



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

Cd.Mx., mayo, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

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 los doctores revisores de mi tesis doctoral: Dr. Armando Aranda Anzaldo, Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, Dr. Rolando Hernández Muñoz, Dra. Rosaura Hernández Rivas, Dr. Federico Martínez Montes, Dr. David René Romero Camarena, Dr. Fernando López Casillas.

A mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias: David García Vilchis, 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
I. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL NÚCLEO	9
Biofísica del núcleo.....	11
El papel del <i>crowding</i> molecular (aglomeración o concentración molecular)....	13
Biomecánica del núcleo.....	14
II. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DE LA CROMATINA	18
Dinámica de la cromatina	21
Organización funcional del genoma en 3D	22
III. ESTRUCTURA DEL DNA	25
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
IV. ESTRUCTURA DE ORDEN SUPERIOR AL INTERIOR DEL NÚCLEO	
CELULAR: NHOS (<i>Nuclear Higher Order Structure</i>)	38
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
Tensegridad 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.....	60
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
Mapeo topológico con respecto a la MN de las ocho secuencias diana en neuronas de rata y de ratón	102
Perfil genérico de proteínas de MN en hepatocitos y neuronas de rata y de ratón	109

ANEXO I. 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.....	114
DISCUSIÓN.....	122
CONCLUSIONES.....	138
PERSPECTIVAS.....	140
Apéndice 1. La tensegridad.....	142
ANEXO II. Silva-Santiago et al., 2017a.....	145
ANEXO III. Silva-Santiago et al., 2017b.....	155
BIBLIOGRAFÍA.....	166

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 desoxirribonucleico
DNasa I	Desoxirribonucleasa 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 <i>src</i>
Gb	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
ΔL_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 la 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 la 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 tenseguridad (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 las células terminalmente diferenciadas como la neurona, alcanzan 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 la 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 μm 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 típicos (tiempo que las proteínas son retenidas en ciertos compartimentos) 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 semejantes a 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 solución polidispersa, las fuerzas entrópicas favorecen el contacto entre partículas grandes, esto permite que sus volúmenes excluidos se traslapen 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 el espacio extracelular, el 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⁻¹ • s⁻²). 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⁻¹ • s⁻¹]. Un material viscoelástico muestra un comportamiento que es tanto viscoso y elástico. 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 (μ) (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), y 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 que alteran la mecano-transducción,

conduciendo a modificación en los patrones de expresión de los genes tejido-específicos y/o mecanismos epigenéticos, ocurre por la 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); la visión clásica de los libros de texto es que la fibra nucleosomal es subsecuentemente plegada hasta 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 se 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 Gavrilov, 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, los tipos de histonas H3 y H2A.Z 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 empaçamento 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*) han mostrado que la cromatina está confinada a regiones submicrométricas y su difusión está limitada (Abney *et al.*, 1997; Chubb *et al.*, 2002; Marshall *et al.*, 1997; Walter *et al.*, 2003). Se han descrito movimientos estocásticos que son rápidos y frecuentes, y también movimientos lentos que alcanzan varios micrómetros, son dependientes de ATP y poco frecuentes (Soutoglou y Misteli 2007). 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 μm en el mismo cromosoma se mueven independientemente (Levi *et al.*, 2005). Así, la cromatina tiene movimientos constantes de difusión acotada.

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 zigzag (Woodcock y Ghosh, 2010; Razin y Gavrilov, 2014). Considerando que la mayoría de estas fuentes de irregularidad son altamente dinámicas, 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° , como si estuvieran girando alrededor de un eje vertical imaginario formando una hélice (Calladine *et al.*, 2004a).
 Figura 2.

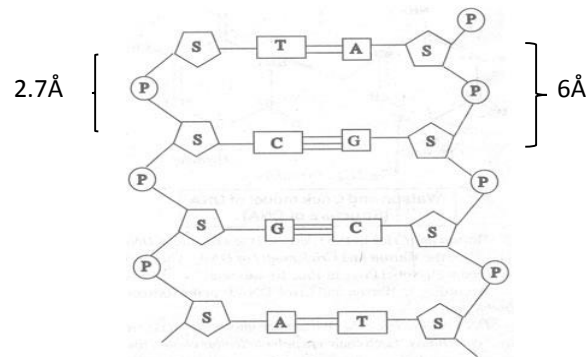


Figura 1. Esquema de la doble hélice de DNA mostrando las dimensiones entre dos pentosas contiguas y el espacio libre entre cada par de bases.

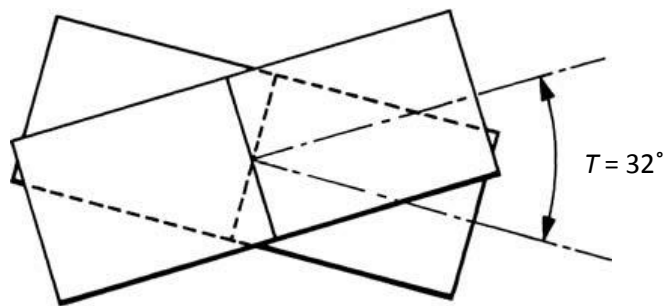


Figura 2. Dos pares de bases apilados entre sí con un giro (*twist*) de 32° entre ellos con respecto a su plano horizontal. Se ilustra el ángulo de giro (*twist*) local: $T = 32^\circ$. Modificado de Calladine *et al.*, 2004.

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 y 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 citosina apilada con una adenina en una cadena y sus bases complementarias timina y guanina 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.

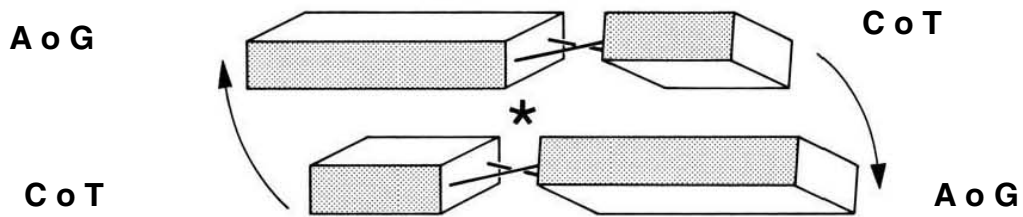


Figura 3. Un paso típico base púrica (A o G)/base pirimídica (C o T), nótese que el apilamiento entre estas bases no es perfecto. El asterisco indica la rotación que se da entre los apareamientos de las bases complementarias conocido como *propeller twist*. Modificado de Calladine *et al.*, 2004.

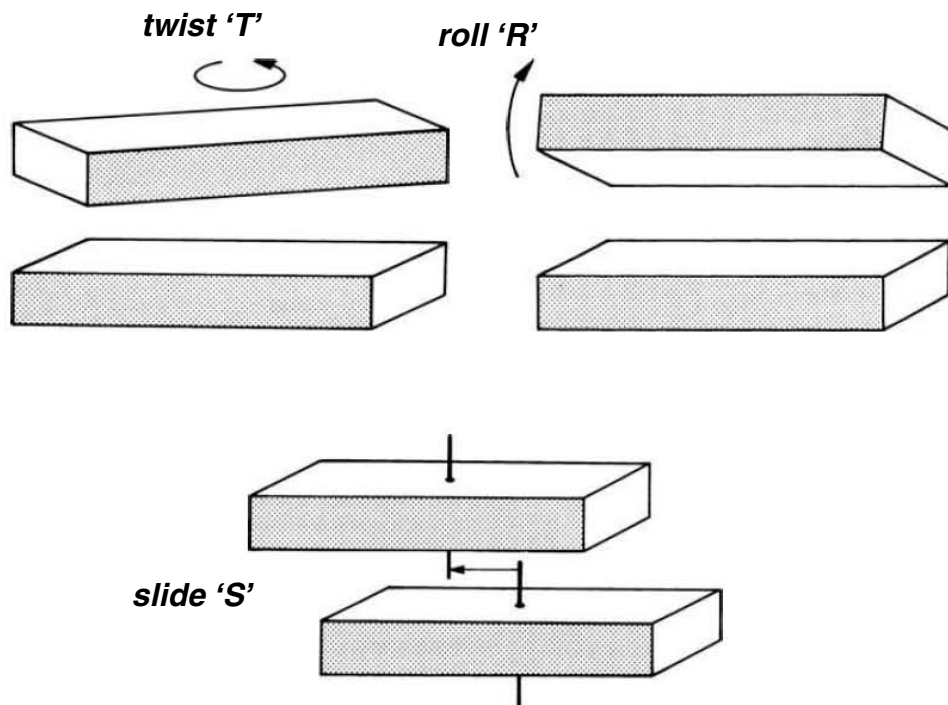


Figura 4. Tres tipos de movimiento en un paso de la doble hélice. *Twist*, *Roll* y *Slide*. Tomado de Calladine *et al.*, 2004.

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 fáciles 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 (100 nm); 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, alrededor de uno a tres grados 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°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, de los 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.

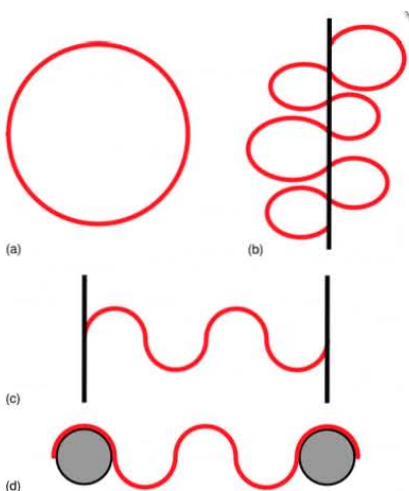


Figura 5. Ejemplos de dominios topológicos. (a) DNA circular, (b) bucles de DNA cromosómico, (c) DNA lineal unido a la membrana, (d) DNA lineal unido a proteínas. Tomado de Mirkin, 2001.

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.

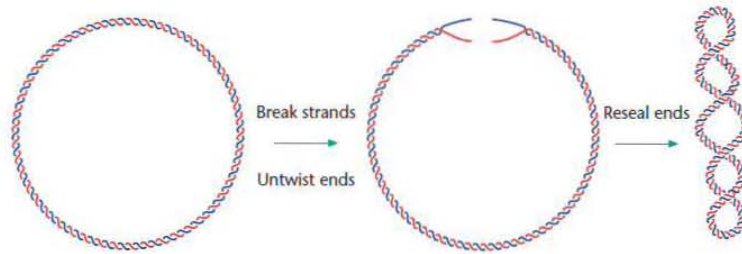


Figura 6. Reduciendo el número de veces que las dos hebras se entrelazan crea un hiperenrollamiento negativo. Si las hebras de un círculo de DNA se rompen y desenrollan varias veces antes de volver a unir las, el círculo resultante tendrá hiperenrollamiento negativo. Tomado de Lindsley, 2005.

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 ΔLk (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 ΔLk 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 ΔLk

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.

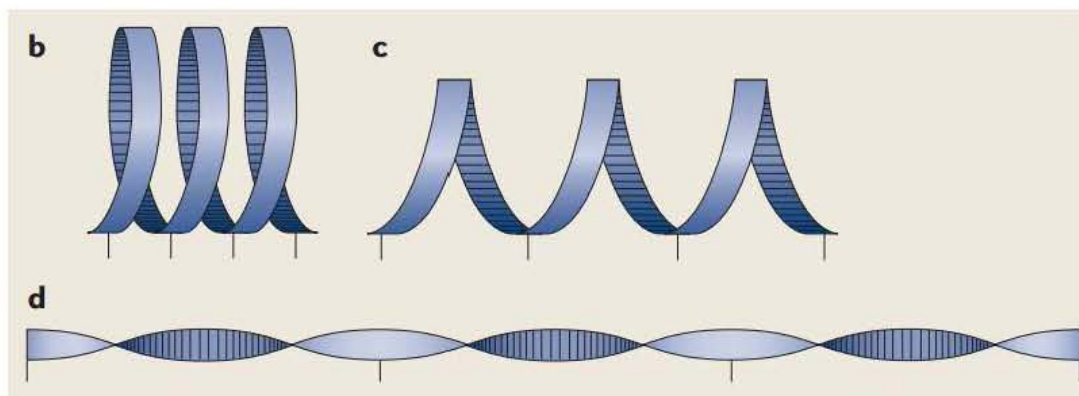


Figura 7. Para cualquier DNA de doble cadena (dsDNA) circular, cualquier cambio en Wr es acompañado por un cambio exacto en el Tw . De modo que $Lk = Tw + Wr$. Por lo tanto, cualquier cambio en Lk debido a actividad enzimática se manifestará geoméricamente como un cambio en el Tw y Wr , de modo que $\Delta Lk = \Delta Tw + \Delta Wr$. 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 el *writhe* representa tres cuartas partes de la diferencia del “*linking number*” y la otra cuarta parte

se debe a cambios en el *twist*. 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.

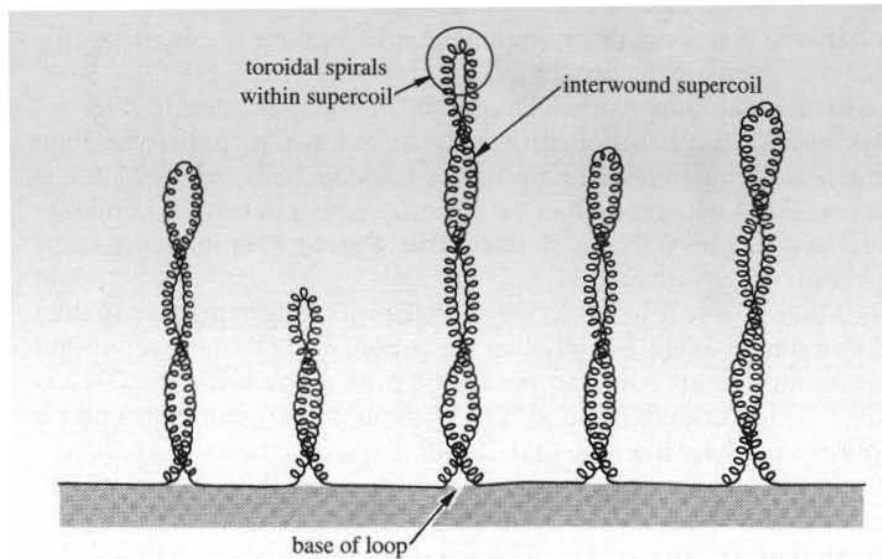


Figura 8. División de una molécula larga de DNA lineal en bucles restringidos por su base mediante su unión a un 'scaffold'. Se muestra el hiperenrollamiento toroidal y el hiperenrollamiento plectonómico (interwound). Tomado de Calladine *et al.*, 2004.

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 determinado 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).

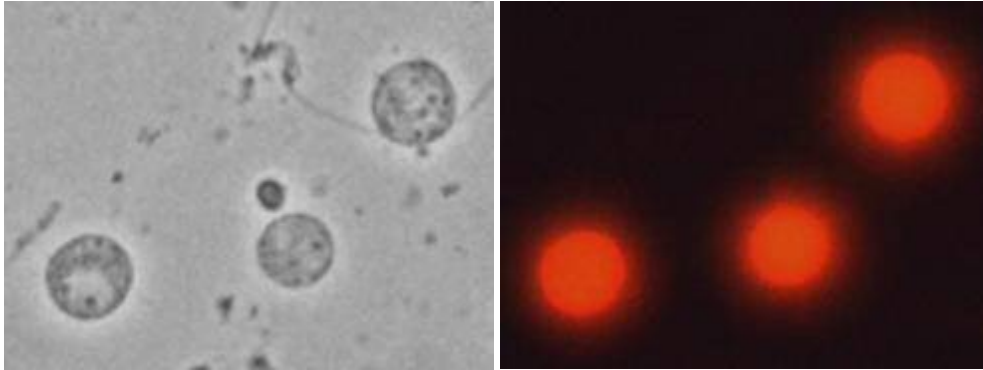


Figura 9. Nucleoides de neuronas extraídos con 2 M de NaCl. Se muestra la foto de la matriz nuclear en contraste de fases y en fluorescencia el nucleoide tratado con 80 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio.

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/30 kb (Boulikas, 1995). El genoma haploide de rata tiene un tamaño de 2.75 Gb (*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 una 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. El reconocimiento de las características globales como la forma del sustrato por la enzima constituye un efecto de lectura indirecta, mientras que el reconocimiento de las características locales es una lectura directa de la enzima sobre 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 indirecta entre el DNA y las proteínas de la MN y no equivalen a interacciones de lectura directa entre las proteínas y grupos funcionales específicos del DNA. 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 de

síntesis, y posteriormente cuando ha pasado el estímulo proliferativo recuperan su conformación basal (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 que están fijadas 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 o NHOS por sus siglas en inglés *Nuclear Higher Order Structure* (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 o (*twist*) se refleja inmediatamente en un cambio en su forma tridimensional (*writhe*). 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.

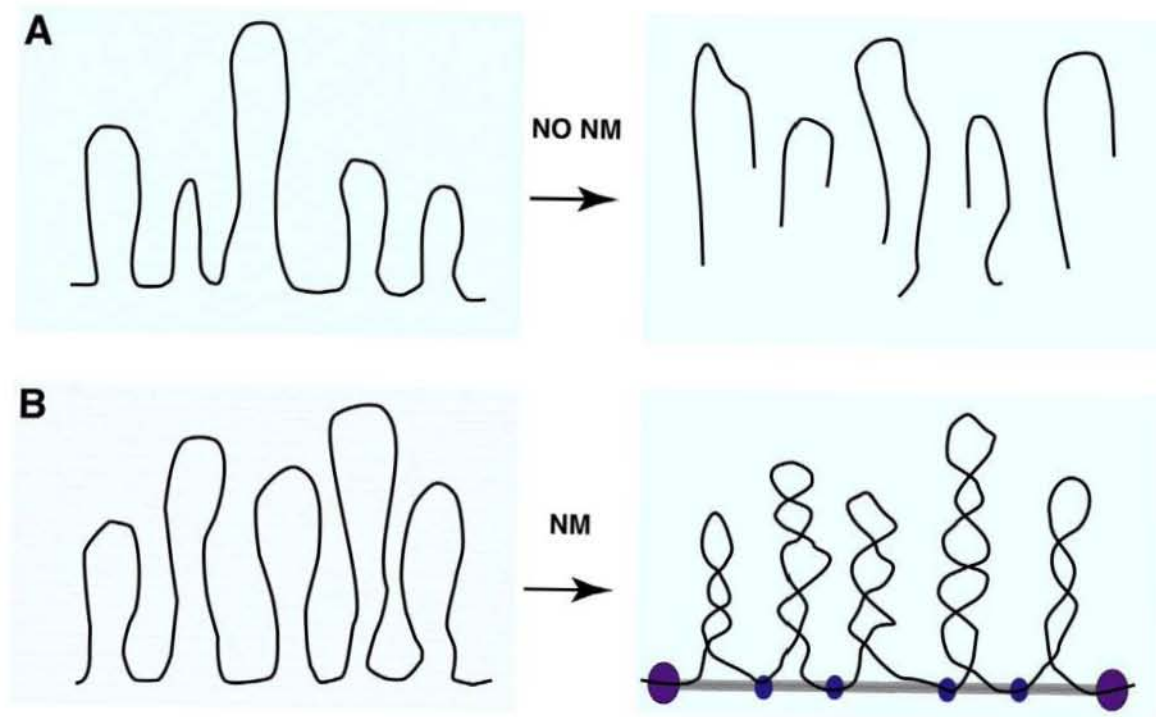


Figura 10. Estrés estructural a lo largo del DNA cromosomal. A) Una molécula de DNA de un cromosoma largo está sujeto a fluctuaciones aleatorias a temperatura ambiente, conduciendo de manera espontánea a la formación de bucles. Eventualmente el DNA podría fragmentarse debido al movimiento. B) Dentro 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 se preserva la integridad del cromosoma mientras se crean 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).

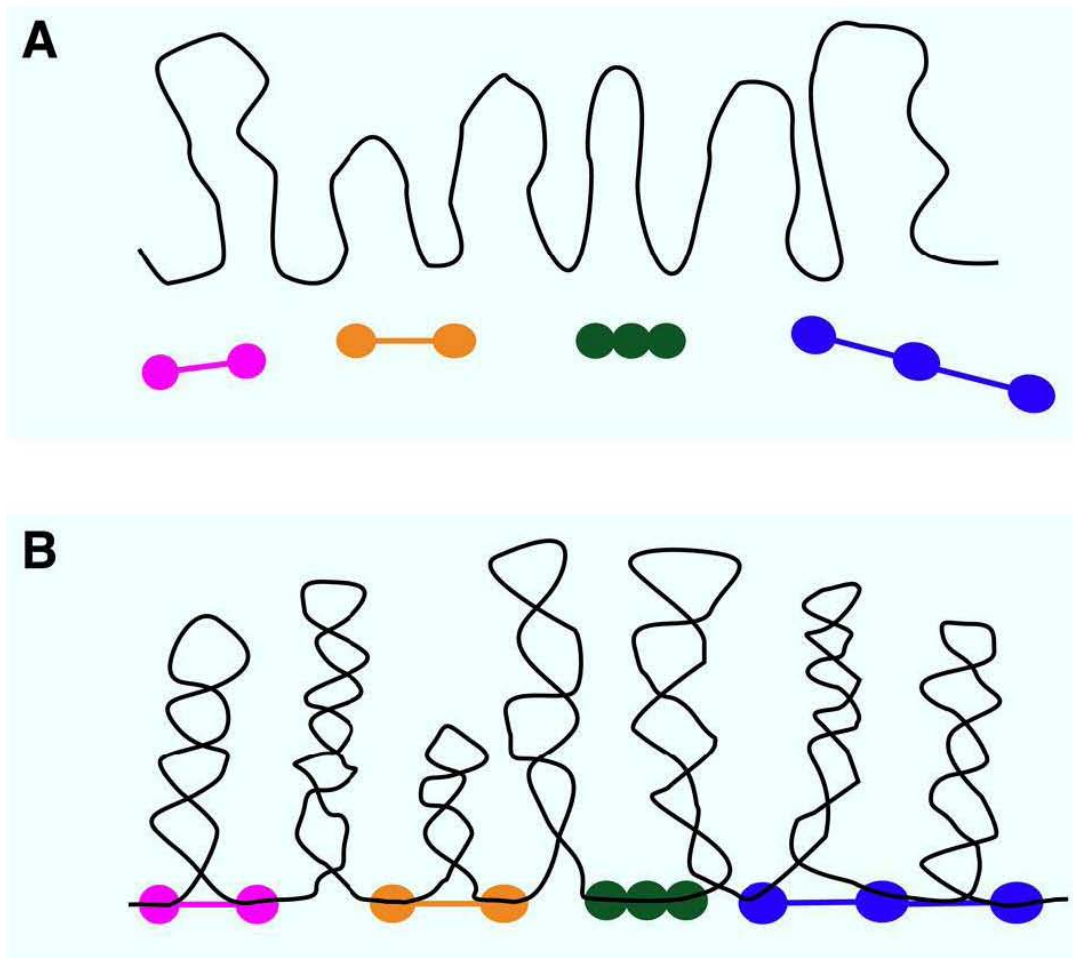


Figura 11. Tensegridad y NHOS. Tensegridad estructural implica que elementos discontinuos de compresión y elementos continuos de tensión interactúan constituyendo una estructura global muy estable. Un elemento básico en la tensegridad es la presencia de pre-estrés, una tensión isométrica equilibrada, 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.

