue menor en el caso del ratón, ya que el tamaño del cerebro es menor que el de la rata.

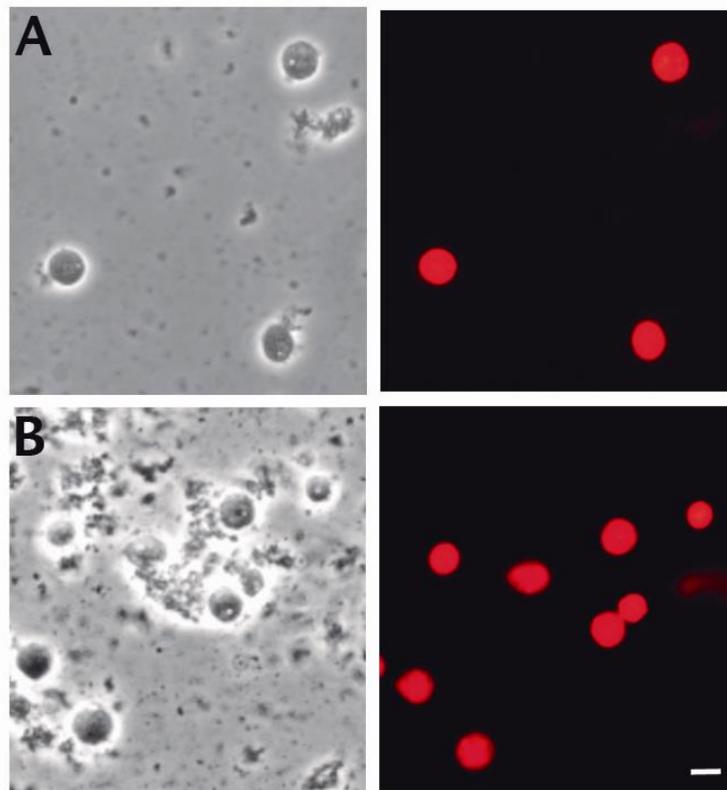


Figura 22. Aislamiento de núcleos neuronales de rata (A) y ratón (B). Micrografía 40X en contraste de fases (panel izquierdo) y fluorescencia (panel derecho) teñidos con 80  $\mu\text{g/ml}$  bromuro de etidio. Barra=15  $\mu\text{m}$ .

## Extracción de nucleoides de neuronas

Nucleoides neuronales fueron extraídos para la caracterización biofísica de los mismos, así como para la realización de cinéticas de digestión con DNasa I, Figura 23.

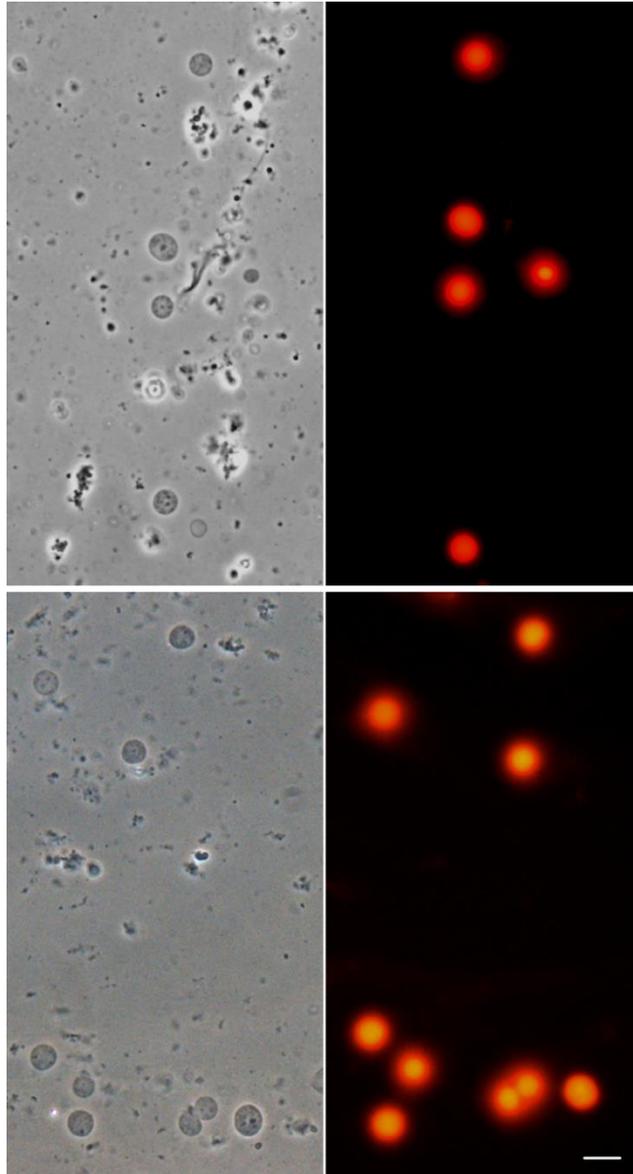


Figura 23. Extracción de nucleoides de neuronas de rata (panel superior) y ratón (panel inferior). Micrografía 40X en contraste de fases y fluorescencia teñida con 80  $\mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio. En contraste de fases se observa la morfología de la MN. En fluorescencia se observa el halo de fluorescencia inducido por el tratamiento con el bromuro de etidio. Barra=15  $\mu\text{m}$ .

## Caracterización biofísica de la NHOS en hepatocitos y neuronas de rata y de ratón

La estructura de orden superior al interior del núcleo celular (NHOS) se define como las interacciones entre el DNA y la MN. La caracterización biofísica de esta estructura da información de las características a nivel global de la NHOS, como son el tamaño promedio de los bucles y la estabilidad de las interacciones entre DNA y MN.

Los compuestos capaces de intercalarse en el DNA contienen una estructura aromática policíclica plana que puede insertarse entre dos pares de bases de la doble hélice de DNA. Esto causa un desenrollamiento local de la doble hélice, esto es, una disminución en el *twist* local del DNA; el desenrollamiento local de la doble hélice es de aproximadamente  $26^\circ$  (Calladine et al., 2004c). Por lo tanto, a una concentración crítica de bromuro de etidio, el DNA estará completamente relajado (sin hiperenrollamiento), el retorcimiento (*writhe*) promedio de la molécula original será cancelado por la reducción en el *twist* causado por la intercalación del colorante ( $Wr = 0$ ,  $Tw = Lk$ ). Conforme se incrementa la concentración de bromuro de etidio el DNA mostrará nuevamente una compactación debido al incremento de *writhe* positivo en un grado equivalente a la muestra inicial. El bromuro de etidio y otros intercaladores de este tipo actúan de la misma manera que el incremento en la temperatura, o que la disminución en la concentración de iones positivos, estos factores alteran el nivel de hiperenrollamiento (pero no el *linking number*) de un DNA circular cerrado. Estos cambios pueden ser descritos en términos de alteraciones en el *twist*, conduciendo a consecuentes cambios en el *writhe*, o en términos de cambios en  $Lk^0$  y por lo tanto conduciendo a cambios en  $Lk$  ( $\Delta Lk$ ).

La afinidad de unión intrínseca del bromuro de etidio es modulada por el estado topológico del DNA. El EBr se unirá con mayor afinidad al DNA con hiperenrollamiento negativo que a una molécula sin hiperenrollamiento (por ejemplo DNA circular nickeado), dado que la unión resulta en una reducción en el hiperenrollamiento negativo o del *twist* en el caso de moléculas circulares de DNA relajadas (sin hiperenrollamiento).

Los bucles de DNA desnudo anclado a la MN constituyen un nucleoide. Bajo las condiciones de lisis empleadas para generar nucleoides el DNA permanece intacto, pero éste carece de nucleosomas debido a la disociación de histonas y otras proteínas de la cromatina (Cook et al., 1976). Los bucles de DNA están topológicamente limitados al estar anclados a la MN y su comportamiento es equivalente al de un círculo de DNA. Los bucles de DNA desnudo tienen un gradiente de hiperenrollamiento que va de menor a mayor de la punta a la base del bucle, pero se ha sugerido que justo en el sitio de anclaje las propiedades de los MARs les permiten funcionar como *buffers* de hiperenrollamiento negativo y de esta manera evitan hiperenrollamiento máximo en la base de los bucles (Bode et al., 1996; Benham et al., 1997). El análisis de los nucleoides mediante el tratamiento con bromuro de etidio a una concentración limitada ocasiona el desenrollamiento de los bucles de DNA anclados a la MN (Aranda-Anzaldo y Dent, 1997), este fenómeno se observa bajo el microscopio de fluorescencia como la expansión de un halo fluorescente en la periferia de la MN (Figura 22). Este análisis biofísico pone de manifiesto que el genoma se organiza en bucles hiperenrollados restringidos topológicamente por su unión con la MN, ya que el EBr actúa como palanca molecular que ejerce fuerza de tracción en los sitios de anclaje (Aranda-Anzaldo y Dent, 1997). También muestra evidencia de la estabilidad de las interacciones entre DNA-MN, así como de la robustez de la estructura del nucleoide (Aranda-Anzaldo y Dent, 1997; Martínez-Ramos et al., 2005).

El tratamiento de los nucleoides con 80 µg/ml de EBr reveló la expansión del halo de fluorescencia que rodea a la matriz nuclear (Figura 24). Las características observadas durante la dinámica de expansión del halo, tales como el tiempo de expansión del halo, la simetría y homogeneidad del mismo, la resistencia al tratamiento con el bromuro de etidio y la permanencia de la integridad del nucleoide después de la expansión del halo; constituyen la evidencia de la organización del genoma en bucles hiperenrollados restringidos topológicamente por su unión con la MN, así como de la estabilidad de las interacciones DNA-MN. La dinámica del fenómeno de expansión del halo fue similar entre la rata y el ratón, lo cual sugiere que la organización global en bucles estructurales asociados con la MN y la estabilidad de las interacciones DNA-MN son

altamente similares entre ambas especies. Para corroborar este resultado se determinó el tamaño promedio del radio del halo de DNA de los nucleoides de hepatocitos.

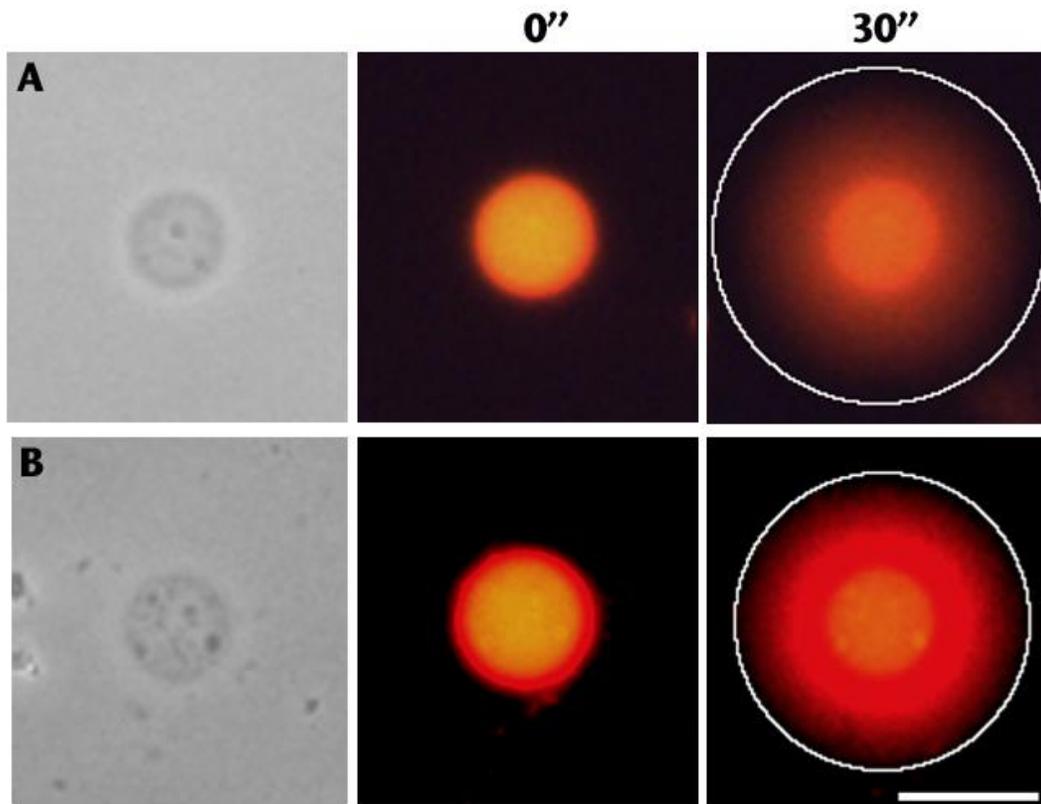


Figura 24. Micrografías 40X de nucleoides de hepatocitos tratados con 80  $\mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio para inducir el desenrollamiento de los bucles de DNA y la relajación de los mismos, de esta manera se forma un halo de fluorescencia alrededor del contorno de la NM. (A) Rata y (B) Ratón. Primer panel: contraste de fases. 0'' corresponde al tiempo cero de exposición a la fluorescencia, 30'' indica 30 segundos después de la exposición a la fluorescencia cuando el halo se ha expandido completamente. La región de interés marcada en blanco delimita el contorno del halo de fluorescencia a partir del cual se determinó el tamaño promedio del radio del halo. Barra=15  $\mu\text{m}$ .

Se determinó el tamaño promedio del radio del halo de DNA en  $\mu\text{m}$ , a partir del contorno de la MN al límite exterior del halo de DNA mediante una herramienta del software Image J (Auto Local Thresholdv.1.16.1). Se probaron diferentes algoritmos para la detección del contorno del halo de fluorescencia de los nucleoides, los cuales establecen un umbral determinado para la detección del contorno de la señal de fluorescencia (Tabla 5); se decidió usar el método Median (<http://homepages.inf.ed.ac.uk/rbf/HIPR2/adpthrsh.htm>) debido a que con este se pudo medir de manera consistente el mayor número de muestras. El radio promedio del halo en hepatocitos de rata fue de  $14.1 \pm 2.3 \mu\text{m}$ , mientras que en el ratón de  $13.0 \pm 1.3 \mu\text{m}$  (Tabla 6). Es posible estimar el tamaño promedio de un bucle de DNA a partir de la medición del halo de fluorescencia que se forma por el tratamiento con el EBr, utilizando el factor de conversión:  $0.34 \mu\text{m}/1000 \text{ pb}$ , para DNA relajado sin hiperenrollamiento (Smith y Wood, 1992). De esta manera se obtuvo el tamaño promedio del bucle de DNA en hepatocitos, para la rata fue de  $82.9 \text{ kpb}$  y para el ratón  $76.7 \text{ kpb}$  (Tabla 6). El tamaño promedio del bucle estimado en hepatocitos de rata es consistente con el previamente reportado (Maya-Mendoza et al., 2005).

Tabla 5. Métodos empleados para la determinación del radio del halo de los nucleoides de hepatocitos y neuronas en la rata y en el ratón. Los métodos señalados son una herramienta del software Image J (Auto Local Thresholdv.1.16.1).

MÉTODO	HEPATOCITOS (radio del halo en $\mu\text{m}$ )		MÉTODO	NEURONAS (radio del halo en $\mu\text{m}$ )	
	RATA	RATÓN		RATA	RATÓN
OTSU	$14.57 \pm 2$ (n=38)	$13.35 \pm 2.15$ (n=24)	OTSU	$6.6 \pm 1$ (n=43)	$9.55 \pm 1$ (n=102)
CONTRAST	$11.74 \pm 1.65$ (n=31)		PHANKASTAR		$8.56 \pm 1.79$ (n=45)
MEDIAN	$14.10 \pm 2.25$ (n=32)	$13.04 \pm 1.3$ (n=74)	MEDIAN	$8.24 \pm 0.88$ (n=44)	$8.15 \pm 0.86$ (n=134)

Tabla 6. Radio del halo de fluorescencia de los nucleoides de hepatocitos y neuronas en la rata y en el ratón. Tamaño promedio del bucle de DNA estimado para hepatocitos y neuronas en la rata y en el ratón.

	Hepatocitos		Neuronas	
	Rata n=32	Ratón n=74	Rata n=43	Ratón n=135
Radio del halo en $\mu\text{m}$	14.1 $\pm$ 2.3	13.0 $\pm$ 1.3	8.24 $\pm$ 0.88	8.15 $\pm$ 0.86
Tamaño del bucle de DNA de la base a la punta en kbp	41.47	38.35	24.23	23.97
Tamaño promedio de un bucle de DNA en kbp	82.94	76.7	48.46	47.94

El tratamiento de los nucleoides neuronales con 80  $\mu\text{g/ml}$  de EBr reveló la expansión del halo de fluorescencia que rodea de manera simétrica a la matriz nuclear (Figura 25). Las características de tiempo de expansión del halo, la simetría y homogeneidad del mismo, la resistencia al tratamiento con el bromuro de etidio y la permanencia de la integridad del nucleoide después de la expansión del halo, fueron bastante similares entre rata y ratón.

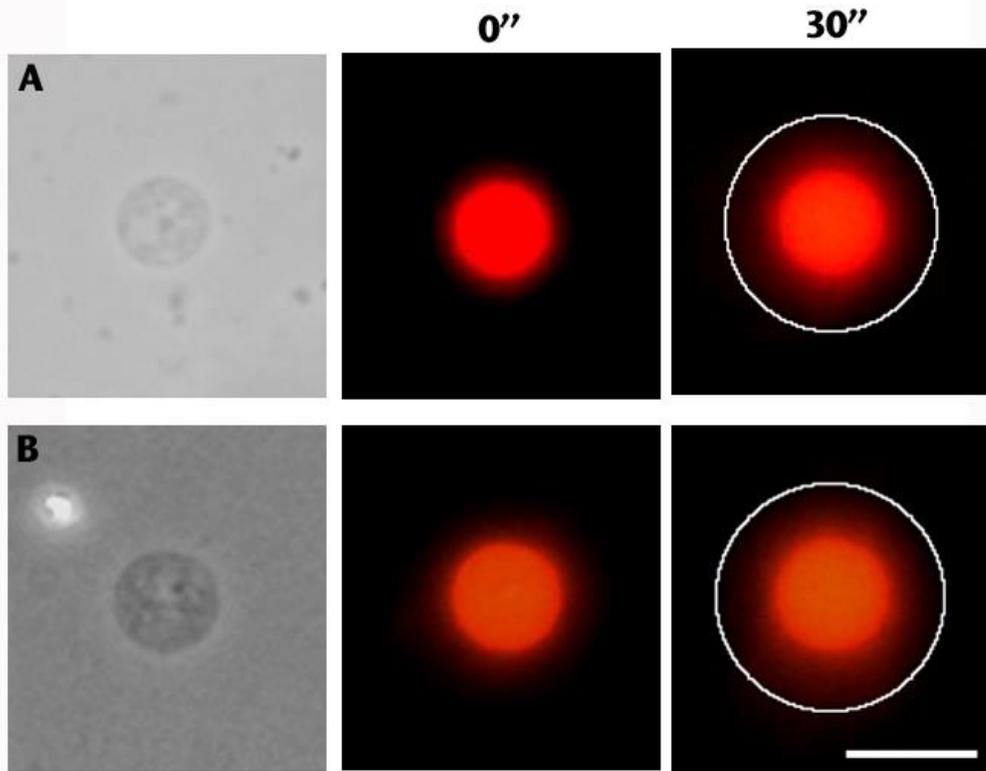


Figura 25. Micrografías 40X de nucleoides neuronales tratados con 80  $\mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio para inducir el desenrollamiento de los bucles de DNA y la relajación de los mismos, de esta manera se forma un halo de fluorescencia alrededor del contorno de la MN. (A) Rata y (B) Ratón. Primer panel: contraste de fases. 0'' corresponde al tiempo cero de exposición a la fluorescencia, 30'' indica 30 segundos después de la exposición a la fluorescencia cuando el halo se ha expandido completamente. La región de interés marcada en blanco delimita el contorno del halo de fluorescencia a partir del cual se determinó el tamaño promedio del radio del halo. Barra=15  $\mu\text{m}$ .

Para completar la caracterización biofísica de los nucleoides neuronales se determinó el tamaño promedio del radio del halo de DNA, el cual fue de  $8.24 \pm 0.88 \mu\text{m}$  en la rata y  $8.15 \pm 0.86 \mu\text{m}$  en el ratón (Tabla 6). El tamaño promedio estimado del bucle en neuronas fue de 48.5 kb y 47.9 kb, respectivamente en la rata y en el ratón. El tamaño

promedio del bucle estimado en neuronas de rata es consistente con el previamente reportado (Alva-Medina et al., 2011).

En la rata, el tamaño promedio del radio del halo en neuronas es 42% más pequeño que el de los hepatocitos; en el ratón, el tamaño promedio del radio del halo de neuronas resultó ser 38% más pequeño que el de los hepatocitos. Comparando el mismo tejido entre especies se encontró una similitud tanto en el estudio biofísico de los nucleoides como en el tamaño promedio del bucle de DNA. Estos resultados sugieren que la organización del DNA en bucles estructurales a nivel global, así como la estabilidad de las asociaciones DNA-MN, son muy similares en la rata y el ratón.

En las micrografías de contraste de fases las matrices nucleares, tanto de hígado como de neuronas, son estructuras indistintas entre la rata y el ratón; se pueden describir ambas matrices nucleares como estructuras que mantienen el volumen y la forma del núcleo (Figuras 24 y 25).

## **Cinéticas de digestión con DNasa I**

Al interior del núcleo celular, el DNA desnudo se organiza formando bucles hiperenrollados que se estabilizan por una estrecha asociación con la MN. Desde el punto de vista topológico, estos bucles de DNA son equivalentes a círculos de DNA cerrados de manera covalente y su estructura tridimensional puede ser estudiada utilizando parámetros y/o principios topológicos. El DNA libre de las proteínas de la cromatina adopta un hiperenrollamiento tipo plectonémico; debido a la estructura propia de la molécula de DNA, este hiperenrollamiento disminuye hacia la punta del bucle, siendo ésta la parte más relajada del mismo (Figura 27).

En nuestro laboratorio se desarrolló un método para determinar la estructura tridimensional de los bucles de DNA asociados con la MN de cualquier región genómica con secuencia conocida (Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo, 2003; Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010). El método se fundamenta en principios topológicos

elementales tales como las relaciones de vecindad y/o proximidad y la continuidad del objeto que se estudia. Con base en estos conceptos se tiene que el mapeo topológico de los puntos a, b, c... en una fibra deformable, pero continua (como el DNA), corresponde a su posición relativa con respecto a una estructura de referencia invariante en su posición (como la MN), de manera que a partir del patrón de mapeo topológico puede deducirse la conformación en tercera dimensión de la fibra (Figura 26).

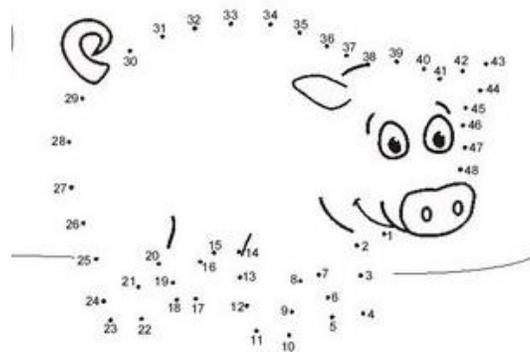


Figura 26. Dibujo que ilustra el principio topológico elemental a partir del cual el mapeo topológico de los puntos en una fibra deformable (cerdito), con respecto a una posición de referencia que no varía (la línea que representa la base o el suelo), sirve para determinar la forma tridimensional de la fibra.

El método desarrollado explota las propiedades topológicas de los bucles de DNA asociados con la MN, al someter a digestión con nucleasas inespecíficas como la DNasa I, que es una enzima sensible a la topología del DNA (Lewin, 1994). En una preparación de nucleoides sometidos a digestión con DNasa I, usando concentraciones limitadas (0.5 U/ml), los bucles muestran una resistencia que es directamente proporcional a su proximidad con la MN (Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo 2003; Maya-Mendoza et al., 2004) Figura 27. Este comportamiento se debe principalmente a

dos factores: i) el impedimento estérico dado por las proteínas de la MN, que actúan como una barrera física que protege relativamente al DNA desnudo que está más cerca de la MN de la acción de la enzima. ii) el grado de hiperenrollamiento en el bucle de DNA representa una barrera estructural contra la acción de la DNasa I, ya que ésta hidroliza el DNA por un mecanismo de escisión de hebra sencilla (*nicking*). Estos factores confieren resistencia relativa, más no absoluta al corte por la DNasa I. Sin embargo, en una muestra grande de nucleoides expuestos a concentraciones limitadas de DNasa I, hay una tendencia consistente en la cual la sensibilidad del bucle de DNA a la enzima es inversamente proporcional a su distancia relativa a la MN. De aquí, que las regiones distales del bucle sean digeridas primero, mientras que las regiones más cercanas a la MN son digeridas después (Figura 27). De hecho, el DNA embebido dentro de la MN es muy resistente a la acción de la DNasa I, y existe una fracción que corresponde alrededor del 2% del DNA total que es básicamente no digerible, incluso cuando se expone a altas concentraciones de la enzima. Esta fracción corresponde a fragmentos con una longitud promedio de 1.5 kpb en hepatocitos de rata (Berezney y Buchholtz, 1981), y probablemente representan las regiones que incluyen los anclajes de los bucles a la MN (LARs).