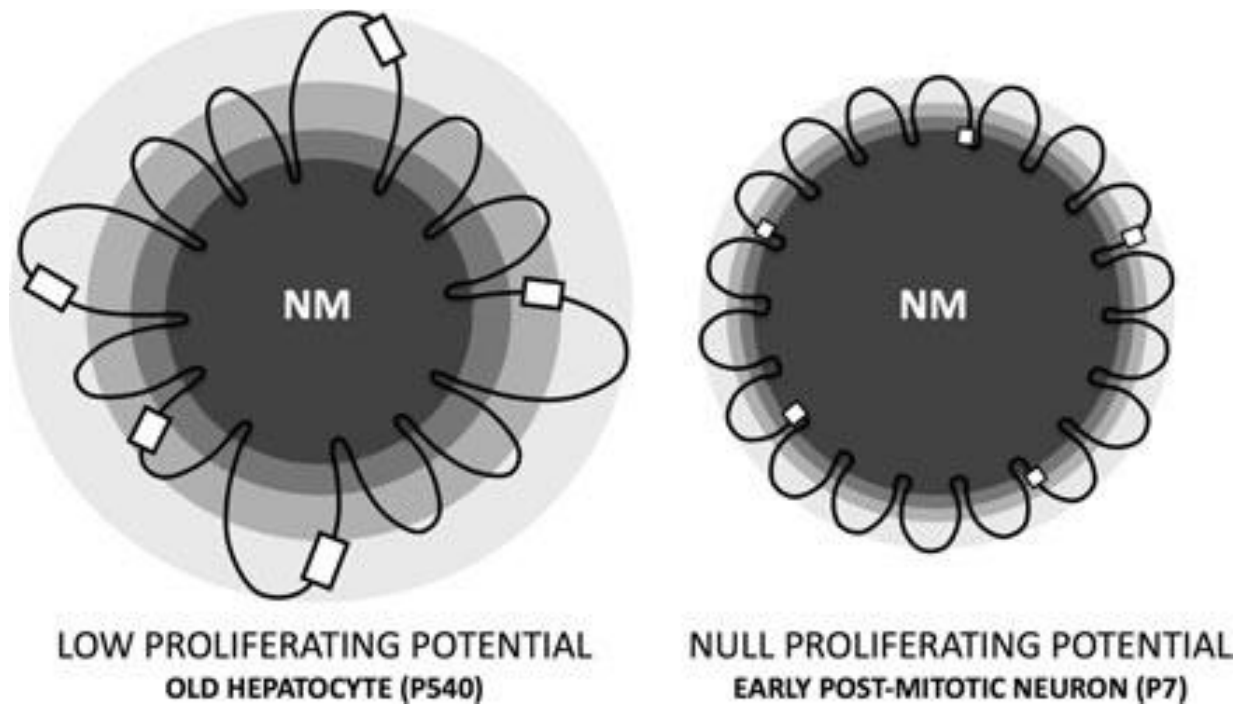


Figura 12. Modelo que representa la estructura de orden superior en el núcleo celular (NHOS) que resulta de las interacciones entre DNA y MN en nucleoides de hepatocitos P540 y neuronas P7. Las zonas topológicas con respecto a la MN correspondientes están representadas por una escala de grises de intensidad 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 blancas 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 poco 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, estos 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-MN 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 sub-división 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 la rata y el ratón.

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 (de 250 a 300 g de peso) alimentadas *ad libitum*. Se utilizaron ratones CD1 macho adultos (de 20 a 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 a 300 g (de 2 a 3 meses de edad) y ratones de 25 a 30 g (de 1 a 2 meses) y de 30 a 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

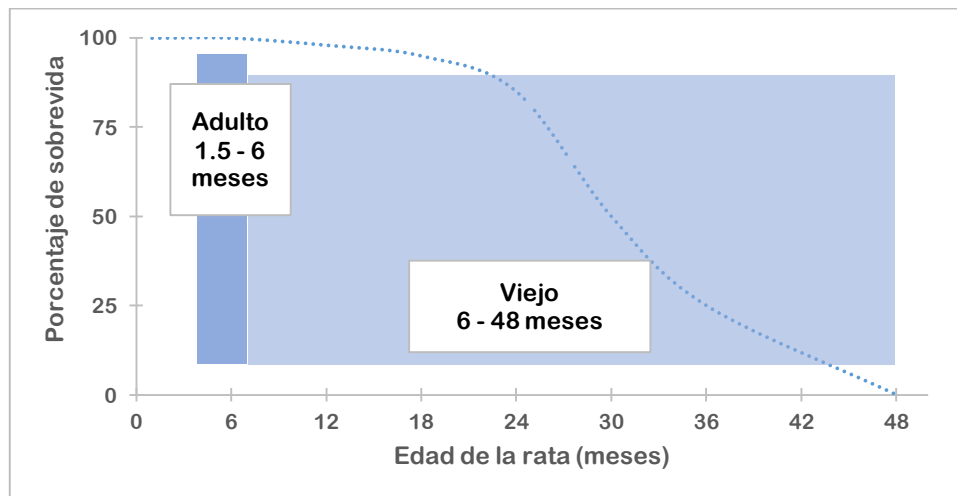
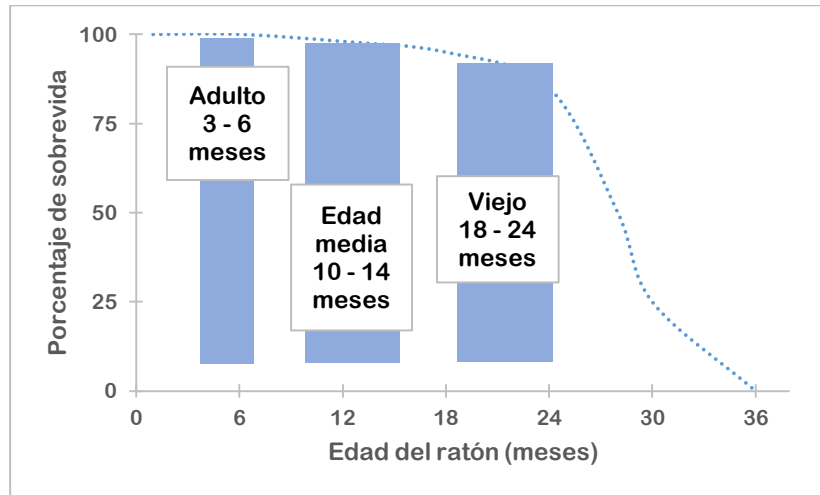


Figura 13. Historias de vida de la rata y el ratón (Tomado y modificado de Life span as a biomarker: referencia 108).

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 Ca²⁺, ni Mg²⁺ (PBS-A), a 37°C, durante 3 a 5 minutos, y posteriormente con colagenasa IV, Sigma (0.01-0.25% colagenasa con 0.075% CaCl₂ en HEPES, pH 7.6) durante un tiempo aproximado de 3 a 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 MgCl₂, 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 mililitros 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 a 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 3×10^5 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 3×10^5 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 µl.

d. Análisis de la integridad de los nucleoides

Se tomaron muestras de nucleoides de hepatocitos y nucleoides neuronales de rata y de ratón en un volumen de 10 μ l y se tiñeron con bromuro de etidio (concentración final de 80 μ 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 μ 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 en kilobases de los bucles correspondientes a nucleoides de hepatocitos y de neuronas 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 1.8×10^6 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 β -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 μ l 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-H₂O), 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, 1.8×10^6 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-H₂O, 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 a 55%, longitud del oligo entre 18 a 24 pb, T_m de 55 a 58°C, diferencia de T_m de 0 a 1.2°C, diferencia de GC de 0 a 5%; ΔG de formación de estructuras secundarias, dímeros y dúplex mayor a -2 Kcal/mol, tamaño de producto de PCR entre 250 a 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 buena eficiencia en la amplificación, por lo que se usaron los mismos oligos 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 µl: 0.7 U GoTaq DNA polimerasa (Promega), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP y 0.1 µM de cada oligo; para *Nef-l* y *Nef-m* se usaron 0.6 µM y 0.36 µM 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 µg/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 (de 10 a 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 de 8.5 a 8.7). Las muestras fueron tratadas con buffer de carga (0.125 M Tris, 4 % SDS, 20 % glicerol, 10 % mercaptoetanol). Se cargaron 30 µg 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 de 94 a 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 quimiorrecepción (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 (mayores a 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 entre 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	<i>Primer</i> sentido rata	<i>Primer</i> anti-sentido rata	Longitud del amplicón (bp)
<i>Alb</i>	TGGCAAACATACGCAAGGGA	GCGAAACACACCCCTGGAAA	275
<i>Actb</i>	AACACCCCAGCCATGTACG	ATGTCACGCACGATTTCCC	254
<i>Col1a1</i>	CATACCTGGGCCACACCAT	CTTGCACTTTCTTCTGGGA	261
<i>Fyn</i>	ACACAATGCTGATCTAGTCGTGGC	CACATCTGTGTTTCATCACTGTCCG	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	<i>Primer</i> sentido ratón	<i>Primer</i> anti-sentido ratón	Longitud del amplicón (bp)
<i>Alb</i>	TGGCAAACATACGCAAGGGA	GCGAAACACACCCCTGGAAA	264
<i>Actb</i>	AACACCCCAGCCATGTACG	ATGTCACGCACGATTTCCC	254
<i>Col1a1</i>	AAGGTGTGTCTGGCATGGCA	CCCCTTGTACTTTCTTTCTGGGAC	367
<i>Fyn</i>	ATCCTGTGCCTTGTGCGTTAGA	CATCCCTCAGCCGTTCCATT	308
<i>CD23</i>	GCTACCAACAGGATACTGGGAACC	CAGCGGCAGGAAAATGACAG	449
<i>Cd86</i>	CATATCTGCCGTGCCATTTAC	GACCCACATTCCCTCCAAA	445
<i>Nef-l</i>	CTTTTTTCTCTGTCCACCTCCC	CGCTGGCTTGCTGATTCCTTTA	444
<i>Nef-m</i>	TTTCCTGCGGAGCAATCACG	TTTCCTGGCAGAGCGAATGG	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).

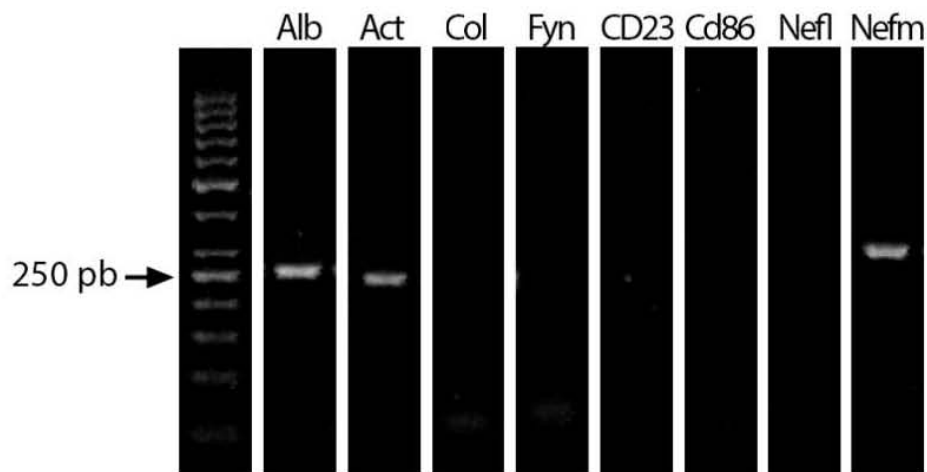


Figura 14. Amplificación de las ocho secuencias blanco en hepatocitos de ratón. Los *primers* empleados corresponden a los diseñados sobre el genoma de rata. La amplificación fue exitosa para las secuencias *Alb* y *Actb*, *Nef-m* rindió un amplicón de alrededor de 300 pb que no corresponde al esperado. 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 1×10^{-5} errores/pb/duplicación. Por lo tanto, en principio, después de 35 ciclos de PCR, podría haber un error cada 2,857 pb. Por lo tanto, tomando en cuenta el tamaño de los amplicones utilizados en el presente estudio (≤ 500 pb) 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 3×10^{-5} errores/pb 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 *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).

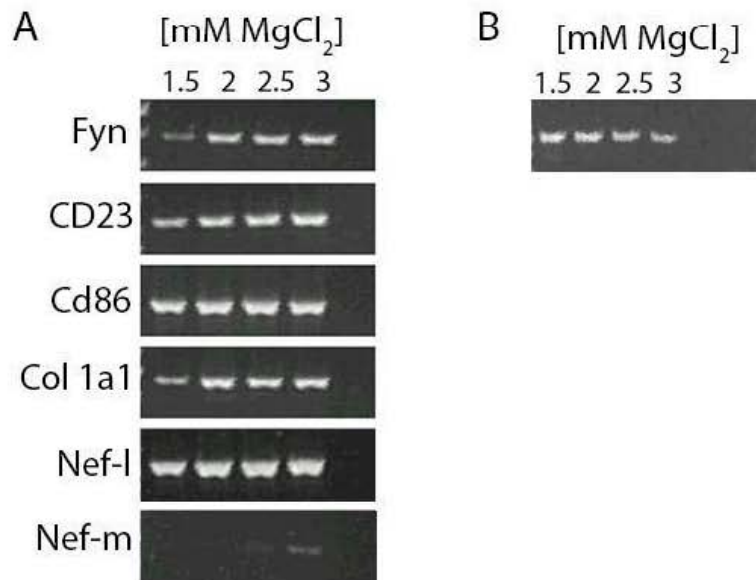


Figura 16. Estandarización de los *primers* diseñados para el ratón. (A) Se muestra una escalera de 1.5 a 3 mM de MgCl₂, no se incluyeron albúmina y actina debido a que estos *primers* ya fueron probados (Figura 1). La concentración óptima de MgCl₂ empleada fue de 2 mM. Los parámetros de la PCR fueron: 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

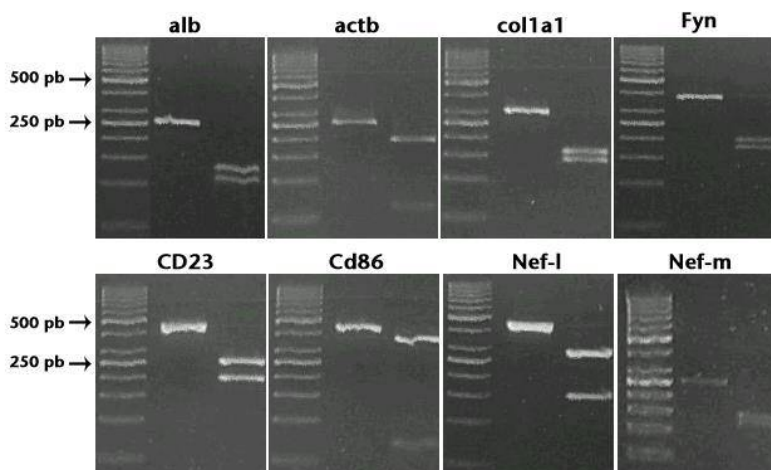


Figura 17. Análisis de restricción de los amplicones correspondientes a las ocho secuencias diana utilizadas en el mapeo topológico en el ratón. Los amplicones fueron restringidos con las enzimas correspondientes de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes (Tabla 3). Gel de agarosa 3 %, teñido con bromuro de etidio (0.28 $\mu\text{g/ml}$). 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 a 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 a 30 g (1 a 2 meses) y de 30 a 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 a 30 g. La morfología de los hepatocitos aislados resultó ser bastante similar entre rata y ratón (Figura 18).

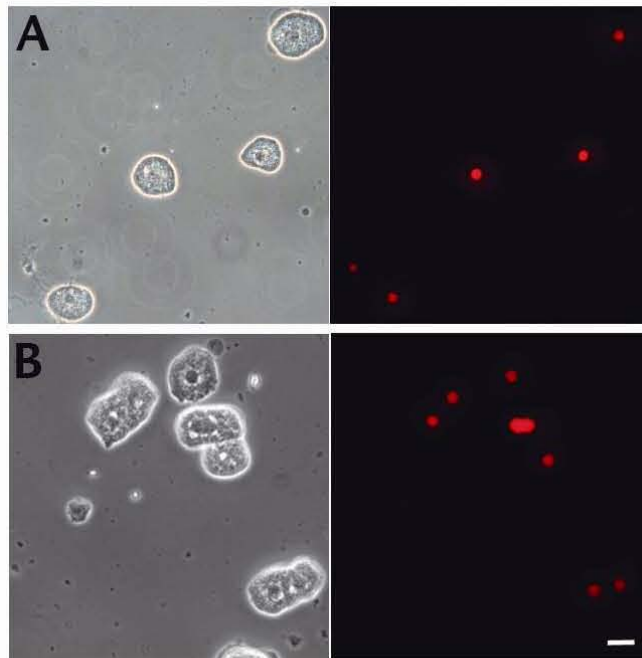


Figura 18. Aislamiento de hepatocitos de rata (A) y ratón (B). Micrografía 40X en contraste de fases (panel izquierdo) y fluorescencia (panel derecho) teñidos con 80 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio. Barra=15 μm .

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 edades cronológicas mayores (> 6 meses). Estos cambios se han asociado con la senescencia de los hepatocitos (Sigal *et al.*, 1995; Celton-Morizur *et al.*, 2010).

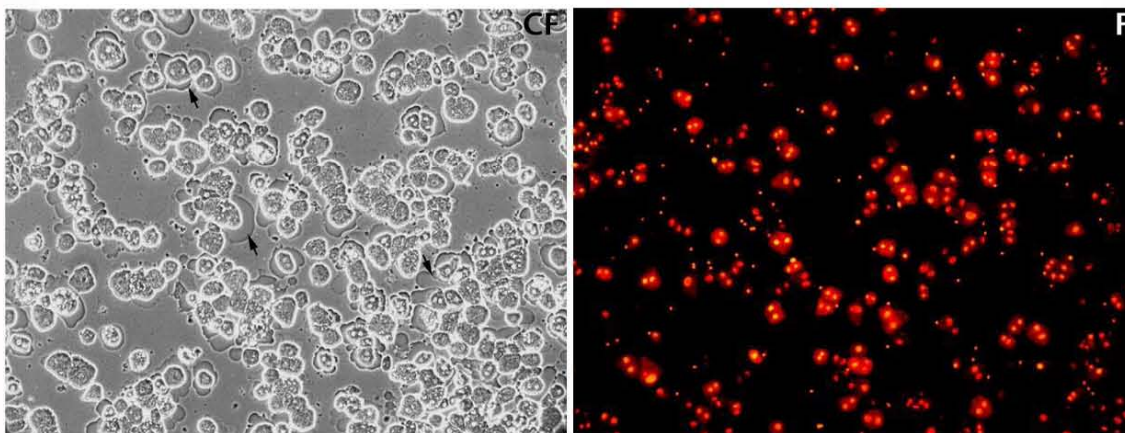


Figura 19. Aislamiento de hepatocitos de ratón. Micrografía 10X en contraste de fases (CF) y fluorescencia (F). Los hepatocitos fueron teñidos con 80 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio. La población de hepatocitos binucleados corresponde al 83.4 % (n=109). Las flechas indican la abundancia de lípidos presentes 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 ≤ 60 % de la población celular total (Figura 20).

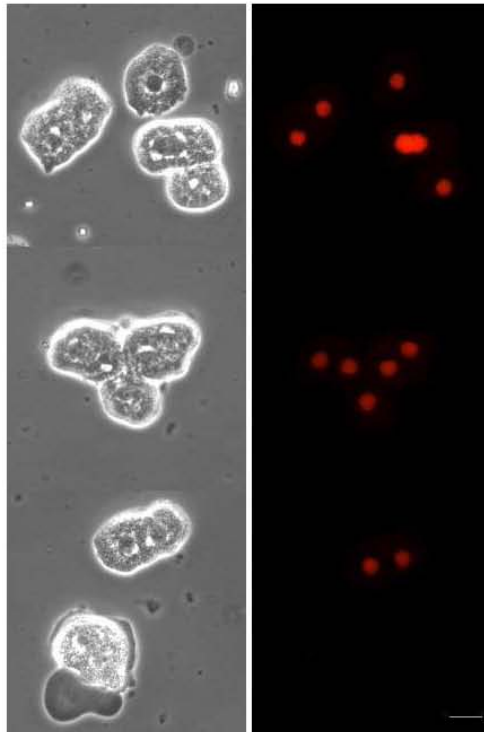


Figura 20. Aislamiento de hepatocitos de ratón. Micrografía 40X en contraste de fases (panel izquierdo) y fluorescencia (panel derecho) teñidos con 80 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio. A las cuatro semanas de edad y bajo restricción calórica, disminuye notablemente la cantidad de lípidos en los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

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).

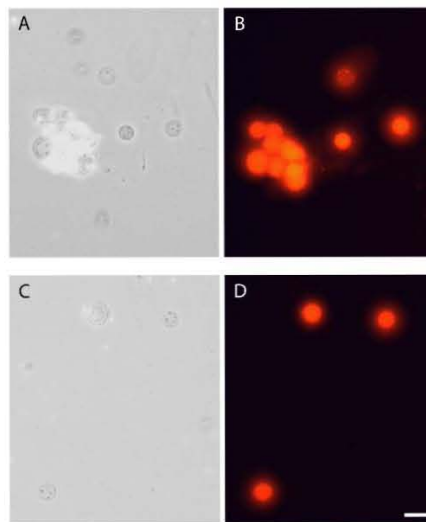


Figura 21. Extracción de nucleoides de hepatocitos de ratón. Micrografía 40X en contraste de fases y fluorescencia teñida con 80 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio. En A y B se observa la agregación de los nucleoides durante la extracción debido a la presencia excesiva de lípidos en los hepatocitos 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 μm .

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.

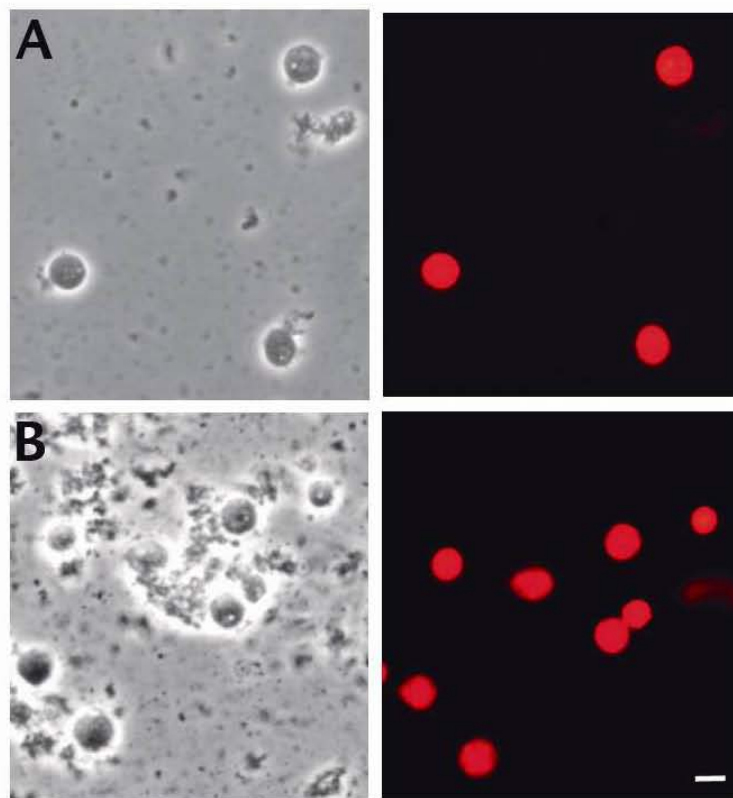


Figura 22. Aislamiento de núcleos neuronales de rata (A) y ratón (B). Micrografía 40X en contraste de fases (panel izquierdo) y fluorescencia (panel derecho) teñidos con 80 $\mu\text{g/ml}$ bromuro de etidio. Barra=15 μm .