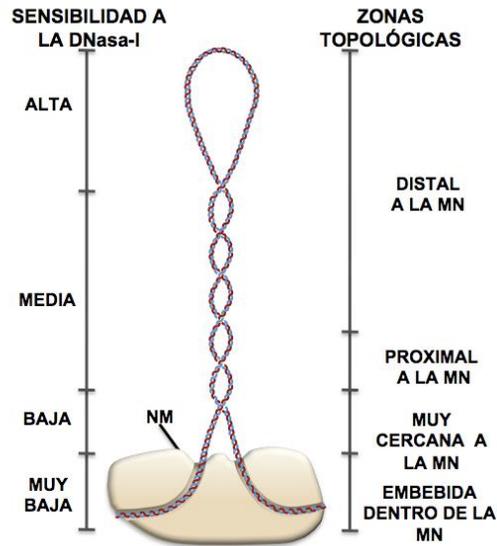


Figura 27. Esquema de un bucle de DNA típico (DNA desnudo) asociado con la MN. Se muestran las propiedades topológicas del bucle como son el hiperenrollamiento que es menor en la punta del bucle y la relación de proximidad relativa del DNA con la MN. Debido a esta topología, los bucles de DNA muestran una sensibilidad diferencial al corte por la DNasa I. En el método desarrollado se establece una correlación entre la distancia relativa del bucle de DNA a la MN y la sensibilidad al corte por la DNasa I. Con base en las cinéticas de digestión de los nucleoides con DNasa I, se definen zonas topológicas que indican la distancia relativa del bucle a la MN. Tomado y modificado de Rivera-Mulia, 2010 Tesis Doctoral.

El intervalo de concentraciones de DNasa I usadas fue de 0.5 a 1.0 U/ml (Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo, 2003). El tratamiento de nucleoides de hepatocitos de rata con estas concentraciones resultó en cinéticas de digestión altamente reproducibles (Figura 28). Es posible identificar tres fases en la cinética de digestión típica, la primera corresponde a una fase muy rápida que remueve más del 50% del total de DNA asociado con la MN dentro de los primeros 5 minutos. Esta fracción de DNA corresponde a la fracción del bucle distal a la MN y tiene un grado de hiperenrollamiento relativamente menor, que actúa como la única barrera a la acción de la endonucleasa. Sin embargo, conforme la DNasa I 'nickea' el bucle de DNA, cada

*nick* es un punto de ulterior desenrollamiento, y esto disminuye el grado de hiperenrollamiento en función del tiempo, haciendo al bucle de DNA más accesible a la acción de la endonucleasa. Sin embargo, la fricción del medio acuoso circundante impide que el proceso de desenrollamiento del bucle sea instantáneo (Nelson, 1999). La segunda fase dura 10 minutos, y muestra una cinética lenta en la cual aproximadamente 10% del DNA residual es eliminado; esta fracción de DNA corresponde a la fracción del bucle de DNA proximal a la MN. Esta cinética lenta es el resultado de una velocidad más lenta en la pérdida del hiperenrollamiento en el bucle de DNA próximo a la MN (originalmente altamente hiperenrollado) que frena la acción de la enzima. La tercera es la fase más lenta, y dura 45 minutos; en ésta aproximadamente 10% del DNA residual asociado con la MN es eliminado. Esta cinética muy lenta resulta de dos factores: i) el hiperenrollamiento residual en la fracción del bucle de DNA que se asocia con la MN y ii) principalmente la proximidad con la MN que actúa como barrera física contra la acción de la DNasa I. La fracción de DNA que es eliminado en esta fase corresponde a la zona topológica muy cercana a la MN. Finalmente, aproximadamente 20% del DNA total permanece unido a la MN incluso después de 60 minutos de digestión. Esta fracción corresponde al DNA que está embebido dentro de la MN y es resistente a la digestión con DNasa I. Estas tres fases de la cinética de digestión se describen en términos de los cambios en las pendientes correspondientes a los siguientes intervalos de digestión: 0-5 min, 5-15 min, 15-30 min y 30-60 min. El método utiliza el concepto de 'zona topológica' para indicar la proximidad relativa de un bucle de DNA con respecto a la MN; de la base a la punta del bucle se establecieron cuatro zonas topológicas con respecto a la MN, denominadas: embebida en la MN, muy cercana a la MN, proximal a la MN y distal a la MN, respectivamente. Las respectivas pendientes y las desviaciones estándar de los tiempos 5, 15, 30 y 60 minutos de digestión, son las variables que se utilizaron para definir cada zona topológica con respecto a la MN (Figuras 27 y 28).

El daño al DNA debido a la incorrecta preparación de nucleoides, o a la presencia natural de DNA nickeado en algunos tipos celulares terminalmente diferenciados (tales como los linfocitos activados) produce una curva de digestión bifásica (una fase rápida

y otra lenta) dado que el hiperenrollamiento en los bucles de DNA se ha perdido o se ha reducido de manera importante. Sin embargo, en todas las preparaciones de nucleoides tratados con una cantidad limitada de DNasa I, hay una fracción del DNA total que es resistente a la acción de la enzima por estar embebido dentro de la MN; este DNA es fácilmente identificable en las curvas de digestión como la fracción que es digerida muy lentamente o es resistente a la digestión, de manera que la pendiente local es o se aproxima a cero y permanece sin cambio incluso después de tiempos prolongados de incubación con la enzima.

De esta manera, el comportamiento de la cinética de digestión nos informa de manera indirecta sobre las características de la organización del DNA en bucles asociados con la MN (hiperenrollamiento e integridad de los bucles). Cada fase de la cinética representa, de manera gráfica, las zonas topológicas con respecto a la MN, establecidas para realizar el mapeo topológico de cualquier región genómica con secuencia conocida (Figura 28).

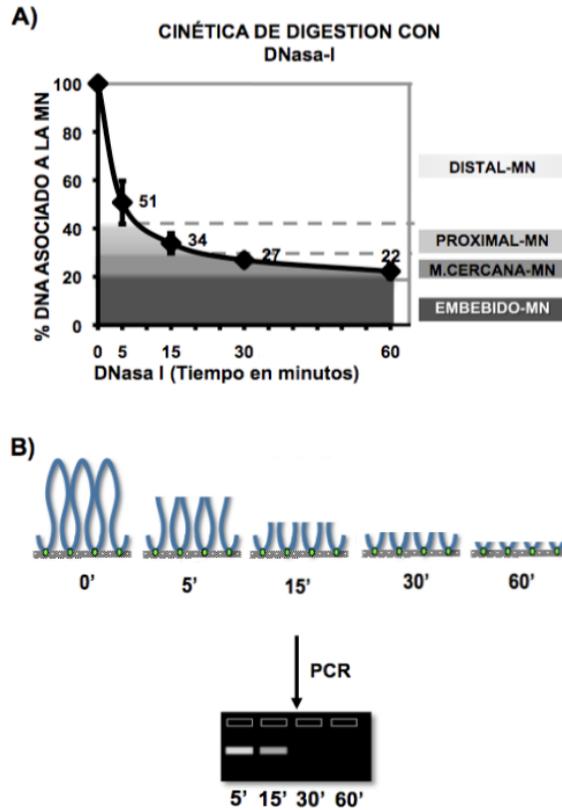


Figura 28. A) Las cinéticas de digestión con DNasa-I de los nucleoides muestran un comportamiento muy homogéneo que consta de tres fases, lo que permite establecer zonas topológicas relativas a la MN (distal, proximal, muy cercana Y embebida). B) El DNA residual de los nucleoides parcialmente digeridos obtenidos a diferentes tiempos de digestión con DNasa I, es usado directamente como templado en la PCR. Para determinar la posición de las secuencias de interés se analizan los amplicones en geles de agarosa y se registra su presencia como positiva (+) o negativa (-) para cada una de las zonas topológicas establecidas en función de la cinética de digestión. Tomado y modificado de Rivera-Mulia, 2010 Tesis Doctoral.

El DNA residual físicamente asociado a la MN, en cada tiempo de digestión establecido, es utilizado directamente como templado en la PCR para determinar la posición relativa con respecto a la MN de ciertos puntos de interés en el genoma (Figura 28). Tanto la longitud de persistencia intrínseca del DNA de secuencia

aleatoria, estimada en aproximadamente 150 a 300 pb, y el hiperenrollamiento negativo, confieren rigidez relativa a los bucles de DNA, limitando parcialmente su deformabilidad, de tal manera que las posiciones determinadas de las secuencias del bucle de DNA relativas a la MN son altamente reproducibles entre experimentos, indicando fluctuaciones limitadas de la morfología del bucle de DNA en el tiempo (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010).

Con base en estas consideraciones sobre el método topológico utilizado en este trabajo, los nucleoides de hepatocitos de rata y de ratón se sometieron a digestión con 0.5 U/ml de DNasa I por espacio de una hora. Las cinéticas de digestión de la rata y el ratón mostraron el mismo comportamiento, de manera que fue posible definir zonas topológicas relativas a la MN equivalentes para ambos casos (Tabla 7).

Tabla 7. Pendientes de las cinéticas de digestión del DNA asociado a la MN en hepatocitos de rata y de ratón. Usando la cinética de digestión promedio se determinaron las pendientes entre los intervalos de digestión correspondientes. Las pendientes y las desviaciones estándar de cada tiempo de digestión establecido fueron usadas para definir las zonas topológicas con respecto a la MN, las cuales indican la proximidad relativa del DNA a la MN.

<b>hígado rata</b>			<b>hígado ratón</b>		
<b>Intervalo de digestión</b>	<b>Pendiente</b>	<b>Zona relativa a la MN</b>	<b>Intervalo de digestión</b>	<b>Pendiente</b>	<b>Zona relativa a la MN</b>
<b>0 – 5</b>	- 10.8	Distal	<b>0 – 5</b>	- 9.2	Distal
<b>5 – 15</b>	- 1.5	Proximal	<b>5 – 15</b>	- 2.0	Proximal
<b>15 – 30</b>	- 0.33	Muy cercana	<b>15 – 30</b>	- 0.6	Muy cercana
<b>30 – 60</b>	- 0.16	Muy cercana	<b>30 – 60</b>	- 0.16	Muy cercana
<b>&gt; 60</b>	→ 0	Embebida	<b>&gt; 60</b>	→ 0	Embebida

Para la rata, las zonas topológicas corresponden a los siguientes porcentajes del DNA total asociado a la MN: distal = 55%, proximal = 18%, muy cercana = 9% y embebida = 18% (Tabla 8 y Figura 29).

Para el ratón, las zonas topológicas corresponden a los siguientes porcentajes del DNA total asociado a la MN: distal = 49%, proximal = 20%, muy cercana = 12% y embebida = 19% (Tabla 9 y Figura 30).

Desde el punto de vista topológico la morfología de las cinéticas es la misma. Este resultado da información de las características globales de la NHOS, tales como el hiperenrollamiento y las asociaciones con la MN.

Cabe señalar que para el caso del ratón se realizaron cinéticas de digestión de animales de uno, dos y tres meses de edad por separado. De manera interesante, se encontró que las morfologías de dichas cinéticas se mantuvieron sin cambios en este intervalo de tiempo (Figura 31).

Tabla 8. Tiempos de digestión con DNasa I (0.5 U/ml) de nucleoides de hepatocitos de rata. En la segunda columna se aprecia el descenso progresivo de DNA asociado a la MN conforme avanza el tiempo de digestión. En la cuarta columna se nota el aumento en la cantidad de DNA total que se digirió. Se indica la zona topológica correspondiente a cada tiempo de digestión.

Tiempo de digestión (min)	% DNA residual promedio $\pm$ DE (n=4)	% DNA digerido*	% del DNA total que se ha perdido	Fase de la cinética de digestión	Zona Topológica
0	100	0	0		CONTROL
5	46.16 $\pm$ 1	54.6	54.6	Rápida	DISTAL
15	31.0 $\pm$ 3.6	18.0	72.6	Lenta	PROXIMAL
30	26.0 $\pm$ 2.6	4.0	76.6	Muy lenta	MUY CERCANA
60	21.2 $\pm$ 2.9	5.1	81.8	Muy lenta	MUY CERCANA
> 60	18.2	→ 0	81.8	DNA resistente	EMBEBIDA

\*Corresponde al % de DNA que se localiza en dicha zona topológica  
DE: desviación estándar

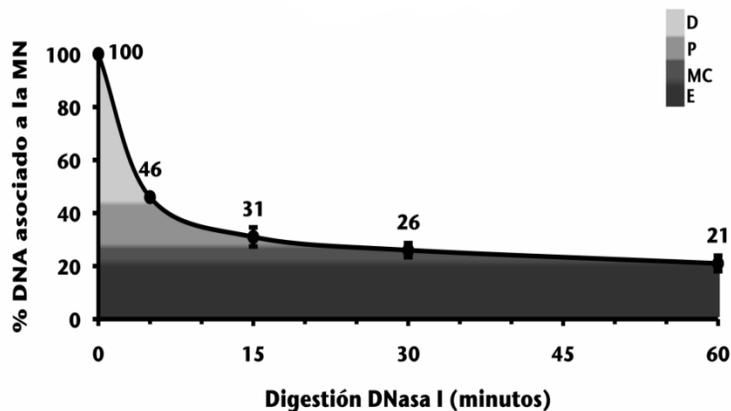


Figura 29. Cinéticas de digestión promedio de nucleoides de hepatocitos de rata. Los nucleoides fueron digeridos con DNasa I (0.5 U/ml) por 60 minutos. Se muestran las desviaciones estándar para cada tiempo de digestión correspondiente. Las pendientes entre los intervalos de tiempo correspondientes y las desviaciones estándar describen las zonas topológicas relativas a la MN; Distal: 100-45%, Proximal: 45-30%, Muy cercana: 30-18% y Embebida: 18-0%.

Tabla 9. Tiempos de digestión con DNasa I (0.5 U/ml) de nucleoides de hepatocitos de ratón. En la segunda columna se aprecia el descenso progresivo de DNA asociado a la MN conforme avanza el tiempo de digestión. En la cuarta columna se nota el aumento en la cantidad de DNA total que se digirió. Se indica la zona topológica correspondiente a cada tiempo de digestión.

Tiempo de digestión (min)	% DNA residual promedio y DE (n=4)	% DNA digerido*	% del DNA total que se ha perdido	Fase de la cinética de digestión	Zona Topológica
0	100	0	0		CONTROL
5	53.8±2.6	48.8	48.8	Rápida	DISTAL
15	34.4±2.9	19.6	68.5	Lenta	PROXIMAL
30	25.4±1.0	7.1	75.6	Muy lenta	MUY CERCANA
60	20.4±1.2	5.2	80.8	Muy lenta	MUY CERCANA
> 60	19	→ 0	80.8	DNA resistente	EMBEBIDA

\*Corresponde al % de DNA que se localiza en dicha zona topológica  
DE: desviación estándar

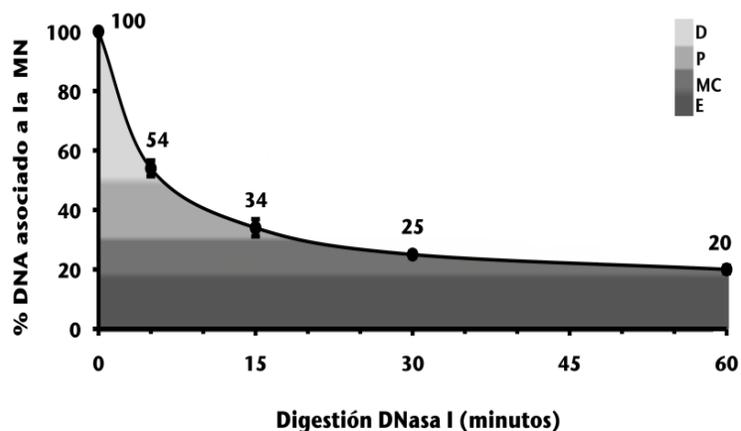


Figura 30. Cinéticas de digestión promedio de nucleoides de hepatocitos de ratón (20-30 g). Los nucleoides fueron digeridos con DNasa I (0.5 U/ml) por 60 minutos. Se muestran las desviaciones estándar para cada tiempo de digestión correspondiente. Las pendientes entre los intervalos de tiempo correspondientes y las desviaciones estándar describen las zonas topológicas relativas a la MN; Distal: 100-51%, Proximal: 51-31%, Muy cercana: 31-19% y Embebida: 19-0%.

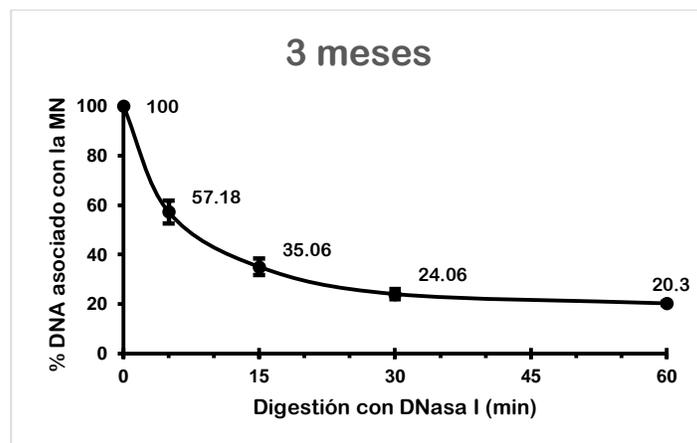
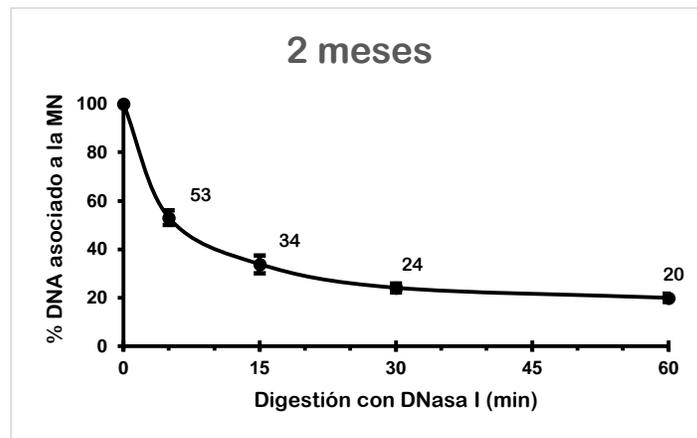
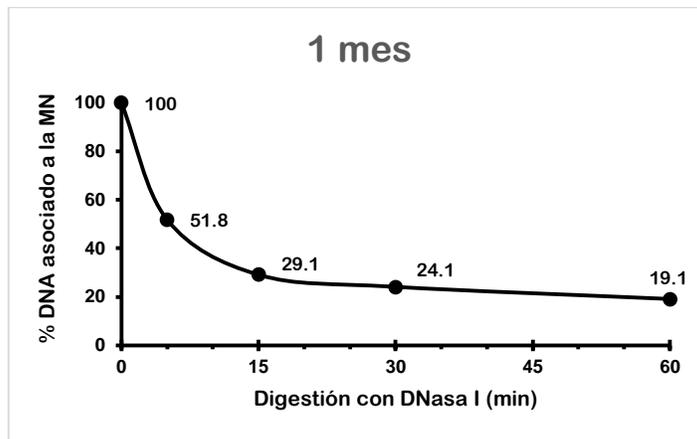


Figura 31. Cinéticas de digestión promedio de nucleoides de hepatocitos de ratón de uno, dos y tres meses de edad. Se muestran las desviaciones estándar para cada tiempo de digestión correspondiente. Ratones de 1 mes (n=1); 2 meses (n=5), 3 meses (n=5).

Por último, se realizaron cinéticas de digestión de los ratones de un mes de edad sometidos a restricción calórica a partir del destete (aporte del 60% del consumo típico diario). Se encontró que la cinética de digestión con DNasa I es muy similar a la cinética de digestión promedio que se obtuvo para hepatocitos de uno, dos y tres meses de edad alimentados *ad libitum* (Figura 32). Cabe recordar que en los ratones sometidos a restricción calórica se observó una disminución importante en el porcentaje de hepatocitos binucleados (del 80% a  $\leq 60\%$ ) y una menor cantidad de lípidos en los hepatocitos, con respecto a los ratones de 1-3 meses de edad alimentados *ad libitum*. Sin embargo, no se observaron cambios en el comportamiento de la cinética de digestión en estos grupos de estudio.

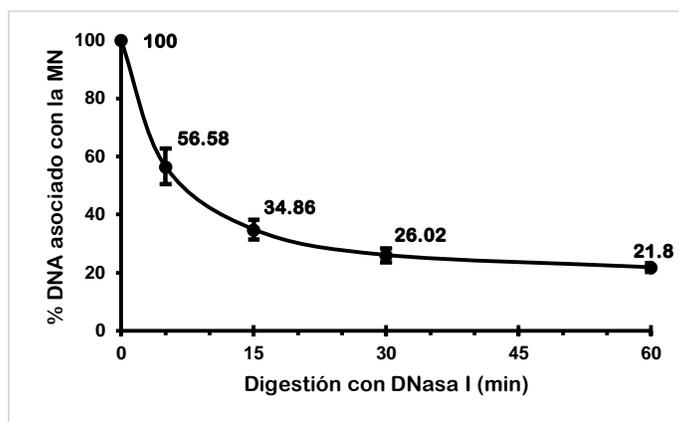


Figura 32. Cinéticas de digestión promedio de nucleoides de hepatocitos de ratón (de un mes de edad) sometidos a restricción calórica. Se muestran las desviaciones estándar para cada tiempo de digestión correspondiente, n=5.

Se realizó un experimento de control de lavados en hepatocitos de ratón mediante el cual se verificó que el DNA residual en cada tiempo de digestión (que corresponde al DNA de cada zona topológica respectiva) no estuviera asociado de manera inespecífica con fragmentos de DNA producto de la digestión con DNasa I después de los lavados (Figura 33).

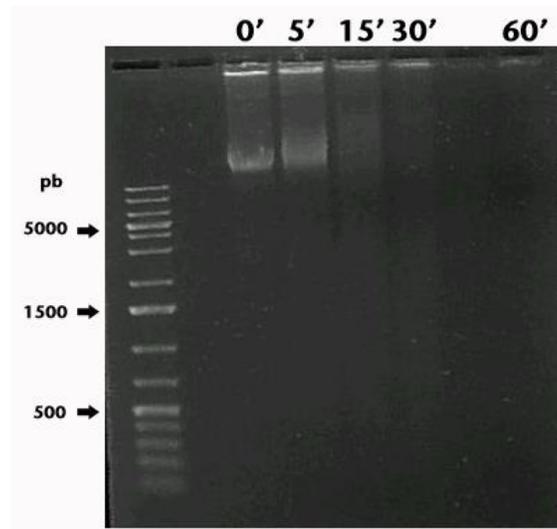


Figura 33. Gel de agarosa 1% TBE 0.5X, teñido con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Primer carril escalera de peso molecular. Muestras de nucleoides parcialmente digeridos con DNasa I (0.5 U/ml) a 0, 5, 15, 30 y 60 minutos de digestión. Cada carril fue cargado con 1 µg de DNA. Este gel pone en evidencia que la electroforesis puede desprender DNA anclado a la MN: los dos primeros carriles muestran una banda consistente de DNA de relativo alto peso molecular que es liberado de los nucleoides sin digerir o digeridos por 5', esta señal disminuye en función del tiempo de digestión. El tamaño de los fragmentos de la banda dominante en 5' es demasiado grande como para ser causado por la digestión con DNasa I que se sabe produce fragmentos con un rango promedio de 0.5 a 1.5 kpb. La ausencia de un barrido correspondiente a fragmentos de DNA menores a 2 kpb en los carriles correspondientes a muestras digeridas con DNasa I indica que los lavados son eficaces y que los fragmentos cortados por la DNasa I no se re-asocian de manera inespecífica con la MN. El gel se corrió a 100 V durante 60 minutos.

## **Mapeo topológico con respecto a la MN de las ocho secuencias diana en hepatocitos de rata y de ratón**

Para indagar si existen factores de tipo biológico que determinen cuáles son las regiones en el DNA que se asocian con la NM (LARs) y que definen los bucles estructurales de DNA, se realizó un estudio comparativo de la posición con respecto a la MN de ocho secuencia diana que están conservadas entre ambas especies, a fin de establecer si existen diferencias (o no) en el patrón de asociación entre el DNA y la MN en ambas especies de roedor. Las secuencias diana estudiadas se localizan en diferentes cromosomas, de manera que constituyen una muestra representativa de diferentes territorios cromosómicos al interior del núcleo.

Para ello, el DNA residual anclado a la MN después de la digestión con DNasa I para cada tiempo de digestión establecido (0, 5, 15, 30 y 60 minutos) fue usado directamente como templado en la PCR a fin de mapear la posición relativa a la MN de las ocho secuencias diana utilizadas.

En el protocolo de mapeo la señal de las secuencias blanco se marca como presente (amplificable) o ausente (no amplificable) en función del tiempo de digestión con DNasa I, según se detecte o no en un programa de análisis de imágenes. No se considera la intensidad de las señales de amplificación debido a que la propiedad de localidad en el espacio es una propiedad factual y no estadística (Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo, 2003; Maya-Mendoza et al., 2004; Rivera-Mulía y Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García y Aranda-Anzaldo, 2012; Castillo-Mora y Aranda-Anzaldo, 2012).

La concentración óptima de *primers* para *Nef-I* en la rata fue de 0.6  $\mu\text{M}$ , pero se realizó un experimento usando 0.3  $\mu\text{M}$ . Esto a fin de igualar las condiciones de amplificación entre la rata y el ratón, ya que los oligos del ratón mostraron buena eficiencia de amplificación usando 0.2  $\mu\text{M}$  de cada oligo (Figura 16). El resultado se muestra en la figura 34, se observa que usando 0.3  $\mu\text{M}$  de cada oligo en la rata, la señal de amplificación disminuye considerablemente, por lo que se decidió usar la concentración de 0.6  $\mu\text{M}$  en ambos casos (Figura 34).