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.

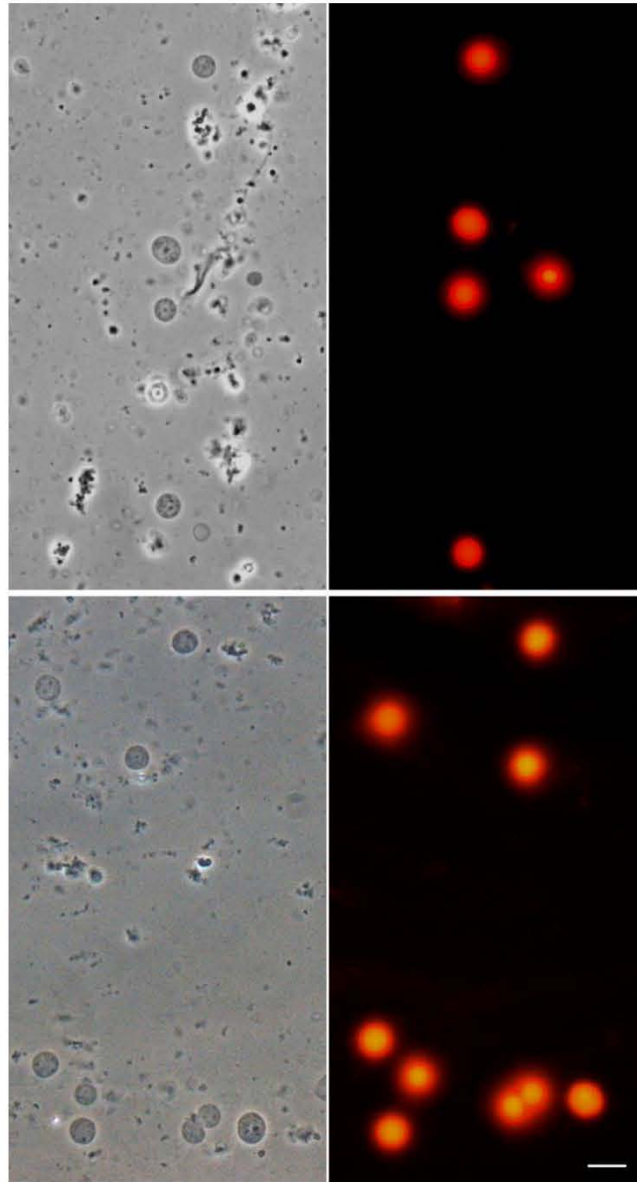


Figura 23. Extracción de nucleoides de neuronas de rata (panel superior) y ratón (panel inferior). Micrografía 40X en contraste de fases y fluorescencia teñida con 80 µg/ml de bromuro de etidio. En contraste de fases se observa la morfología de la MN. En fluorescencia se observa el halo de fluorescencia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

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° (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 ($W_r = 0$, $T_w = L_k$). 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 L_k^0 y por lo tanto conduciendo a cambios en L_k (ΔL_k).

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.

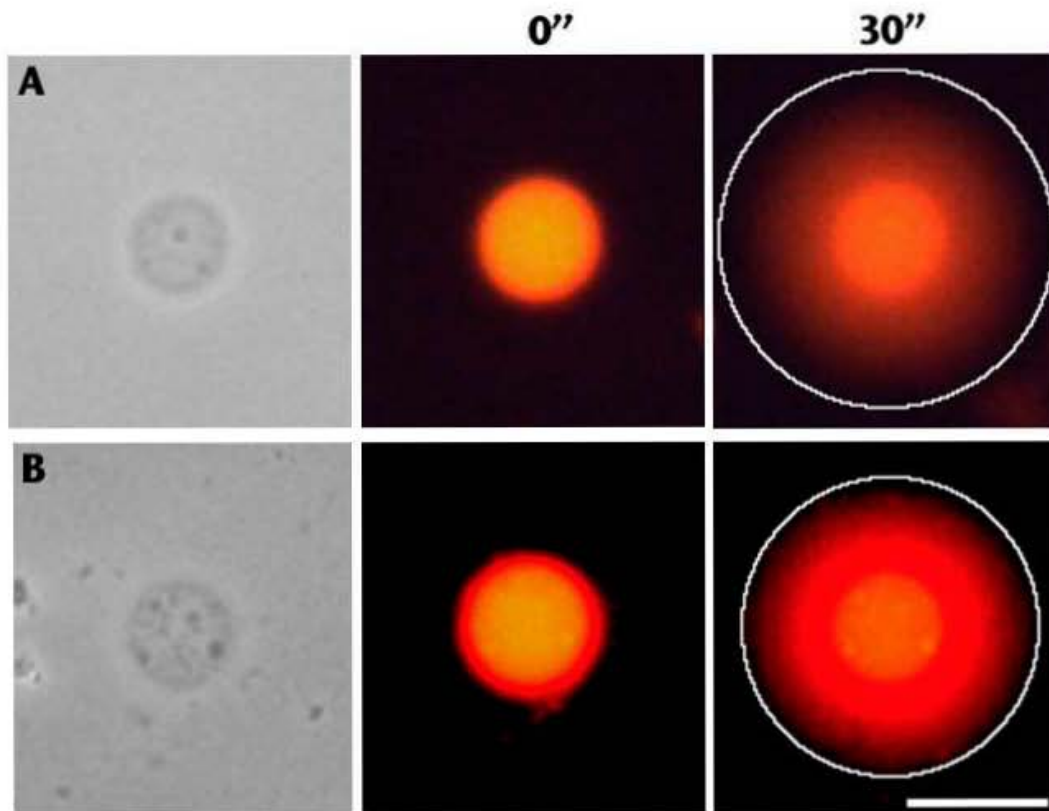


Figura 24. Micrografías 40X de nucleoides de hepatocitos tratados con 80 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio para inducir el desenrollamiento de los bucles de DNA y la relajación de los mismos, de esta manera se forma un halo de fluorescencia alrededor del contorno de la NM. (A) Rata y (B) Ratón. Primer 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 μm .

Se determinó el tamaño promedio del radio del halo de DNA en μm , 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). 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 kb y para el ratón 76.7 kb (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 Threshold v.1.16.1).

MÉTODO	HEPATOCITOS (radio del halo en μm)		MÉTODO	NEURONAS (radio del halo en μm)	
	RATA	RATÓN		RATA	RATÓN
OTSU	14.57 ± 2 (n=38)	13.35 ± 2.15 (n=24)	OTSU	6.6 ± 1 (n=43)	9.55 ± 1 (n=102)
CONTRAST	11.74 ± 1.65 (n=31)		PHANKASTAR		8.56 ± 1.79 (n=45)
MEDIAN	14.10 ± 2.25 (n=32)	13.04 ± 1.3 (n=74)	MEDIAN	8.24 ± 0.88 (n=44)	8.15 ± 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 μm	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 kb	41.47	38.35	24.23	23.97
Tamaño promedio de un bucle de DNA en kb	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.

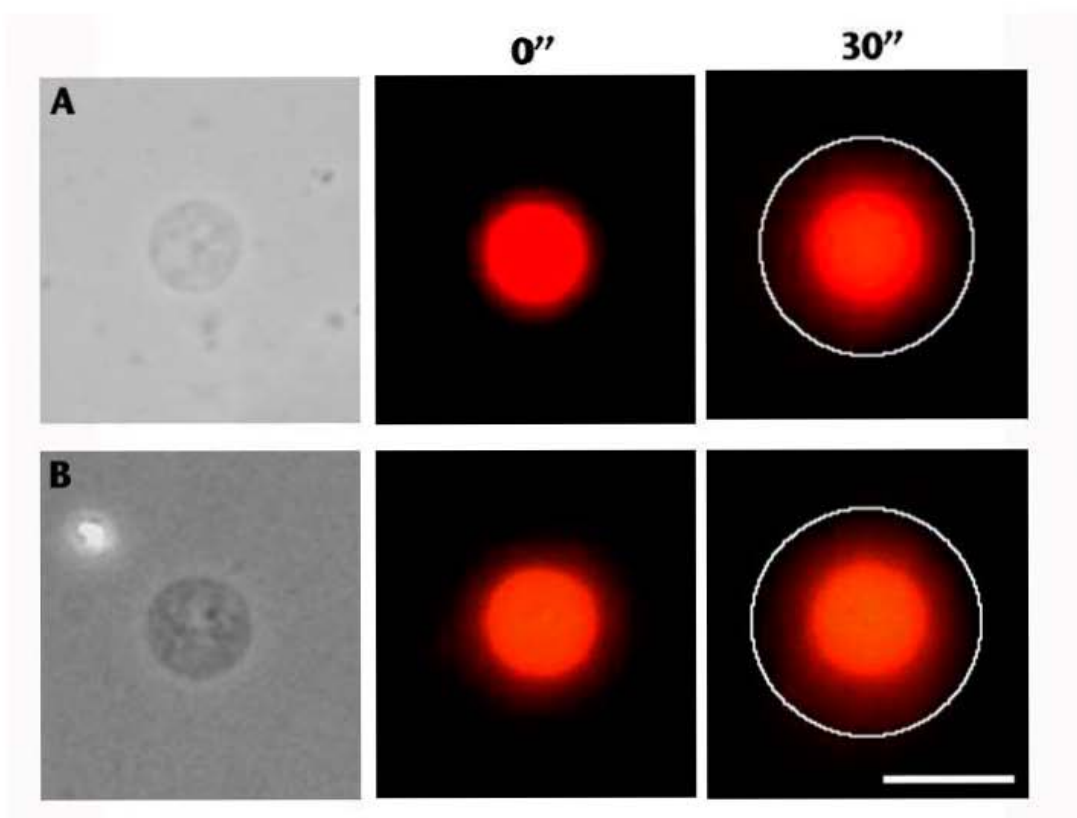


Figura 25. Micrografías 40X de nucleoides neuronales tratados con 80 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio para inducir el desenrollamiento de los bucles de DNA y la relajación de los mismos, de esta manera se forma un halo de fluorescencia alrededor del contorno de la MN. (A) Rata y (B) Ratón. Primer 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 μm .

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 plectonómico; 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).

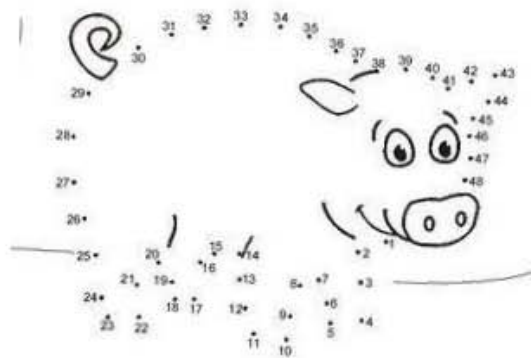


Figura 26. Dibujo que ilustra el principio topológico elemental a partir del cual el mapeo topológico de los puntos en una fibra deformable (cerdito), con respecto a una posición de referencia que no varía (la línea que representa la base o el suelo), sirve para determinar la forma tridimensional de 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 kb en hepatocitos de rata (Berezney y Buchholtz, 1981), y probablemente representan las regiones que incluyen los anclajes de los bucles a la MN (LARs).

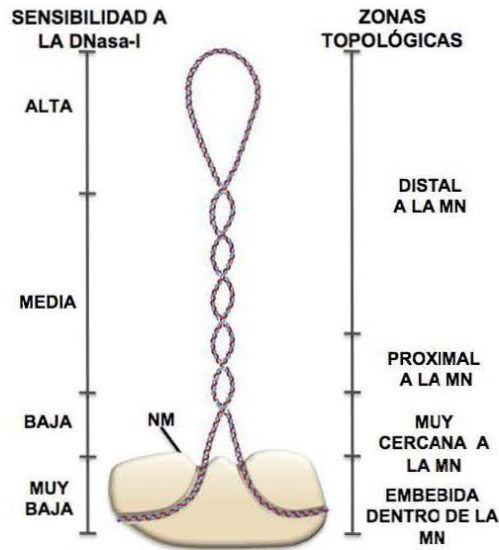


Figura 27. Esquema de un bucle de DNA típico (DNA desnudo) asociado con la MN. Se muestran las propiedades topológicas del bucle como son el hiperenrollamiento que es menor en la punta del bucle y la relación de proximidad relativa del DNA con la MN. Debido a esta topología, los bucles de DNA muestran 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).

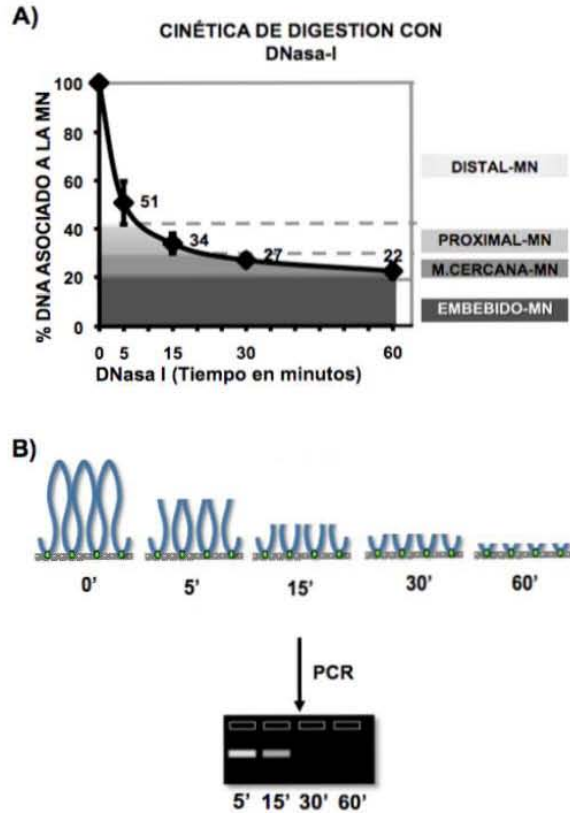


Figura 28. A) Las cinéticas de digestión con DNasa-I de los nucleoides muestran un comportamiento muy homogéneo que consta de tres fases, lo que permite establecer zonas topológicas relativas a la MN (distal, proximal, muy cercana y embebida). B) El DNA residual de los nucleoides parcialmente digeridos 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 de 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.

hígado rata			hígado ratón		
Intervalo de digestión	Pendiente	Zona relativa a la MN	Intervalo de digestión	Pendiente	Zona relativa a la MN
0 – 5	- 10.8	Distal	0 – 5	- 9.2	Distal
5 – 15	- 1.5	Proximal	5 – 15	- 2.0	Proximal
15 – 30	- 0.33	Muy cercana	15 – 30	- 0.6	Muy cercana
30 – 60	- 0.16	Muy cercana	30 – 60	- 0.16	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 = 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 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	46.16± 1	54.6	54.6	Rápida	DISTAL
15	31.0 ± 3.6	18.0	72.6	Lenta	PROXIMAL
30	26.0 ± 2.6	4.0	76.6	Muy lenta	MUY CERCANA
60	21.2 ±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

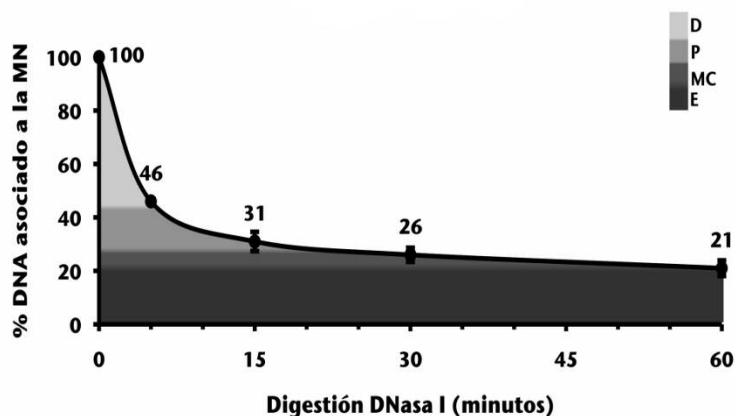


Figura 29. Cinéticas de digestión promedio de nucleoides de hepatocitos de rata. Los nucleoides fueron digeridos con DNasa I (0.5 U/ml) por 60 minutos. Se muestran las desviaciones estándar para cada tiempo de digestión correspondiente. Las pendientes entre los intervalos de tiempo correspondientes y 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

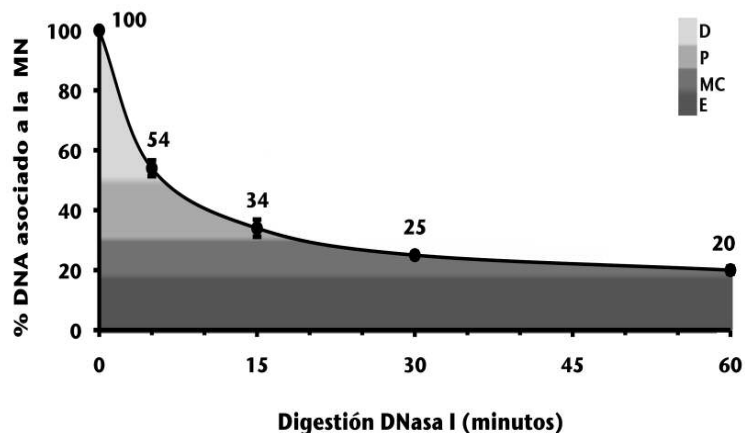


Figura 30. Cinéticas de digestión promedio de nucleoides de hepatocitos de ratón (20-30 g). Los nucleoides fueron digeridos con DNasa I (0.5 U/ml) por 60 minutos. Se muestran las desviaciones estándar para cada tiempo de digestión correspondiente. Las pendientes entre los intervalos de tiempo correspondientes 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 %.

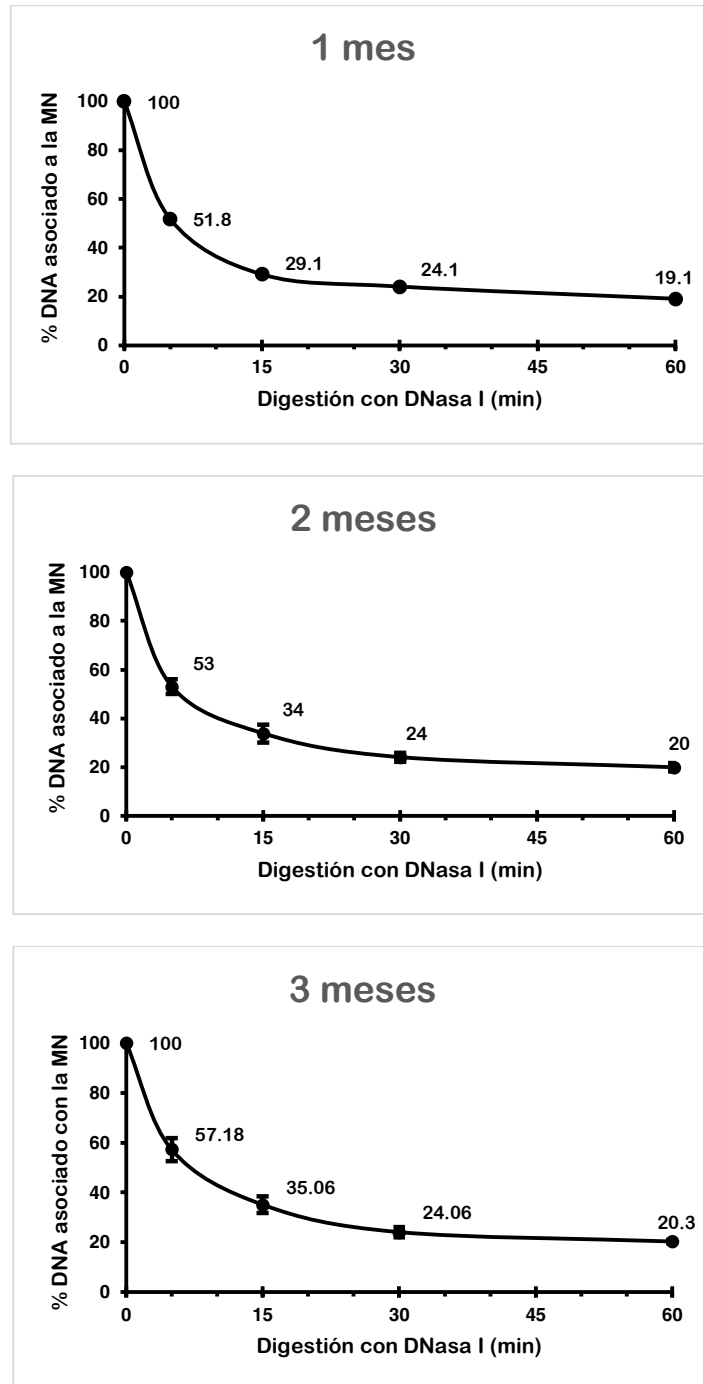


Figura 31. Cinéticas de digestión promedio de nucleoides de hepatocitos de ratón de uno, dos y tres meses de edad. Se muestran las desviaciones estándar para cada tiempo de digestión correspondiente. Ratones de 1 mes (n=1); 2 meses (n=5), 3 meses (n=5).

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 ≤ 60 %) y una menor cantidad de lípidos en los hepatocitos, con respecto a los ratones de 1 a 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.

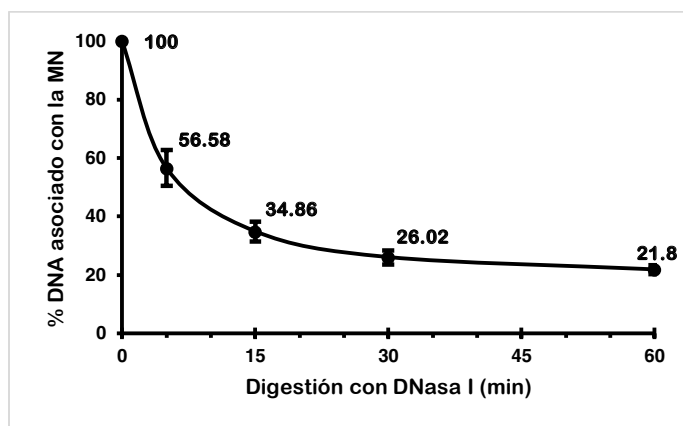


Figura 32. Cinéticas de digestión promedio de nucleoides de hepatocitos de ratón (de un mes de edad) sometidos a restricción calórica. Se muestran las desviaciones estándar para cada tiempo de digestión correspondiente, n=5.

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).

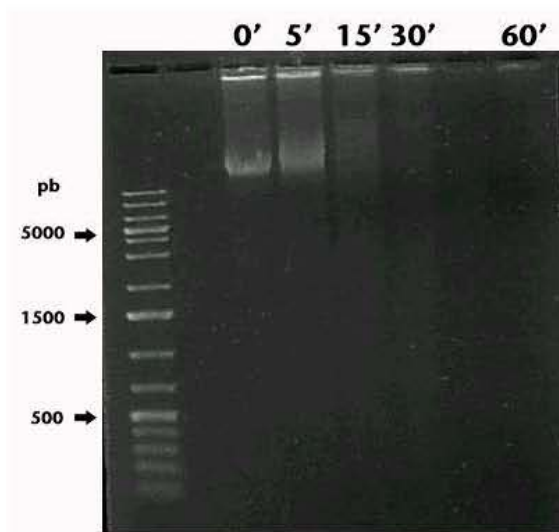


Figura 33. Gel de agarosa 1% TBE 0.5X, teñido con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Primer carril escalera de peso molecular. Muestras de nucleoides parcialmente digeridos con DNasa I (0.5 U/ml) a 0, 5, 15, 30 y 60 minutos de digestión. Cada carril fue cargado con 1 µg de DNA. Este gel pone en evidencia 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 minutos, esta señal disminuye en función del tiempo de digestión. El tamaño de los fragmentos de la banda dominante en 5 minutos 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 kb. La ausencia de un barrido correspondiente a fragmentos de DNA menores a 2 kb 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 MN (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-Mulia 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 μM , pero se realizó un experimento usando 0.3 μM . 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 μM de cada oligo (Figura 16). El resultado se muestra en la figura 34, se observa que usando 0.3 μM de cada oligo en la rata, la señal de amplificación disminuye considerablemente, por lo que se decidió usar la concentración de 0.6 μM en ambos casos (Figura 34).

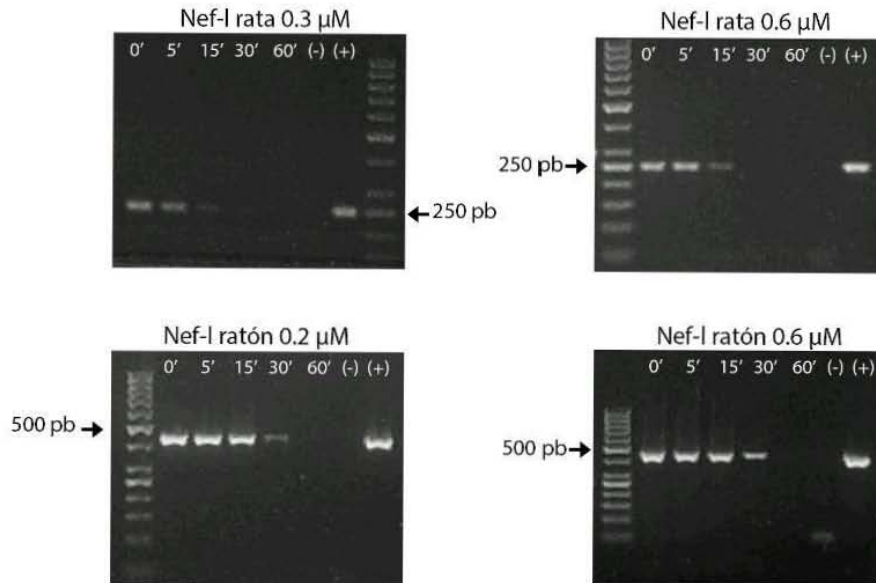


Figura 34. Amplificación de la secuencia diana del gen neurofilamento ligero (*Nef-l*) en la rata y en el ratón. Se probaron dos concentraciones de *primers* (0.2 y 0.6 μM). En el caso de la rata, se usó 0.3 μM de cada *primer* donde la intensidad de la señal disminuye considerablemente. En el ratón se usó 0.2 μM de cada *primer*, se aprecia que la señal de amplificación es bastante buena. La concentración óptima final usada fue de 0.6 μM 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 *Nef-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).

Tabla 10. 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 las diferencias 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>	+				+	+	+	

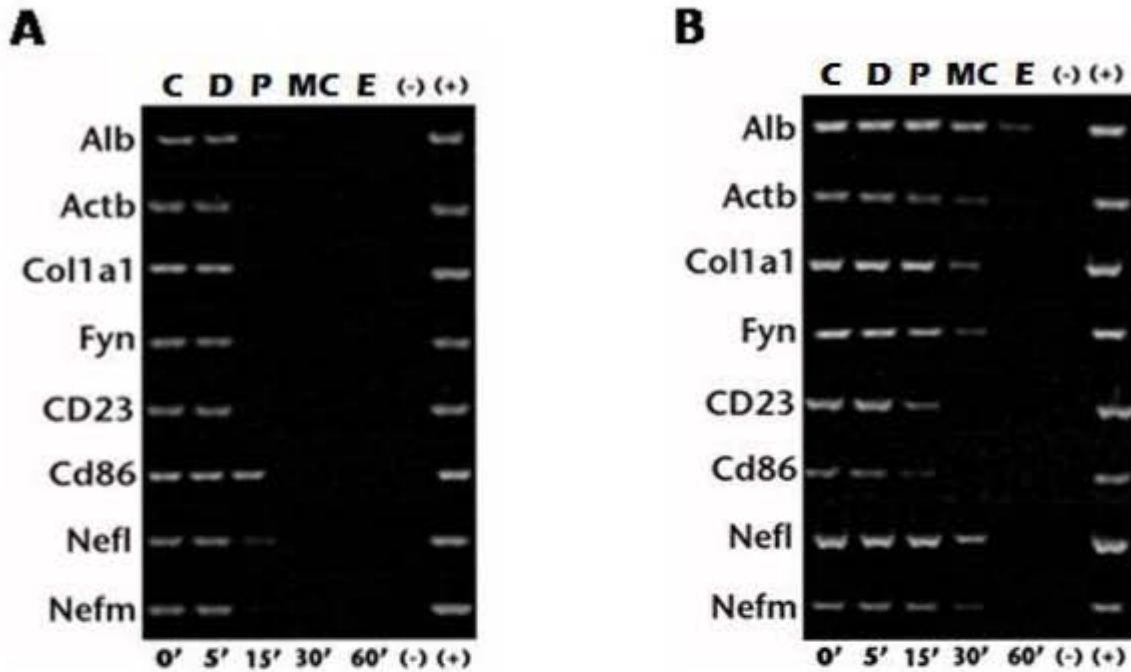


Figura 35. Ejemplo representativo del mapeo topológico con respecto a la MN de las ocho secuencias blanco en hepatocitos de rata (A) y de ratón (B). Los amplicones se consideraron como positivos o negativos mediante un software de análisis de imágenes (Kodak 1D Image Analysis Software 3.5 System) empleando 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 aproximadamente 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.

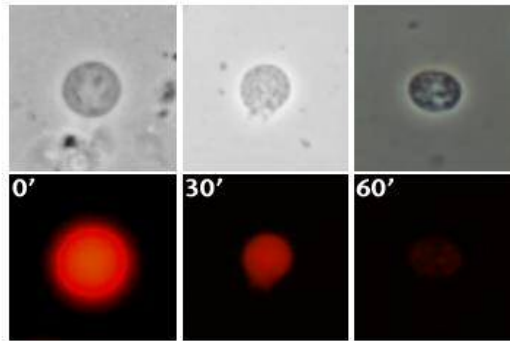


Figura 36. Micrografía 40X en contraste de fases y fluorescencia de nucleoides de neuronas de rata tratados con 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de EBr. Se obtuvieron muestras de nucleoides a los 0', 30' y 60' minutos de digestión. Se observa la disminución de la señal de fluorescencia conforme la digestión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

neurona rata			neurona ratón		
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

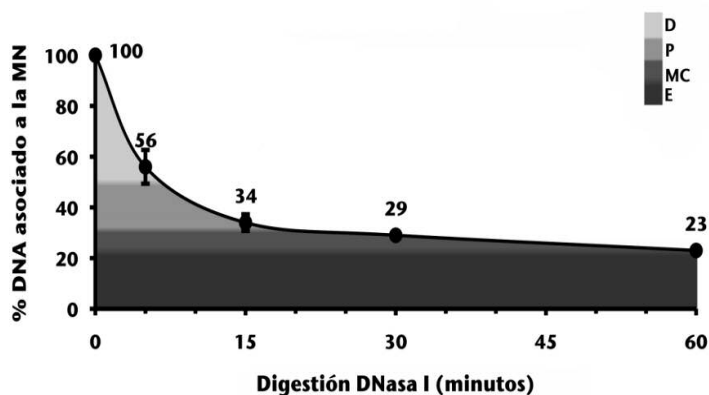


Figura 37. Cinéticas de digestión promedio de nucleoides de neuronas de rata. Los nucleoides fueron digeridos con DNasa I (0.92 U/ml) por 60 minutos. Se muestran las desviaciones estándar para cada tiempo de digestión correspondiente. Las pendientes entre los intervalos de tiempo correspondientes y las 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

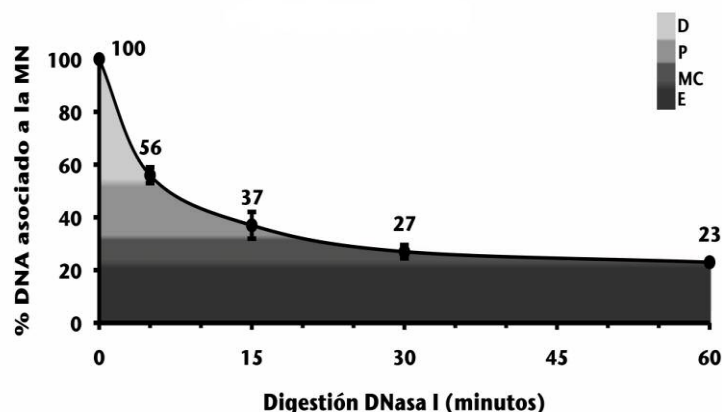


Figura 38. Cinéticas de digestión promedio de nucleoides de neuronas de ratón. Los nucleoides fueron digeridos con DNasa I (0.92 U/ml) por 60 minutos. Se muestran las desviaciones estándar para cada tiempo de digestión correspondiente. Las pendientes entre los intervalos de tiempo correspondientes y 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.

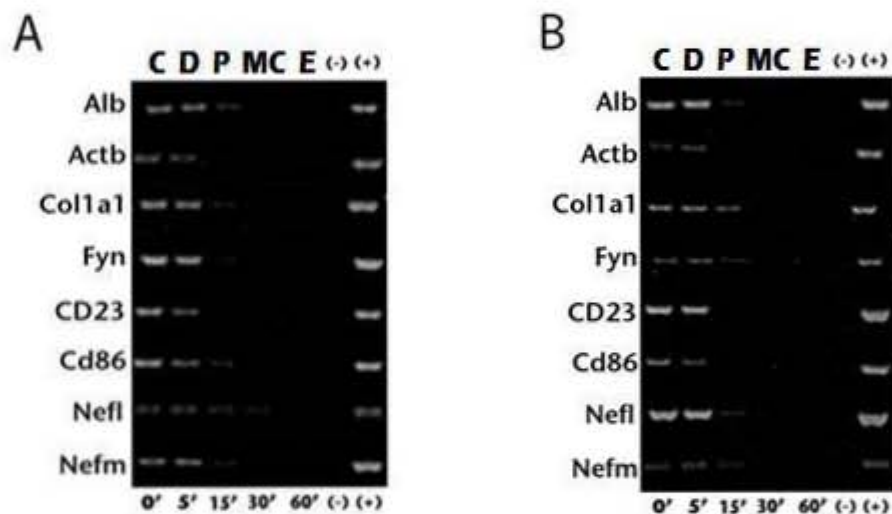


Figura 39. Ejemplo representativo del mapeo topológico con respecto a la MN de las ocho secuencias blanco en neuronas de rata (A) y de ratón (B). Se consideró a los amplicones como positivos o negativos mediante un software de análisis de imágenes (Kodak 1D Image Analysis Software 3.5 System) empleando 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. El color rojo indica que el patrón de mapeo fue diferente entre rata y ratón, n=5.

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 MN 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.

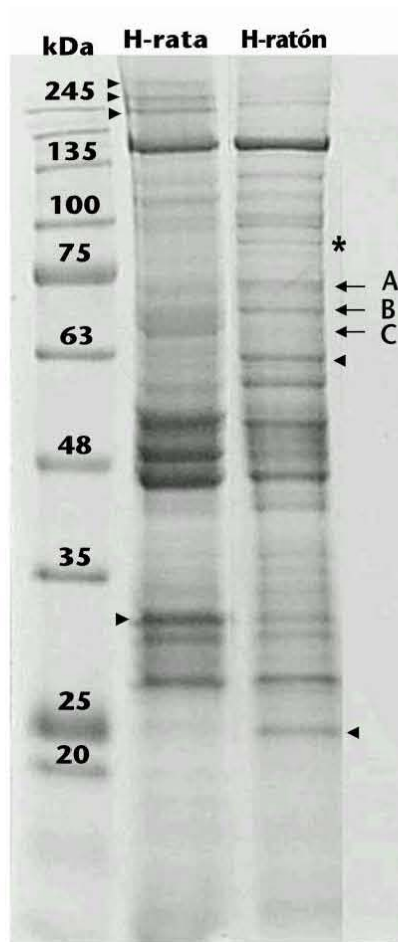
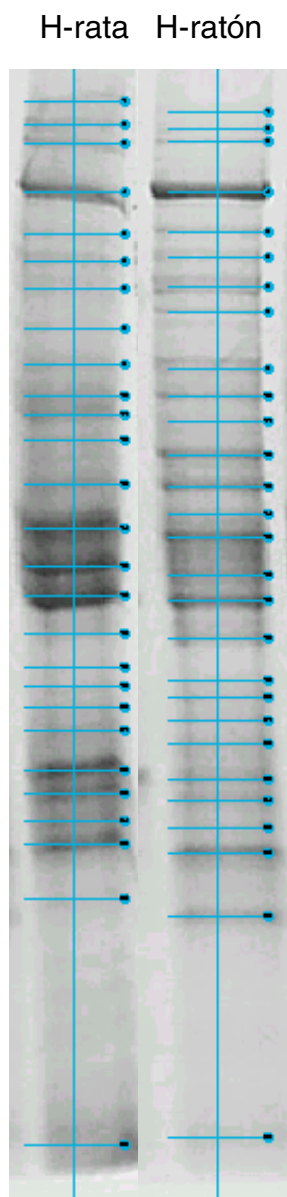


Figura 40. Perfiles proteicos de la matriz nuclear de hepatocitos de rata (H-rata) y de ratón (H-ratón). SDS PAGE teñido con azul de coomassie. Se cargaron 30 μg de muestra en cada carril. A, B y C, señalan las bandas correspondientes a láminas A (74 kDa), B (66 kDa), y C (65 kDa) respectivamente. Las 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 densitometría, 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

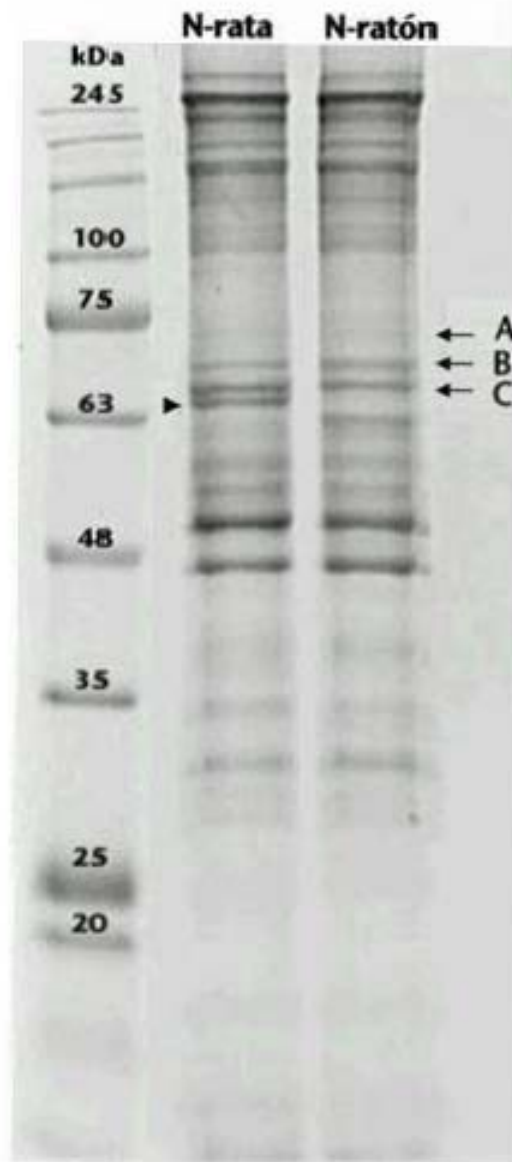
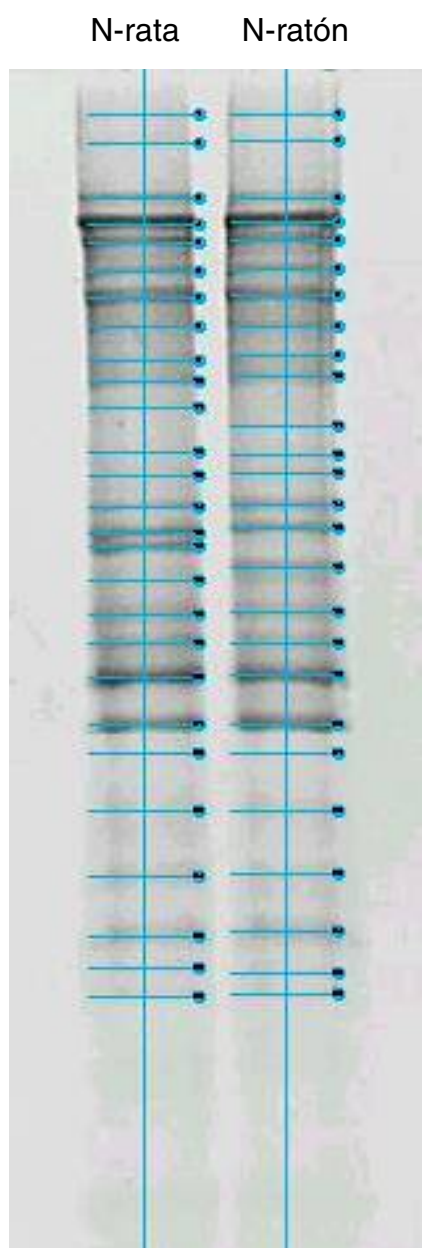


Figura 41. Perfiles proteicos de la matriz nuclear de neuronas de rata (N-rata) y de ratón (N-ratón). SDS PAGE teñido con azul de coomassie. Se cargaron 30 μg de muestra en cada carril. A, B y C, señalan las bandas correspondientes a láminas A (74 kDa), B (66 KDa), y C (65 KDa) respectivamente. La punta 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 densitometría, 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 I. 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 y 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 de tipo físico: estructurales y termodinámicas 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.

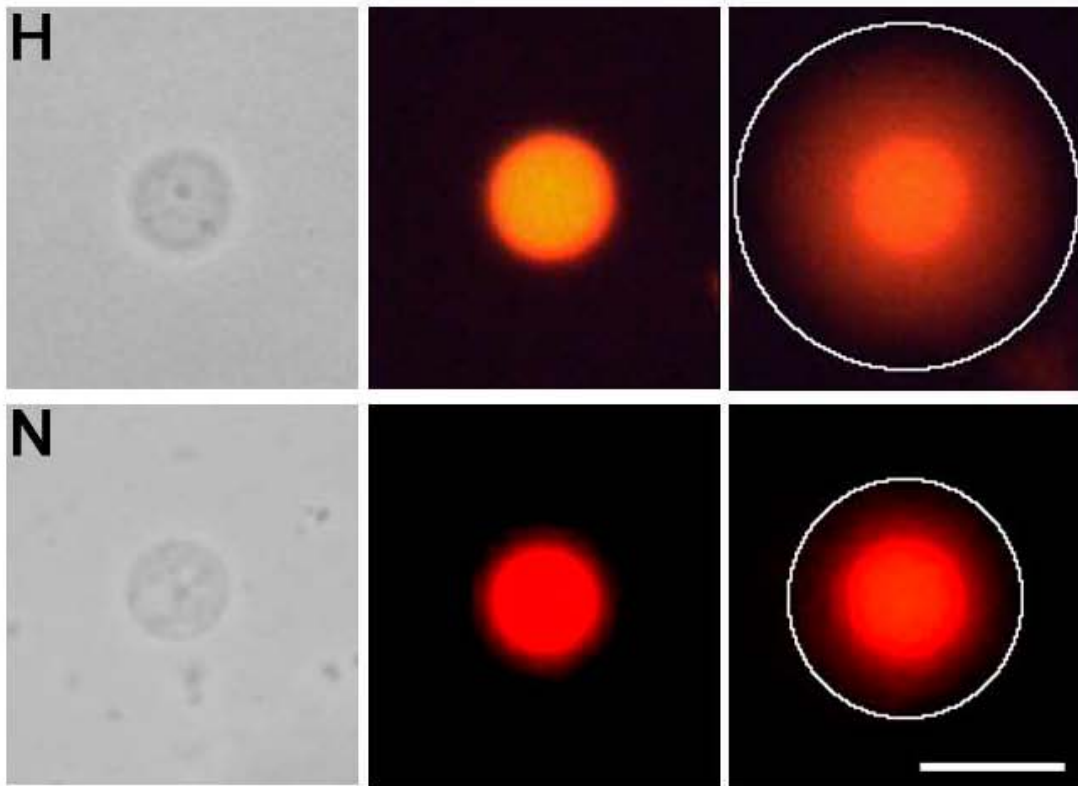


Figura 42. Nucleoides de hepatocitos (H) y neuronas (N) de rata tratados con 80 $\mu\text{g/ml}$ de EBr para inducir el desenrollamiento y relajación de los bucles de DNA asociados con la MN. La micrografía en contraste de fases (panel de la izquierda) muestra la matriz nuclear. Las micrografías de fluorescencia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

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 μm	Hepatocitos (n=32)	Neuronas (n=43)
		14.1 \pm 2.3
Tamaño del bucle de DNA de la base a la punta en kb	41.5	24.2
Tamaño promedio de un bucle de DNA en kb	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.