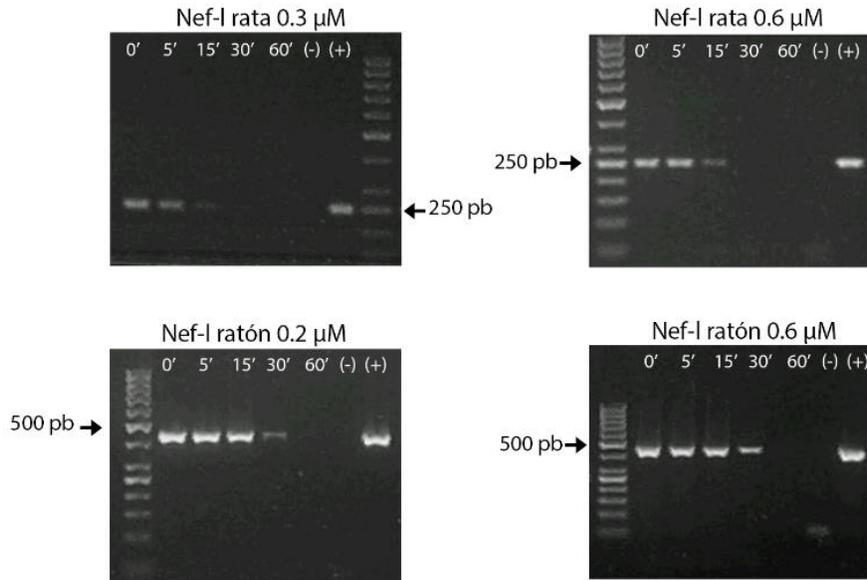


Figura 34. Amplificación de la secuencia diana del gen neurofilamento ligero (*Nef-l*) en la rata y en el ratón. Se probaron dos concentraciones de *primers* (0.2 y 0.6  $\mu\text{M}$ ). En el caso de la rata, se usó 0.3  $\mu\text{M}$  de cada *primer* donde la intensidad de la señal disminuye considerablemente. En el ratón se usó 0.2  $\mu\text{M}$  de cada *primer*, se aprecia que la señal de amplificación es bastante buena. La concentración óptima final usada fue de 0.6  $\mu\text{M}$  en ambos casos. Se usó como templado DNA asociado a la MN sometido a digestión con DNasa I. 0', 5', 15', 30', 60': indican minutos de digestión con DNasa I. Primer carril escalera de peso molecular (50 pb).

Se realizaron los experimentos de mapeo topológico en hepatocitos de rata y de ratón. En hepatocitos de rata las secuencias de *Alb*, *Cd86* y *Nfm-l* se ubicaron en la zona proximal; *Actb*, *Col 1a1*, *Fyn*, *CD23* y *Nef-m* se ubicaron en la zona distal (Tabla 10 y Figura 35).

Por su parte, en hepatocitos de ratón la secuencia de *Alb* se ubicó en la zona embebida; *Actb*, *Col 1a1*, *Fyn*, *Nef-l* y *Nef-m* en la zona muy cercana, *CD23* y *Cd86* en la zona proximal (Tabla 10 y Figura 35). Algunas secuencias que se localizan cercanas a los límites entre dos zonas topológicas, pueden mostrar cierta variabilidad en su posición relativa a la MN. Este fue el caso de *Alb*, entre las zonas embebida y muy

cercana y *Actb* entre las zonas muy cercana y proximal (Tabla 10). Se puede apreciar que entre la rata y el ratón los patrones de mapeo topológico contrastan entre sí; así en la rata las secuencias diana ocuparon preferencialmente zonas alejadas de la MN, mientras que en el ratón ocuparon zonas más cercanas a la MN. Siete de las ocho secuencias mapeadas (*Alb*, *Actb*, *Col1a1*, *Fyn*, *CD23*, *Nef-l* y *Nef-m*) tuvieron una localización diferente entre rata y ratón, mientras que sólo una (*Cd 86*) ocupó la misma zona en ambos casos (Tabla 10).

El mapeo topológico con respecto a la MN de las secuencias diana en los ratones de tres meses de edad se mantuvo sin cambios para las secuencias de *Alb*, *Actb*, *Col 1a1*, *Fyn* y *Nef-m*; las secuencias de *CD23*, *Cd86* y *Nef-l* mostraron un acercamiento hacia la MN con respecto a los ratones de uno a dos meses de edad (Tabla 11). Este resultado es interesante, porque se sabe que la NHOS es dinámica, permitiendo la formación de nuevos anclajes del DNA a la MN en función del tiempo (Maya-Mendoza et al., 2005; Alva-Medina et al., 2011).

Tabla10. Tabla comparativa del mapeo topológico relativo a la MN de las ocho secuencias diana entre hepatocitos de rata y de ratón. (+) Indica que el amplicón fue detectado por el software de análisis de imágenes empleado. (-) Indica que el amplicón no fue detectado por el software. (\*) Indica que en aproximadamente 50% de los experimentos, la secuencia blanco correspondiente se ubicó en la zona topológica previa. El color rojo indica diferencias entre rata y ratón. El color azul indica que el patrón de mapeo fue igual entre rata y ratón.

Amplicón	Zonas topológicas relativas a la MN en hepatocitos de rata (n=5)				Zonas topológicas relativas a la MN en hepatocitos de ratón (n=6)			
	Distal	Proximal	Muy cercana	Embebida	Distal	Proximal	Muy cercana	Embebida
<i>Alb</i>	+	+			+	+	+	+*
<i>Actb</i>	+				+	+	+*	
<i>Col1a1</i>	+				+	+	+	
<i>Fyn</i>	+				+	+	+	
<i>CD23</i>	+				+	+		
<i>Cd86</i>	+	+			+	+		
<i>Nef-l</i>	+	+			+	+	+	
<i>Nef-m</i>	+				+	+	+	

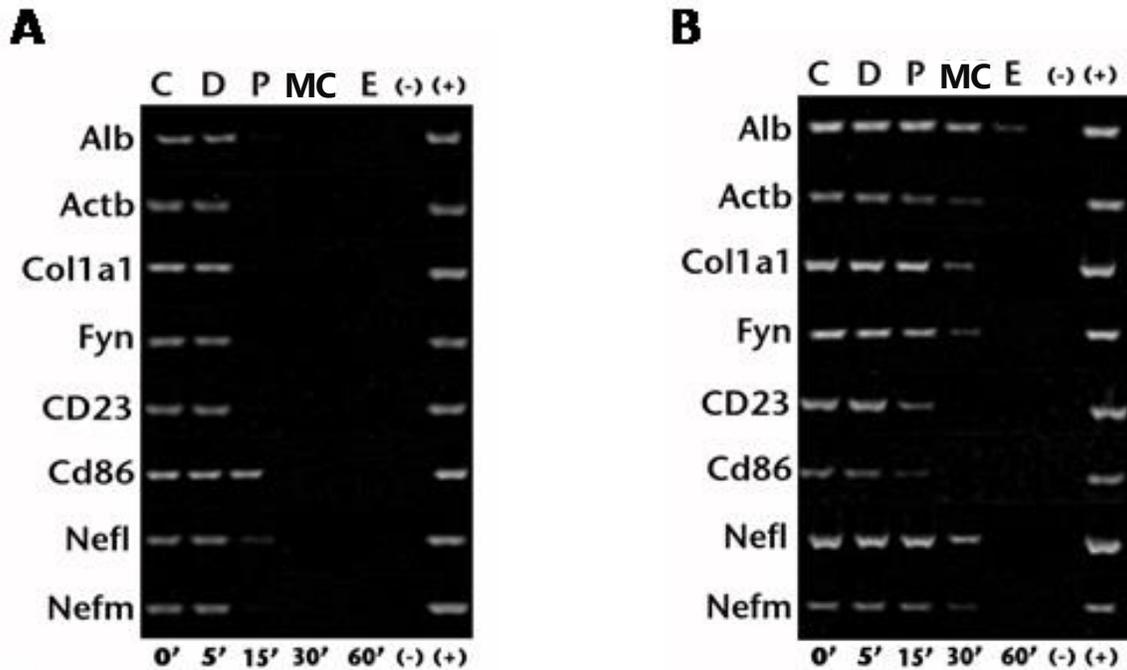


Figura 35. Ejemplo representativo del mapeo topológico con respecto a la MN de las ocho secuencias blanco en hepatocitos de rata (A) y de ratón (B). Los amplicones se consideraron como positivos o negativos mediante un software de análisis de imágenes (Kodak 1D Image Analysis Software 3.5 System) empleando los parámetros default, de esta manera se ubicaron las secuencias en las zonas topológicas correspondientes. C=control, D=distal a la MN, P=proximal a la MN, MC=muy cercana a la MN, E=embebida en la MN. (-) Indica control negativo, reacción sin DNA, (+) Indica control positivo, usando DNA genómico. 0', 5', 15', 30', 60' corresponden a los tiempos de digestión.

Tabla 11. Tabla comparativa del mapeo topológico relativo a la MN de las ocho secuencias diana en hepatocitos de ratón según la edad: de uno a dos meses de edad y de tres meses de edad. (+) Indica que el amplicón se detectó por el software de análisis de imágenes empleado. (-) Indica que el amplicón no fue detectado por el software. (\*) Indica que en ~ 50% de los experimentos, la secuencia blanco correspondiente se ubicó en la zona topológica previa. El color rojo indica las diferencias encontradas.

Amplicón	Zonas topológicas relativas a la MN en hepatocitos de ratón de 1-2 meses de edad (n=6)				Zonas topológicas relativas a la MN en hepatocitos de ratón de 3 meses de edad (n=5)			
	Distal	Proximal	Muy cercana	Embebida	Distal	Proximal	Muy cercana	Embebida
<i>Alb</i>	+	+	+	+*	+	+	+	+*
<i>Actb</i>	+	+	+*		+	+	+*	
<i>Col1a1</i>	+	+	+		+	+	+	
<i>Fyn</i>	+	+	+		+	+	+	
<i>CD23</i>	+	+			+	+	+*	
<i>Cd86</i>	+	+			+	+	+*	
<i>Nef-l</i>	+	+	+		+	+	+	+*
<i>Nef-m</i>	+	+	+		+	+	+	

Se decidió aprovechar los animales bajo restricción calórica para realizar experimentos de mapeo topológico de las ocho secuencias diana. Como se describió previamente, los animales bajo este régimen de alimentación mostraron disminución notable tanto de hepatocitos binucleados como de la cantidad de lípidos presente en los hepatocitos

aislados. Los resultados de una serie de cinco experimentos en ratones de un mes de edad bajo restricción calórica mostraron un patrón de mapeo igual al de los animales de uno a dos meses de edad alimentados *ad libitum*.

### **Mapeo topológico con respecto a la MN de las ocho secuencias diana en neuronas de rata y de ratón**

Trabajo de nuestro laboratorio ha mostrado que la NHOS de las neuronas mantiene un número mayor de anclajes del DNA a la MN en comparación con tipos celulares que no son postmitóticos, o sea, terminalmente diferenciados; por lo que, los bucles son más pequeños y tienen un tamaño más homogéneo entre sí (Alva-Medina et al., 2010, 2011; Aranda-Anzaldo, 2012; Aranda-Anzaldo et al., 2014). Debido a esta organización, la posición de las secuencias del DNA con respecto a la MN tiende también a homogenizarse, de manera que las posiciones relativas de los genes con respecto a la MN se vuelven similares, debido a que los anclajes a la MN ocurren en forma más frecuente y homogénea a lo largo de los cromosomas. Esta propiedad de la NHOS en neuronas permitió que se utilizara como caso control en el estudio comparativo realizado, dado que la organización del DNA-MN es más homogénea en las neuronas, se espera que las diferencias de la NHOS entre rata y ratón sean menores.

Para ello, los nucleoides de neuronas de rata y de ratón se sometieron a digestión con 0.9 U/ml de DNasa I durante 60 minutos. La digestión del DNA en función del tiempo puede observarse directamente bajo el microscopio de fluorescencia. Este experimento de control de la digestión de DNA se correlacionó con la cuantificación por espectrofotometría del DNA residual asociado a la MN después de la digestión (Figura 36).

En la tabla 12 se puede apreciar que las pendientes de las cinéticas de digestión de nucleoides neuronales de rata y ratón son prácticamente las mismas, de manera que fue posible definir zonas topológicas relativas a la MN equivalentes para ambos casos.

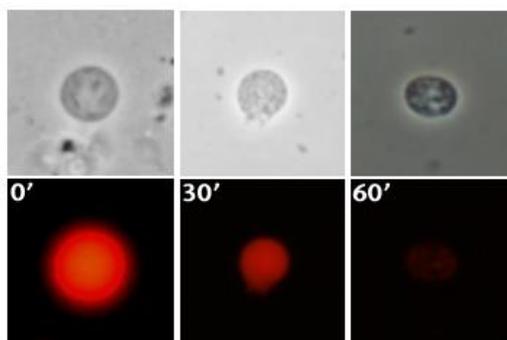


Figura 36. Micrografía 40X en contraste de fases y fluorescencia de nucleoides de neuronas de rata tratados con 80  $\mu\text{g/ml}$  de EtBr. Se obtuvieron muestras de nucleoides a los 0', 30' y 60' minutos de digestión. Se observa la disminución de la señal de fluorescencia conforme la digestión progresa en el tiempo.

Tabla 12. Pendientes de las cinéticas de digestión del DNA asociado a la MN en neuronas de rata y de ratón. Usando la cinética de digestión promedio se determinaron las pendientes entre los intervalos de digestión correspondientes. Las pendientes y las desviaciones estándar de cada tiempo de digestión establecido fueron usadas para definir las zonas topológicas con respecto a la MN.

<b>neurona rata</b>			<b>neurona ratón</b>		
Intervalo de digestión	Pendiente	Zona relativa a la MN	Intervalo de digestión	Pendiente	Zona relativa a la MN
0 – 5	- 8.8	Distal	0 – 5	- 8.8	Distal
5 – 15	- 2.2	Proximal	5 – 15	- 1.9	Proximal
15 – 30	- 0.33	Muy cercana	15 – 30	- 0.66	Muy cercana
30 – 60	- 0.2	Muy cercana	30 – 60	- 0.13	Muy cercana
> 60	→ 0	Embebida	> 60	→ 0	Embebida

Para la rata, las zonas topológicas corresponden a los siguientes porcentajes del DNA total asociado a la MN: distal = 51%, proximal = 19%, muy cercana = 9% y embebida = 22% (Tabla 13 y Figura 37).

Tabla 13. Tiempos de digestión con DNasa I (0.92 U/ml) de nucleoides de neuronas de rata. En la segunda columna se aprecia el descenso progresivo de DNA asociado a la MN conforme avanza el tiempo de digestión. En la cuarta columna se nota el aumento en la cantidad de DNA total que se digirió. Se indica la zona topológica correspondiente a cada tiempo de digestión.

Tiempo de digestión (min)	% DNA residual promedio y DE (n=4)	% DNA digerido*	% del DNA total que se ha perdido	Fase de la cinética de digestión	Zona Topológica
0	100	0	0		Control
5	56 ± 6.65	50.65	50.65	Rápida	DISTAL
15	34 ± 3.27	18.62	69.27	Lenta	PROXIMAL
30	29 ± 1	2.3	71.57	Muy lenta	MUY CERCANA
60	23 ± 1	6.43	78	Muy lenta	MUY CERCANA
> 60	22	→ 0	78	DNA resistente	EMBEBIDA

\*Corresponde al % de DNA que se localiza en dicha zona topológica  
DE: desviación estándar

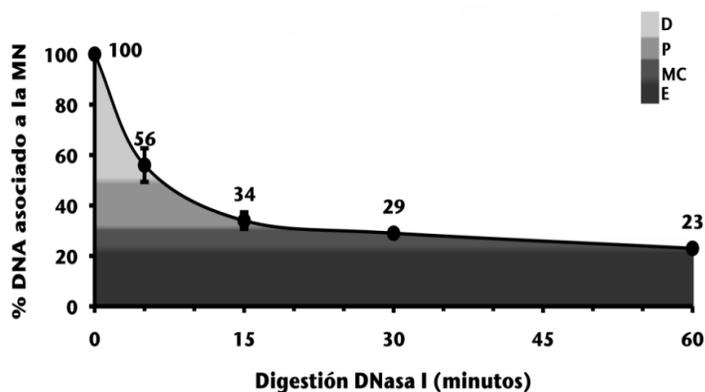


Figura 37. Cinéticas de digestión promedio de nucleoides de neuronas de rata. Los nucleoides fueron digeridos con DNasa I (0.92 U/ml) por 60 minutos. Se muestran las desviaciones estándar para cada tiempo de digestión correspondiente. Las pendientes entre los intervalos de tiempo correspondientes y las desviaciones estándar describen las zonas topológicas relativas a la MN; Distal: 100-49%, Proximal: 49-31%, Muy cercana: 31-22% y Embebida: 22-0%.

Para el ratón, las zonas topológicas corresponden a los siguientes porcentajes del DNA total asociado a la MN: distal = 47%, proximal = 21%, muy cercana = 10% y embebida = 22% (Tabla 14 y Figura 38). Este resultado es consistente con los resultados del estudio biofísico de los nucleoides neuronales en la rata y en el ratón. Ambos resultados sugieren que la organización global del genoma en bucles estructurales asociados a la MN en neuronas es muy similar entre la rata y el ratón.

La similitud de las cinéticas de digestión y de las propiedades biofísicas de los nucleoides de acuerdo al tipo celular apoya la evidencia de que la NHOS es tejido específica (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García y Aranda-Anzaldo, 2011; Silva-Santiago et al., 2017b).

El DNA residual anclado a la MN después de la digestión con DNasa I se usó directamente como templado en la PCR para mapear la posición relativa a la MN de las ocho secuencias diana en nucleoides neuronales.

En neuronas de rata cinco de las ocho secuencias mapearon en la zona proximal: *Alb*, *Col 1a1*, *Fyn*, *Cd86* y *Nef-m*; dos en la zona distal: *Actb* y *CD23*, y *Nef-l* en la zona muy cercana. Algunas secuencias que se localizan cercanas a los límites entre dos zonas topológicas, pueden mostrar cierta variabilidad en su posición relativa a la MN, tal es el caso de la secuencias *Alb*, *Actb* y *Cd86*, que en aproximadamente 50% de los experimentos se detectaron en la zona proximal, mientras que el otro 50% mapearon en la zona distal (Tabla 15 y Figura 39).

Tabla 14. Tiempos de digestión con DNasa I (0.92 U/ml) de nucleoides de neuronas de ratón. En la segunda columna se aprecia el descenso progresivo de DNA asociado a la MN conforme avanza el tiempo de digestión. En la cuarta columna se nota el aumento en la cantidad de DNA total que se digirió. Se indica la zona topológica correspondiente a cada tiempo de digestión.

Tiempo de digestión (min)	% DNA residual promedio y DE (n=4)	% DNA digerido*	% del DNA total que se ha perdido	Fase de la cinética de digestión	Zona Topológica
0	100	0	0		CONTROL
5	56±3	47	47	Rápida	DISTAL
15	37±5.05	21.05	68.05	Lenta	PROXIMAL
30	27±2.5	7.45	75.5	Muy lenta	MUY CERCANA
60	23±1	2.5	78	Muy lenta	MUY CERCANA
> 60	22	→ 0	78	DNA resistente	EMBEBIDA

\*Corresponde al % de DNA que se localiza en dicha zona topológica  
DE: desviación estándar

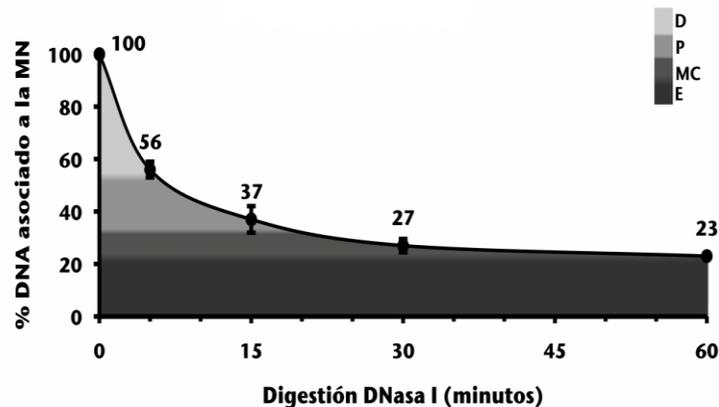


Figura 38. Cinéticas de digestión promedio de nucleoides de neuronas de ratón. Los nucleoides fueron digeridos con DNasa I (0.92 U/ml) por 60 minutos. Se muestran las desviaciones estándar para cada tiempo de digestión correspondiente. Las pendientes entre los intervalos de tiempo correspondientes y las desviaciones estándar describen las zonas topológicas relativas a la MN; Distal: 100-53%, Proximal: 53-32%, Muy cercana: 32-22% y Embebida: 22-0%.

El patrón de mapeo en el ratón fue el siguiente: *Alb*, *Col 1a1*, *Fyn* y *Nef-m* mapearon en la zona proximal; *Actb*, *CD23* y *Cd86* en la zona distal y *Nef-l* en la zona muy cercana. En el ratón, dos secuencias mostraron fluctuaciones entre zonas topológicas contiguas: *Fyn* entre las zonas proximal y distal, y neurofilamento ligero entre las zonas muy cercana y proximal. Estas fluctuaciones se deben a que la secuencia diana tienen una localización cercana a los límites entre dos zonas topológicas.

Como puede apreciarse, los patrones de mapeo entre rata y ratón son bastante similares entre sí (Tabla 15 y Figura 39), lo cual es consistente con una NHOS más simétrica como la de las neuronas.

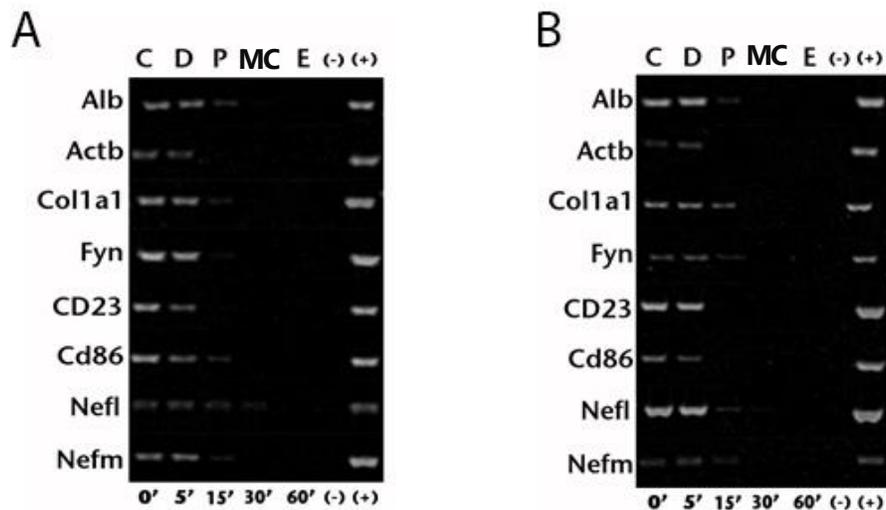


Figura 39. Ejemplo representativo del mapeo topológico con respecto a la MN de las ocho secuencias blanco en neuronas de rata (A) y de ratón (B). Se consideró a los amplicones como positivos o negativos mediante un software de análisis de imágenes (Kodak 1D Image Analysis Software 3.5 System) empleando los parámetros default, de esta manera se ubicaron las secuencias en las zonas topológicas correspondientes. C=control, D=distal a la MN, P=proximal a la MN, MC=muy cercana a la MN, E=embebida en la MN. (-) Indica control negativo, reacción sin DNA, (+) Indica control positivo, usando DNA genómico. 0', 5', 15', 30', 60' corresponden a los tiempos de digestión.

Tabla 15. Tabla comparativa del mapeo topológico relativo a la MN de las ocho secuencias diana entre neuronas de rata y de ratón. (+) Indica que el amplicón fue detectado por el software de análisis de imágenes empleado. (-) Indica que el amplicón no fue detectado por el software. (\*) Indica que en aproximadamente 50% de los experimentos, la secuencia blanco correspondiente se ubicó en la zona topológica previa, n=5. El color azul indica que el patrón de mapeo fue igual entre rata y ratón, el color rojo indica que el mapeo resultó diferente.

Amplicón	Zonas topológicas relativas a la MN en neuronas de rata				Zonas topológicas relativas a la MN en neuronas de ratón			
	Distal	Proximal	Muy cercana	Embebida	Distal	Proximal	Muy cercana	Embebida
<i>Alb</i>	+	+*			+	+		
<i>Actb</i>	+	+*			+			
<i>Col1a1</i>	+	+			+	+		
<i>Fyn</i>	+				+	+*		
<i>CD23</i>	+	+			+			
<i>Cd86</i>	+	+*			+			
<i>Nef-l</i>	+	+	+		+	+	+*	
<i>Nef-m</i>	+	+			+	+		

## **Perfil genérico de proteínas de MN en hepatocitos y neuronas de rata y de ratón**

La NHOS se define como las interacciones entre el DNA y la MN. Dada la alta conservación del genoma entre la rata y el ratón se espera que cualquier región genómica que tenga potencial de asociarse con la MN esté presente en ambas especies.

Por otro lado, el carácter tejido específico de la NHOS sugiere que los elementos de la MN constituyen el factor responsable del anclaje diferencial del DNA a la MN. La MN se define operacionalmente como la estructura que se obtiene después de un tratamiento a la célula con 2 M de sal, detergente no iónico y DNasa I. El análisis proteómico de esta estructura reveló alrededor de 272 proteínas como el componente principal de la MN (Engelke et al., 2014). No obstante, se sabe que la MN contiene proteínas que son tejido-específicas (Stuurman et al., 1990; Dent et al., 2010). De esta manera se establecen condiciones diferenciales de asociación entre el DNA y la MN entre los diferentes tejidos.

Con el objetivo de detectar posibles diferencias cualitativas y/o cuantitativas importantes entre la composición proteica de las matrices nucleares de hepatocitos entre rata y ratón, se realizaron perfiles genéricos de proteínas como se describe en la sección de materiales y métodos. Entre los perfiles SDS-PAGE de proteínas de matriz nuclear de rata y ratón, no se detectaron diferencias notables en la composición de esta estructura. En el perfil proteico de la matriz nuclear de hepatocitos de ratón, se detectó la señal de una banda alrededor de los 80 kDa que no fue detectada en la rata (Figura 40). El análisis de densitometría reveló diferencias cuantitativas, algunas corresponden a una diferencia en la intensidad de la banda mayor a dos veces entre especies (Tabla 16).

Posteriormente se realizaron perfiles proteicos de proteínas de matriz nuclear de neuronas de rata y de ratón (Figura 41). En estas células tampoco se detectaron

diferencias cualitativas en la composición de proteínas de NM y sólo se encontraron algunas diferencias cuantitativas significativas (Tabla 17).