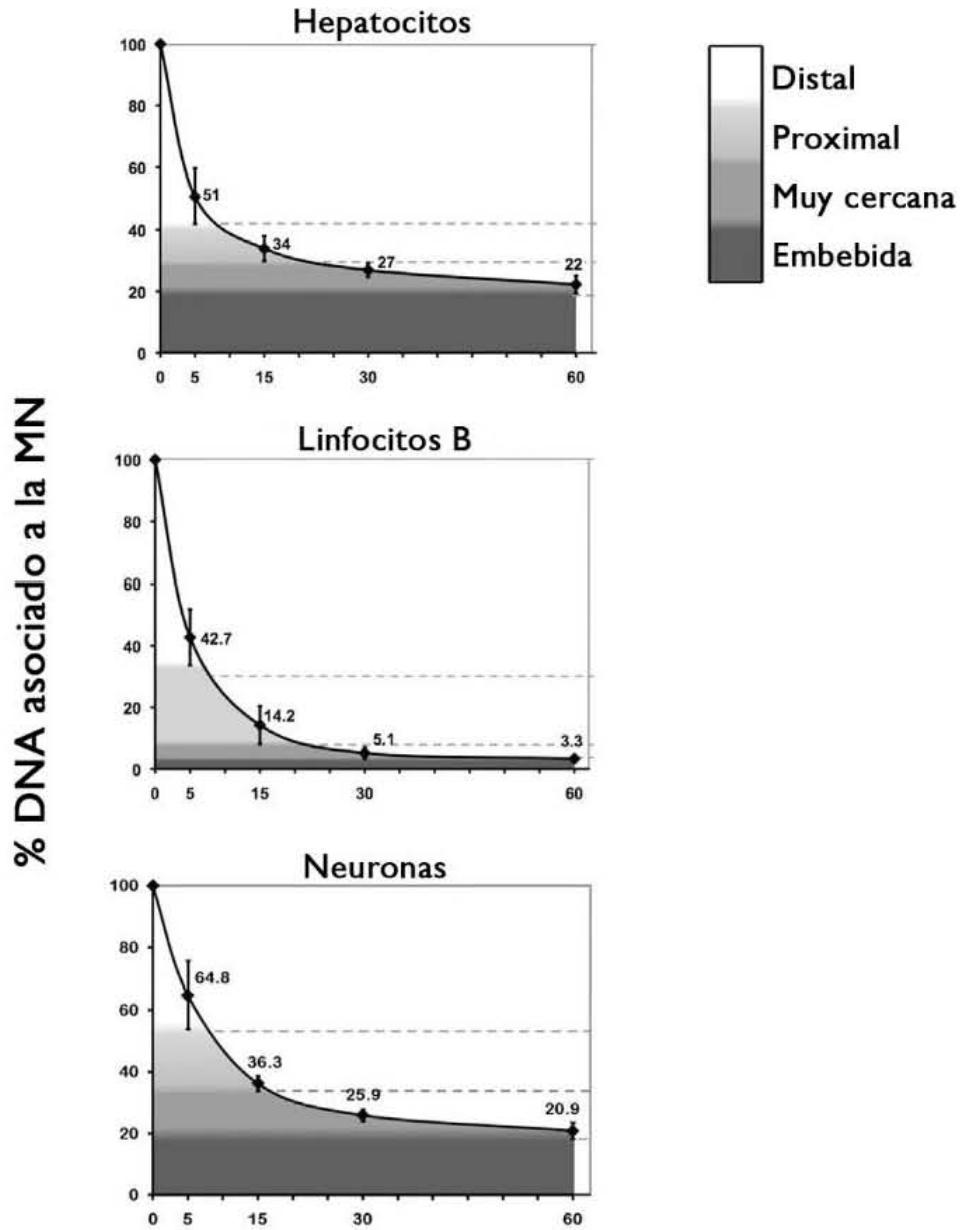


Figura 43. Cinéticas de digestión promedio de nucleoides de hepatocitos de rata. Los nucleoides fueron digeridos con DNasa I durante 60 minutos (0.5 U/ml para hepatocitos y linfocitos, y 0.92 U/ml para neuronas). Se muestran las desviaciones estándar para cada tiempo de digestión correspondiente. Las 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.

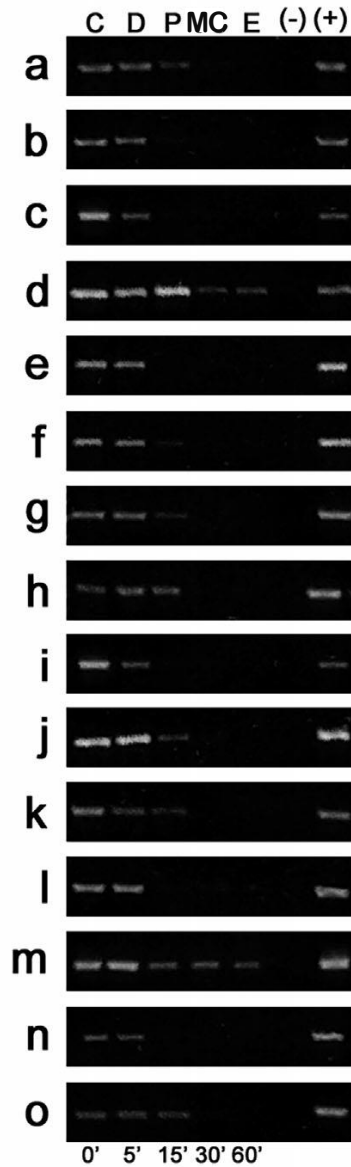


Figura 44. Ejemplo representativo del mapeo topológico con respecto a la MN de quince secuencias blanco (a-o) en neuronas de rata. Los amplicones fueron considerados como positivos o negativos mediante un software de análisis de imágenes (Kodak 1D Image Analysis Software 3.5 System) empleando los parámetros 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≥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 = ≥4.

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

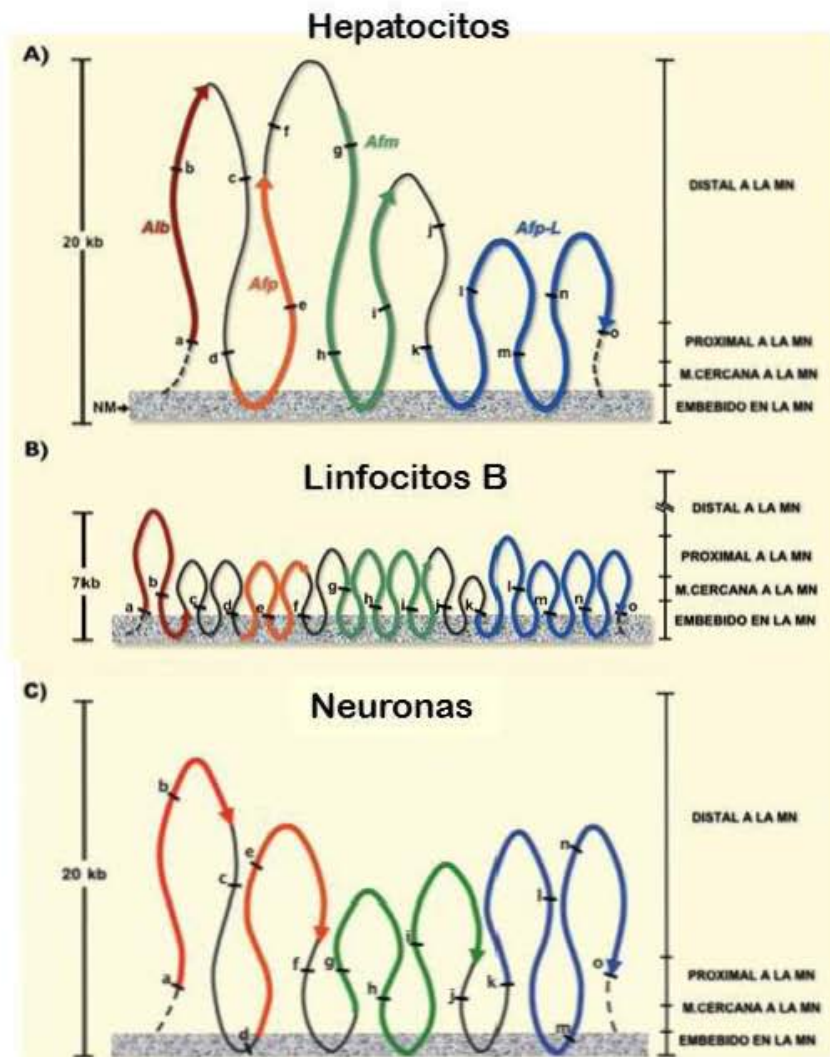


Figura 45. Organización en bucles estructurales de DNA de la región genómica de 162 kb que incluye cuatro miembros de la familia albúmina, en hepatocitos: A y linfocitos: B (Tomado de Rivera-Mulia y Aranda Anzaldo 2010). C) Organización en neuronas conforme los datos de la tabla 18. Las letras indican 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 (*Afrm*), azul (*Afrp-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 el DNA y la MN se da por efectos de lectura indirectos, en los cuales el reconocimiento de la topología local de los elementos que interactúan determina la unión (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 de 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 sobre las características globales de la NHOS, tales como el número de bucles estructurales, el grado de hiperenrollamiento de los mismos y la estabilidad de las asociaciones entre el DNA y la MN. Estas características son similares en el mismo tejido de especies cercanas, lo cual 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).

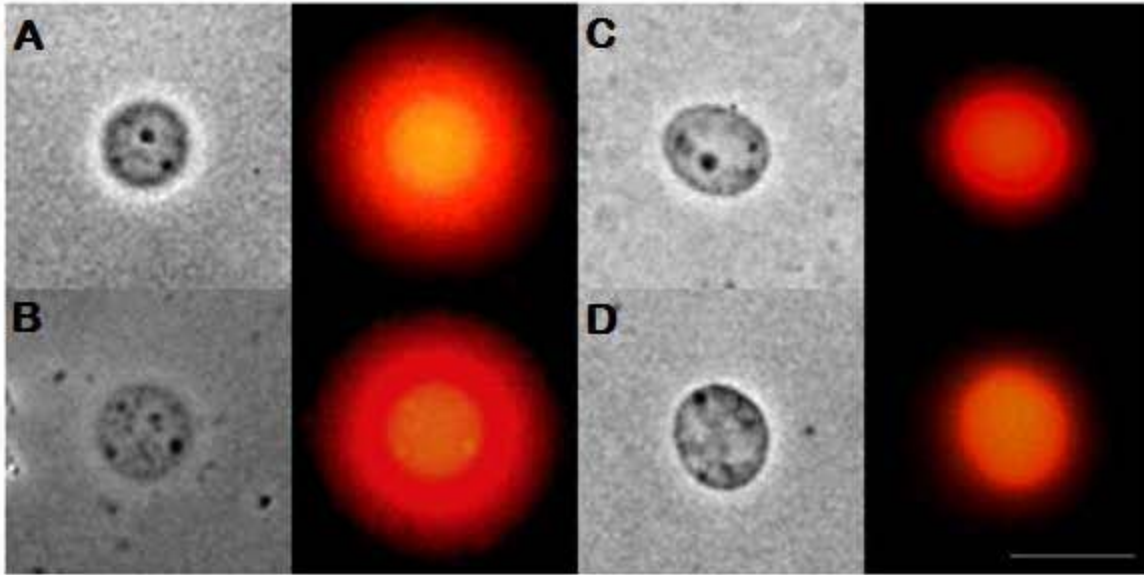


Figura 46. Halos de DNA. Micrografías en contraste de fases y de fluorescencia de nucleoides tratados con 80 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio para inducir el desenrollamiento y la relajación de los bucles de DNA, de esta manera se forma un halo de DNA alrededor del contorno de la MN. A: hepatocitos de rata. B: hepatocitos de ratón. C: neuronas de rata y D: neuronas de ratón. 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 kb) en la rata ($n=43$) y $8.15 \pm 0.86 \mu\text{m}$ (23.97 kb) en el ratón ($n = 135$). Tales valores corresponden a la mitad de la longitud total del bucle de DNA. Barra = 15 μm .

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.

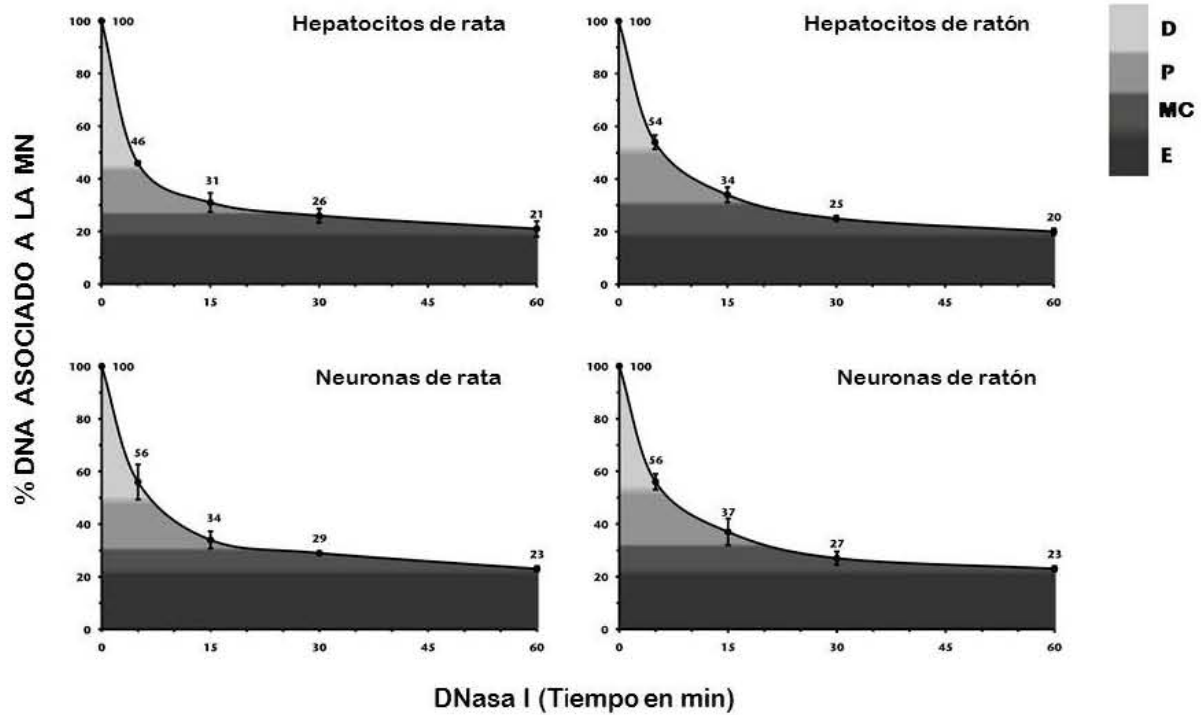


Figura 47. Cinéticas de digestión del DNA en nucleoides. Los nucleoides fueron digeridos con DNasa I. El valor de cada tiempo es el promedio de experimentos separados, $n > 4$. Las barras indica la correspondiente desviación estándar (DE). Las zonas topológicas relativas a la MN corresponden a porcentajes 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, MC=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 la 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.

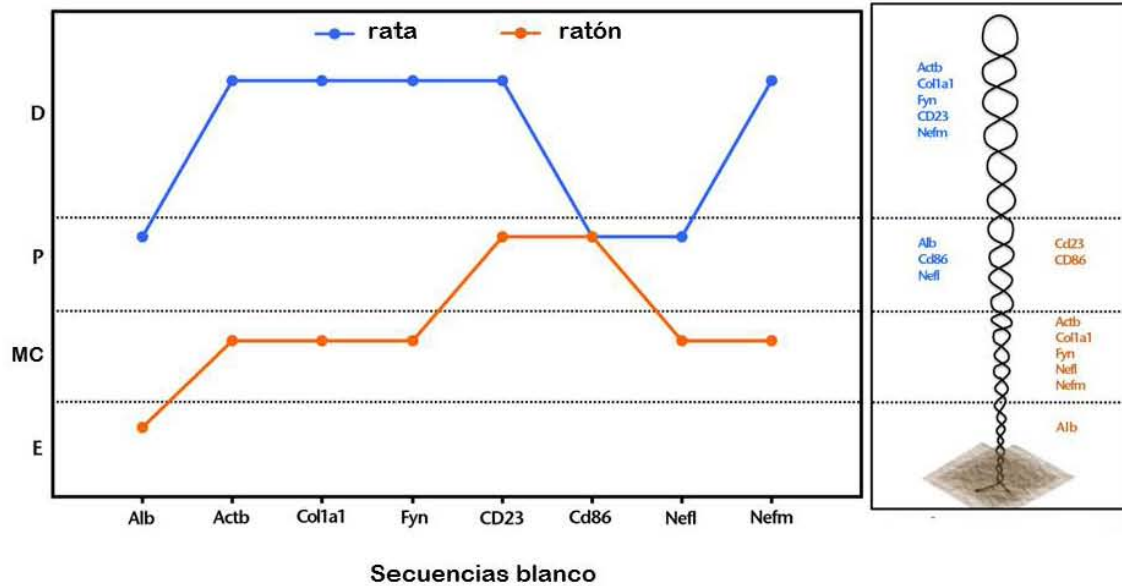


Figura 48. Patrón de mapeo topológico de ocho secuencias blanco en hepatocitos de rata y de ratón. Siete de las ocho secuencias blanco se ubicaron en zonas topológicas diferentes en ambas especies. Se muestra un esquema de la distribución de las secuencias en un bucle de DNA asociado a la MN. Observe 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 como resultado 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; 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 (como 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 84 a 100 %) de las regiones mapeadas entre la rata y el ratón, 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 del 100 %, la ausencia de amplificación se puede deber a las diferencias en la secuencia más allá de la región de interés, lo cual afecta 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.

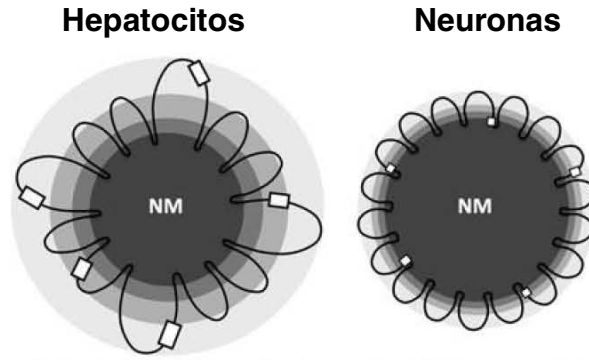
El hecho de que no exista secuencia consenso que defina los LARs y que no se hayan identificado proteínas responsables de establecer los anclajes con el DNA de manera consistente, sugiere que las interacciones que se establecen entre el DNA y la MN no corresponden a relaciones unívocas entre una proteína 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 la 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

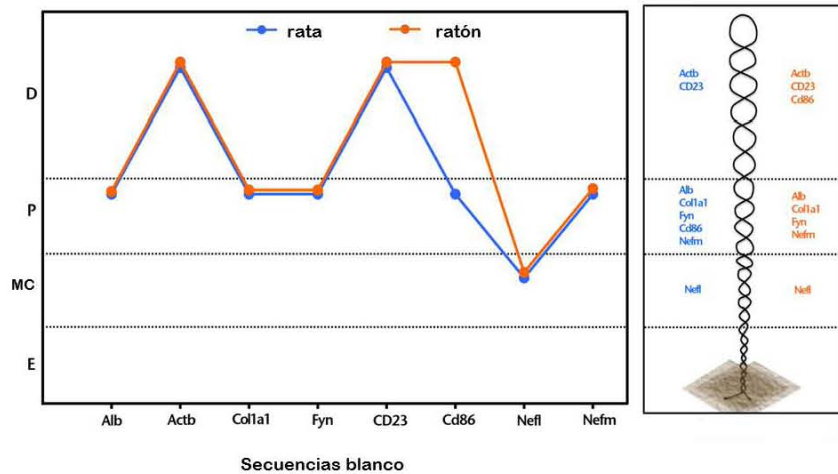


Figura 49. (A) Modelo de la estructura de orden superior en el núcleo celular (NHOS) en hepatocitos y neuronas. Las zonas topológicas con respecto a la MN correspondientes están representadas por una escala de grises de intensidad creciente donde el gris más oscuro representa a la MN. Los cuadros blancos 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 las posiciones 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 realizar 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 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 del 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 el DNA y la 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 García 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).

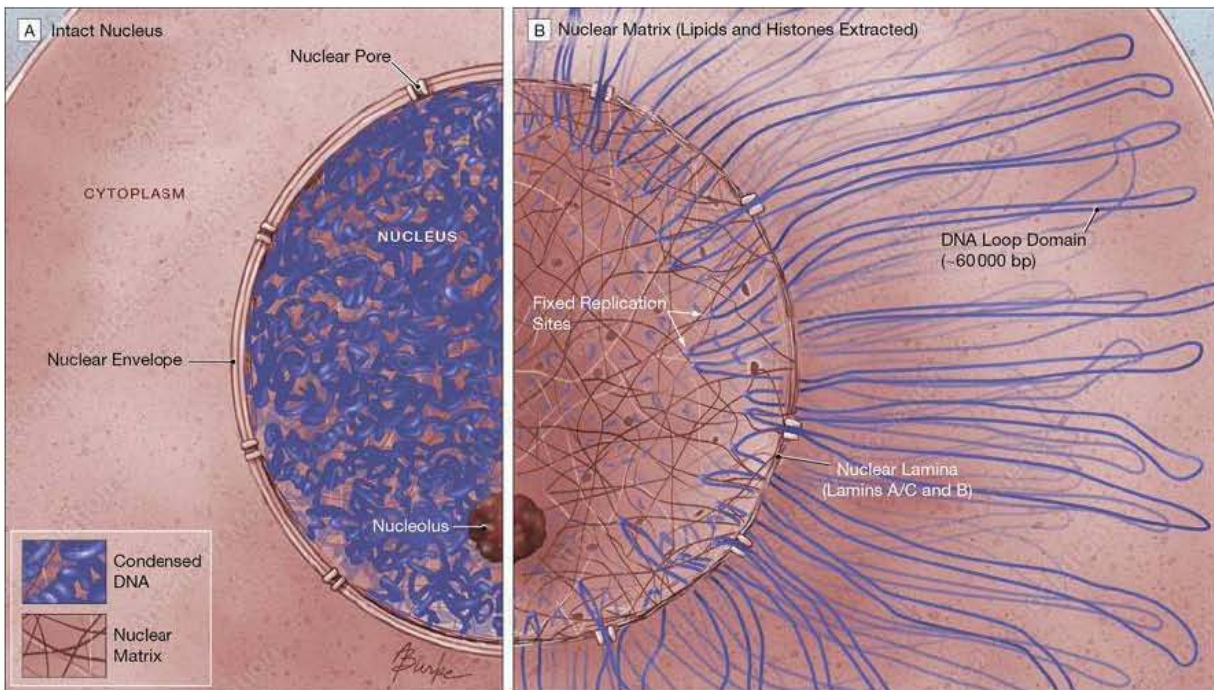


Figura 50. Modelo de la matriz nuclear y los bucles de DNA asociados a esta. Tomado de © American Medical Association, <http://www.alison-burke.com/works-cellsmols.html>.

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 nivel global 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) 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.
- 7) El perfil de proteínas de MN del mismo tipo celular entre especies cercanas es similar.
- 8) Los nucleoides del mismo tipo celular entre especies cercanas son similares, indicando que las propiedades estructurales del DNA y de los componentes de la MN son los factores que determinan el establecimiento de las interacciones DNA-MN.
- 9) Sin embargo las diferencias en el cariotipo entre especies favorece que a nivel local se formen anclajes específicos entre el DNA y la MN.
- 10) 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.

- 11) Los factores de tipo biológico no son determinantes en el establecimiento de 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.

Se propone estudiar la relación entre el carácter tejido-específico de la NHOS y la diferenciación celular. La NHOS es una organización muy estable, lo cual hace pensar que puede estar relacionada con la especificación del fenotipo celular que también es bastante estable.

Es posible que cambios en la NHOS afecten la organización en 3D del genoma y por lo tanto la diferenciación celular. De manera que en el estudio de la NHOS en ciertos estadios del desarrollo, por ejemplo en el paso de una célula madre totipotencial al estadio de gástrula, se buscaría si existen NHOS específicos de las tres capas germinales (linaje-específica).

Si el conjunto de LARs propio de una de las capas germinales se preserva en las células derivadas de ésta, se confirmaría que existen NHOS linaje-específicos.

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, 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 la secuenciación masiva de los LARs genómicos y mediante análisis bioinformático, 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.kennethsnelson.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 intercelular (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 mecanoreceptores (Ingber, 1991; Wang *et al.*, 1993; Hu *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 tenseguridad 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 tenseguridad dado que la inducción de fuerzas de desgarro por el 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).