De manera interesante, en el análisis de densitometría se encontró que el número total de bandas detectadas fue el mismo, tanto en hepatocitos como en neuronas de ambas especies.

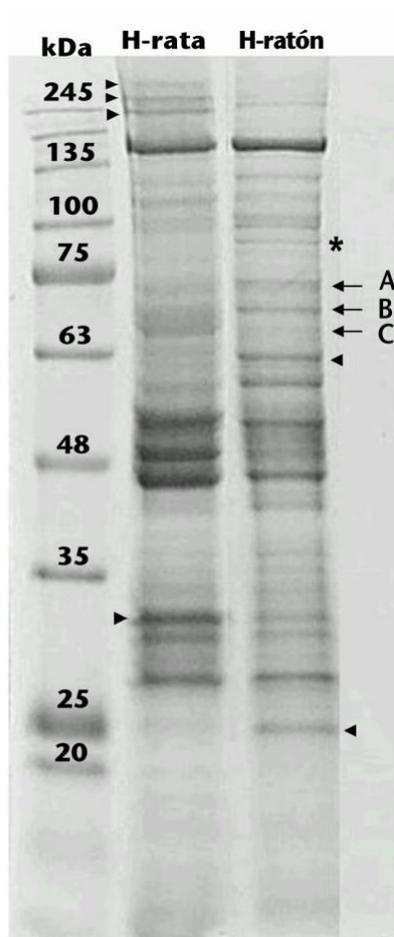
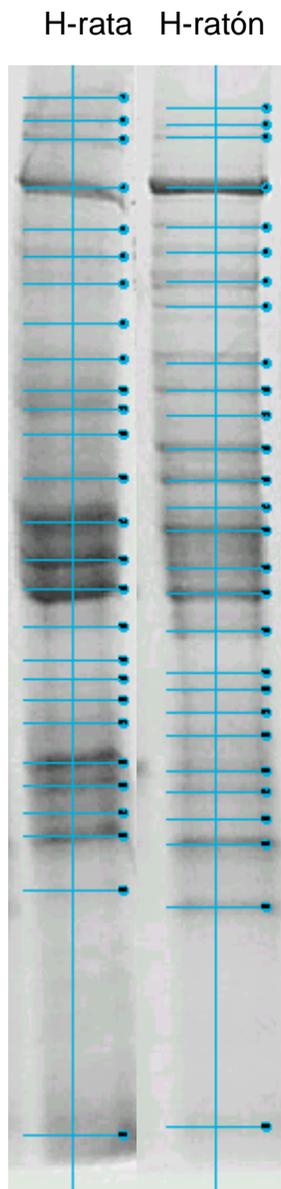


Figura 40. Perfiles proteicos de la matriz nuclear de hepatocitos de rata (H-rata) y de ratón (H-ratón). SDS PAGE teñido con azul de coomassie. Se cargaron 30  $\mu$ g de muestra en cada carril. A, B y C, señalan las bandas correspondientes a láminas A (74 kDa), B (66 kDa), y C (65 kDa) respectivamente. Las puntas de flecha indican los casos donde la diferencia en la intensidad de la banda fue mayor a dos veces entre especies. (\*) Indica una banda en hepatocitos de ratón que no fue detectada en la rata, n=3.

Tabla 16. Densitometría del perfil proteico de matriz nuclear de hepatocitos de rata (H-rata) y de ratón (H-ratón). Las celdas en amarillo indican una diferencia de intensidad mayor a dos veces entre especies. La banda en rojo indica que su contraparte en la rata no pudo ser detectada. Se muestra el gel con el diagrama de la densitmetría, n=3.



Banda	Intensidad de la banda	
	rata	ratón
1	29.51	7.54
2	40.61	9.78
3	31.86	12.97
4	43.48	29.7
5	79.81	95.72
6	29.51	17.03
7	37.43	18.67
8	-----	31.37
9	31.86	24.13
10	27.41	21.53
11	37.01	27.74
12	51.58	36.59
13	42.68	50.7
14	22.09	47.29
15	52.74	59.42
16	100.58	72.97
17	106.28	58.05
18	109.1	74.65
19	36.87	36.79
20	30.52	29.78
21	43.65	32.92
22	95.43	44.73
23	75.01	38.73
24	81.15	52.86
25	10.49	41.56
26	31	22.28
27	31.45	46.37

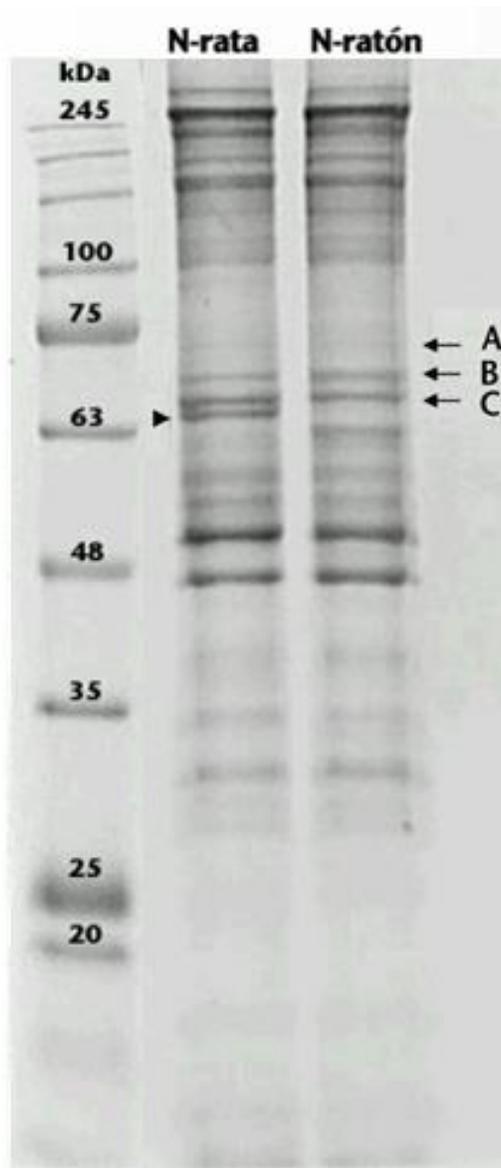
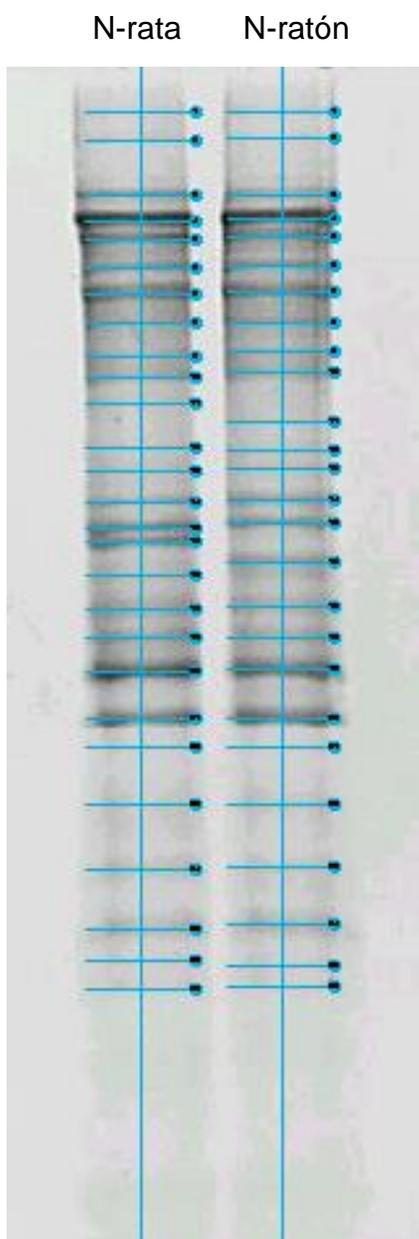


Figura 41. Perfiles proteicos de la matriz nuclear de neuronas de rata (N-rata) y de ratón (N-ratón). SDS PAGE teñido con azul de coomassie. Se cargaron 30  $\mu\text{g}$  de muestra en cada carril. A, B y C, señalan las bandas correspondientes a láminas A (74 kDa), B (66 KDa), y C (65 KDa) respectivamente. La punta de flecha indica un caso donde la intensidad de la banda en la rata fue mayor a dos veces lo detectado en el ratón.

Tabla 17. Densitometría del perfil proteico de matriz nuclear de neuronas de rata (N-rata) y de ratón (N-ratón). La celda en amarillo indica una diferencia cuya intensidad en la rata fue mayor a dos veces lo encontrado en el ratón. Se muestra el gel con el diagrama de la densitmetría, n=3.



Banda	Intensidad de la banda	
	rata	ratón
1	6.07	6.57
2	8.77	6.21
3	38.57	28.63
4	93.63	94.02
5	74.41	63.78
6	49.48	50.82
7	67.53	68.16
8	39.41	40.65
9	28.82	32.55
10	34.72	32.77
11	14.15	16.49
12	16.32	19.67
13	33.03	49.48
14	58.85	36.05
15	61.19	30.95
16	22.22	29.61
17	36.84	31.35
18	40.33	75.05
19	93.38	68.25
20	62.42	70.23
21	7.13	13.27
22	11.17	13.51
23	14.83	25.62
24	21.95	10.78
25	9.08	9
26	8.09	4.82
27	5.78	5.59

## **ANEXO 1. Caracterización comparativa de los bucles estructurales de DNA del locus multigénico de la familia albúmina entre neuronas, hepatocitos y linfocitos B “naive” de rata adulta.**

Se ha especulado por largo tiempo si los bucles estructurales de DNA corresponden a dominios funcionales independientes del genoma (Razin, 2001). La evidencia disponible hasta el momento muestra que los bucles estructurales no corresponden a las unidades de transcripción (Iarovaia et al., 2004) y que la transcripción de ciertos genes estudiados ocurre de manera independiente de la NHOS, sugiriendo que no hay relación causal entre transcripción y NHOS (Maya-Mendoza et al., 2003; Trevilla-García y Aranda-Anzaldo, 2012).

Por otro lado, hay evidencia que sugiere que los bucles de DNA asociados a la MN corresponden a los replicones *in vivo* (Buongiorno-Nardelli et al., 1982; Rivera-Mulia et al., 2011) y que la MN funciona como un compartimento organizador de la replicación del genoma (Wei et al., 1998; Anachkova et al., 2005; Wilson and Coverley, 2013). Surge entonces esta pregunta: ¿la replicación determina la NHOS? Trabajo de nuestro laboratorio mostró que la NHOS a nivel local y a gran escala, en dos tejidos con potencial proliferativo, es claramente diferente (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García y Aranda-Anzaldo, 2011, 2012), sugiriendo que la replicación *per se* no es un determinante crítico de la NHOS. Hasta ahora la evidencia indica que el establecimiento de la NHOS es independiente de limitantes funcionales relacionadas con la replicación y la transcripción, y es tejido-específica. Se ha propuesto que limitantes estructurales que afectan al DNA y la MN son los principales factores que participan en su establecimiento (Aranda-Anzaldo, 2012, 2016).

¿Cuál es entonces el papel de los factores biológicos en el establecimiento de la NHOS? Desde una perspectiva evolutiva, nosotros abordamos esta pregunta. En un estudio comparativo de la NHOS entre rata y ratón; de manera interesante encontramos que la NHOS es específica de cada especie. De este resultado se deduce que no existen factores de naturaleza biológica implicados en su establecimiento. Por

lo tanto, este resultado indica que la NHOS se establece de manera circunstancial, y es dirigida por los factores físicos (estructurales y termodinámicos) que operan en el núcleo y en la fibra de DNA (Silva-Santiago et al., 2017a).

Ante la evidencia sobre la especificidad de la NHOS según el tipo celular y según la especie, es interesante estudiar la NHOS de neuronas y establecer un análisis comparativo con hepatocitos y linfocitos B *“naive”*. El caso de las neuronas es relevante, debido a que estas células son postmitóticas, pero conservan la capacidad de replicación del DNA bajo ciertas circunstancias. Por su parte, estudios comparativos a gran escala en hepatocitos y linfocitos B *“naive”* sugieren que la NHOS es tejido-específica (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García y Aranda-Anzaldo, 2011, 2012). De esta manera el hallazgo de que la NHOS en neuronas es relativamente similar a la de hepatocitos o linfocitos B *“naive”*, sugiere la participación de factores de tipo funcional en el establecimiento de la NHOS.

Se realizó una comparación a gran escala y a nivel local de la NHOS entre neuronas, hepatocitos y linfocitos B *“naive”* de rata.

La caracterización biofísica de los nucleoides mostró que el tamaño promedio del bucle en neuronas es significativamente más pequeño que en hepatocitos y linfocitos B (Figura 42 y Tabla 18). Este resultado implica que hay mayor número de interacciones entre DNA y MN en las neuronas y por lo tanto a nivel global la NHOS es diferente.

Después se realizaron cinéticas de digestión con DNasa I en neuronas de rata. Entre hepatocitos y linfocitos B *“naive”* existe una diferencia importante después de 60 minutos de digestión con 0.5 U/ml de DNasa I; en hepatocitos el porcentaje de DNA que permanece asociado con la MN es del 22%, en cambio en los linfocitos B *“naive”* es del 3%. En los nucleoides de neuronas tratados con 0.5 U/ml de DNasa I se obtiene alrededor de 50% del DNA asociado con la MN, por lo que es necesario aumentar la cantidad de enzima a 0.92 U/ml a fin de obtener una cinética similar a la de los hepatocitos y poder establecer zonas topológicas equivalentes entre sí (Figura 43). El

comportamiento particular de las cinéticas según el tipo celular sugiere una diferencia a nivel global de la NHOS entre los tres tipos celulares estudiados.

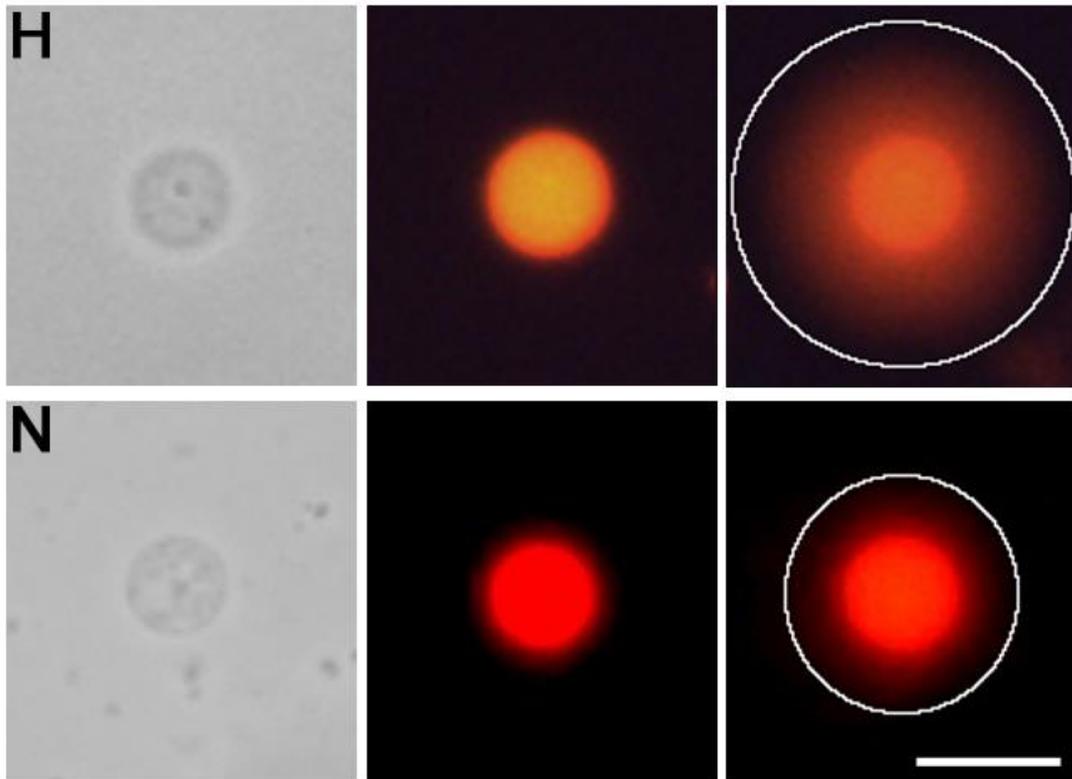


Figura 42. Nucleoides de hepatocitos (H) y neuronas (N) de rata tratados con 80  $\mu\text{g/ml}$  de EBr para inducir el desenrollamiento y relajación de los bucles de DNA asociados con la MN. La micrografía en contraste de fases muestra el contorno de la MN. Las micrografías de fluorescencia son tomadas a los 0 y 30 segundos, cuando el halo de fluorescencia se ha expandido completamente. La región de interés marcada en blanco delimita el contorno del halo. Barra 15  $\mu\text{m}$ .

Tabla 18. Radio del halo de fluorescencia de los nucleoides de hepatocitos y neuronas en la rata. Tamaño promedio del bucle de DNA estimado para hepatocitos y neuronas en la rata.

Radio del halo en $\mu\text{m}$	Hepatocitos (n=32)	Neuronas (n=43)
		14.1 $\pm$ 2.3
Tamaño del bucle de DNA de la base a la punta en kpb	41.5	24.2
Tamaño promedio de un bucle de DNA en kbp	82.9	48.5

Finalmente exploramos la NHOS a nivel local realizando el mapeo topológico de la región de 162 kb que incluye a cuatro miembros del locus multigénico de la familia de albúmina en las neuronas de rata y lo comparamos con el de los hepatocitos y los linfocitos B “naive” (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010) Figura 44 y Tabla 19. Con los datos del mapeo topológico determinamos la configuración en tercera dimensión de los bucles estructurales asociados con la MN, de la región en estudio; encontramos que el número de bucles y el tamaño promedio de los mismos fue diferente al que se encuentra en los hepatocitos y en los linfocitos B “naive” (Figura 45). Este resultado es consistente con la evidencia disponible sobre la especificidad según el tipo celular de la NHOS, sugiriendo que no existe relación causal entre la replicación y la NHOS.

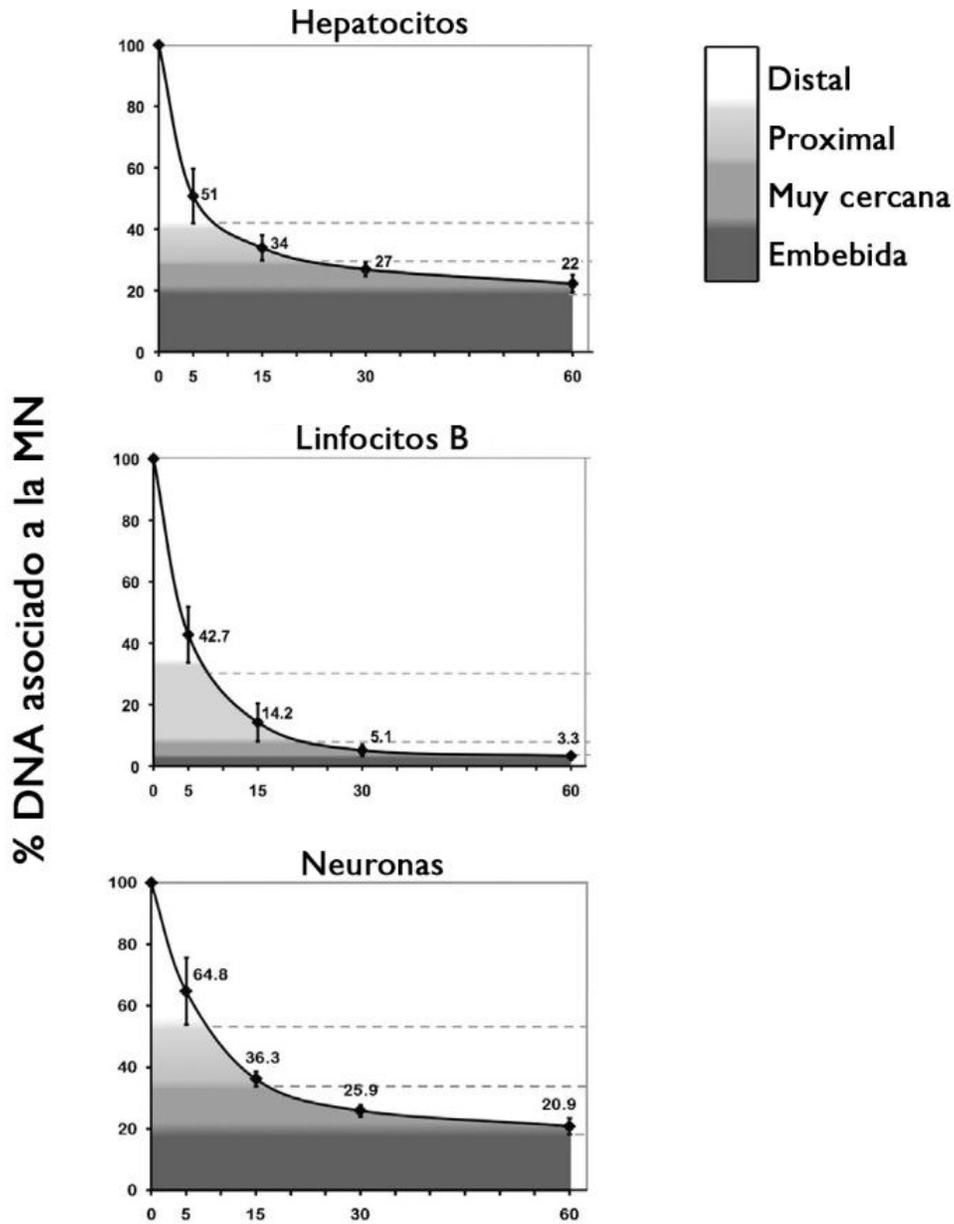


Figura 43. Cinéticas de digestión promedio de nucleoides de hepatocitos de rata. Los nucleoides fueron digeridos con DNasa I por 60 minutos (0.5 U para hepatocitos y linfocitos, y 0.92U/ml para neuronas). Se muestran las desviaciones estándar para cada tiempo de digestión correspondiente. Las pendientes entre los intervalos de tiempo correspondientes y las desviaciones estándar definen las zonas topológicas relativas a la MN: distal, proximal, muy cercana, y embebida.

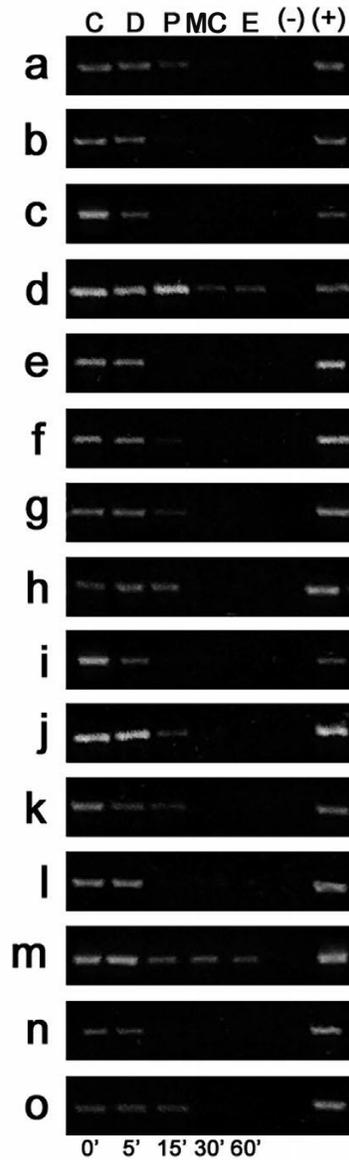


Figura 44. Ejemplo representativo del mapeo topológico con respecto a la MN de quince secuencias blanco (a-o) en neuronas de rata. Los amplicones fueron considerados como positivos o negativos mediante un software de análisis de imágenes (Kodak 1D Image Analysis Software 3.5 System) empleando los parámetros default, de esta manera se ubicaron las secuencias en las zonas topológicas correspondientes. C=control, D=distal a la MN, P=proximal a la MN, MC=muy cercana a la MN, E=embebida en la MN. (-) Indica control negativo, reacción sin DNA, (+) Indica control positivo, usando DNA genómico. 0', 5', 15', 30', 60' corresponden a los tiempos de digestión,  $n \geq 4$ .

Tabla 19. Mapeo topológico relativo a la MN de las quince secuencias diana (a-o) en neuronas de rata. (+) Indica que el amplicón se detectó por el software de análisis de imágenes empleado. (-) Indica que el amplicón no se detectó por el software. (\*) Indica que en aproximadamente 50% de los experimentos, la secuencia blanco correspondiente se ubicó en la zona topológica previa,  $n \geq 4$ .

Amplicón	Zonas topológicas relativas a la MN en neuronas de rata			
	Distal	Proximal	Muy cercana	Embebida
<b>a</b>	+	+*		
<b>b</b>	+			
<b>c</b>	+			
<b>d</b>	+	+	+	+
<b>e</b>	+			
<b>f</b>	+	+		
<b>g</b>	+	+		
<b>h</b>	+	+		
<b>i</b>	+			
<b>j</b>	+	+*		
<b>k</b>	+	+*		
<b>l</b>	+			
<b>m</b>	+	+	+	+
<b>n</b>	+			
<b>o</b>	+	+*		

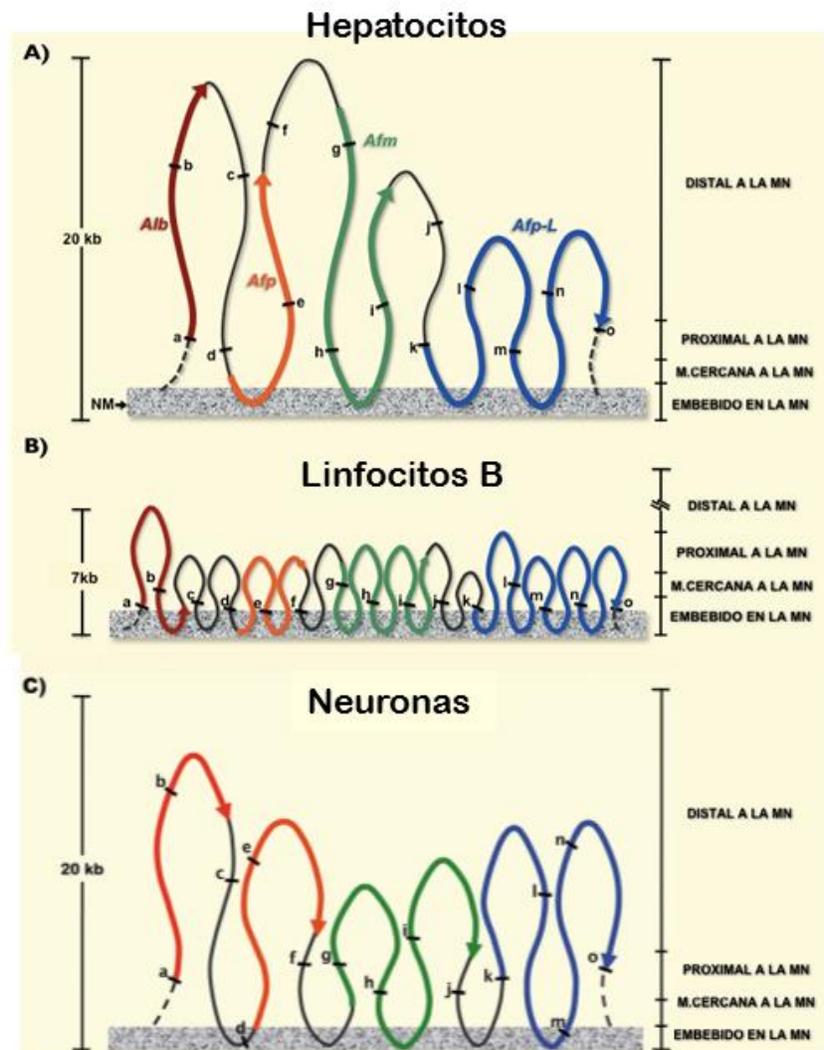


Figura 45. Organización en bucles estructurales de DNA de la región genómica de 162 kb que incluye cuatro miembros de la familia albúmina. A y B tomado de Rivera-Mulia y Aranda Anzaldo 2010; C: configuración en neuronas conforme los datos de la tabla 18. Las letras indican la posición de las secuencias diana en los bucles de DNA. Las líneas en negrita indican la posición de los genes correspondientes: rojo (*Alb*), naranja (*Afp*), verde (*Afm*), azul (*Afp-L*). Las líneas punteadas indican la proyección de regiones más allá de la región estudiada. La línea izquierda indica el tamaño relativo del bucle de DNA de la base a la punta; de manera que el tamaño del bucle completo es el doble de tal valor. La barra derecha indica las zonas topológicas relativas a la MN.

## DISCUSIÓN

En metazoarios en interfase, el DNA está organizado en bucles hiperenrollados asociados a una subestructura proteica conocida como matriz nuclear (MN) (Cook et al., 1976; Nickerson, 2001; Tsutsui et al., 2005). Las interacciones entre el DNA y la MN son de alta estabilidad y definen una estructura de orden superior al interior del núcleo celular (NHOS) (Aranda-Anzaldo, 2009; Alva-Medina et al., 2010, 2011; Trevilla-García y Aranda-Anzaldo, 2011, 2012; Aranda-Anzaldo et al., 2014). La evidencia disponible sugiere que las interacciones entre DNA y MN se da por efectos de lectura indirectos entre el DNA y la MN; donde el reconocimiento de la topología local de los elementos que interactúan tiene un papel determinante (Zhang, 2004; Aranda-Anzaldo, 2016). Se ha estimado que la densidad promedio de secuencias con afinidad a la MN (MARs) en el genoma diploide de la rata es de aproximadamente 180,000 MARs potenciales. Sin embargo, el tamaño promedio del bucle de DNA en hepatocitos de la rata adulta es de 80 kb, lo cual corresponde a la formación de 60,000 bucles estructurales de DNA, indicando que no todos los MARs potenciales se encuentran en realidad asociados con la MN constituyendo verdaderos LARs (Berezney y Buchholtz 1981; Maya-Mendoza et al., 2005). Los LARs no pueden ser definidos *a priori* con base en la secuencia, tampoco es posible predecir su localización usando herramientas bioinformáticas (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010). Para el estudio de la NHOS en nuestro laboratorio se desarrolló un método basado en principios topológicos que permite mapear la posición con respecto a la MN de cualquier región genómica con secuencia conocida; a partir del mapeo de una serie de puntos a lo largo del DNA es posible determinar su estructura tridimensional y, por lo tanto, inferir las regiones de anclaje (Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo, 2003; Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010), utilizando este método se realizó un estudio comparativo de la NHOS entre la rata y ratón cuyos genomas son altamente similares (Gibbs et al., 2004), a fin de conocer si está conservada en la evolución.

La caracterización biofísica de nucleoides mediante microscopía de fluorescencia con el uso de bromuro de etidio permitió estudiar las cualidades de hiperenrollamiento y la estabilidad de las interacciones entre el DNA y la MN de los nucleoides, además se estimó el tamaño promedio de los bucles de DNA (Maya-Mendoza et al., 2005; Alva-Medina et al., 2010). Usando esta estrategia se caracterizaron los nucleoides de los hepatocitos y las neuronas, en ambas especies.

El análisis cualitativo de la caracterización biofísica de los nucleoides de rata y ratón (que corresponde a la dinámica de expansión del halo y la resistencia al tratamiento con el bromuro de etidio), así como la estimación del tamaño promedio de los bucles, mostró que los resultados se agruparon en dos conjuntos que corresponden a los dos tipos celulares estudiados. En el caso de los hepatocitos, el tamaño promedio del bucle estimado fue de 82.9 kb en la rata y 76.7 kb en el ratón. Para las neuronas fue de 48.5 kb en la rata y 47.9 en el ratón. En la rata, el tamaño promedio del bucle en neuronas resultó ser 42 % más pequeño que en los hepatocitos; de manera interesante, también en el ratón el tamaño promedio del bucle en las neuronas resultó ser 38 % más pequeño que en los hepatocitos. Este resultado es consistente con el carácter tejido-específico de la NHOS reportado en la rata (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García y Aranda-Anzaldo, 2011). Estos resultados dan información a escala global sobre la NHOS: número de bucles estructurales, el grado de hiperenrollamiento de los mismos y la estabilidad de las asociaciones entre el DNA con la MN. De acuerdo con los resultados, estas características son similares entre especies cercanas con respecto al mismo tipo celular. Esto implica que en las dos especies la distribución de los LARs a lo largo de los cromosomas debe ser semejante en el mismo tipo de tejido (Figura 46).

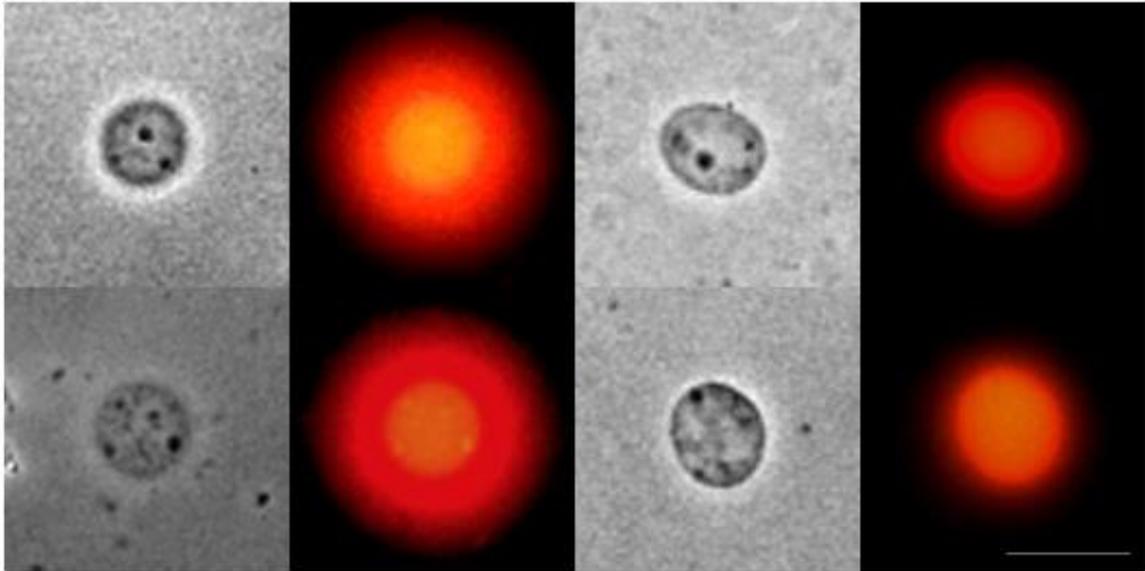


Figura 46. Halos de DNA. Micrografías de fluorescencia de nucleoides tratados con 80  $\mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio para inducir el desenrollamiento y la relajación de los bucles de DNA, de esta manera se forma un halo de DNA alrededor del contorno de la MN. Panel superior: hepatocitos de rata (izquierdo) y neuronas de rata (derecho). Panel inferior: hepatocitos de ratón (izquierda) y neuronas de ratón (derecha). El tamaño promedio del bucle estimado de la base a la punta para hepatocitos fue  $14.1 \pm 2.3 \mu\text{m}$  (41.5 kb) en la rata ( $n=32$ ) y  $13.0 \pm 1.3 \mu\text{m}$  (38.4 kb) en el ratón ( $n=74$ ). Para neuronas fue de  $8.24 \pm 0.88 \mu\text{m}$  (24.23 kbp) en la rata ( $n=43$ ) y  $8.15 \pm 0.86 \mu\text{m}$  (23.97 kbp) en el ratón ( $n = 135$ ). Tales valores corresponden a la mitad de la longitud total del bucle de DNA. Barra = 15  $\mu\text{m}$ .

Las cinéticas de digestión de los nucleoides usando concentraciones limitadas de DNasa I (0.5 U/ml en hepatocitos y 0.92 U/ml en neuronas) durante 60 minutos mostraron tres fases: una fase rápida en los primeros 5 minutos, donde se pierde más del 50% del DNA asociado a la MN; después una fase lenta en la que se observa una reducción en la cinética de digestión, esta dura 10 minutos y se pierde aproximadamente 10% del DNA residual asociado con la MN; finalmente los últimos 45 minutos corresponden a una fase muy lenta donde se pierde otro 10% del DNA

residual que permanece asociado con la MN. Después de 60 minutos de digestión permanece alrededor de 20% de DNA asociado a la MN, esta fracción de DNA es resistente a la acción de la enzima. La reproducibilidad de las cinéticas de digestión permitió establecer zonas topológicas con respecto a la MN “homólogas” entre rata y ratón para hepatocitos y neuronas respectivamente (Figura 47).

De acuerdo al método de mapeo topológico de secuencias génicas con respecto a la MN, el comportamiento de las cinéticas de digestión es una función del grado de hiperenrollamiento de los bucles y de la proximidad relativa con la MN. Por lo tanto, la semejanza en las cinéticas de digestión del mismo tipo celular entre rata y ratón significa que a escala global, la organización del DNA en bucles estructurales y su asociación con la MN es bastante semejante.

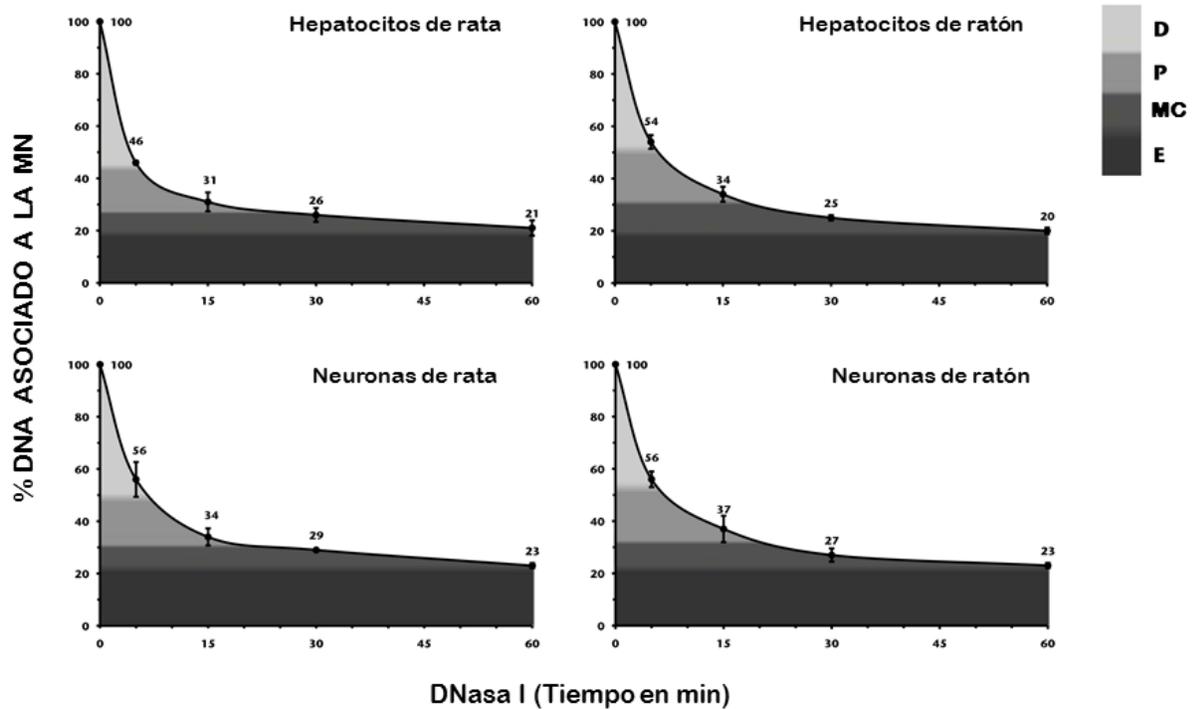


Figura 47. Cinéticas de digestión del DNA en nucleoides. Los nucleoides fueron digeridos con DNasa I. El valor de cada tiempo es el promedio de experimentos separados,  $n \geq 4$ . Las barras indica la correspondiente desviación estándar (DE). Las zonas topológicas relativas a la MN corresponden a porcentajes decrecientes del DNA total asociado con la MN, D: distal a la MN, P: proximal a la MN, MC: muy cercana a la MN, E: embebida en la MN. Para hepatocitos de rata: D=100-45% del DNA total, P=45-30% del DNA total, MC=30-18% del DNA total y E=18-0% del DNA total. Las pendientes correspondientes son las siguientes: 0-5 min=-10.8; 5-15 min=-1.5; 15-30 min=-0.3; 30-60 min=-0.16. Para neuronas de rata: D=100-49% del DNA total, P=49-31% del DNA total, MC=31-22% del DNA total y E=22-0% del DNA total. Las pendientes correspondientes: 0-5 min=-8.8; 5-15 min=-2.2; 15-30 min=-0.3; 30-60 min=-0.2. Para hepatocitos de ratón: D=100-51% del DNA total, P=51-31% del DNA total, MC=31-19% del DNA total y E=19-0% del DNA total. Las pendientes correspondientes: 0-5 min=-9.2; 5-15 min=-2; 15-30 min=-0.6; 30-60=-0.16. Para neuronas de ratón: D=100-53% del DNA total, P=53-32% del DNA total, VC=32-22% del DNA total y E=22-0% total DNA. Las pendientes correspondientes: 0-5 min=-8.8; 5-15=-1.9; 15-30=-0.66; y 30-60=-0.13.

Derivado del análisis cualitativo de la NHOS dado por la caracterización biofísica de los nucleoides en dos tipos celulares entre la rata y el ratón, y por las cinéticas de digestión de los mismos usando concentraciones limitadas de DNasa I, es posible inferir que al interior del núcleo se crean condiciones para generar asociaciones estructurales (de alta estabilidad) que surgen de una acción tripartita entre DNA, proteínas de MN y RNA (Aranda-Anzaldo, 2016).

La existencia de nucleoides muy semejantes entre especies, de acuerdo al tipo celular observado, sugiere que existen factores determinantes para el establecimiento de las asociaciones entre el DNA y MN, estos corresponden a las propiedades estructurales del DNA y la composición de la MN que es tejido específica. Algunos autores consideran que el hiperenrollamiento es un rasgo conservado en toda la escala evolutiva (Mirkin, 2001). Sin embargo, desde la perspectiva estructural, se sabe que el DNA posee propiedades estructurales genéricas, como la helicidad, el hiperenrollamiento y la longitud de persistencia. Dichas propiedades restringen la conformación de la molécula en tercera dimensión hacia la formación de dominios circulares con hiperenrollamiento, razón por la cual en la naturaleza el DNA de todos los seres vivos se encuentra formando dominios topológicos hiperenrollados. Por lo tanto, lo que se conserva es el DNA como material genético que posee de manera intrínseca hiperenrollamiento.

En principio, las propiedades topológicas de los bucles de DNA permiten la realización de un mapeo topológico con respecto a la MN de cualquier región genómica con secuencia conocida. De hecho, los datos que se obtienen del mapeo son bastante reproducibles entre experimentos independientes, lo cual sugiere que el grado de deformabilidad de los bucles de DNA es limitado; por lo tanto, las posiciones de las secuencias diana, que se obtienen del mapeo topológico, corresponden a las posiciones más probables *in vivo* (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010). A fin de obtener un panorama general de los patrones de asociación entre el DNA y MN entre la rata y el ratón, se determinó en hepatocitos el mapeo topológico con respecto a la MN de ocho secuencias diana ubicadas en diferentes cromosomas, los cuales son una

muestra representativa de diferentes territorios cromosómicos al interior del núcleo (30% de los territorios cromosómicos en la rata y 36% en el ratón). Se encontró que siete de ocho secuencias (excepto *Cd86*) mostraron un patrón de mapeo diferente. Considerando que los puntos de anclaje (LARs) definen los bucles estructurales, la posición diferencial con respecto a la MN de las regiones mapeadas significa que los sitios de anclaje de los bucles estructurales donde se encuentran son diferentes; por lo tanto la organización en bucles estructurales asociados con la MN entre rata y ratón es diferente (Figura 48). El patrón de mapeo especie-específico encontrado, significa que en el establecimiento de la NHOS, definida por las interacciones entre el DNA y la MN, no se privilegia ninguna región en el DNA para ser actualizada en la MN, sino que las interacciones se dan de manera discreta, según la contribución de los factores que participan en la formación de los anclajes, esto son: la afinidad mutua entre el DNA y el sitio de unión potencial en la MN, la relativa densidad de sitios de unión potenciales en la MN y las propiedades estructurales de la fibra de DNA, que modulan su conformación en tercera dimensión (Aranda-Anzaldo, 2009; García-Vilchis y Aranda-Anzaldo, 2017).

Desde la perspectiva evolutiva cualquier factor crítico para la sobrevivencia y/o adaptación de la especie será conservado por la selección natural, por lo tanto, el hecho de que la NHOS no esté conservada en la evolución significa que esta se establece de manera independiente de las necesidades de naturaleza biológica. Es decir, los factores de tipo biológico no actúan como determinantes directos de las interacciones entre el DNA y la MN.

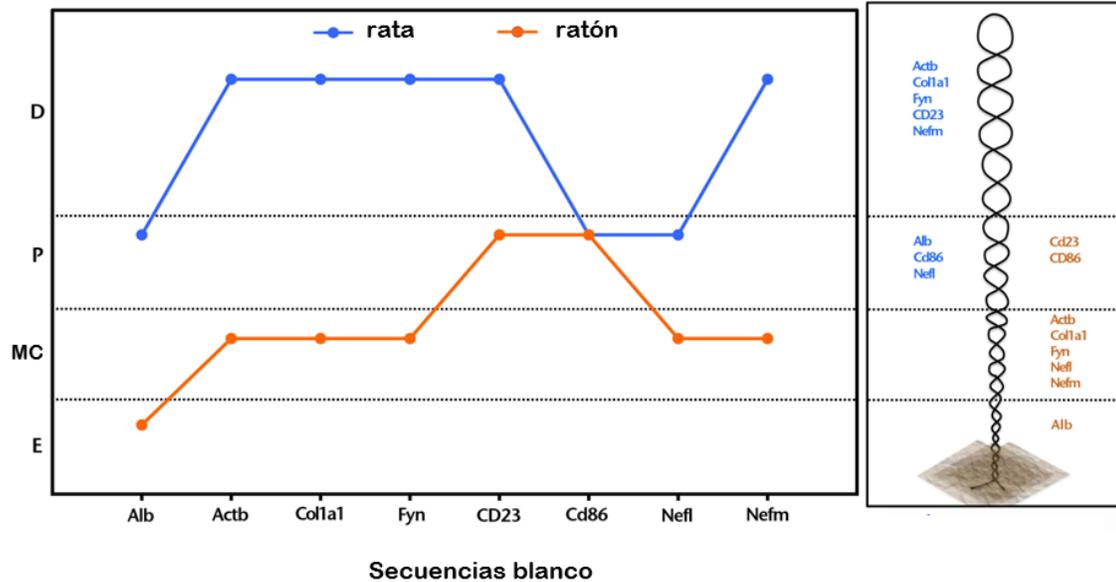


Figura 48. Patrón de mapeo topológico de ocho secuencias blanco en hepatocitos de rata y de ratón. Siete de las ocho secuencias blanco se ubicaron en zonas topológicas diferentes en ambas especies. Se muestra un esquema de la distribución de las secuencias a en un bucle. Observe que a partir del mapeo topológico con respecto a la MN se puede inferir que las regiones de anclaje (LARs) son diferentes en ambas especies. D=distal a la MN, P=proximal a la MN, MC=muy cercana a la MN y E=embebida en la MN.

En consecuencia, los factores de tipo físico (estructural-termodinámicos) son la fuerza que dirige la construcción de una estructura al interior del núcleo que, sin embargo, es de suma relevancia biológica. Esto es así porque al interior del núcleo la fibra de DNA posee una complejidad estructural que representa un problema para conservar la integridad y coherencia de la molécula. Por su longitud y propiedades estructurales, si el DNA existiera libre, flotando en el núcleo, se rompería (Aranda-Anzaldo, 2016). Además, los procesos genéticos generan estrés topológico en las regiones donde el DNA es transcrito o copiado, y se sabe que una causa de fragilidad cromosómica está relacionada con dicho estrés. Por lo tanto, deben existir necesariamente mecanismos que permitan tanto a la replicación como a la transcripción del DNA continuar después

de encontrar un sitio restringido topológicamente (Helmrich et al., 2013). De hecho, tanto las rupturas en el DNA como la formación de 'nudos' ocurren a consecuencia de los procesos genéticos (Mirkin, 2001; Lindsley, 2005), pero estos se limitan, ya que la estabilidad del genoma se mantiene. Ante el problema de la complejidad estructural del DNA surge la necesidad fundamental de garantizar la integridad y coherencia del DNA para que pueda ser funcional. La NHOS se ha propuesto como un modelo de organización del cromosoma en interfase, el cual concilia la complejidad estructural del DNA con su función biológica (Aranda-Anzaldo, 2016). Este modelo propone que el establecimiento de la NHOS disipa el estrés estructural de la fibra de DNA mediante el hiperenrollamiento y la formación de bucles estabilizados por la unión con proteínas de la MN. De esta manera, la NHOS constituye un mecanismo general que contribuye a resolver el problema del estrés estructural que se genera cada vez que la estructura del DNA se modifica (Aranda-Anzaldo, 2016). De manera interesante y consistente con este modelo, las regiones que se asocian con la MN (LARs) tienen propiedades estructurales que pueden amortiguar cierto estrés estructural causado por las alteraciones en la estructura de la molécula (Bode et al., 1992; Bode et al., 1996; Benham et al., 1997).

Las uniones entre el DNA y la MN son interacciones estables de largo plazo, por lo tanto, la NHOS debe constituir el punto de inicio para futuros refinamientos o modificaciones de tal configuración dada por proteínas de la cromatina y mecanismos epigenéticos que afectan la estructura de ésta. El patrón de organización en bucles estructurales del DNA puede también determinar los límites de futuros cambios estructurales locales en la cromatina relacionados con la diferenciación celular y/o la transcripción (Razin et al., 2007; Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García y Aranda-Anzaldo, 2011, 2012; Castillo-Mora y Aranda-Anzaldo, 2012; Aranda-Anzaldo, 2016). De manera interesante los estudios de Hi-C han encontrado similitud en los mapas de asociación entre poblaciones celulares tan diversas como células madre, células terminalmente diferenciadas y células en quiescencia, (Lieberman-Aiden et al., 2009; Dixon et al., 2012; Zhang et al., 2012), sugiriendo que la organización espacial del genoma de mamíferos es un estado fundamental sobre el cual se desarrolla la

función del genoma (Guelen et al., 2008; Peric-Hupkes et al., 2010; Lieberman-Aiden et al., 2009; Dixon et al., 2012; Zhang et al., 2012). Estudios recientes de la conformación del cromosoma al interior del núcleo observan de manera regular las siguientes características: que hay un nivel de organización subyacente a los dominios LADs y/o TADs encontrados, cuyos factores moleculares están por ser definidos (Nora et al., 2017; Schwarzer *et al.*, 2017; Kubo et al., 2017; Flyamer *et al.*, 2017). Que la organización espacial del genoma se logra por un mecanismo independiente de CTCF y cohesina, el cual actúa globalmente y a varias escalas, incluyendo escalas más pequeñas que las previamente apreciadas. Que los límites precisos de los segmentos cromosómicos que pertenecen al mismo dominio correspondan a bucles de menor tamaño que no son detectados con la resolución de los protocolos actuales (Nora et al., 2017; Schwarzer *et al.*, 2017). Estas características son satisfechas por el modelo de organización del cromosoma en interfase que se basa en la NHOS (Aranda-Anzaldo, 2016). La relación entre NHOS y TADs y/o LADs es una pregunta que puede ser abordada en futuros proyectos.