ANEXO II. Silva-Santiago et al., 2017a



Research paper

The nuclear higher-order structure defined by the set of topological relationships between DNA and the nuclear matrix is species-specific in hepatocytes



Evangelina Silva-Santiago^a, Juan Pablo Pardo^b, Rolando Hernández-Muñoz^c, Armando Aranda-Anzaldo^{a,*}

^a Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50180, Edo. Méx., Mexico

^b Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacan, 04510, Ciudad de México, Mexico

^c Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacan, 04510, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 July 2016

Received in revised form 12 October 2016

Accepted 18 October 2016

Available online 19 October 2016

Keywords:

DNA loop

DNA supercoiling

DNA topology

Karyotype

Matrix attachment region

Loop attachment region

Natural selection

ABSTRACT

During the interphase the nuclear DNA of metazoan cells is organized in supercoiled loops anchored to constituents of a nuclear substructure or compartment known as the nuclear matrix. The stable interactions between DNA and the nuclear matrix (NM) correspond to a set of topological relationships that define a nuclear higher-order structure (NHOS). Current evidence suggests that the NHOS is cell-type-specific. Biophysical evidence and theoretical models suggest that thermodynamic and structural constraints drive the actualization of DNA-NM interactions. However, if the topological relationships between DNA and the NM were the subject of any biological constraint with functional significance then they must be adaptive and thus be positively selected by natural selection and they should be reasonably conserved, at least within closely related species.

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 a limited set of 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 the NM is not conserved between the hepatocytes of the two closely related species, suggesting that the NHOS, like the karyotype, is species-specific.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The interior of the cell nucleus is a highly structured milieu where the fundamental processes of DNA replication and transcription occur according to a spatio-temporal order. During the interphase the nuclear DNA of metazoan cells is organized in supercoiled loops attached or anchored to constituents of a nuclear substructure or compartment known as the nuclear matrix (Cook et al., 1976; Roti-Roti and Wright, 1987; Thomas and Thomas, 1989; Razin et al., 1995; Woodcock and Ghosh, 2010). The stable interactions between DNA and the nuclear matrix (NM) correspond to a set of topological relationships that define a nuclear higher-order structure (NHOS) that is largely independent of regulatory proteins that bind DNA on a sequence-specific fashion, and also of chromatin proteins, since the standard procedures for obtaining

the nuclear matrix (NM) remove both types of proteins and yet the DNA loops remain supercoiled and attached to the NM (Cook et al., 1976; Verheijen et al., 1986; Razin et al., 1995). DNA interacts with the NM by means of so-called matrix attachment or addressed regions (MARs) that in mammals correspond to ill-defined DNA sequences besides being relatively enriched in A-T and presenting tracts where DNA is naturally kinked or bent (Ottaviani et al., 2008). In principle, MARs have the potential to be bound to the NM but experiments using constructs with multi-copy tandems of well characterized MARs inserted into a host genome show that not all MARs actually bind to the NM, indicating that unknown constraints determine the actual use of MARs (Heng et al., 2004). In situ MARs have been operationally classified into structural-constitutive, that resist extraction with high salt and transient-facultative that do not resist such extraction (Maya-Mendoza et al., 2003; Elcock and Bridger, 2008). The former are also known as true loop attachment regions or LARs (Razin, 2001).

Current evidence suggests that the NHOS is cell-type-specific (Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García and Aranda-Anzaldo, 2011). Moreover, genomic regions corresponding to large genes that are similarly expressed in different cell types are organized into cell-type specific patterns of structural DNA loops attached to

Abbreviations: LAR, loop attachment region; MAR, matrix attachment/addressed region; NHOS, nuclear higher-order structure; NM, nuclear matrix; PAGE, polyacrilamide gel electrophoresis; SDS, sodium dodecyl sulphate.

* Corresponding author at: Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Toluca y Jesús Carranza s/n, Toluca, 50180, Edo. Méx., Mexico.

E-mail addresses: aaa@uaemex.mx, armando10@gmail.com (A. Aranda-Anzaldo).

the NM, suggesting on the one hand that transcription is adapted to work efficiently independently of the particular organization of the structural DNA loops and on the other hand, that the NHOS is established independently of transcriptional constraints (Trevilla-García and Aranda-Anzaldo, 2012). There is compelling evidence that the structural DNA loops attached to the NM correspond to the actual subdivision of the genome into units of replication (replicons) in vivo (Buongiorno-Nardelli et al., 1982; Lemaitre et al., 2005; Courbet et al., 2008; Rivera-Mulia et al., 2011) and that the NM is an organizing compartment for DNA replication (Wei et al., 1998; Anachkova et al., 2005; Wilson and Coverley, 2013). Nevertheless, the NHOS evolves and this evolution correlates with changes in cell differentiation as well as in the proliferating potential of the cell. Cells with a significant proliferating potential display a rather loose and heterogeneous NHOS while in terminally differentiated cells the NHOS becomes very homogeneous and stable, as indicated by the further actualization as LARs of a large number of potential MARs, resulting in shorter, more numerous and more homogeneously sized DNA loops (Maya-Mendoza et al., 2005; Alva-Medina et al., 2010).

The trend for NHOS stabilization suggests that thermodynamic and structural constraints drive the actualization of DNA-NM interactions (Alva-Medina et al., 2011; Aranda-Anzaldo, 2016). However, if the topological relationships between DNA and the NM were the subject of any biological constraint with functional significance then they must be adaptive and thus be positively selected by natural selection (Bakewell et al., 2007; Graur et al., 2013), in such a way that the average pattern of LARs and so the locations of genomic sequences relative to the NM should be reasonably conserved, at least within closely related species. We have carried out a coarse-grained, comparative evaluation of the DNA-NM topological relationships in two closely related mammals: rat and mouse, using primary liver hepatocytes, by determining the relative position to the NM of a limited set of 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 the NM is not significantly conserved between the hepatocytes of closely related species, suggesting that the NHOS, like the karyotype, is species-specific.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Primary cells were isolated from male adult Wistar rats (weight 250–300 g) or from male adult CD1 mice (20–30 g). Animals were used, prior approval from the Ethics Committee of Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, following the guidelines of the Official Mexican Norm for production, care and use of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999). Animals were euthanized under general anesthesia.

2.2. Primary hepatocytes

Primary hepatocytes either from mouse or rat were isolated as previously described (Maya-Mendoza et al., 2003). The freshly isolated hepatocytes were suspended in PBS without Ca^{2+} or Mg^{2+} (PBS-A) at 4 °C, counted in a hemocytometer and immediately used for further preparations.

2.3. Nucleoid preparation

Nucleoids are operationally defined as structures consisting of the residual NM with the naked genomic DNA firmly bound to it. For obtaining nucleoids 50 μl aliquots containing 3×10^5 hepatocytes were gently mixed with 150 μl of lysis buffer (2.6 M NaCl, 1.3 mM EDTA, 2.6 mM Tris, 1.2% Triton-X100, pH 8) and incubated for 20 min at 4 °C. Next the samples were washed in ice-cold PBS-A at a ratio

1:70 v:v and spun at 3000 rpm for 5 min. The final nucleoid pellets were gently re-suspended in a 200 μl PBS-A.

2.4. Nucleoid fluorescent halo assay

Aliquots of nucleoids from hepatocytes (10 μl) were deposited directly on a microscope slide and stained with 10 μl of ethidium bromide at 160 mg/ml in PBS-A (final ethidium bromide concentration 80 mg/ml). After 30 s the nucleoid samples were examined under an Olympus BX60 epifluorescence microscope fitted with a QiClick/QIMAGING camera for assessing the DNA halo expansion and so the nucleoid DNA integrity and supercoiling (Aranda-Anzaldo et al., 1999). Average DNA halo radii were estimated from the core nucleoid contour to the outer limit of the DNA halo with Image J: Auto Local Threshold v.1.16.1 software using the Median method that applies Adaptive-Dynamic thresholding for image analysis (<http://homepages.inf.ed.ac.uk/rbf/HIPR2/adpthrsh.htm>). The corresponding average DNA loop size was deduced from the measurement of DNA halos as previously described (Maya-Mendoza et al., 2005).

2.5. DNase I digestion of nucleoids

1.8×10^6 nucleoids from hepatocytes suspended in 1.2 ml PBS-A were mixed with 5.1 ml of digestion buffer (10 mM MgCl_2 , 0.2 mM β -mercaptoethanol, 50 mM Tris, pH 7.2) and DNase I (pancreatic bovine DNase I Sigma) was added (from a stock in 0.15 M NaCl, 50% glycerol) to a final concentration of 0.5 U/ml. Digestions were carried out at 37 °C for 60 min. 1 ml aliquots from partially digested nucleoids were collected at 0, 5, 15, 30 and 60 min. In such aliquots digestion was stopped by adding 200 μl of stop buffer (0.2 M EDTA, 10 mM Tris, pH 7.5). The samples were spun for 10 min at 9000 g at 4 °C, the nucleoid pellet re-suspended in 1 ml PBS-A and centrifuged again as above. Next the pellet was washed twice as above in 1 ml of ice-cold deionized water (dd- H_2O) and the final pellet of partially digested nucleoids was re-suspended in 200 μl dd- H_2O to be used directly as template for PCR. The amount of DNA present in each sample from a digestion curve was determined by spectrophotometry.

2.6. Genomic DNA primers

Pairs of primers defining eight short amplicons (≤ 449 bp), corresponding to eight target genes located in six separate chromosomes (according to the species-specific karyotype) were designed considering on the one hand their high specificity but on the other hand their ability to perform efficient DNA amplification under the same PCR program for all (Tables 1 and 2). All primers were 18–24 bp in length, G-C content of 50–55% (with a difference $\leq 5\%$), T_m 50–58 °C (with a difference ≤ 1.2 °C). Secondary structures with a $\Delta G < -1$ kcal/mol and dimmer/duplexes with a $\Delta G < -2$ kcal/mol were avoided. The specificity of the set of primers was confirmed using the NCBI BLAST algorithm.

2.7. PCR amplification of target sequences on NM-bound templates

We have previously shown that there is no difference in the efficiency of amplification of short target sequences when using either purified DNA templates or NM-bound DNA templates (Maya-Mendoza and Aranda-Anzaldo, 2003). Thus PCR amplification of target sequences was carried out on NM-bound templates. 10 ng of NM-bound DNA from the corresponding aliquots resulting from the treatment of nucleoids with DNase I were used for PCR amplification in a 50 μl reaction volume: 0.7 U GoTaq DNA polymerase (Promega), 2 mM MgCl_2 , 0.2 mM from each dNTP and 0.1 μM from each primer. All target sequences were amplified under the same program in an Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler: initial denaturation step at 94 °C for 5 min, following denaturation steps at 94 °C for 45 s, annealing at 56 °C for 1 min, extension at 72 °C for 1 min for 35 cycles and final extension at 72 °C for

Table 1
Sets of primers and corresponding amplicon size of target sequences used for determining a coarse-grained sample of the Nuclear Higher Order Structure (NHOS) in primary hepatocytes from rat and mouse adults.

Gene target	Forward primer rat	Reverse primer rat	Amplicon length (bp)
Alb	TGGCAACATACGCAAGGGA	GCGAAACACACCCTGGAAA	275
Actb	AACACCCAGCCATGTACG	ATGTCACGCAGATTCCC	254
Col1a1	CATACCTGGCCACACCAT	CTTGCACTTCTCTTGCGA	261
Fyn	ACACAATGCTGATCTAGTCGTGGC	CACATCTGTTCATCACTGTCCG	340
CD23	TAGGAGACGATGCTGCTGTGCA	CGTGGGAAGAGGATCAGACAAGAA	284
Cd86	CCACTCTCAGATCCACATCCCT	CCAGGCTCTACGACTTACAATGT	284
Nefl	TCCCTTGTAGTCTCTTGA	ACTTGTCCCTTACGGGAGA	249
Nefm	CGGAGCAATCACGAAGAGGA	TGGCGATCTCTTCTTAGCG	254
Gene target	Forward primer mouse	Reverse primer mouse	Amplicon length (bp)
Alb	TGGCAACATACGCAAGGGA	GCGAAACACACCCTGGAAA	264
Actb	AACACCCAGCCATGTACG	ATGTCACGCAGATTCCC	254
Col1a1	AAGGTGTGTCTGGCATGGCA	CCCCTTGTACTTCTTCTGGGAC	367
Fyn	ATCCTGTGCCTGTGCGTTAGA	CATCCCTCAGCGTCCATT	308
CD23	GCTACCAACAGGATACTGGGAACC	CAGCGGCAGGAAAATGACAG	449
Cd86	CATATCTGCCGTGCCAATTAC	GACCCACATCCCTCCAAA	445
Nefl	CTTTTTTCTCTGTCCCACTCCC	CGCTGGCTTGTGATTCCTTA	444
Nefm	TTTCTGCGGAGCAATCACG	TTCTTGGCAGAGCGAATGG	250

10 min. PCR products were resolved in 2% agarose gels and stained with ethidium bromide, recorded and analyzed using a Kodak ID Image Analysis Software 3.5 system. Amplicons were scored as positive or negative in the partially digested nucleoid samples depending on whether they are detected or not by the software using the default settings. The identity of all amplicons was confirmed by restriction enzyme analysis.

2.8. Extraction of NM proteins

NM proteins were extracted from hepatocyte nucleoids ($10\text{--}15 \times 10^6$ nucleoids/sample). Nucleoids were pelleted by centrifugation (9000g/10 min at 4 °C) and homogenized in 100 µl of extraction buffer (2% SDS, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 5 mM Tris pH 7.2) added with a protease-inhibitor cocktail (800 nM apoprotinin, 40 µM bestatin, 100 µM leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 1 mM PMSF). The homogenate was boiled for 5 min and then centrifuged (10,000 rpm/10 min at 4 °C). Both pellet and supernatant were stored at -70 °C until further use. Proteins were quantified by spectrophotometry using the Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions.

2.9. PAGE of NM proteins

NM proteins were analyzed in standard discontinuous (10 ml/2 ml) SDS-polyacrylamide gels (resolving gel: 10% acrylamide, 0.375 M Tris pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% Ammonium persulphate, 0.04% TEMED; concentrating gel: 4% acrylamide, 0.126 M Tris pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% Ammonium persulphate, 0.1% TEMED). Protein samples in loading buffer (0.125 M Tris, 4% SDS, 20% glycerol, 10% mercaptoethanol) were loaded in the gel (30 µg/well) and run at 40 mA (running buffer: 0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 0.1% SDS, pH 8.5–8.7) for 1–1.5 h and stained with Coomassie blue. Gel images were analyzed using the Kodak 1D Image Analysis Software 3.5 system, using the default settings.

Table 2
Gene targets located in six different chromosomes from each rodent species.

Gene	Chromosome location		Target location
	Rat	Mouse	
Alb	14p22	5G2	Exon 1
Actb	12p11	5G2	Exon 4
Col1a1	10q31	11D	5' UTR
Fyn	20q13	10B1	Exon 2
CD23	12p12	8 A1	Exon 3–4
Cd86	11q22	16B5	Exon 2
Nefl	15p12	14D3	5' UTR
Nefm	15p12	14D1	Exon 1

3. Results

3.1. Large-scale comparison of the NHOS of rat and mouse hepatocytes

A classical observation is the formation of a halo of nuclear DNA that results from the unwinding and expansion of the formerly supercoiled DNA loops attached to the NM, when exposed to the action of a DNA intercalating agent such as the fluorescent dye ethidium bromide (Cook et al., 1976; Roti-Roti et al., 1993; Aranda-Anzaldo et al., 1999). The dye intercalates between the rungs of base pairs acting as a molecular lever that induces the unwinding of the supercoiled loops. The resulting DNA halo provides relevant information since the average diameter of the halo is directly proportional to the average size of the DNA loops (Razin et al., 1995), while the morphology and stability of the halo after expansion correlates with the actual stability and average distribution of the DNA-NM attachments (Maya-Mendoza et al., 2005; Martínez-Ramos et al., 2005). This halo assay is performed on nucleoids which correspond to structures resulting from treating the nucleus with high-salt and non-ionic detergent which eliminate the nuclear envelope and the whole set of soluble nuclear proteins, including those of chromatin (Cook et al., 1976; Verheijen et al., 1986; Jackson et al., 1990; Razin et al., 1995), leaving only the naked genomic DNA attached to the non-soluble ribonucleoproteins that constitute the NM (Nickerson, 2001). Using this method we have previously shown that the DNA loops are 36% shorter on average in the hepatocytes from senescent rats when compared to the average DNA-loop size in hepatocytes from young adult rats as the ones used in the present study (Maya-Mendoza et al., 2005). Also we have shown that in cortical neurons of rats the average size of the DNA loops is ~50% of that in the hepatocytes of the corresponding rats (Alva-Medina et al., 2010). Thus we performed a comparative evaluation of the nuclear DNA halos in nucleoids from primary hepatocytes from both rat and mouse. The results show that the stability of the NHOS is quite similar in the hepatocytes from both species, as well as the average size of the corresponding DNA loops (Fig. 1). Therefore the overall distribution and number of attachments to the NM appear to be quite similar in the hepatocytes from both rodent species.

3.2. Comparative kinetics of digestion by DNase I of NM-bound DNA in rat and mouse hepatocytes

Since the naked DNA loops attached to the NM are negatively supercoiled, this property can be exploited for mapping the relative position to the NM of any known genomic sequence, provided that it is not a repetitive or ubiquitous sequence (Maya-Mendoza and

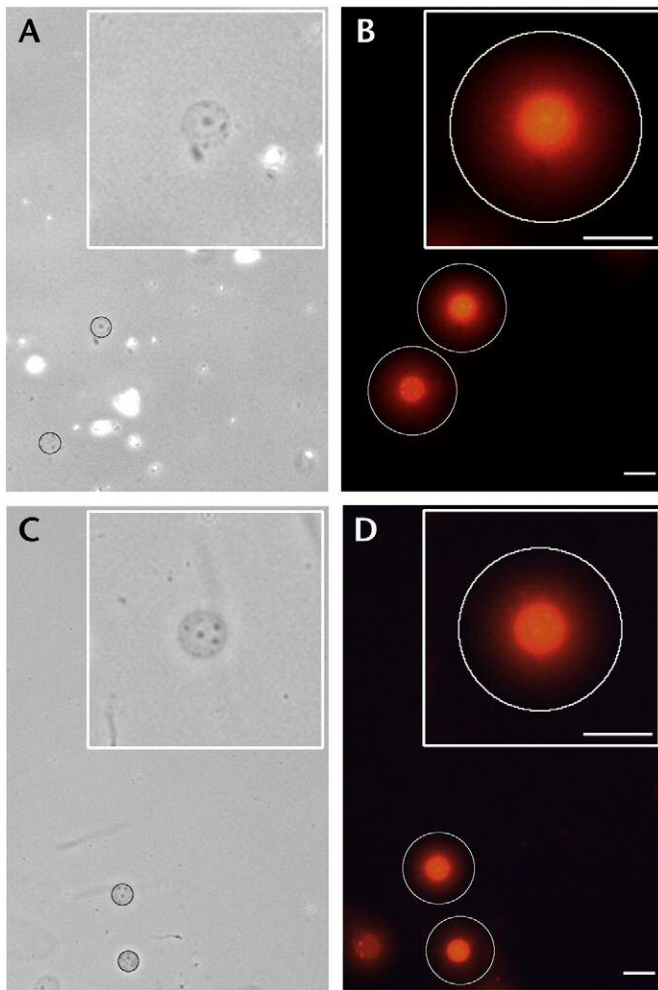


Fig. 1. DNA halos. Typical phase contrast (left) and fluorescence (right) micrographs of nucleoids from hepatocytes treated with 80 $\mu\text{g/ml}$ of ethidium bromide (EB) for inducing unwinding and relaxation of DNA loops resulting in a DNA halo around the nuclear matrix (NM) contour. A, B nucleoids from rat hepatocytes. C, D nucleoids from mouse hepatocytes. The phase contrast micrographs display the contour of the corresponding NM (black circles). The contour of the DNA halo as measured by the image analysis software is highlighted (white circles) in the fluorescence micrographs. The assay is done with nucleoid samples in suspension this implies that the nucleoids may drift to a different position when shifting from phase contrast to fluorescence. All images were taken with a 40 \times lens (the insets show 2 \times amplified images). The estimated average loop size from the base to tip for nucleoid hepatocytes was $14.1 \pm 2.25 \mu\text{m}$ (41.47 kbp) in rat ($n = 32$) and $13.04 \pm 1.3 \mu\text{m}$ (38.35 kbp) in mouse ($n = 74$). Such values correspond to half of the whole average DNA length per loop. Bar = 15 μm .

Aranda-Anzaldo, 2003; Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010). The mapping procedure exploits the fact that when present at very low concentration DNase I action on genomic DNA is limited by two parameters: 1) DNA supercoiling that is a topological barrier for the cutting activity, since DNase I proceeds by single-stranded cuts and so two closely parallel cuts are necessary for cleaving a given DNA fragment (Lewin, 1980). Yet being a bulky protein DNase I can only cleave the more superficially exposed phosphodiester bonds and not those hidden by tight DNA supercoiling (Rhodes and Klug, 1980). Nicking of a given strand may cause the unwinding of the tightly packed supercoiled DNA but the frictional drag of the surrounding medium slows down the actual rate of unwinding (Nelson, 1999; Frank-Kamenetskii and Prakash, 2014). Therefore significant reduction of the overall DNA supercoiling must occur before the looped DNA becomes completely accessible to DNase I. 2) Steric hindrance posed by the presence of the NM that protects the DNA that is closer to it from the action of an incoming bulky enzyme. Indeed, DNA embedded within the NM is resistant to

large concentrations of DNase I. The presence of both parameters results in a trend for cleaving first those regions of DNA that are less supercoiled and farther from the NM (the tips of DNA loops) and cleaving latter those regions closer to the NM.

Thus when applied to preparations containing a large number of nucleoids this procedure results in a highly reproducible kinetics of digestion by DNase I of NM-bound DNA (Fig. 2). The slopes of the digestion curve define four topological zones relative to the NM: distal, proximal, very close and embedded. The remarkably similar morphology of the digestion curves indicates that in both species similar amounts of bulk DNA are distributed within the corresponding topological zones, confirming the overall or large-scale similarity of the NHOS in the hepatocytes from both species. This is consistent with our previous finding that the distribution of bulk DNA within the four topological zones relative to the NM is cell-type specific (Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010; Alva-Medina et al., 2010; Trevilla-García and Aranda-Anzaldo, 2011).

3.3. Comparative positional mapping relative to the NM of target sequences

The position of specific target sequences within the topological zones relative to the NM can be located according to their presence being detected by PCR amplification on the corresponding time-aliquot of the DNase I digestion curve. The topological zone assigned to a given target sequence corresponds to the last one where the corresponding amplicon is detected. All target sequences were amplified using the same program. The target amplicons were within 449–250 bp in length, thus short enough so as to preclude any significant difference in amplification efficiency related to amplicon length, and long enough so as to be highly specific (Table 1). The presence of the corresponding amplicon is scored as positive or negative by an image analysis program set to its default threshold. In this assay the actual strength of the amplicon signal is non-relevant since location is a spatial property not a statistical one (Fig. 3). Using this established approach (Maya-Mendoza and Aranda-Anzaldo, 2003; Maya-Mendoza et al., 2003; Iarovaia et al., 2004; Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García and Aranda-Anzaldo, 2011) we mapped in nucleoids from either rat or mouse hepatocytes, the position relative to the NM of eight target amplicons corresponding to highly-conserved sequences of specific genes distributed in six different chromosomes that represent separate territories within the nucleus. In both species we included pairs of targets belonging to the same species-specific chromosome and located in the same chromosome arm (Table 2). The expression in the liver of the genes chosen for our study has been well characterized in both rodent species and it is publicly available (Atlas of Gene Expression: www.ebi.ac.uk/gxa/). We included four genes with similar expression in rat and mouse liver (*Alb*; *Actb*; *Col1a1*; *Fyn*), two genes that are not expressed in the liver from both species (*Nefl*; *Nefm*) and two genes that are slightly expressed in the rat liver but not expressed in the mouse liver (*Cd23*; *Cd86*).

When comparing the location of the target sequences in the nucleoids of the hepatocytes from rat and mouse, it is clear that the positions relative to the NM are not significantly conserved, since only one of the eight targets (*Cd86*) is located in the same topological zone relative to the NM in both species. On the other hand, five targets (*Alb*; *Actb*; *Col1a1*; *Fyn*; *Nefm*) display a comparative shift of two topological zones in their location relative to the NM (Table 3 and Fig. 4) implying the species-specific organization of the structural DNA loops in the hepatocytes from both species.

3.4. Comparative PAGE profiles of the NM from hepatocytes from both rodent species

The NM is operationally defined as the substructure or compartment resulting from extracting the nucleus with high-salt and non-ionic detergent followed by extensive digestion with DNase (Tsutsui et al.,

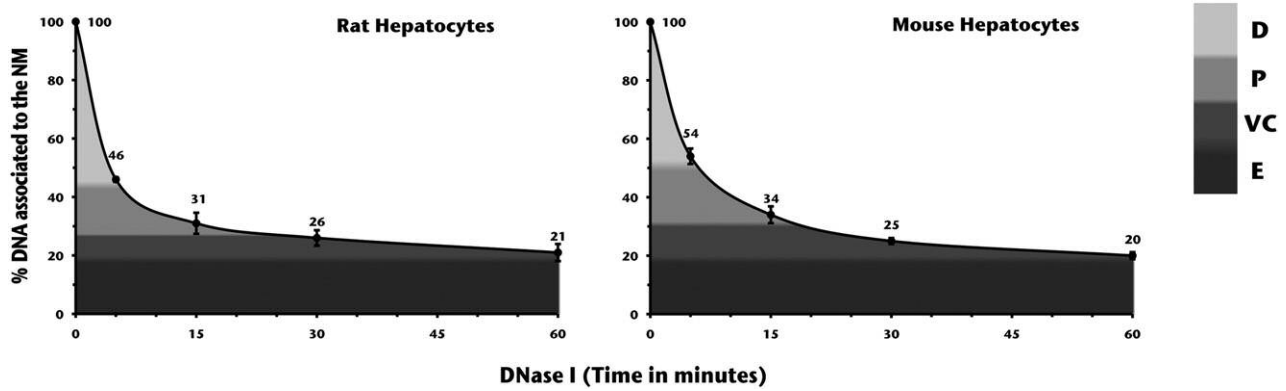


Fig. 2. Kinetics of digestion of DNA in nucleoids from hepatocytes. Nucleoids were digested with DNase I (0.5 U/ml). Each time-point value is the average of separate experiments $n \geq 4$. Bars indicate the corresponding SD. Shades of gray define four topological zones relative to the NM: D (distal to NM), P (proximal to NM), VC (very close to NM), E (embedded within NM). The shades of gray increase according to the relative proximity of the residual DNA to the NM. For rat hepatocytes: D = 55% of bulk DNA, P = 15% of bulk DNA, VC = 12% bulk DNA and E = 18% bulk DNA. The corresponding slopes are the following: 0–5 min = -10.8 ; 5–15 min = -1.5 ; 15–30 min = -0.3 ; 30–60 min = -0.16 . For mouse hepatocytes: D = 49% bulk DNA, P = 20% bulk DNA, VC = 12% bulk DNA and E = 19% bulk DNA. Corresponding slopes: 0–5 min = -9.2 ; 5–15 min = -2 ; 15–30 min = -0.6 ; 30–60 min = -0.16 . The similarity between species in the percentage of bulk DNA corresponding to each topological zone indicates similarity in the overall distribution of bulk DNA relative to the nuclear matrix in both species.

2005; Engelke et al., 2014). The result is a complex mixture of non-soluble ribonucleoproteins (Nickerson, 2001). State of the art proteomic analysis has defined a consistent set of 272 core-NM proteins that occur independently of the particulars of the extraction procedure for obtaining the NM (Engelke et al., 2014). On the other hand, there is

ample evidence that besides the common set there are many cell-type specific NM proteins (Stuurman et al., 1990; Dent et al., 2010; Engelke et al., 2014). Considering that the species-specific genome is the same in all cell types then qualitative changes in NM composition could help to explain the previously reported cell-type specificity of the

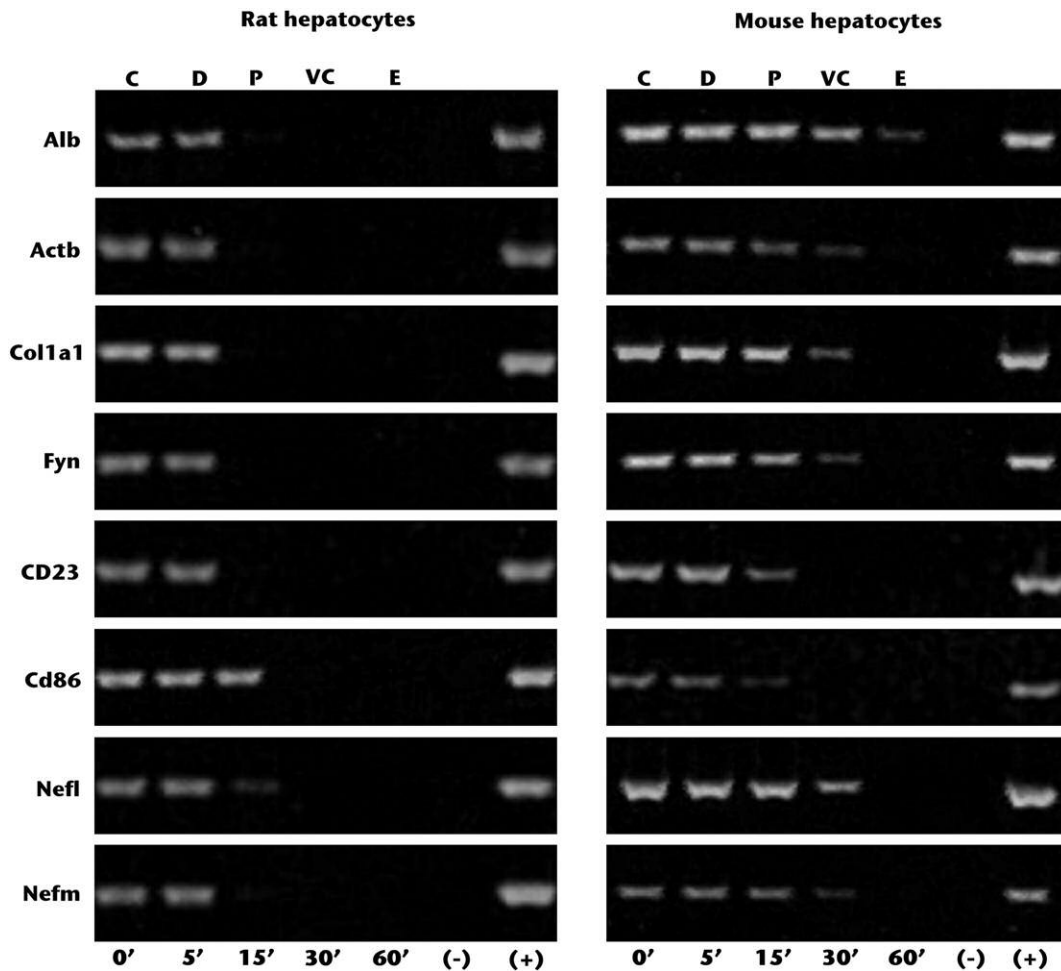


Fig. 3. Representative amplification pattern of the target sequences mapped to topological zones relative to the NM in nucleoids from rat and mouse hepatocytes. The amplicons were scored as positive or negative by an image analysis system (Kodak 1D Image Analysis Software 3.5 system) using its default settings and thus positioned within the specific topological zones defined according to the corresponding kinetics of nucleoid-DNA digestion (Fig. 2). C = control (0' digestion time), D = distal to the NM, P = proximal to the NM, VC = very close to the NM, E = embedded within the NM. (-) Negative control without DNA template. (+) Positive control with genomic DNA, $n = 6$.

Table 3

Topological mapping relative to the nuclear matrix of eight target sequences in nucleoids from rat and mouse hepatocytes. (+) Indicates that the amplicon was detected by the image analysis software. (–) Indicates that the amplicon was not detected by the software. (*) Indicates that in ~50% of the experiments, the corresponding target sequence mapped to the previous topological zone (n = 6 separate experiments for both rat and mouse samples).

Amplicon	Topological zones relative to NM in rat hepatocytes				Topological zones relative to NM in mouse hepatocytes			
	Distal	Proximal	Very close	Embedded	Distal	Proximal	Very close	Embedded
Alb	+	+			+	+	+	+
Actb	+				+	+	+	+
Col1a1	+				+	+	+	+
Fyn	+				+	+	+	+
CD23	+				+	+	+	+
Cd86	+	+			+	+		
Nefl	+	+			+	+	+	
Nefm	+				+	+	+	

NHOS (Trevilla-García and Aranda-Anzaldo, 2011; Alva-Medina et al., 2010, 2011). Yet quantitative changes in NM composition could be related to the species-specific differences in the NHOS between hepatocytes from both species. Indeed, comparative SDS-PAGE profiles of NM proteins from hepatocytes show no significant qualitative difference between rat and mouse except for a single band (in the 100–75 kDa range) present in mouse hepatocytes whose counterpart in rat hepatocytes could not be ascertained in several experiments. Yet a limited number of proteins bands showed a significant quantitative difference (>2-fold) between rat and mouse hepatocytes (Fig. 5).

4. Discussion

In metazoans the nuclear DNA is organized in supercoiled loops attached or anchored to constituents of the NM compartment. Such DNA-NM interactions are of higher affinity than those between DNA and chromatin proteins since the latter can be eliminated by exposure to mild-ionic strength conditions while the former resist the high-ionic strength necessary for extracting the NM (Cook et al., 1976; Verheijen et al., 1986; Razin et al., 1995). The high affinity DNA-NM interactions define a NHOS that corresponds to a set of topological relationships between the genome and the NM. Therefore the structural DNA loops stably attached to the NM are clearly different from DNA loops that may result from interactions between regulatory proteins and regulatory sequences in DNA or between regulatory proteins and

chromatin proteins associated with DNA, since such interactions cannot survive the procedures for extracting the NM. Thus, it is not possible, for the time being, to establish a clear correlation between the structural DNA loops constituting the NHOS and the many and diverse chromatin loops determined by 3C (chromosome conformation capture) and related assays that depend on the artificial and indiscriminate cross-linking of nuclear DNA with any sort of DNA bound proteins (either directly or indirectly) and whose many caveats are a current matter of discussion (Gavrilov et al., 2013; O'Sullivan et al., 2013; Williamson et al., 2014; Gavrilov et al., 2015).

In the present study we performed a coarse-grained comparison of the NHOS in primary hepatocytes from adult individuals of two closely related rodent species. We choose the hepatocytes because despite being usually quiescent they preserve a remarkable proliferating potential and so they are not terminally differentiated cells (Michalopoulos and DeFrances, 1997; Overturf et al., 1997) besides corresponding to the cell type where the NM was originally isolated and characterized (Berezney and Coffey, 1974, 1977). Our results indicate that most target sequences (7/8) display differential topological locations relative to the NM between the hepatocytes from both species (Fig. 4). Thus, despite the limited number of target sequences analyzed but considering that such sequences are located within structural DNA loops distributed in six different chromosomes (from each species) that correspond to separate territories within the corresponding nucleus, it can be suggested that significantly different sets of LARs are actually bound to the NM

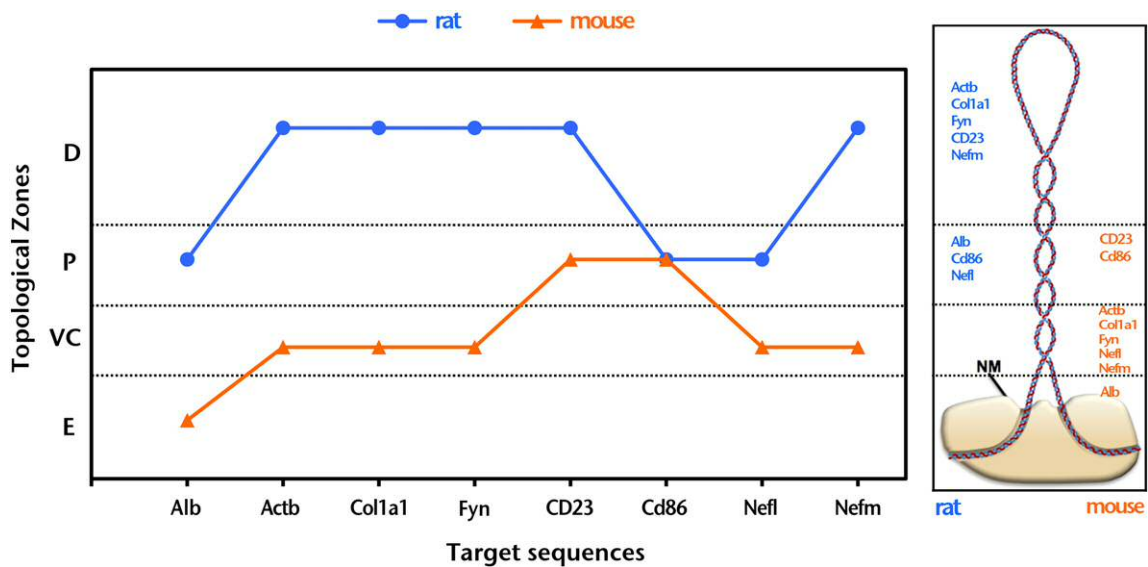


Fig. 4. Comparative topological mapping of target sequences relative to NM in nucleoids from rat and mouse hepatocytes. The linear graph (left) represents the distribution of the target sequences in the corresponding topological zones relative to the NM. Rat hepatocytes (blue) and mouse hepatocytes (orange). The species-specific graphs do not overlap except for the Cd86 target point, indicating that the NHOS of hepatocytes is species-specific. The right inset depicts the location of the specific targets in the corresponding topological zones of an average structural DNA loop.

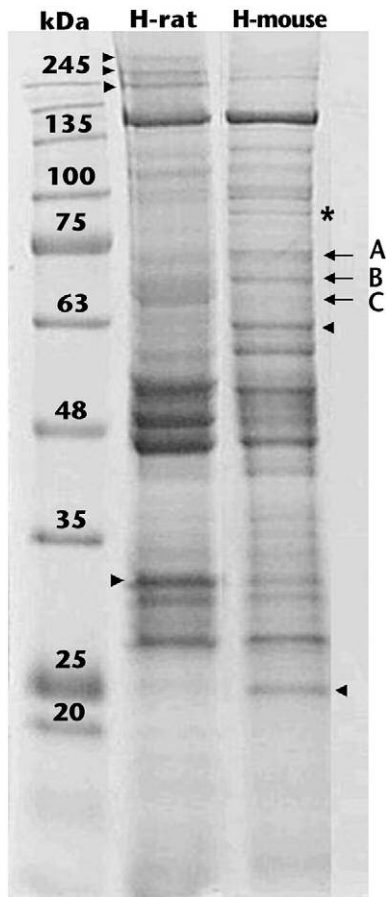


Fig. 5. Comparative SDS-PAGE profiles of NM proteins from rat and mouse hepatocytes. Equal amounts (30 μ g) of NM proteins/lane were loaded and resolved in a 10% SDS-polyacrilamide gel. Black triangles indicate NM proteins that in a densitometric analysis displayed a significant quantitative difference (>2-fold) between rat and mouse samples. The arrows indicate the position of Lamins A (74 kDa), B (68 kDa) and C (65 kDa). (*) Indicates a single NM-protein band in mouse hepatocytes whose counterpart could not be ascertained in rat hepatocytes.

in the hepatocytes from each rodent species and so that the NHOS of hepatocytes is species-specific. Otherwise the relative position of the target sequences to the NM should be quite similar in both species. We used outbred animals (Wistar rats and Swiss-CD1 mice) in order to minimize the probability of finding differences in the NHOS that were nothing but genetic idiosyncrasies resulting from high inbreeding typical of laboratory strains. Potential MARs may occur quite often along a chromosome (Boulikas, 1995) but their set is larger than the set of LARs actually bound to the NM (Maya-Mendoza et al., 2005). It is known that by itself the MAR sequence is not enough for determining the actual binding to the NM (Heng et al., 2004) and there is evidence that other factors such as nuclear shape, DNA structural stress and local topological constraints might be behind the choice of MARs that become LARs (Martínez-Ramos et al., 2005; Aranda-Anzaldo, 2016).

We cannot rule out that several minute differences in the composition of the NM, only detectable by deep proteomic analysis, could be responsible for the actual difference in the NHOS between hepatocytes from both species. However, considering that the phenotypic traits of a given cell type largely correspond to the proteins present in the corresponding cells and that hepatocytes perform the same functional roles in both species, it is unlikely that species-specific NM proteins may be primary responsible for the observed differences in NHOS between rat and mouse hepatocytes. Yet the few NM proteins that show significant (>2-fold) quantitative differences between rat and mouse hepatocytes (Fig. 5) could be responsible, at least in part, of the observed differences

in NHOS between species. Recently a role for non-coding RNAs in mediating DNA-NM interactions has been described (Hacisuleyman et al., 2014; Hall et al., 2014) but given that ncRNAs are involved in the regulation of genes it is likely that equivalent cell types displaying a similar phenotype must express equivalent ncRNA populations which are unlikely to cause a differential NHOS. Indeed, the difference in NHOS between hepatocytes from both species has no obvious impact on the transcription of the set of genes included in the present study, since four genes mapped in the present study (*Alb*; *Actb*; *Col1a1*; *Fyn*), whose expression has been previously confirmed in hepatocytes (Maya-Mendoza et al., 2003, 2005; Trevilla-García and Aranda-Anzaldo, 2012) are similarly expressed in both rat and mouse liver (Atlas of Gene Expression: www.ebi.ac.uk/gxa/) despite presenting a comparative shift of two topological zones in their location relative to the NM. Moreover, *Cd86* (also known as B7-2), the only one from the eight genes analyzed that presents a similar location relative to the NM in the hepatocytes from both species, it is slightly expressed in the adult rat liver but not expressed in the mouse liver (Atlas of Gene Expression). However, the *Cd86* expression is derived from professional antigen-presenting cells present in the rat liver but not from the hepatocytes (Harris and Ronchese, 1999). These facts are consistent with previous evidence suggesting that transcription occurs independently of the standard basal position of genes relative to the NM (Maya-Mendoza et al., 2003, 2004, 2005; Alva-Medina et al., 2011) and correlate with the evidence that specific genes can be similarly expressed in different cell types despite being differentially organized in structural DNA loops according to cell type (Trevilla-García and Aranda-Anzaldo, 2012).

The structural DNA-NM interactions are unlikely to depend on direct readouts between specific DNA sequences and specific DNA-binding proteins, since MARs/LARs show no consensus sequences and few MAR-binding proteins have been identified (Tsutsui et al., 2005; Ottaviani et al., 2008). A current proposal is that DNA-NM interactions depend on indirect readouts (Aranda-Anzaldo, 2016) resulting from the local topology of the interacting partners (Zhang et al., 2004; Yamasaki et al., 2012). For example, high-mobility-group chromatin proteins bind to bent or distorted DNA independently of the local nucleotide sequence (Štros, 2010). The typical mammalian chromosome corresponds to a long DNA fiber. Such a fiber in a thermal medium adopts a random-coiled state with complex topologies (Neumann, 1977). On the other hand, since DNA is polymorphic and heterogeneous in sequence, stiffness or flexibility varies continuously along the fiber (Travers, 2004). Thus, the same set of DNA segments arranged in a different order along a given chromosome results in fibers with differential flexibilities at the local and general level. This may also result in a differential set of potential topological conformations or a differential distribution for such topologies along the chromosome. Interestingly, despite the large and short-scale synteny between the mouse and rat genomes, the fact is that syntenic blocks are differentially arranged in the corresponding karyotypes from both species (Zhao et al., 2004; Graphodatsky et al., 2011). Therefore mouse and rat chromosomes might display differential topological properties at the short and long-range scales resulting from the differential arrangement of the syntenic blocks in the corresponding karyotypes. This may lead to differential affinities for the NM that might contribute to the differential NHOS in both species.

It is well known that closely related species of mammals, hardly distinguishable by the non-experts, may nevertheless possess remarkably different karyotypes (Yang et al., 1995; Graphodatsky et al., 2011) implying on the one hand, that similar genetic potentials can be structurally organized in quite different fashions and on the other hand, that karyotypes are not the subject of positive (adaptive) selection (Pardo-Manuel de Villena, 2005), otherwise they should be highly conserved instead of being species-specific. The results presented here suggest that the NHOS can be significantly different between equivalent cells from closely related species without having an impact on cellular fate

or function, thus they also suggest that the NHOS, like the karyotype, is not subjected to positive (adaptive) selection.

Funding

This work was funded by CONACYT-México grant CB2012-176794 to A.A.-A. CONACYT had no role in the study design, data collection and analysis or in the decision to publish and the preparation of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

E.S.-S. performed experiments and analyzed data. J.P.P. and R.H.-M. reviewed data and suggested experiments. A.A.-A. designed the study, analyzed and reviewed data. A.A.-A. and E.S.-S. wrote the paper.

Acknowledgments

We thank Dr. Claudia V. Rivera-Cerecedo and IFC-UNAM for providing laboratory rats.

E.S.-S. is a CONACYT Research Scholar within the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas at IFC-UNAM. This work partially fulfils the requirements of E.S.-S. to obtain the Ph.D. degree.