En el presente trabajo se encontró que en dos especies evolutivamente cercanas, la NHOS mantiene su carácter tejido específico, lo cual apoya la evidencia de que en cada tejido la NHOS constituye una estructura fundamental sobre la cual se adaptan los procesos de la fisiología nuclear (Aranda-Anzaldo, 2009; Alva-Medina et al., 2010, 2011; Trevilla-García y Aranda-Anzaldo, 2011, 2012).

La perspectiva de este estudio permitió distinguir cómo contribuyen los factores físicos y los biológicos en la organización que se observa en el núcleo. Si se considera que el núcleo tiene una estructura física y por lo tanto sujeta a leyes físicas, al menos a nivel de la NHOS, se encontró que el comportamiento de los elementos que la componen obedece principalmente a principios de orden físico: estructural-termodinámico. Este dato es relevante en el campo de estudio de la estructura nuclear, ya que las limitantes de naturaleza física, actúan como factores genéricos que gobiernan el comportamiento molecular, por lo que es posible confundir los fenómenos esencialmente físicos (p.e. la posición y la dinámica de las moléculas) con las causas o los efectos de los procesos

biológicos. Por lo tanto, es necesario entender la realidad física del núcleo y cómo participan los fenómenos estrictamente físico-químicos en el funcionamiento celular. No cabe duda que existe una dialéctica entre estructura física y función biológica. En lo que respecta a la NHOS, su relación con la función nuclear se puede apreciar en los siguientes casos: contribuye en la compactación del genoma mediante el hiperenrollamiento (Chen et al., 1995; Aranda-Anzaldo, 2016); en la organización del DNA en replicones, favoreciendo que el proceso de replicación ocurra satisfactoriamente dentro de un tiempo relativamente corto (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2011); además la energía libre disponible del hiperenrollamiento se usa en muchos procesos biológicos (Mirkin, 2001; Bowater, 2005).

Ante el carácter especie-específico de la NHOS encontrado, se propone que las diferentes propiedades estructurales (flexibilidad de doblarse o torcerse) de los genomas entre rata y ratón se deben en parte a que el cariotipo es diferente (20 cromosomas en el ratón y 21 en la rata). Las propiedades estructurales de una fibra de DNA dependen entre otros factores de la secuencia y la longitud de la fibra (Calladine et al., 2004). Entre especies cercanas hay conservación de más del 70% del genoma a nivel de secuencia, incluso el grado de sintenia (homología entre fragmentos cromosómicos con tamaños de 0.1–40 Mb, de diferentes especies) es alto, sin embargo la distribución de las secuencias o de los bloques sinténicos es diferente en cada cromosoma (Zhao et al., 2004). Esto resulta en cromosomas con una estructura y longitud propias de cada especie. En consecuencia, las propiedades estructurales son diferentes entre cromosomas homólogos de la rata y el ratón. Se sabe que dos regiones de DNA con alta identidad a nivel de secuencia, pueden comportarse de manera muy diferente en su estructura terciaria. De hecho, no es posible predecir con precisión la estructura de un cromosoma a partir de su longitud y su secuencia (Gardiner et al., 2003). Es ilustrativo el resultado del ensayo de los *primers* que se utilizaron, ya que a pesar del alto grado de identidad de secuencia de las regiones mapeadas entre la rata y el ratón (84-100%), la mayoría de los *primers* de la rata no funcionaron en el ratón. En el diseño de los *primers* se considera la identidad de secuencia de la región y se calculan las propiedades termodinámicas de los oligos

resultantes. La ausencia de amplificación de los primers de la rata en el ratón sugiere que las variaciones mínimas de secuencia en las regiones de interés modificaron las propiedades termodinámicas de la fibra. En las regiones donde la identidad de secuencia fue de 100% la ausencia de amplificación se puede deber a las diferencias en la secuencia más allá de la región de interés, lo cual afecta a las propiedades estructurales-termodinámicas de la fibra completa. Es interesante este dato, ya que actualmente se hacen grandes esfuerzos para predecir la estructura tridimensional del DNA, a la fecha sin tener resultados confiables (Junier et al., 2010; Fudenberg y Mirny, 2012). De esta manera, para cromosomas homólogos entre rata y ratón, el conjunto de LARs actualizados en la MN es diferente, por lo que la estructura del cariotipo, específica de cada especie, ayuda a explicar el carácter especie-específico de la NHOS.

El hecho de que no exista secuencia consenso que defina los LARs y que no se hayan identificado proteínas responsables de establecer los anclajes con el DNA de manera consistente, sugiere que las interacciones que se establecen entre el DNA y MN no corresponden a relaciones unívocas entre una proteína y el DNA. Por otro lado, considerando que la conservación del genoma entre rata y ratón en las regiones codificantes es mayor al 90%, no se espera que existan diferencias importantes en el proteoma de la MN de los tipos celulares estudiados, para documentar este hecho se realizaron perfiles genéricos de proteínas de MN (SDS-PAGE) de hepatocitos y neuronas. El análisis de densitometría mostró un perfil similar entre el mismo tipo celular. En el análisis cuantitativo de los perfiles proteicos se encontraron algunas diferencias que corresponden a un cambio mayor a dos veces lo encontrado en una especie, si estas diferencias cuantitativas participan en establecer relaciones topológicas DNA-MN especie específica es materia de futura investigación.

Las neuronas poseen una NHOS muy estable caracterizada por mayor número de bucles, cuyos tamaños son más homogéneos entre sí, lo cual indica que la distribución de LARs es más regular en estas células (Aranda-Anzaldo, 2009; 2012; Aranda-Anzaldo y Dent, 2012; Alva-Medina et al., 2010; 2011; Aranda-Anzaldo et al., 2014).

Esta propiedad permitió que fueran utilizadas como tejido control, ya que por ser un sistema más simétrico las diferencias esperadas se reducen. De manera interesante se encontró que la posición de siete de las ocho secuencias mapeadas fue la misma entre la rata y el ratón. Este resultado es consistente con una distribución de LARs más regular a lo largo de los cromosomas en ambas especies, dirigido a distribuir la energía de estrés estructural del DNA de manera más simétrica al interior del núcleo (Figura 49).

Se ha sugerido que la capacidad de proliferación de las células depende de su capacidad para reorganizar el genoma, ya que con cada división celular se acumulan cambios cuantitativos y cualitativos en la cromatina, limitando su potencial para futuros re-arreglos (Macieira-Coelho y Puvion-Detilleul, 1985). De aquí que un núcleo muy estable, como el de las neuronas, implica mayor resistencia al cambio y un potencial dinámico reducido como resultado de barreras intrínsecas que están relacionadas con una energía de activación muy alta, como la que se necesita para replicar el genoma y la mitosis. De esta manera se ha propuesto que la NHOS constituye la base estructural del estado postmitótico (Aranda-Anzaldo, 2009; Aranda-Anzaldo et al., 2014). Así, durante el desarrollo, los tipos celulares postmitóticos establecerán mayor número de anclajes que las células menos diferenciadas. Nuestros resultados apoyan esta propuesta, ya que las neuronas en ratones mostraron el mismo comportamiento que en la rata, sugiriendo que la NHOS es un mecanismo general que constituye la base estructural del estado postmitótico.

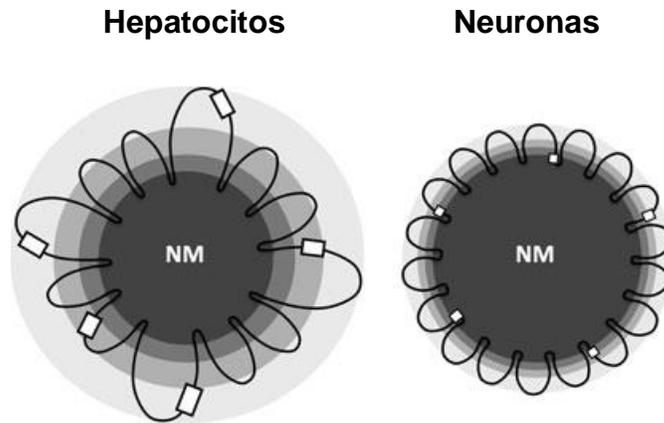
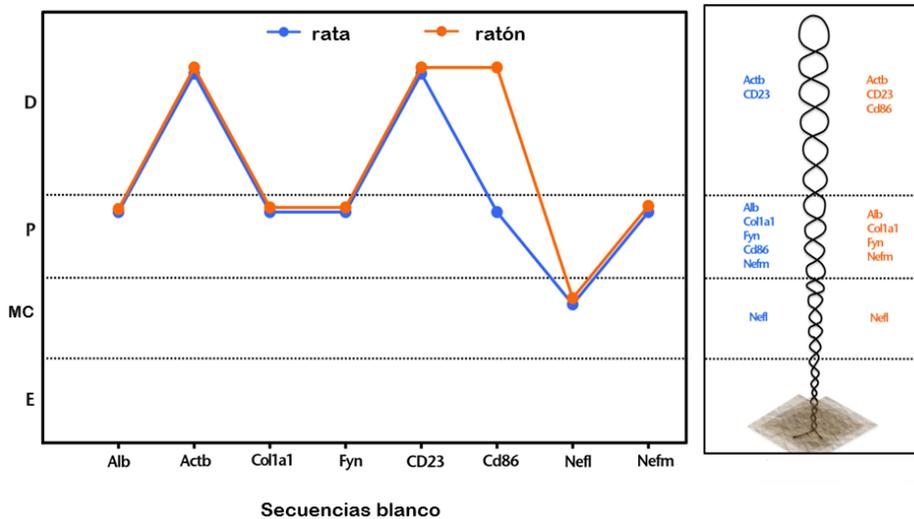
**A****B**

Figura 49. (A) Modelo de la estructura de orden superior en el núcleo celular (NHOS) en hepatocitos y neuronas. Las zonas topológicas con respecto a la MN correspondientes están representadas por una escala de grises de intensidad creciente donde el gris más oscuro representa a la MN. Los cuadros blancos representan secuencias blanco que corresponden a ciertos genes en los bucles. Observe que los bucles en nucleoides de neuronas son más cortos, más numerosos y más homogéneos en tamaño, en comparación con los nucleoides de hepatocitos, los cuales todavía muestran heterogeneidad en el tamaño. Como consecuencia la posición de las secuencias con respecto a la MN, también tienden a homogenizarse. (B) Patrón de mapeo topológico de ocho secuencias blanco en neuronas de rata y ratón. Se muestra un esquema de la distribución de las secuencias blanco en un bucle. Observe que la posición de las secuencias en la misma zona topológica se debe a la distribución más regular de (LARs) en estas células. D=distal a la MN, P=proximal a la MN, MC=muy cercana a la MN y E=embebida en la MN.

Ante la evidencia del carácter tejido-específico y especie-específico de la NHOS, y por otro lado de que los bucles estructurales corresponden a los replicones *in vivo*, se propuso un estudio comparativo de la NHOS entre hepatocitos, linfocitos B “naive” y neuronas en la rata, para indagar sobre el papel de la replicación en la determinación de dicha estructura, ya que las neuronas conservan la capacidad de replicar el genoma bajo ciertas circunstancias a pesar de ser postmitóticas. En este modelo de análisis, si la NHOS en neuronas es relativamente similar a la de hepatocitos o linfocitos B “naive” sugiere la participación de factores de tipo funcional en el establecimiento de la NHOS.

El análisis comparativo a gran escala entre hepatocitos, linfocitos B y neuronas de la rata, mediante la caracterización biofísica de los nucleoides mostró que el tamaño promedio del bucle en neuronas es más pequeño (48.4 kb) en comparación con el de hepatocitos y linfocitos B (82.9 kb). Este resultado implica que en las neuronas hay más asociaciones del DNA con la MN que en hepatocitos y linfocitos B, por lo tanto, el número de bucles estructurales es mayor.

Las cinéticas de digestión utilizando concentraciones limitadas de DNasa I mostraron que después de 60 minutos de digestión el porcentaje de DNA que permanece asociado con la MN en hepatocitos es del 22%, en los linfocitos B “naive” es del 3% y en neuronas 50%. El comportamiento particular de cada cinética indica que a nivel global la NHOS es diferente entre los tres tipos celulares estudiados.

Para estudiar la NHOS a nivel local, se realizó en neuronas de rata el mapeo topológico con respecto a la MN de la región de 162 kb que incluye a cuatro miembros del locus multigénico de la familia albúmina. Se encontró que la región se organiza en seis bucles. El análisis comparativo con los hepatocitos y linfocitos B “naive” mostró una organización diferente en cada tipo celular: 5 bucles en hepatocitos y 14 bucles en linfocitos B. Este resultado apoya la evidencia disponible sobre el carácter tejido-específico de la NHOS (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo; 2010; Trevilla-García y Aranda-Anzaldo, 2011, 2012; Silva-Santiago et al., 2017b). El hallazgo de que la NHOS en neuronas es diferente a la de hepatocitos y linfocitos B descarta la participación del proceso de la replicación del genoma en el establecimiento de los anclajes entre DNA y

MN. Este resultado es concluyente sobre la ausencia de relación causal entre uno de los procesos funcionales de suma relevancia en el núcleo y la NHOS (Silva-Santiago et al., 2017b).

Cómo se relacionan los factores físicos-termodinámicos y los factores biológicos en el núcleo es una pregunta que surge de este trabajo. A la luz de los resultados que hasta ahora se tienen sobre la NHOS: su carácter tejido-específico y especie-específico y que en su establecimiento no participan la replicación (Silva-Santiago et al., 2017b), ni la transcripción (Iarovaia et al., 2004; Maya-Mendoza et al., 2003; Trevilla Gracia y Aranda-Anzaldo, 2011; 2012); se puede apreciar que los factores físicos-termodinámicos determinan el establecimiento de la NHOS. Así, esta estructura constituye un nivel de organización primario sobre el cual deben adaptarse y desplegarse los procesos funcionales del núcleo (Figura 50).

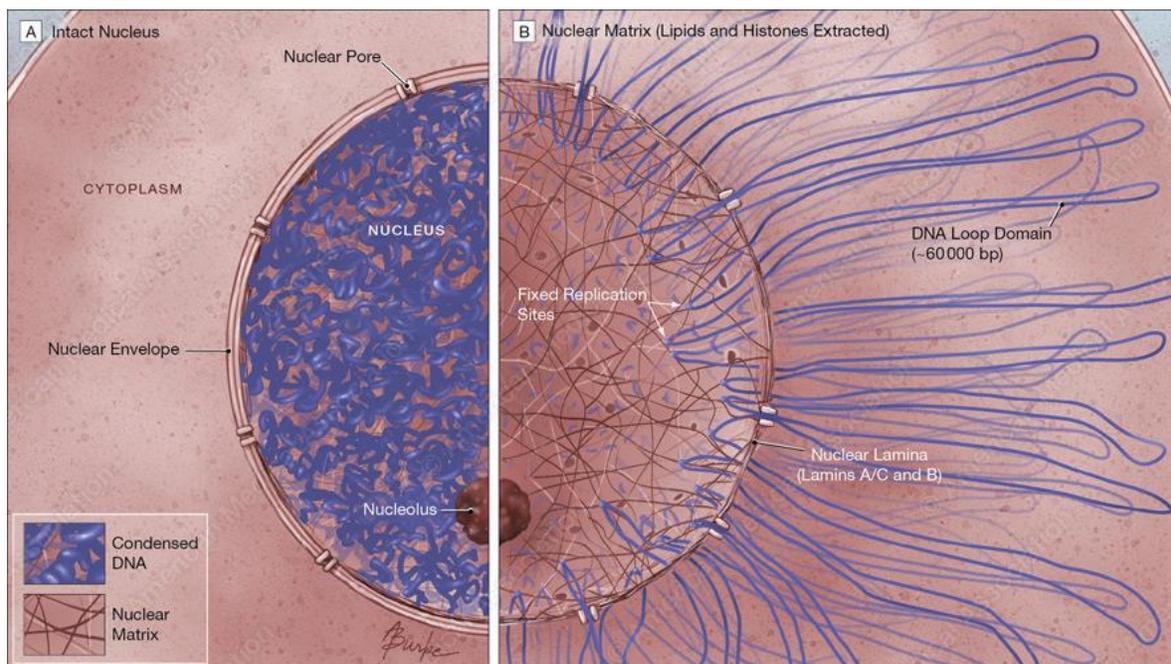


Figura 50. Modelo de la matriz nuclear y los bucles de DNA asociados a esta. Tomado de © American Medical Association, <http://www.alison-burke.com/works-cellsmols.html>

## CONCLUSIONES

- 1) A nivel global y a nivel local la NHOS es tejido-específica.
- 2) Las neuronas poseen una NHOS más estable que la de tipos celulares no postmitóticos (hepatocitos y linfocitos), caracterizada por un aumento en el número de LARs actualizadas, menor tamaño de los bucles estructurales y mayor homogeneidad en el tamaño promedio de los mismos.
- 3) A gran escala la NHOS es similar en células del mismo tipo pertenecientes a especies cercanas.
- 4) Sin embargo, el análisis a pequeña escala revela que las interacciones entre regiones específicas del DNA y la MN no están conservadas entre especies cercanas.
- 5) Por lo tanto, el conjunto de los LARs que definen los bucles estructurales, es especie-específico.
- 6) Los factores de tipo biológico no son determinantes en el establecimiento de la NHOS.
- 7) La NHOS se establece de manera independiente de la transcripción y de la replicación, sugiriendo que no existe relación causal aparente entre los procesos funcionales del núcleo y la NHOS.
- 8) El perfil de proteínas de MN del mismo tipo celular entre especies cercanas es similar.
- 9) Los nucleoides del mismo tipo celular entre especies cercanas son similares, indicando que las propiedades estructurales del DNA y los componentes de la MN son los factores que determinan la actualización del DNA con la MN.
- 10) Sin embargo las diferencias en el cariotipo entre especies favorece que a nivel local se formen anclajes específicos entre el DNA y la MN.
- 11) La eficiente disipación de la energía del estrés estructural propio del DNA dentro del volumen del núcleo condiciona un aumento de la entropía, entendida como una distribución más homogénea de la energía en un estado final comparado

con un estado inicial, estos parecen ser los factores físicos y termodinámicos que determinan la NHOS.

- 12) La NHOS constituye un nivel de organización primario sobre el cual deben adaptarse y desplegarse los procesos funcionales del núcleo.

## PERSPECTIVAS

Los resultados de este trabajo enseñan que los factores físicos contribuyen en el establecimiento de la estructura nuclear. Así la NHOS establece un nivel de organización basal, sobre el cual se adaptan los procesos de la fisiología nuclear.

El carácter tejido-específico de la NHOS sugiere que durante la diferenciación, hay factores que restringen o influyen en la NHOS. La estabilidad de la NHOS hace pensar que puede estar relacionada con la especificación del fenotipo celular que también es bastante estable. Por lo que el estudio de la NHOS puede ayudar a entender el fenómeno de la diferenciación celular.

Aquí se propone estudiar la NHOS en ciertos estadios del desarrollo, por ejemplo en el paso de una célula madre toti-potencial al estadio de gástrula se espera encontrar una NHOS linaje-específica. Si en el proceso de diferenciación ocurren cambios estructurales irreversibles en el genoma, es posible que involucren conformaciones a nivel de la NHOS. No se pretende encontrar cuáles son las causas de la diferenciación, sino cómo es que esta ocurre, buscando una correlación entre estadio de diferenciación y NHOS.

Explorando si el conjunto de LARs propio de una de las capas germinales se preserva en las células diferenciadas derivadas de esta.

Para abordar esta pregunta se propone realizar una identificación 'masiva' de los LARs en las tres líneas germinales y posteriormente en tipos celulares más diferenciados que derivan de cada una de ellas. Mediante un análisis de los mismos se podrá establecer si los LARs de una línea germinal se preservan en células derivadas de esta. Si se preservan esto indicaría que el carácter tejido-específico de la NHOS se establece temprano en el desarrollo y que ciertos cambios estructurales en la organización del genoma son permanentes.

## **Indagar la relación entre NHOS y Asociaciones funcionales del genoma**

Los estudios que hacen análisis masivos de la conformación del genoma al interior del núcleo coinciden en que hay un nivel de organización subyacente a los LADs y/o TADs observados, cuyos factores moleculares están por ser definidos y que la organización espacial del genoma se logra por un mecanismo independiente de CTCF y cohesina, el cual actúa globalmente y a varias escalas, incluyendo escalas más pequeñas que las previamente apreciadas. Estas características son consistentes con la NHOS. Para estudiar la relación entre NHOS y asociaciones funcionales del genoma se pueden usar datos de secuenciación masiva de los LARs genómicos y análisis bio-informático, para localizar las regiones de interacciones facultativas reportadas (enhancers-promotor) dentro de los bucles estructurales de un determinado tipo celular, a fin de elucidar si las asociaciones facultativas están condicionadas por la NHOS.

## Apéndice 1. La tensegridad

La tensegridad (acrónimo de *tensional integrity*) es un principio de construcción basado en el uso de elementos de compresión discontinuos que balancean la fuerza generada por los elementos de tensión que son continuos hasta alcanzar un equilibrio donde la estructura se vuelve independiente del efecto de la gravedad (Galli et al., 2005; Ingber, 1997; Ingber et al., 2014) Figura 54. Los cuerpos de tensión son flexibles como cuerdas y se “ajustan” (como las cuerdas de un instrumento), hasta alcanzar un equilibrio entre las fuerzas de tensión y las fuerzas de compresión generadas (un estado llamado de pre-estrés) esta configuración minimiza la energía elástica almacenada en la estructura (Galli et al., 2005). La estabilidad estructural depende de la integridad tensional o “tensión continua y compresión discontinua”. Según la manera en que los elementos interactúan, una estructura basada en tensegridad puede mostrar rigidez o ser bastante flexible (Ingber, 1997; Ingber et al., 2014).



Figura 51. Escultura basada en tensegridad “Fly” del artista Kenneth Snelson. Tomado de [www.kennethnelson.net](http://www.kennethnelson.net)

Actualmente hay amplia evidencia de que la tensegridad opera en la organización estructural de las células y que es fundamental para entender la mecanotransducción (proceso por el cual la energía mecánica es convertida en señales bioquímicas) dentro y entre las células (Ingber, 1997, 2000; Ingber et al., 2014). El citoesqueleto constituye la red de filamentos que provee la principal fuerza mecánica a la célula, así como la principal vía para la transferencia de señales mecánicas de la superficie celular hacia el núcleo. La eficiencia de la transmisión de las fuerzas depende directamente de las propiedades mecánicas del citoesqueleto, estas propiedades mecánicas surgen de las interacciones cooperativas entre los microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos. La organización estructural y las interconexiones del citoesqueleto proveen la base física para traducir las fuerzas mecánicas en una respuesta bioquímica, así los microfilamentos median la transferencia de fuerzas a bajas tensiones hacia el núcleo; los filamentos intermedios son requeridos para mantener el acoplamiento ante mayor deformación, estos funcionan como “cables” de retención para anclar el núcleo en su lugar y para controlar su rigidez mecánica. Por su parte, los microtúbulos actúan para estabilizar el citoplasma y el núcleo contra la compresión lateral (Ingber, 1997). Las conexiones moleculares generan tensión o pre-estrés interno, por lo que se considera que el citoesqueleto es una estructura activa (Ingber et al., 2014). Para estabilizar la forma de la célula se incorporan elementos resistentes a la compresión o “*struts* moleculares”, dentro de la célula y en regiones localizadas en la matriz extracelular subyacente, de manera que la célula resiste la tracción global del citoesqueleto contráctil. Los sitios de adhesión localizados como los receptores transmembranales para componentes de la matriz extracelular (integrinas) y las moléculas de adhesión inter-celular (cadherinas, selectinas, o moléculas de adhesión celular) que físicamente se acoplan al citoesqueleto, proveen la vía molecular específica para la transferencia de las señales mecánicas a través de la superficie celular, es decir, actúan como mecano-receptores (Ingber, 1991; Wang N. et al., 1993; Hu S. et al., 2003; 2004). Mediante la distribución de las fuerzas sobre los elementos de soporte, este tipo de red provee un mecanismo para concentrar el estrés mecánico y/o focalizar la energía mecánica sobre elementos moleculares específicos que se

asocian físicamente con el citoesqueleto, tales como los complejos de adhesión focal, canales iónicos en la membrana, poros nucleares, cromosomas e incluso genes individuales (Ingber et al., 2014).

Una célula puede ser modelada como un campo de vectores en el cual el acoplamiento mecánico entre citoesqueleto y nucleoesqueleto es el transductor de la información mecánica (Aranda-Anzaldo, 1989). Tal modelo predice que cambios en la forma celular resultará en cambios en la red de interacciones mecánicas conduciendo a modificaciones en la estructura de orden superior al interior del núcleo. Este principio fue sometido a prueba experimental mediante la inducción de un cambio estable en la forma del núcleo que resultó en la modificación de los bucles estructurales de DNA asociados con la MN (Martínez-Ramos et al., 2005). Una organización en interfase en la cual el DNA cromosómico está sub-dividido en dominios circulares hiperenrollados anclados a nodos de ribonucleoproteínas de la MN, mientras que las regiones teloméricas están ancladas a la lámina nuclear periférica, muestra todas las características básicas de un sistema estructural de tensegridad en el cual el DNA tiene el papel de cable mientras que los nodos de la MN tienen el papel de estructuras compresibles (Aranda-Anzaldo, 2016). De hecho, evidencia experimental de que la perturbación masiva del hiperenrollamiento presente en los bucles estructurales de DNA conduce a la fragmentación completa de la MN (Maya-Mendoza et al., 2005; Alva-Medina et al., 2011), es consistente con la idea de que el cromosoma en interfase corresponde a una estructura de tensegridad dado que la inducción de fuerzas de desgarramiento por desenrollamiento forzado de los bucles de DNA afecta la estabilidad de la MN proteica. Además las uniones de los telómeros de los cromosomas a la lámina periférica (Luderus et al., 1996) garantiza que la organización estructural resultante este balanceada tanto por elementos internos (nodos de proteínas de MN) y elementos externos (lamina nuclear periférica) conduciendo a la minimización de la energía elástica almacenada de todos los cromosomas, y esto protege el núcleo contra las fuerzas entrópicas masivas que la cromatina no limitada puede generar (Mazumder et al., 2008) ocasionando la desintegración espontánea del núcleo (Aranda-Anzaldo, 2016).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abney, J. R., Cutler, B., Fillbach, M. L., Axelrod, D., and Scalettar, B. A. (1997). Chromatin dynamics in interphase nuclei and its implications for nuclear structure. *The Journal of cell biology*, 137(7), 1459-1468.
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell* 5th edition ed. Garland Science, New York.
3. Albiez, H., Cremer, M., Tiberi, C., Vecchio, L., Schermelleh, L., Dittrich, S., Küpper, K., Joffe, B., Thormeyer, T., von Hase, J. and Yang, S. (2006). Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks. *Chromosome research*, 14(7), 707-733.
4. Alva-Medina, J., Dent, M.A.R., and Aranda-Anzaldo, A. (2010). Aged and post-mitotic cells share a very stable higher-order structure in the cell nucleus in vivo. *Biogerontology* 11(6), 703-716.
5. Alva-Medina, J., Maya-Mendoza, A., Dent, M.A.R., Aranda-Anzaldo, A. (2011). Continued stabilization of the nuclear higher order structure of post-mitotic neurons in vivo. *Plos One*, 6 (6) e21360.
6. Anachkova, B., Djeliova, V. and Russev, G. (2005). Nuclear matrix support of DNA replication. *Journal of cellular biochemistry*, 96 (5), 951-961.
7. Andreollo, N. A., Santos, E. F. D., Araújo, M. R., and Lopes, L. R. (2012). Rat's age versus human's age: what is the relationship? *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*, 25(1), 49-51.
8. Aranda-Anzaldo, A. (1989). On the role of chromatin higher-order structure and mechanical interactions in the regulation of gene expression. *Speculations in Science and Technology*, 12(3), 163-176.
9. Aranda-Anzaldo, A. (2009). A structural basis for cellular senescence. *Aging* 1 (1): 598-607.
10. Aranda-Anzaldo, A. (2012). The post-mitotic state in neurons correlates with a stable nuclear higher-order structure. *Communicative and integrative biology*, 5(2), 134-139.

11. Aranda-Anzaldo, A. (2016). The interphase mammalian chromosome as a structural system based on tensegrity. *Journal of Theoretical Biology*, 393, 51-59.
12. Aranda-Anzaldo, A. and M. A. Dent (1997). Loss of DNA loop supercoiling and organization in cells infected by herpes simplex virus type 1. *Research on Virology* 148(6): 397-408.
13. Aranda-Anzaldo, A., Dent, M. A., and Martínez-Gómez, A. (2014). The higher-order structure in the cells nucleus as the structural basis of the post-mitotic state. *Progress in biophysics and molecular biology*, 114(3), 137-145.
14. Arlucea, J., Andrade, R., Alonso, R., and Aréchaga, J. (1998). The nuclear basket of the nuclear pore complex is part of a higher-order filamentous network that is related to chromatin. *Journal of structural biology*, 124(1), 51-58.
15. Bates, A.D. and Maxwell, A., 2005. DNA Topology, second ed. Oxford University Press, pp. 66-68.
16. Bednar, J., Furrer, P., Katritch, V., Stasiak, A., Dubochet, J., and Stasiak, A. (1995). Determination of DNA persistence length by cryo-electron microscopy. Separation of the static and dynamic contributions to the apparent persistence length of DNA. *Journal of molecular biology*, 254(4), 579-594.
17. Benham, C., Kohwi-Shigematsu, T. and Bode, J. (1997). Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *Journal of molecular biology*, 274(2), 181-196.
18. Berezney, R. and Coffey, D. S. (1974). Identification of a nuclear protein matrix. *Biochemical and biophysical research communications*, 60(4), 1410-1417.
19. Berezney, R. and L. A. Buchholtz (1981). Isolation and characterization of rat liver nuclear matrices containing high molecular weight deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 20(17): 4995-5002.
20. Bickmore, W. A., and van Steensel, B. (2013). Genome architecture: domain organization of interphase chromosomes. *Cell*, 152(6), 1270-1284.
21. Bode, J., Kohwi, Y., Dickinson, L., Joh, T., Klehr, D., Mielke, C., and Kohwi-Shigematsu, T. (1992). Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. *Science*, 255(5041), 195-197.

22. Bode, J., Schlake, T., Rios-Ramirez, M., Mielke, C., Stengert, M., Kay, V., and Klehr-Wirth, D. (1996). Scaffold/matrix-attached regions: structural properties creating transcriptionally active loci. *International review of cytology*, 162, 389-454.
23. Bolzer, A., Kreth, G., Solovei, I., Koehler, D., Saracoglu, K., Fauth, C., Bolzer, A., Kreth, G., Solovei, I., Koehler, D., Saracoglu, K., Fauth, C., Müller, S., Eils, R., Cremer, C., Speicher, M.R. and Cremer, T. (2005). Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS biology*, 3(5), e157.
24. Boulikas, T. (1995). Chromatin domains and prediction of MAR sequences. In *International review of cytology*, (Vol. 162, pp. 279-388). Academic Press.
25. Bowater, Richard Peter (2005) Supercoiled DNA: Structure. In: *eLS. John Wiley and Sons Ltd, Chichester*. <http://www.els.net> [doi: 10.1038/npg.els.0003899]
26. Brand, P., Lenser, T., and Hemmerich, P. (2010). Assembly dynamics of PML nuclear bodies in living cells. *PMC biophysics*, 3(1), 3.
27. Brandt, A., Papagiannouli, F., Wagner, N., Wilsch-Bräuninger, M., Braun, M., Furlong, E. E., Loserth, S., Wenzl, C., Pilot, F., Vogt, N. and Lecuit, T. and Lecuit, T. (2006). Developmental control of nuclear size and shape by Kugelkern and Kurzkern. *Current Biology*, 16(6), 543-552.
28. Bridger, J. M., Boyle, S., Kill, I. R., and Bickmore, W. A. (2000). Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts. *Current Biology*, 10(3), 149-152.
29. Broers, J. L., Kuijpers, H. J. H., Östlund, C., Worman, H. J., Endert, J., and Ramaekers, F. C. S. (2005). Both lamin A and lamin C mutations cause lamina instability as well as loss of internal nuclear lamin organization. *Experimental cell research*, 304(2), 582-592.
30. Broers, J. L., Peeters, E. A., Kuijpers, H. J., Endert, J., Bouten, C. V., Oomens, C. W., Baaijens, F. P. and Ramaekers, F. C. (2004). Decreased mechanical stiffness in LMNA<sup>-/-</sup> cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies. *Human molecular genetics*, 13(21), 2567-2580.

31. Brosig, M., Ferralli, J., Gelman, L., Chiquet, M., and Chiquet-Ehrismann, R. (2010). Interfering with the connection between the nucleus and the cytoskeleton affects nuclear rotation, mechanotransduction and myogenesis. *The international journal of biochemistry and cell biology*, 42(10), 1717-1728.
32. Buongiorno-Nardelli, M., Micheli, G., Carri, M.T. and Marilley, M. (1982). A relationship between replicon size and supercoiled loop domains in the eukaryotic genome. *Nature*, 298 (5869), 100-102.
33. Caille, N., Thoumine, O., Tardy, Y., and Meister, J. J. (2002). Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells. *Journal of biomechanics*, 35(2), 177-187.
34. Calladine, C., Drew, H., Luisi, B.F. and Travers, A.A. (2004). Understanding DNA. 3rd ed. Elsevier-Academic Press.
35. Calladine, C., Drew, H., Luisi, B.F. and Travers, A.A. (2004a). Understanding DNA. 3rd ed. Elsevier-Academic Press. pp. 20-28.
36. Calladine, C., Drew, H., Luisi, B.F. and Travers, A.A. (2004b). Understanding DNA. 3rd ed. Elsevier-Academic Press. pp. 40-41.
37. Calladine, C., Drew, H., Luisi, B.F. and Travers, A.A. (2004c). Understanding DNA. 3rd ed. Elsevier-Academic Press. pp. 44-54.
38. Calladine, C., Drew, H., Luisi, B.F. and Travers, A.A. (2004d). Understanding DNA. 3rd ed. Elsevier-Academic Press. pp. 44-54.
39. Calladine, C., Drew, H., Luisi, B.F. and Travers, A.A. (2004e). Understanding DNA. 3rd ed. Elsevier-Academic Press. pp. 44-54. p. 116-128.
40. Calladine, C., Drew, H., Luisi, B.F. and Travers, A.A. (2004f). Understanding DNA. 3rd ed. Elsevier-Academic Press. pp. 83-84.
41. Capco, D. G., Wan, K. M., and Penman, S. (1982). The nuclear matrix: three-dimensional architecture and protein composition. *Cell*, 29(3), 847-858.
42. Capell, B. C. and Collins, F. S. (2006). Human laminopathies: nuclei gone genetically awry. *Nature reviews. Genetics*, 7(12), 940.

43. Castillo-Mora, R. C., and Aranda-Anzaldo, A. (2012). Reorganization of the DNA–nuclear matrix interactions in a 210 kb genomic region centered on c-myc after DNA replication in vivo. *Journal of cellular biochemistry*, 113(7), 2451-2463.
44. Celton-Morizur, S., Merlen, G., Couton, D., and Desdouets, C. (2010). Polyploidy and liver proliferation: central role of insulin signaling. *Cell Cycle*, 9(3), 460-466.
45. Chen, J., Rauch, C. A., White, J. H., Englund, P. T., and Cozzarelli, N. R. (1995). The topology of the kinetoplast DNA network. *Cell*, 80(1), 61-69.
46. Chuang, C. H., and Belmont, A. S. (2007). Moving chromatin within the interphase nucleus-controlled transitions? In *Seminars in cell and developmental biology* (Vol. 18, No. 5, pp. 698-706). Academic Press.
47. Chubb, J. R., Boyle, S., Perry, P., and Bickmore, W. A. (2002). Chromatin motion is constrained by association with nuclear compartments in human cells. *Current Biology*, 12(6), 439-445.
48. Clapier, C. R. and Cairns, B. R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual review of biochemistry*, 78, 273-304.
49. Clark, D. J., and Kimura, T. (1990). Electrostatic mechanism of chromatin folding. *Journal of molecular biology*, 211(4), 883-896.
50. Cook P.R. and Brazell (1975) Supercoils in human DNA. *Journal of cell science*, 19(2), 261-279.
51. Cook P.R. and Brazell (1976) Conformational Constraints in Nuclear DNA. *Journal of cell science*, 22(2), 287-302.
52. Cook P.R., Brazell, I.A. and Jost, E. (1976). Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *Journal of cell science*, 22(2), 303-324.
53. Cook, P. R. (1999). The organization of replication and transcription. *Science*, 284(5421), 1790-1795.
54. Cook, P. R. (2002). Predicting three-dimensional genome structure from transcriptional activity. *Nature genetics*, 32(3), 347-352.
55. Cordes, V. C., Reidenbach, S., Köhler, A., Stuurman, N., Van Driel, R., and Franke, W. W. (1993). Intranuclear filaments containing a nuclear pore complex protein. *The Journal of Cell Biology*, 123(6), 1333-1344.

56. Cozzarelli, N. R., Cost, G. J., Nöllmann, M., Viard, T., and Stray, J. E. (2006). Giant proteins that move DNA: bullies of the genomic playground. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(8), 580-588.
57. Cremer, T., and Cremer, M. (2010). Chromosome territories. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(3), a003889.
58. Cremer, T., Cremer, M., Dietzel, S., Müller, S., Solovei, I. and Fakan, S. (2006). Chromosome territories—a functional nuclear landscape. *Current opinion in cell biology*, 18(3), 307-316.
59. Crisp, M., Liu, Q., Roux, K., Rattner, J. B., Shanahan, C., Burke, B., Stahl, P.D. and Hodzic, D. (2006). Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol*, 172(1), 41-53.
60. Dahl, K. N., Engler, A. J., Pajeroski, J. D., and Discher, D. E. (2005). Power-law rheology of isolated nuclei with deformation mapping of nuclear substructures. *Biophysical journal*, 89(4), 2855-2864.
61. Dahl, K. N., Kahn, S. M., Wilson, K. L., and Discher, D. E. (2004). The nuclear envelope lamina network has elasticity and a compressibility limit suggestive of a molecular shock absorber. *Journal of cell science*, 117(20), 4779-4786.
62. De, D.N., (2002). Protein constitution of the chromosome axis. *Chromosoma* 111(2), 69-79.
63. Dechat, T., Pflieger, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D. K., Solimando, L., and Goldman, R. D. (2008). Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes and development*, 22(7), 832-853.
64. Dent, M. A., Segura-Anaya, E., Alva-Medina, J., and Aranda-Anzaldo, A. (2010). NeuN/Fox-3 is an intrinsic component of the neuronal nuclear matrix. *FEBS letters*, 584(13), 2767-2771.
65. Denton, A. R. (2014). Crowding in Polymer–Nanoparticle Mixtures. In *International review of cell and molecular biology* (Vol. 307, pp. 27-71).

66. Deryusheva, S. and Gall, J. G. (2004). Dynamics of coilin in Cajal bodies of the *Xenopus* germinal vesicle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(14), 4810-4814.
67. Dickerson, R. E., and Ng, H. L. (2001). DNA structure from A to B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13), 6986-6988.
68. Diesinger, P. M., Kunkel, S., Langowski, J., and Heermann, D. W. (2010). Histone depletion facilitates chromatin loops on the kilobasepair scale. *Biophysical journal*, 99(9), 2995-3001.
69. Dittmer, T. A., and Misteli, T. (2011). The lamin protein family. *Genome biology*, 12(5), 222.
70. Dixon, J. R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S. and Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, 485(7398), 376.
71. Downs, J. A., and Jackson, S. P. (2004). A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(5), 367.
72. Dundr, M., Hebert, M. D., Karpova, T. S., Stanek, D., Xu, H., Shpargel, K. B., Meier, U. T., Neugebauer, K. M., Matera, A. G. and Misteli, T. (2004). In vivo kinetics of Cajal body components. *J Cell Biol*, 164(6), 831-842.
73. Earnshaw, W. C. and Laemmli, U. K. (1983). Architecture of metaphase chromosomes and chromosome scaffolds. *The Journal of Cell Biology*, 96(1), 84-93.
74. El Hassan, M. A. and Calladine, C. R. (1997). Conformational characteristics of DNA: empirical classifications and a hypothesis for the conformational behaviour of dinucleotide steps. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 355(1722), 43-100.
75. Elcock L. S. and Bridger JM. (2008). Exploring the effects of a dysfunctional nuclear matrix. *Biochemical Society Transactions* 36: 1378-1383.
76. Engelke, R., Riede, J., Hegermann, J., Wuerch, A., Eimer, S., Dengjel, J., and Mittler, G. (2014). The Quantitative Nuclear Matrix Proteome as a Biochemical

- Snapshot of Nuclear Organization. *Journal of proteome research*. 13(9), 3940-3956.
77. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., and Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4), 677-689.
  78. Fakan, S. (1994). Perichromatin fibrils are in situ forms of nascent transcripts. *Trends in cell biology*, 4(3), 86-90.
  79. Fan, J. Y., Rangasamy, D., Luger, K., and Tremethick, D. J. (2004). H2A. Z alters the nucleosome surface to promote HP1 $\alpha$ -mediated chromatin fiber folding. *Molecular cell*, 16(4), 655-661.
  80. Ferrai, C., de Castro, I. J., Lavitas, L., Chotalia, M., and Pombo, A. (2010). Gene positioning. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(6), a000588.
  81. Fey, E. G., and Penman, S. (1988). Nuclear matrix proteins reflect cell type of origin in cultured human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85:121-125. AQUÍ VOY
  82. Flyamer, I. M., Gassler, J., Imakaev, M., Brandão, H. B., Ulianov, S. V., Abdennur, N., Razin, S. V., Mirny, L. A. and Tachibana-Konwalski, K. (2017). Single-nucleus Hi-C reveals unique chromatin reorganization at oocyte-to-zygote transition. *Nature*, 544(7648), 110.
  83. Fošnarič, M., Iglič, A., Kroll, D. M., and May, S. (2013). Monte Carlo simulations of a polymer confined within a fluid vesicle. *Soft Matter*, 9(15), 3976-3984.
  84. Fudenberg, G., and Mirny, L. A. (2012). Higher-order chromatin structure: bridging physics and biology. *Current opinion in genetics and development*, 22(2), 115-124.
  85. Fussner, E., Strauss, M., Djuric, U., Li, R., Ahmed, K., Hart, M., Ellis, J., and Bazett-Jones, D. P. (2012). Open and closed domains in the mouse genome are configured as 10-nm chromatin fibres. *EMBO reports*, 13(11), 992-996.
  86. Galli, C., Guizzardi, S., and Passeri, G. (2005). Life on the wire: on tensegrity and force balance in cells. *Acta Bio Medica Atenei Parmensis*, 76(1), 5-12.

87. Gan, L., Ladinsky, M. S., and Jensen, G. J. (2013). Chromatin in a marine picoeukaryote is a disordered assemblage of nucleosomes. *Chromosoma*, 122(5), 377-386.
88. García-Vilchis, D., and Aranda-Anzaldo, A. (2017). DNA Length Modulates the Affinity of Fragments of Genomic DNA for the Nuclear Matrix In Vitro. *Journal of cellular biochemistry*, 118(12), 4487-4497.
89. Gardiner, E. J., Hunter, C. A., Packer, M. J., Palmer, D. S., and Willett, P. (2003). Sequence-dependent DNA structure: a database of octamer structural parameters. *Journal of molecular biology*, 332(5), 1025-1035.
90. Gartenberg, M. R., Neumann, F. R., Laroche, T., Blaszczyk, M., and Gasser, S. M. (2004). Sir-mediated repression can occur independently of chromosomal and subnuclear contexts. *Cell*, 119(7), 955-967.
91. Gavrillov, A. A., Golov, A. K., and Razin, S. V. (2013). Actual ligation frequencies in the chromosome conformation capture procedure. *PLoS One*, 8(3), e60403.
92. Gavrillov, A., Razin, S. V., and Cavalli, G. (2015). In vivo formaldehyde cross-linking: it is time for black box analysis. *Briefings in functional genomics*, 14(2), 163-165.
93. Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Metzker, M. L., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., Scherer, S., ... and Okwuonu, G. (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*, 428(6982), 493-521.
94. Görisch, S. M., Lichter, P., and Rippe, K. (2005). Mobility of multi-subunit complexes in the nucleus: accessibility and dynamics of chromatin subcompartments. *Histochemistry and cell biology*, 123(3), 217-228.
95. Greaves, I. K., Rangasamy, D., Ridgway, P., and Tremethick, D. J. (2007). H2A. Z contributes to the unique 3D structure of the centromere. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(2), 525-530.
96. Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M. B., Talhout, W., Eussen, B. H., de Klein, A., Wessels, L., de Laat, W. and van Steensel, B. (2008). Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature*, 453(7197), 948.

97. Guilak, F., Tedrow, J. R., and Burgkart, R. (2000). Viscoelastic properties of the cell nucleus. *Biochemical and biophysical research communications*, 269(3), 781-786.
98. Handwerger, K. E., Murphy, C., and Gall, J. G. (2003). Steady-state dynamics of Cajal body components in the *Xenopus* germinal vesicle. *J Cell Biol*, 160(4), 495-504.
99. Harborth, J., Wang, J., Gueth-Hallonet, C., Weber, K., and Osborn, M. (1999). Self-assembly of NuMA: multiarm oligomers as structural units of a nuclear lattice. *The EMBO journal*, 18(6), 1689-1700.
100. Heitz, E. (1928). Das Heterochromatin der Moose. *Jb. Bot* 69: 762–818.
101. Helmrich, A., Ballarino, M., Nudler, E., and Tora, L. (2013). Transcription-replication encounters, consequences and genomic instability. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(4), 412.
102. Hemmerich, P., Schmiedeberg, L., and Diekmann, S. (2011). Dynamic as well as stable protein interactions contribute to genome function and maintenance. *Chromosome research*, 19(1), 131-151.
103. Hemmerich, P., Weidtkamp-Peters, S., Hoischen, C., Schmiedeberg, L., Erliandri, I., and Diekmann, S. (2008). Dynamics of inner kinetochore assembly and maintenance in living cells. *The Journal of cell biology*, 180(6), 1101-1114.
104. Heng, H. H., Goetze, S., Christine, J. Y., Liu, G., Stevens, J. B., Bremer, S. W., ... and Krawetz, S. A. (2004). Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. *J Cell Sci*, 117(7), 999-1008.
105. Heun, P., Laroche, T., Shimada, K., Furrer, P., and Gasser, S. M. (2001). Chromosome dynamics in the yeast interphase nucleus. *Science*, 294(5549), 2181-2186.
106. Holaska, J. M., and Wilson, K. L. (2007). An emerin “proteome”: purification of distinct emerin-containing complexes from HeLa cells suggests molecular basis for diverse roles including gene regulation, mRNA splicing, signaling, mechanosensing, and nuclear architecture. *Biochemistry*, 46(30), 8897-8908.

107. Holaska, J. M., Kowalski, A. K., and Wilson, K. L. (2004). Emerin caps the pointed end of actin filaments: evidence for an actin cortical network at the nuclear inner membrane. *PLoS biology*, 2(9), e231.
108. <https://www.jax.org/research-and-faculty/research-labs/the-harrison-lab/gerontology/life-span-as-a-biomarker>
109. Hu, S., Chen, J., and Wang, N. (2004). Cell spreading controls balance of prestress by microtubules and extracellular matrix. *Front Biosci*, 9, 2177-2182.
110. Hu, S., Chen, J., Fabry, B., Numaguchi, Y., Gouldstone, A., Ingber, D. E., Fredgber, J. J., Butler, J. P. and Wang, N. (2003). Intracellular stress tomography reveals stress focusing and structural anisotropy in cytoskeleton of living cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 285(5), C1082-C1090.
111. Hunter, C. A. (1993). Sequence-dependent DNA structure: the role of base stacking interactions. *Journal of molecular biology*, 230(3), 1025-1054.
112. Iarovaia, O. V., Bystritskiy, A., Ravcheev, D., Hancock, R., and Razin, S. V. (2004). Visualization of individual DNA loops and a map of loop domains in the human dystrophin gene. *Nucleic acids research*, 32(7), 2079-2086.
113. Ingber, D. E. (1997). Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annual review of physiology*, 59(1), 575-599.
114. Ingber, D. E. (1991). Extracellular matrix and cell shape: potential control points for inhibition of angiogenesis. *Journal of cellular biochemistry*, 47(3), 236-241.
115. Ingber, D. E. (2000). The origin of cellular life. *Bioessays*, 22(12), 1160-1170.
116. Ingber, D. E., Wang, N., and Stamenović, D. (2014). Tensegrity, cellular biophysics, and the mechanics of living systems. *Reports on Progress in Physics*, 77(4), 046603.
117. Jackson, D. A. (2006). The nucleus—An overview. *Viruses and the nucleus John Wiley and Sons, West Sussex, UK*, 1-24.
118. Janin, A., Bauer, D., Ratti, F., Millat, G., and Méjat, A. (2017). Nuclear envelopathies: a complex LINC between nuclear envelope and pathology. *Orphanet journal of rare diseases*, 12(1), 147.

119. Jiang, G., Huang, A. H., Cai, Y., Tanase, M., and Sheetz, M. P. (2006). Rigidity sensing at the leading edge through  $\alpha\beta3$  integrins and RPTP $\alpha$ . *Biophysical journal*, 90(5), 1804-1809.
120. Johansen, K. M., Forer, A., Yao, C., Girton, J., and Johansen, J. (2011). Do nuclear envelope and intranuclear proteins reorganize during mitosis to form an elastic, hydrogel-like spindle matrix? *Chromosome research*, 19(3), 345-365.
121. Johnston, K. P., Maynard, J. A., Truskett, T. M., Borwankar, A. U., Miller, M. A., Wilson, B. K., Dinin, A. K., Khan, T. A. and Kaczorowski, K. J. (2012). Concentrated dispersions of equilibrium protein nanoclusters that reversibly dissociate into active monomers. *ACS nano*, 6(2), 1357-1369.
122. Junier, I., Martin, O., and Képès, F. (2010). Spatial and topological organization of DNA chains induced by gene co-localization. *PLoS computational biology*, 6(2), e1000678.
123. Kimura, H., and Cook, P. R. (2001). Kinetics of core histones in living human cells. *The Journal of cell biology*, 153(7), 1341-1354.
124. Kireev, I., Lakonishok, M., Liu, W., Joshi, V. N., Powell, R., and Belmont, A. S. (2008). In vivo immunogold labeling confirms large-scale chromatin folding motifs. *Nature methods*, 5(4), 311-313.
125. Kramer, P.R. and Sinden, R.R. (1997). Measurement of unrestrained negative supercoiling and topological domain size in living human cells. *Biochemistry* 36(11), 3151–3158.
126. Kubo, N., Ishii, H., Gorkin, D., Meitinger, F., Xiong, X., Fang, R., Liu, T., Ye, Z., Li, B., Dixon, J. R., Desai, A., Zhao, H. and Ren B. (2017). Preservation of chromatin organization after acute loss of CTCF in mouse embryonic stem cells. *bioRxiv*, 118737.
127. Lambert, F. L. (2002). Disorder – A cracked crutch for supporting entropy discussions. *Journal of Chemical Education* (79)2, 187-192.
128. Lammerding, J., Fong, L. G., Ji, J. Y., Reue, K., Stewart, C. L., Young, S. G., and Lee, R. T. (2006). Lamins A and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics. *Journal of Biological Chemistry*, 281(35), 25768-25780.

129. Lammerding, J., Schulze, P. C., Takahashi, T., Kozlov, S., Sullivan, T., Kamm, R. D., Stewart C. L, and Lee, R. T. (2004). Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *Journal of Clinical Investigation*, 113(3), 370.
130. Lampert, F., Hofmann, D., and Sandritter, W. (1966). Interference microscopic dry weight determination of nucleus, cytoplasm and nucleolus of HeLa and amnion cells in tissue culture. *Histochemie. Histochemistry. Histochimie*, 6(4), 370.
131. Leckband, D., and Israelachvili, J. (2001). Intermolecular forces in biology. *Quarterly reviews of biophysics*, 34(2), 105-267.
132. Lee, J. S., Hale, C. M., Panorchan, P., Khatau, S. B., George, J. P., Tseng, Y., ... and Wirtz, D. (2007). Nuclear lamin A/C deficiency induces defects in cell mechanics, polarization, and migration. *Biophysical journal*, 93(7), 2542-2552.
133. Levi, V., Ruan, Q., Plutz, M., Belmont, A. S., and Gratton, E. (2005). Chromatin dynamics in interphase cells revealed by tracking in a two-photon excitation microscope. *Biophysical journal*, 89(6), 4275-4285.
134. Lewin, B. (1994). *Genes V*. Oxford University Press. New York; 804-808.
135. Libotte, T., Zaim, H., Abraham, S., Padmakumar, V. C., Schneider, M., Lu, W., Munck, M., Hutchison, C., Wehnert, M., Fahrenkrog B., Sauder, U., Aebi, U., Noegel, A. A., and Karakesisoglou, I. (2005). Lamin A/C–dependent localization of Nesprin-2, a giant scaffolder at the nuclear envelope. *Molecular biology of the cell*, 16(7), 3411-3424.
136. Lieberman-Aiden, E., Van Berkum, N. L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., ... and Sandstrom, R. (2009). Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*, 326(5950), 289-293.
137. Lindsley, Janet E. (2005). DNA Topology: Supercoiling and Linking. In: *eLS. John Wiley and Sons Ltd, Chichester*. <http://www.els.net> [doi: 10.1038/npg.els.0003904].

138. Lippincott-Schwartz, J., Altan-Bonnet, N., and Patterson, G. H. (2003). Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nature Cell Biology*, S7-14.
139. Lombardi, M. L., Jaalouk, D. E., Shanahan, C. M., Burke, B., Roux, K. J., and Lammerding, J. (2011). The interaction between nesprins and sun proteins at the nuclear envelope is critical for force transmission between the nucleus and cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*, 286(30), 26743-26753.
140. López García P. and Forterre, P. (1997). DNA topology in hyperthermophilic archaea: reference states and their variation with growth phase, growth temperature and temperature stresses. *Molecular Microbiology* 23(6), 1267-1279.
141. Ludérus, M. E., van Steensel B., Chong, L., Sibon, O. C., Cremers, F. F., and de Lange T. (1996). Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex. *The Journal of cell biology*, 135(4), 867-881.
142. Luger, K., and Hansen, J. C. (2005). Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Current opinion in structural biology*, 15(2), 188-196.
143. Lukas, C., Bartek, J., and Lukas, J. (2005). Imaging of protein movement induced by chromosomal breakage: tiny 'local' lesions pose great 'global' challenges. *Chromosoma*, 114(3), 146-154.
144. Macieira-Coelho, A., and Puvion-Dutilleul, F. (1985). Genome reorganization during aging of dividing cells. In *Werner's Syndrome and Human Aging* (pp. 391-419). Springer, Boston, MA.
145. Maniotis, A. J., Chen, C. S., and Ingber, D. E. (1997). Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(3), 849-854.
146. Marenduzzo, D., Micheletti, C., and Cook, P. R. (2006). Entropy-driven genome organization. *Biophysical journal*, 90(10), 3712-3721.
147. Markaki Y., Gunkel M., Schermelleh L., Beichmanis S., Neumann J., Heidemann M., Leonhardt H., Eick D., Cremer C., Cremer T., (2010). Functional Nuclear

- Organization of Transcription and DNA Replication. A topographical Marriage between Chromatin Domains and the Interchromatin Compartment. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology LXXV*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 978-1-936113-07-1.
148. Markiewicz, E., Venables, R., Quinlan, R., Dorobek, M., Hausmanowa-Petruciewicz, I., and Hutchison, C. (2002). Increased solubility of lamins and redistribution of lamin C in X-linked Emery–Dreifuss muscular dystrophy fibroblasts. *Journal of structural biology*, 140(1), 241-253.
  149. Marshall, W. F. (2002). Order and disorder in the nucleus. *Current biology*, 12(5), R185-R192.
  150. Marshall, W. F., Straight, A., Marko, J. F., Swedlow, J., Dernburg, A., Belmont, A., ... and Sedat, J. W. (1997). Interphase chromosomes undergo constrained diffusional motion in living cells. *Current Biology*, 7(12), 930-939.
  151. Martin, C., Chen, S., Maya-Mendoza, A., Lovric, J., Sims, P. F., and Jackson, D. A. (2009). Lamin B1 maintains the functional plasticity of nucleoli. *Journal of cell science*, 122(10), 1551-1562.
  152. Martínez-Ramos I, Maya-Mendoza A, Gariglio P. and Aranda-Anzaldo A. 2005. A global but stable change in HeLa cell morphology induces reorganization of DNA structural loop domains within the cell nucleus. *Journal of cellular biochemistry* 96(1), 79–88.
  153. Matera, A. G. (1999). Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends in cell biology*, 9(8), 302-309.
  154. Matera, A. G., Izaguire-Sierra, M., Praveen, K., and Rajendra, T. K. (2009). Nuclear bodies: random aggregates of sticky proteins or crucibles of macromolecular assembly? *Developmental cell*, 17(5), 639-647.
  155. Maya-Mendoza, A. and Aranda-Anzaldo, A. (2003). Positional mapping of specific DNA sequences relative to the nuclear substructure by direct polymerase chain reaction on nuclear matrix-bound templates. *Analytical biochemistry*, 313(2), 196-207.

156. Maya-Mendoza, A., Hernandez-Munoz, R., Gariglio, P. and Aranda-Anzaldo, A. (2005) Natural ageing in the rat liver correlates with progressive stabilisation of DNA-nuclear matrix interactions and withdrawal of genes from the nuclear substructure. *Mechanisms of aging and development*, 126(6-7), 767-782.
157. Maya-Mendoza, A., Hernández-Muñoz R., Gariglio, P. and Aranda-Anzaldo, A. (2003). Gene positional changes relative to the nuclear substructure correlate with the proliferating status of hepatocytes during liver regeneration. *Nucleic acids research*, 31(21), 6168-6179.
158. Maya-Mendoza, A., Hernández-Muñoz, R., Gariglio P., and Aranda-Anzaldo A. (2004). Gene positional changes relative to the nuclear substructure during carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *Journal of cellular biochemistry*, 93(6), 1084-1098.
159. Mazumder, A., Roopa, T., Basu, A., Mahadevan, L., and Shivashankar, G. V. (2008). Dynamics of chromatin decondensation reveals the structural integrity of a mechanically prestressed nucleus. *Biophysical journal*, 95(6), 3028-3035.
160. McCready, S.J., Godwin, J., Mason, D.W., Brazell, I.A. and Cook, P.R. (1980) DNA is replicated at the nuclear cage. *Journal of Cell Science*, 46(1), 365-386.
161. McInerney, P., Adams, P., y Hadi, M. Z. (2014) Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase. *Molecular Biology International*, 2014.
162. Meshorer, E. (2007). Chromatin in embryonic stem cell neuronal differentiation. *Histology and histopathology*, 22(3), 311-319.
163. Mirkin, Sergei M. (2001) DNA Topology: Fundamentals. In: *eLS. John Wiley and Sons Ltd, Chichester*. <http://www.els.net> [doi: 10.1038/npg.els.0001038].
164. Misteli, T. (2001a). Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science*, 291(5505), 843-847.
165. Misteli, T. (2001b). The concept of self-organization in cellular architecture. *J Cell Biol*, 155(2), 181-186.
166. Misteli, T. (2007). Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell*, 128(4), 787-800.

167. Misteli, T. (2008). Physiological importance of RNA and protein mobility in the cell nucleus. *Histochemistry and cell biology*, 129(1), 5-11.
168. Moir, R. D., Yoon, M., Khuon, S., and Goldman, R. D. (2000). Nuclear Lamins and B1. *The Journal of cell biology*, 151(6), 1155-1168.
169. Mortusewicz, O., Leonhardt, H., and Cardoso, M. C. (2008). Spatiotemporal dynamics of regulatory protein recruitment at DNA damage sites. *Journal of cellular biochemistry*, 104(5), 1562-1569.
170. Müller, I., Boyle, S., Singer, R. H., Bickmore, W. A., and Chubb, J. R. (2010). Stable morphology, but dynamic internal reorganisation, of interphase human chromosomes in living cells. *PloS one*, 5(7), e11560.
171. Murugesapillai, D., McCauley, M. J., Huo, R., Nelson Holte, M. H., Stepanyants, A., Maher III, L. J., ... and Williams, M. C. (2014). DNA bridging and looping by HMO1 provides a mechanism for stabilizing nucleosome-free chromatin. *Nucleic acids research*, 42(14), 8996-9004.
172. Murugesapillai, D., McCauley, M. J., Maher, L. J., and Williams, M. C. (2016). Single-molecule studies of high-mobility group B architectural DNA bending proteins. *Biophysical reviews*, 1-24.
173. Nagano, T., Lubling, Y., Várnai, C., Dudley, C., Leung, W., Baran, Y., ... and Tanay, A. (2017). Cell-cycle dynamics of chromosomal organization at single-cell resolution. *Nature*, 547(7661), 61.
174. Nelson, D. L.; Lehninger, A. L. and Cox, M. M. (2008) *Lehninger principles of biochemistry*. 5<sup>th</sup> ed. Mcmillan. pp. 271-283
175. Nelson, P. (1999). Transport of torsional stress in DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(25), 14342–14347.
176. Neumann, R.M. (1977). The entropy of a single Gaussian macromolecule in a non-interacting solvent. *The Journal of Chemical Physics*, 66(2), 870–871.
177. Nickerson, J. (2001). Experimental observations of a nuclear matrix. *Journal of cell science*, 114(3), 463-474.

178. Nishino, Y., Eltsov, M., Joti, Y., Ito, K., Takata, H., Takahashi, Y., ... and Maeshima, K. (2012). Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. *The EMBO journal*, 31(7), 1644-1653.
179. Nora, E. P., Goloborodko, A., Valton, A. L., Gibcus, J. H., Uebersohn, A., Abdennur, N., ... and Bruneau, B. G. (2017). Targeted degradation of CTCF decouples local insulation of chromosome domains from genomic compartmentalization. *Cell*, 169(5), 930-944.
180. Nora, E. P., Lajoie, B. R., Schulz, E. G., Giorgetti, L., Okamoto, I., Servant, N., ... and Gribnau, J. (2012). Spatial partitioning of the regulatory landscape of the x-inactivation center. *Nature*, 485(7398), 381.
181. Olins, A. L., and Olins, D. E. (1974). Spheroid chromatin units (v bodies). *Science*, 183(4122), 330-332.
182. Oosawa, F., and Asakura, S. (1954). Surface Tension of High-Polymer Solutions. *The Journal of Chemical Physics*, 22(7), 1255-1255.
183. O'sullivan, J. M., Hendy, M. D., Pichugina, T., Wake, G. C. and Langowski, J. (2013). The statistical-mechanics of chromosome conformation capture. *Nucleus*, 4(5), 390-398.
184. Ottaviani, D., Lever, E., Takousis, P. and Sheer, D. (2008). Anchoring the genome. *Genome biology*, 9, 201.
185. Packer, M. J., and Hunter, C. A. (1998) Sequence-dependent DNA structure: The role of the sugar-phosphate backbone. *Journal of molecular biology*, 280(3), 407-420.
186. Pajerowski, J. D., Dahl, K. N., Zhong, F. L., Sammak, P. J., and Discher, D. E. (2007). Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(40), 15619-15624.
187. Parada, L. A., McQueen, P. G., and Misteli, T. (2004). Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome biology*, 5(7), R44.
188. Pardoll, D.M., Vogelstein, B. and Coffey, D.S. (1980) A fixed site of DNA replication in eucaryotic cells. *Cell*, 19(2), 527-536.

189. Peric-Hupkes, D., Meuleman, W., Pagie, L., Bruggeman, S. W., Solovei, I., Brugman, W., ... and Reinders, M. (2010). Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation. *Molecular cell*, 38(4), 603-613.
190. Poirier, M. G., and Marko, J. F. (2002). Mitotic chromosomes are chromatin networks without a mechanically contiguous protein scaffold. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15393-15397.
191. Rabut, G., Doye, V., and Ellenberg, J. (2004). Mapping the dynamic organization of the nuclear pore complex inside single living cells. *Nature cell biology*, 6(11), 1114.
192. Radulescu, A. E., and Cleveland, D. W. (2010). NuMA after 30 years: the matrix revisited. *Trends in cell biology*, 20(4), 214-222.
193. Rat Genome Sequencing Project Consortium (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428(6982), 493-521.
194. Razin, S. V. (2001). The nuclear matrix and chromosomal DNA loops: is there any correlation between partitioning of the genome into loops and functional domains?" *Cellular and Molecular Biology Letters*, 6(1): 59-69.
195. Razin, S. V., and Gavrilov, A. A. (2014). Chromatin without the 30-nm fiber: constrained disorder instead of hierarchical folding. *Epigenetics*, 9(5), 653-657.
196. Razin, S. V., Iarovaia, O. V., Sjakste, N., Sjakste, T., Bagdoniene, L., Rynditch, A. V., ... and Vassetzky, Y. S. (2007). Chromatin domains and regulation of transcription. *Journal of molecular biology*, 369(3), 597-607.
197. Razin, S.V., (1997). Nuclear Matrix and the spatial organization of chromosomal DNA domains. LANDES Bioscience.
198. Rivera-Mulia, J.C., and Aranda-Anzaldo, A. (2010). Determination of the in vivo structural DNA loop organization in the genomic of the rat albumin locus by means of a topological approach. *DNA Research* 17(1), 23-35.

199. Rivera-Mulia, J.C., Hernández-Muñoz, R., Martínez, F., and Aranda-Anzaldo, A. (2011). DNA moves sequentially towards the nuclear matrix during DNA replication in vivo. *BMC Cell Biology* 12(1), 3.
200. Rowat, A. C., Foster, L. J., Nielsen, M. M., Weiss, M., and Ipsen, J. H. (2005). Characterization of the elastic properties of the nuclear envelope. *Journal of The Royal Society Interface*, 2(2), 63-69.
201. Rowat, A. C., Lammerding, J., and Ipsen, J. H. (2006). Mechanical properties of the cell nucleus and the effect of emerin deficiency. *Biophysical journal*, 91(12), 4649-4664.
202. Rowat, A. C., Lammerding, J., Herrmann, H., and Aebi, U. (2008). Towards an integrated understanding of the structure and mechanics of the cell nucleus. *Bioessays*, 30(3), 226-236.
203. Schwarzer, W., Abdennur, N., Goloborodko, A., Pekowska, A., Fudenberg, G., Loe-Mie, Y., ... and Spitz, F. (2017). Two independent modes of chromatin organization revealed by cohesin removal. *Nature*, 551(7678), 51.
204. Sheval, E. V., and Polyakov, V. Y. (2006). Visualization of the chromosome scaffold and intermediates of loop domain compaction in extracted mitotic cells. *Cell biology international*, 30(12), 1028-1040.
205. Sigal, S. H., Gupta, S., Gebhard, D. F., Holst, P., Neufeld, D., and Reid, L. M. (1995). Evidence for a terminal differentiation process in the rat liver. *Differentiation*, 59(1), 35-42.
206. Silva-Santiago, E., Pardo, J. P., Hernández-Muñoz, R., and Aranda-Anzaldo, A. (2017a). The nuclear higher-order structure defined by the set of topological relationships between DNA and the nuclear matrix is species-specific in hepatocytes. *Gene*, 597, 40-48.
207. Silva-Santiago, E., Rivera-Mulia, J.C., and Aranda-Anzaldo, A. (2017b). The set of structural DNA-nuclear matrix interactions in neurons is cell-type specific and rather independent of functional constraints. *Journal of cellular biochemistry*, 118(8), 2151-2160.

208. Simon, D. N., and Wilson, K. L. (2011). The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic 'network of networks'. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(11), 695.
209. Simon, D. N., Zastrow, M. S., and Wilson, K. L. (2010). Direct actin binding to A- and B-type lamin tails and actin filament bundling by the lamin A tail. *Nucleus*, 1(3), 264-272.
210. Smith, C. A., Wood, E. J., (1992). *Cell Biology*. Chapman and Hall, London, p.81
211. Smith, K. P., Moen, P. T., Wydner, K. L., Coleman, J. R., and Lawrence, J. B. (1999). Processing of endogenous pre-mRNAs in association with SC-35 domains is gene specific. *The Journal of cell biology*, 144(4), 617-629.
212. Solomon, D. A., Cardoso, M. C., and Knudsen, E. S. (2004). Dynamic targeting of the replication machinery to sites of DNA damage. *The Journal of cell biology*, 166(4), 455-463.
213. Soutoglou, E., and Misteli, T. (2007). Mobility and immobility of chromatin in transcription and genome stability. *Current opinion in genetics and development*, 17(5), 435-442.
214. Spector, D. L. (2001). Nuclear domains. *Journal of cell science*, 114(16), 2891-2893.
215. Sporbert, A., Gahl, A., Ankerhold, R., Leonhardt, H., and Cardoso, M. C. (2002). DNA polymerase clamp shows little turnover at established replication sites but sequential de novo assembly at adjacent origin clusters. *Molecular cell*, 10(6), 1355-1365.
216. Sridharan, D. M., McMahon, L. W., and Lambert, M. W. (2006).  $\alpha$ II-Spectrin interacts with five groups of functionally important proteins in the nucleus. *Cell biology international*, 30(11), 866-878.
217. Stuurman, N., Meijne, A. M., van der Pol, A. J., de Jong, L., van Driel, R., and Van Renswoude, J. (1990). The nuclear matrix from cells of different origin. Evidence for a common set of matrix proteins. *Journal of Biological chemistry*, 265(10), 5460-5465.

218. Tang, T. K., Tang, C. J., Chen, Y. L., and Wu, C. W. (1993). Nuclear proteins of the bovine esophageal epithelium. II. The NuMA gene gives rise to multiple mRNAs and gene products reactive with monoclonal antibody W1. *Journal of Cell Science*, 104(2), 249-260.
219. Thakar, R., Gordon, G., and Csink, A. K. (2006). Dynamics and anchoring of heterochromatic loci during development. *Journal of cell science*, 119(20), 4165-4175.
220. Trevilla-García, C., and Aranda-Anzaldo, A. (2011). Cell-type-specific organization of nuclear DNA into structural looped domains. *Journal of cellular biochemistry*, 112(2), 531-540
221. Trevilla-García, C., and Aranda-Anzaldo, A. (2012). The organization of a large transcriptional unit (Fyn) into structural DNA loops is cell-type specific and independent of transcription. *Gene*, 493(1), 1-8.
222. Tsutsui, K., Sano, K. and Tsutsui, K. (2005). Dynamic view of the nuclear matrix. *Acta Medica Okayama*, 59(4), 113-120.
223. van Holde, K., and Zlatanova, J. (1995). Chromatin higher order structure: chasing a mirage? *Journal of Biological Chemistry*, 270(15), 8373-8376.
224. van Holde, K., and Zlatanova, J. (2007, October). Chromatin fiber structure: Where is the problem now? In *Seminars in cell and developmental biology* (Vol. 18, No. 5, pp. 651-658). Academic Press.
225. Verheijen, R., Kuijpers, H., Vooijs, P., van Venrooij, Ramaekers, F. (1986). Protein composition of nuclear matrix preparations from HeLa cells: an immuno-chemical approach. *Journal of cellular science* 80(1),103–122.
226. Viola, M. P., and Puccinelli, E. (1965). Determination of the dry mass of nervous and glial cell nuclei by interference microscopy. *Experientia*, 21(6), 320-321.
227. Walter, H., and Brooks, D. E. (1995). Phase separation in cytoplasm, due to macromolecular crowding, is the basis for microcompartmentation. *FEBS letters*, 361(2-3), 135-139.
228. Walter, J., Schermelleh, L., Cremer, M., Tashiro, S., and Cremer, T. (2003). Chromosome order in HeLa cells changes during mitosis and early G1, but is

- stably maintained during subsequent interphase stages. *The Journal of cell biology*, 160(5), 685-697.
229. Wang, I. F., Reddy, N. M., and Shen, C. K. J. (2002). Higher order arrangement of the eukaryotic nuclear bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13583-13588.
230. Wang, N., Butler, J. P., and Ingber, D. E. (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, 260(5111), 1124-1127.
231. Wang, N., Tytell, J. D., and Ingber, D. E. (2009). Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(1), 75.
232. Watson, J. D., and Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171(4356), 737-738.
233. Wei, X., Samarabandu, J., Devdhar, R. S., Siegel, A. J., Acharya, R., and Berezney, R. (1998). Segregation of transcription and replication sites into higher order domains. *Science*, 281(5382), 1502-1505.
234. Weidtkamp-Peters, S., Lenser, T., Negorev, D., Gerstner, N., Hofmann, T. G., Schwanitz, G., ... and Hemmerich, P. (2008). Dynamics of component exchange at PML nuclear bodies. *Journal of cell science*, 121(16), 2731-2743.
235. Williamson, I., Berlivet, S., Eskeland, R., Boyle, S., Illingworth, R. S., Paquette, D., Dostie, J. and Bickmore, W. A. (2014). Spatial genome organization: contrasting views from chromosome conformation capture and fluorescence in situ hybridization. *Genes and development*, 28(24), 2778-2791.
236. Wilson, R. H., and Coverley, D. (2013). Relationship between DNA replication and the nuclear matrix. *Genes to Cells*, 18(1), 17-31.
237. Woodcock, C. L., and Ghosh, R. P. (2010). Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5), a000596.
238. Worman, H. J., Östlund, C., and Wang, Y. (2010). Diseases of the nuclear envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(2), a000760.

239. Yang, C., Bolotin, E., Jiang, T., Sladek, F. M., and Martinez, E. (2007). Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene*, 389(1), 52-65.
240. Yeung, T., Georges, P. C., Flanagan, L. A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., ... and Janmey, P. A. (2005). Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cytoskeleton*, 60(1), 24-34.
241. Zhang, Y., McCord, R. P., Ho, Y. J., Lajoie, B. R., Hildebrand, D. G., Simon, A. C., ... and Dekker, J. (2012). Spatial organization of the mouse genome and its role in recurrent chromosomal translocations. *Cell*, 148(5), 908-921.
242. Zhang, Y., Y., Xi, Hegde, R. S., Shekkes, Z., Crothers, D.M. (2004). Predicting indirect readout effects in protein-DNA interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(22), 8337-8341.
243. Zhao, S., Shetty, J., Hou, L., Delcher, A., Zhu, B., Osoegawa, K., ... and Fraser, C. M. (2004). Human, mouse, and rat genome large-scale rearrangements: stability versus speciation. *Genome research*, 14(10a), 1851-1860.
244. Zink, D., Fischer, A. H., and Nickerson, J. A. (2004). Nuclear structure in cancer cells. *Nature reviews. Cancer*, 4(9), 677.
245. Zuin, J., Dixon, J. R., van der Reijden, M. I., Ye, Z., Kolovos, P., Brouwer, R. W., ... and Grosveld, F. G. (2014). Cohesin and CTCF differentially affect chromatin architecture and gene expression in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(3), 996-1001.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

ACTA DE EXAMEN



Ciudad Universitaria, a 14 días del mes de mayo de 2018 se celebró el examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS**, que sustentó **SILVA SANTIAGO EVANGELINA**, de nacionalidad mexicana, registrado con el número de cuenta **512014614**, quien cursó los estudios en el periodo comprendido de **2012 a 2016-2**, y cumplió con los requisitos académicos señalados en el plan de estudios correspondiente, presentado la tesis: **"Estudio comparativo de la estructura de orden superior al interior del núcleo celular (NHOS) en dos especies cercanas de mamífero (rata y ratón)"**  
Dirigida por el: Dr. Armando Aranda Anzaldo

El Comité Académico del Programa designó el jurado, formado por los profesores que a continuación se mencionan y que fungieron como:

Presidente: Dra. Rosaura Hernández Rivas

Vocal: Dr. David René Romero Camarena

Vocal: \_\_\_\_\_

Vocal: \_\_\_\_\_

Secretario: Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez

Al término del examen el jurado resolvió: APROBARLA

Se dio por concluido el acto académico con las firmas de los sinodales que en él intervinieron.

[Firma]  
Presidente

[Firma]  
Secretario

[Firma]  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Vocal

**"Por mi raza hablará el espíritu"**

La suscrita, Coordinadora del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, certifica que las firmas son auténticas y corresponden al jurado designado.

[Firma]  
DRA. AUREA OROZCO RIVAS  
COORDINADORA

Por la Dirección General de Administración Escolar

Jefe del Departamento de Exámenes y Títulos Subdirector de Control Documental

5002071218037



Toluca, México, 6 de junio de 2018

A QUIEN CORRESPONDA

Por medio de la presente autorizo que el archivo electrónico correspondiente a mi Tesis Doctoral intitulada "**Estudio comparativo de la estructura de orden superior al interior del núcleo celular (NHOS) en dos especies cercanas de mamífero (rata y ratón)**" se incluyó para fines de difusión en el Repositorio Institucional de la Universidad Autónoma del Estado de México. Dicha tesis desarrollada en el marco del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM fue defendida y aprobada en el examen correspondiente con fecha 14/05/2018, obteniendo así el grado de Doctor en Ciencias por la UNAM. Cabe mencionar que el trabajo experimental vinculado a mi tesis doctoral se desarrolló en el Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México, y que mi tesis fue dirigida por el Dr. Armando Aranda Anzaldo, Investigador "F" de Tiempo Completo adscrito a dicha Facultad. Mi proyecto de tesis recibió apoyo financiero del CONACYT-México en el marco del proyecto CB-176794 otorgado al Dr. Armando Aranda Anzaldo.

Atentamente

Dr. en C. Evangelina Silva Santiago