References

- Alva-Medina, J., Dent, M.A.R., Aranda-Anzaldo, A., 2010. Aged and post-mitotic cells share a very stable higher-order structure in the cell nucleus in vivo. *Biogerontology* 11, 703–716.
- 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.
- Anachkova, B., Djeliova, V., Russev, G., 2005. Nuclear matrix support of DNA replication. *J. Cell. Biochem.* 96, 951–961.
- Aranda-Anzaldo, A., 2016. The interphase mammalian chromosome as a structural system based on tensegrity. *J. Theor. Biol.* 393, 51–59.
- Aranda-Anzaldo, A., Orozco-Velasco, F., García-Villa, E., Gariglio, P., 1999. p53 is a rate-limiting factor in the repair of higher-order DNA structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1446, 181–192.
- Bakewell, M.A., Shi, P., Zhang, J., 2007. More genes underwent positive selection in chimpanzee evolution than in human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 7489–7494.
- Berezney, R., Coffey, D.S., 1974. Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 1410–1417.
- Berezney, R., Coffey, D.S., 1977. Nuclear matrix. Isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei. *J. Cell Biol.* 73, 616–637.
- Boulikas, T., 1995. Chromatin domains and prediction of MAR sequences. *Int. Rev. Cytol.* 162A, 279–388.
- Buongiorno-Nardelli, M., Micheli, G., Carri, M.T., Marilley, M., 1982. A relationship between replicon size and supercoiled loop domains in the eukaryotic genome. *Nature* 298, 100–102.
- Cook, P.R., Brazell, I., Jost, E., 1976. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J. Cell Sci.* 22, 303–324.
- Courbet, S., Gay, S., Arnoult, N., Wronka, G., Anglana, M., Brison, O., Debatisse, M., 2008. Replication fork movement sets chromatin loop size and origin choice in mammalian cells. *Nature* 455, 557–560.
- Dent, M.A.R., Segura-Anaya, E., Alva-Medina, J., Aranda-Anzaldo, A., 2010. NeuN/Fox3 is an intrinsic component of the neuronal nuclear matrix. *FEBS Lett.* 584, 2767–2771.
- Elcock, L.S., Bridger, J.M., 2008. Exploring the effects of a dysfunctional nuclear matrix. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 1378–1383.
- Engelke, R., Riede, J., Hegemann, J., Wuerch, A., Eimer, S., Dengjel, J., Mittler, G., 2014. The quantitative nuclear matrix proteome as a biochemical snapshot of nuclear organization. *J. Proteome Res.* 13, 3940–3956.
- Frank-Kamenetskii, M.D., Prakash, S., 2014. Fluctuations in the double helix: a critical review. *Phys. Life Rev.* 11, 153–170.
- Gavrilov, A.A., Golov, A.K., Razin, S.V., 2013. Actual ligation frequencies in the chromosome conformation capture procedure. *PLoS One* 8 (3), e60403.
- Gavrilov, A., Razin, S.V., Cavalli, G., 2015. In vivo formaldehyde cross-linking: it is time for black box analysis. *Brief. Funct. Genomics* 14, 163–165.
- Graphodatsky, A.S., Trifonov, V.A., Stanyon, R., 2011. The genome diversity and karyotype evolution of mammals. *Mol. Cytogenet.* 4, 22.
- Graur, D., Zheng, Y., Price, N., Azevedo, R.B.R., Zufall, R.A., Elhaik, E., 2013. On the immortality of television sets: “function” in the human genome according to the evolution-free gospel of ENCODE. *Genome Biol. Evol.* 5, 578–590.
- Hacisuleyman, E., Goff, L.A., Trapnell, C., Willimas, A., Henao-Mejia, J., Sun, L., McClanahan, P., Hendrickson, D.G., Sauvageau, M., Kelly, D.R., Morse, M., Engreitz, J., Lander, E.S., Guttman, M., Lodish, H.F., Flavell, R., Raj, A., Rinn, J.L., 2014. Topological organization of multi-chromosomal regions by *Firre*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 198–206.
- Hall, L.L., Carone, D.M., Gomez, A.V., Kolpa, H.J., Byron, M., Metha, N., Fackelmayer, M.O., Lawrence, J.B., 2014. Stable C₀T-1 repeat RNA is abundant and is associated with euchromatic interphase chromosomes. *Cell* 156, 907–919.
- Harris, N.L., Ronchese, F., 1999. The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunol. Cell Biol.* 77, 304–311.
- Heng, H.H.Q., Goetze, S., Ye, J.C., Liu, G., Stevens, J.B., Bremer, S.W., Wykes, S.M., Bode, J., Krawetz, S.A., 2004. Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. *J. Cell Sci.* 117, 999–1008.
- Iarovaia, O.V., Shkumatov, P., Razin, S.V., 2004. Breakpoint cluster regions of the AML-1 and ETO genes contain MAR elements and are preferentially associated with the nuclear matrix in proliferating HEL cells. *J. Cell Sci.* 117, 4583–4590.
- Jackson, D.A., Dickinson, P., Cook, P.R., 1990. The size of chromatin loops in HeLa cells. *EMBO J.* 9, 567–571.
- Lemaitre, J.M., Danis, E., Pasero, P., Vassetzky, Y., Méchali, M., 2005. Mitotic remodeling of the replicon and chromosome structure. *Cell* 123, 787–801.
- Lewin, B., 1980. *Gene Expression* 2. John Wiley and Sons, New York, pp. 360–362.
- Martínez-Ramos, I., Maya-Mendoza, A., Gariglio, P., Aranda-Anzaldo, A., 2005. A global but stable change in HeLa cell morphology induces reorganization of DNA structural loop domains within the cell nucleus. *J. Cell. Biochem.* 96, 79–88.
- Maya-Mendoza, A., 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. *Anal. Biochem.* 313, 196–207.
- Maya-Mendoza, A., Hernández-Muñoz, R., Gariglio, P., Aranda-Anzaldo, A., 2003. Gene positional changes relative to the nuclear substructure correlate with the proliferating status of hepatocytes during liver regeneration. *Nucleic Acids Res.* 31, 6168–6179.
- Maya-Mendoza, A., Hernández-Muñoz, R., Gariglio, P., Aranda-Anzaldo, A., 2004. Gene positional changes relative to the nuclear substructure during carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *J. Cell. Biochem.* 93, 1084–1098.
- Maya-Mendoza, A., Hernández-Muñoz, R., Gariglio, P., Aranda-Anzaldo, A., 2005. Natural ageing in the rat liver correlates with progressive stabilization of DNA-nuclear matrix interactions and withdrawal of genes from the nuclear substructure. *Mech. Ageing Dev.* 126, 767–782.
- Michalopoulos, G.K., DeFrances, M.C., 1997. Liver regeneration. *Science* 276, 60–66.
- Nelson, P., 1999. Transport of torsional stress in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 14342–14347.
- Neumann, R.M., 1977. The entropy of a single Gaussian macromolecule in a noninteracting solvent. *J. Chem. Phys.* 66, 870–871.
- Nickerson, J.A., 2001. Experimental observations of a nuclear matrix. *J. Cell Sci.* 114, 463–474.
- O’Sullivan, J.M., Hendy, M.D., Pichugina, T., Wake, G.C., Langowski, J., 2013. The statistical mechanics of chromosome conformation capture. *Nucleus* 4, 390–398.
- Ottaviani, D., Lever, E., Takousis, P., Sheer, D., 2008. Anchoring the genome. *Genome Biol.* 9 (1), 201.
- Overturf, K., al-Dhalimy, M., Ou, C.N., Finegold, M., Grompe, M., 1997. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am. J. Pathol.* 151, 1273–1280.
- Pardo-Manuel de Villena, F., 2005. Evolution of the mammalian karyotype. In: Ruvinsky, A., Marshall Graves, J.A. (Eds.), *Mammalian Genomics*. CABI Publishing, Cambridge MA, pp. 317–347.
- 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? *Cell. Mol. Biol. Lett.* 6, 59–69.
- Razin, S.V., Gromova, I.I., Iarovaia, O.V., 1995. Specificity and functional significance of DNA interactions with the nuclear matrix: new approaches to clarify old questions. *Int. Rev. Cytol.* 162B, 405–448.
- Rhodes, D., Klug, A., 1980. Helical periodicity of DNA determined by enzyme digestion. *Nature* 286, 573–578.
- Rivera-Mulia, J.C., Aranda-Anzaldo, A., 2010. Determination of the in vivo structural DNA loop organization in the genomic region of the rat albumin locus by means of a topological approach. *DNA Res.* 17, 23–35.
- Rivera-Mulia, J.C., Hernández-Muñoz, R., Martínez, F., Aranda-Anzaldo, A., 2011. DNA moves sequentially towards the nuclear matrix during DNA replication in vivo. *BMC Cell Biol.* 12, 3.
- Roti-Roti, J.L., Wright, W.D., 1987. Visualization of DNA loops in nucleoids of HeLa cells; assays for DNA damage and repair. *Cytometry* 8, 461–467.
- Roti-Roti, J.L., Wright, W.D., Taylor, Y.C., 1993. DNA loop structure and radiation response. *Adv. Radiat. Biol.* 17, 227–259.
- Štros, M., 2010. HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochim. Biophys. Acta* 1799, 101–113.
- Stuurman, N., Meijne, A.M.L., van Der Pol, A.J., de Jong, L., van Driel, R., van Renswoude, J., 1990. The nuclear matrix from cells of different origin. *J. Biol. Chem.* 265, 5460–5465.
- Thomas, E.A., Thomas, C.A., 1989. Nucleoid halo expansion indirectly measures DNA damage in single cells. *Exp. Cell Res.* 183, 149–158.
- Travers, A.A., 2004. The structural basis of DNA flexibility. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. A* 362, 1423–1438.
- Trevilla-García, C., Aranda-Anzaldo, A., 2011. Cell-type-specific organization of nuclear DNA into structural looped domains. *J. Cell. Biochem.* 112, 531–540.

- Trevilla-García, C., 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, 1–8.
- Tsutsui, K.M., Sano, K., Tsutsui, K., 2005. Dynamic view of the nuclear matrix. 2005. *Acta Med. Okayama* 59, 113–120.
- Verheijen, R., Kuijpers, H., Vooijs, P., van Venrooij, W., Ramaekers, F., 1986. Protein composition of nuclear matrix preparations from HeLa cells: an immunochemical approach. *J. Cell Sci.* 80, 103–122.
- Wei, X., Samarabandu, J., Devdhar, R.S., Siegel, A.J., Acharya, R., Berezney, R., 1998. Segregation of transcription and replication sites into higher order domains. *Science* 281, 1502–1506.
- Williamson, I., Berlivet, S., Eskeland, R., Boyle, S., Illingworth, R.S., Paquette, D., Dostie, J., Bickmore, W.A., 2014. Spatial genome organization: contrasting views from chromosome conformation capture and in situ hybridization. *Genes Dev.* 28, 2778–2791.
- Wilson, R.H.C., Coverley, D., 2013. Relationship between DNA replication and the nuclear matrix. *Genes Cells* 18, 17–31.
- Woodcock, C.L., Ghosh, R.P., 2010. Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000596.
- Yamasaki, S., Terada, T., Kono, H., Shimizu, K., Sarai, A.A., 2012. New method for evaluating the specificity of indirect readouts in protein–DNA recognition. *Nucleic Acids Res.* 40, e129.
- Yang, F., Carter, N.P., Shi, L., Ferguson-Smith, M.A., 1995. A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. *Chromosoma* 103, 642–652.
- Zhang, Y., Xi, Z., Hegde, R.S., Shakked, Z., Crothers, D.M., 2004. Predicting indirect readout effects in protein–DNA interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8337–8341.
- Zhao, S., Shetty, J., Hou, L., Delcher, A., Zhu, B., Osegawa, K., de Jong, P., Nierman, W.C., Strausberg, R.L., Fraser, C.M., 2004. Human, mouse and rat genome, large-scale rearrangements: stability versus speciation. *Genome Res.* 14, 1851–1860.

ANEXO III. Silva-Santiago et al., 2017b

The Set of Structural DNA–Nuclear Matrix Interactions in Neurons Is Cell-Type Specific and Rather Independent of Functional Constraints

Evangelina Silva-Santiago, Juan Carlos Rivera-Mulia, and Armando Aranda-Anzaldo*

Facultad de Medicina, Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca 50180, Edo. Méx., Mexico

ABSTRACT

In metazoans, nuclear DNA is organized during the interphase in negatively supercoiled loops anchored to a compartment or substructure known as the nuclear matrix. The interactions between DNA and the nuclear matrix (NM) are of higher affinity than those between DNA and chromatin proteins since the last ones do not resist the procedures for extracting the NM. The structural interactions DNA–NM constitute a set of topological relationships that define a nuclear higher order structure (NHOS) although there are further higher order levels of organization within the nucleus. So far, the evidence derived from studies with primary hepatocytes and naïve B lymphocytes indicates that the NHOS is cell-type specific at the local and at the large-scale level, and so it has been suggested that such NHOS is primary determined by structural and thermodynamic constraints. We carried out a comparative characterization of the NHOS of postmitotic cortical neurons with that of hepatocytes and naïve B lymphocytes. Our results indicate that the NHOS of neurons is completely different at the large scale and at the local level from that one observed in hepatocytes or in naïve B lymphocytes, confirming on the one hand that the set of structural DNA–NM interactions is cell-type specific and supporting, on the other hand the notion that structural constraints that impinge on chromosomal DNA and the NM are more important for determining this NHOS than functional constraints related to replication and/or transcription. *J. Cell. Biochem.* 118: 2151–2160, 2017. © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: CTCF; DNA LOOP; DNA SUPERCOILING; DNA TOPOLOGY; LOOP ATTACHMENT REGION; MATRIX ATTACHMENT REGION; NUCLEOIDS

Currently there is widespread interest in studying the 3D organization of the genome within the nucleus. So far the immediate characterization of the 3D functional organization, deduced from data obtained by 3C and related chromatin/chromosome conformation capture assays that depend on the artificial cross-linking of DNA with any kind of nuclear proteins (that may interact directly with DNA or indirectly by the binding to chromatin proteins) has been privileged, since any regulatory “chromatin loop” resulting from the transient interaction between a distant enhancer and a given gene promoter can be fixed by the artificial cross-linker as well as many other functional interactions between proximal or physically distant regions of the genome [Woodcock and Ghosh, 2010; Dixon et al., 2012]. However, 3C and

related assays present technical caveats that remain underappreciated [O’Sullivan et al., 2013; Williamson et al., 2014; Gavrillov et al., 2015].

Some 40 years ago, it was reported the isolation of a residual nuclear framework resistant to extraction with high salt termed the nuclear matrix (NM) [Berezney and Coffey, 1974]. Since then, a large number of experimental observations have documented the presence of the NM and its role in the structural and functional organization within the nucleus, although for years there has been controversy, fueled by the lack of a thorough biochemical characterization of the NM, on whether the NM could really be an underlying skeletal-like structure [Nickerson, 2001]. Therefore, in recent times there was a shift for defining the NM in operational

Abbreviations: CTCF, CCCTC-binding factor; LAR, loop attachment region; MAR, matrix attachment region; NHOS, nuclear higher order structure; NM, nuclear matrix.

Present address of Juan Carlos Rivera-Mulia is Department of Biological Science, Florida State University, Tallahassee, FL 32306-4295.

Conflicts of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Grant sponsor: CONACYT-Mexico; Grant number: CB2012-176794.

*Correspondence to: Prof. Armando Aranda-Anzaldo, MD, PhD, Facultad de Medicina, Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Tollocan y Jesús Carranza s/n, Toluca, 50180, Edo. Méx., Mexico. E-mail: aaa@uaemex.mx; arandoa10@gmail.com

Manuscript Received: 28 November 2016; Manuscript Accepted: 19 December 2016

Accepted manuscript online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 20 December 2016

DOI 10.1002/jcb.25852 • © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

terms as the compartment or substructure that results from extracting the nucleus with high salt, non-ionic detergent and DNase. State of the art proteomics has allowed the proper biochemical characterization of the NM thus identifying a set of ~300 proteins that define a core-NM independently of the particulars of the extraction procedure [Engelke et al., 2014]. On the other hand, for a long time, it has been known that in metazoan cells the nuclear DNA is organized during the interphase in negatively supercoiled loops anchored to the NM [Cook and Brazell, 1976; Cook et al., 1976; Vogelstein et al., 1980; Roti-Roti and Wright, 1987; Razin et al., 1995]. The interactions between DNA and the nuclear matrix (NM) are of higher affinity than those between DNA and chromatin or regulatory proteins (such as transcription factors) since the last ones do not resist the procedures for extracting the NM [Cook et al., 1976; Vogelstein et al., 1980]. DNA interacts with the NM through so-called matrix attachment or matrix addressed regions (MARs) that in mammals are usually rich in A-T but do not have a consensus sequence or any other feature that may allow their clear-cut identification by simple inspection of the nucleotide sequence [Ottaviani et al., 2008]. Indeed, MARs have been operationally classified into transient/facultative non-resistant to extraction by high salt and structural/ constitutive that resist such an extraction, the last ones are also known as true loop attachment regions or LARs [Razin, 2001]. Therefore, the resulting DNA loops can also be operationally classified in transient or structural [Maya-Mendoza et al., 2003; Elcock and Bridger, 2008]. The structural interactions DNA–NM constitute a set of topological relationships that define a nuclear higher order structure (NHOS) [Alva-Medina et al., 2010].

Current evidence suggests that the structural DNA loops anchored to the NM correspond to the subdivision of the genome into replication units or replicons [Vogelstein et al., 1980; Buongiorno-Nardelli et al., 1982; Lemaitre et al., 2005; Courbet et al., 2008; Rivera-Mulia et al., 2011] and that the NM is an organizing compartment for DNA replication [Wei et al., 1998; Anachkova et al., 2005; Wilson and Coverley, 2013]. Previous work has shown that a 162 kb genomic region containing four members of the albumin-family genes is differentially organized into structural loops in primary hepatocytes and naïve B lymphocytes from the rat, two cell types that preserve a proliferating potential and so are able to fully replicate their DNA. However, only the hepatocytes but not the naïve B lymphocytes are able to express the albumin-family genes. In hepatocytes the region is organized into five structural DNA loops while in naïve B lymphocytes the same region comprises 14 DNA loops [Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010] whose short average size is consistent with the stable repression of the corresponding genes according to current models of transcription in vivo [Linnemann and Krawetz, 2009; Chakalova and Fraser, 2010; Rieder et al., 2012]. However, another genomic region corresponding to a large single transcriptional unit (*fyn*) also displays a differential NHOS between hepatocytes and naïve B lymphocytes despite the fact that the two cell types express the gene in a similar fashion, suggesting that the structural DNA loop size or number are not by themselves limiting factors for transcription [Trevilla-García and Aranda-Anzaldo, 2012]. So far, the evidence indicates that the NHOS is cell-type specific at the local and at the large-scale level

[Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García and Aranda-Anzaldo, 2011, 2012]. Thus, it has been suggested that the NHOS is rather independent of functional constraints related to replication and/or transcription and that it is primarily established following structural and thermodynamic constraints that impinge on chromosomal DNA and the NM [Aranda-Anzaldo, 2012, 2016]. This suggestion is consistent with recent evidence that the NHOS is not conserved between similar cell types from closely related species [Silva-Santiago et al., 2017]. Therefore, it becomes interesting to compare at the large scale the NHOS of postmitotic neurons, that normally do not replicate the genome, with that of hepatocytes and naïve B lymphocytes, as well as to determine the local NHOS of the 162 kb genomic region of the albumin-family genes in postmitotic neurons which are unable to express such genes, because a similarity in the NHOS of neurons, either at the large scale or at the local level, when compared to that in hepatocytes or naïve B lymphocytes may imply the signature of a functional constraint involved in determining the NHOS independently of the cell type. Thus, we characterized in a comparative fashion the NHOS of postmitotic cortical neurons from the rat. Our results indicate that the NHOS of neurons is completely different at the large scale and at the local level from that one observed in hepatocytes or in naïve B lymphocytes, thus confirming on the one hand, that the NHOS is cell-type specific and supporting, on the other hand, the notion that this NHOS is primarily determined by structural constraints and so it is rather independent of functional constraints that might be correlated with replication and/or transcription.

MATERIALS AND METHODS

ANIMALS

Animals were used, prior approval from the Ethics Committee of Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, following the guidelines of the Official Mexican Norm for production, care and use of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999). Animals were euthanized under general anesthesia. Primary cells were isolated from male adult Wistar rats (weight 250–300 g).

CELLS

Primary hepatocytes were isolated as previously described [Maya-Mendoza et al., 2003]. The freshly isolated hepatocytes were suspended in PBS without Ca^{2+} or Mg^{2+} (PBS-A) at 4°C, counted in a hemocytometer and immediately used for further preparations. Primary naïve B lymphocytes were obtained from the spleen of male Wistar rats. The spleen was removed, fragmented and filtered through a mesh with pores of 400 μm in PBS-A. Total lymphocytes were purified from spleen extract by centrifugation at 2,100 rpm for 15 min at room temperature in a isotonic, preformed continuous gradient of Percoll (Sigma–Aldrich) 25%. Subsequently, naïve B-lymphocytes were purified by magnetic separation (MACS Separation columns, Miltenyi Biotec) with anti-CD43-specific beads (rat CD43 microbeads, Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. Viable naïve B lymphocytes were counted in a hemocytometer and used immediately for preparing nucleoids.

NEURONAL NUCLEI ISOLATION

Neuronal nuclei from cerebral cortex of rats were isolated as previously described [Alva-Medina et al., 2010] briefly: the cerebral cortex was dissected from the rat brain and it was homogenized by hand with 10–15 strokes of a Dounce homogenizer in 1 ml of 2.0 M sucrose (1 mM MgCl₂ + 0.25 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). The homogenate was transferred to a fresh tube containing 8 ml of 2.0 M sucrose (1 mM MgCl₂ + 0.25 mM PMSF) forming a two-phase suspension. The suspension was spun at 4°C for 60 min at 49,500 g in a KR 25i centrifuge. The pellet was washed in 10 ml of 0.32 M sucrose (1 mM MgCl₂ + 0.25 mM PMSF) for 5 min at 1500 g. The final pellet containing the isolated neuronal nuclei was resuspended in 600 μl of 0.32 M sucrose. The nuclei were counted in a hemocytometer and used immediately for preparing nucleoids.

PREPARATION OF NUCLEOIDS

Nucleoids are operationally defined as structures consisting of the residual NM with the naked genomic DNA loops firmly bound to it [Cook et al., 1976]. For obtaining nucleoids, freshly isolated and washed hepatocytes and naïve B lymphocytes were suspended in ice-cold PBS-A. Aliquots of 50 μl containing 3.5×10^5 hepatocytes or 5×10^5 naïve B lymphocytes, respectively, were gently mixed with 150 μl of a lysis solution containing 2.6 M NaCl, 1.3 mM EDTA, 2.6 mM Tris, 0.6% Triton X-100 (pH 8.0). For hepatocytes after incubating 20 min at 4°C the mixture was washed in ice-cold PBS-A at a ratio 1:70 v:v and spun at 3,000 rpm for 5 min. The final nucleoid pellet was gently resuspended in 200 μl PBS-A. In the case of naïve B lymphocytes after incubating 15 min at 4°C, the mixture was overlaid on sucrose step gradients that contain 0.2 ml of 30% sucrose under 0.6 ml 15% sucrose. Both sucrose layers contained 2.0 M NaCl, 1.0 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8.0. The gradients were spun at 4°C in a microfuge for 4 min at 10,000 rpm (9,000 g). The nucleoids form a white aggregate that usually sediments to the interface between the two layers of sucrose. The nucleoids were recovered in a volume ranging from 200 to 300 μl. The main aliquot was washed in 14 ml of PBS-A at 4°C for 5 min at 3,000 rpm (1,500g). The final nucleoid pellet was recovered in a volume ranging from 200 to 300 μl. For obtaining neuronal nucleoids 50 μl aliquots containing 3×10^5 neuronal nuclei in ice-cold PBS-A were gently mixed with 150 μl lysis buffer and incubated for 10 min at 4°C. Then, the samples were washed in ice-cold PBS-A at a ratio 1:70 v:v and spun at 3,000 rpm for 5 min. The final nucleoid pellet was gently resuspended in a 200 μl PBS-A.

NUCLEOID FLUORESCENT HALO ASSAY

Hepatocyte or neuronal nucleoid aliquots (10 μl) were deposited directly on a microscope slide and stained with 10 μl of ethidium bromide at 160 mg/ml in PBS-A (final ethidium bromide concentration 80 mg/ml). After 30 s, the nucleoid samples were examined under an Olympus BX60 epifluorescence microscope fitted with a QiClick/QIMAGING camera for assessing the DNA halo expansion and so the nucleoid DNA integrity and supercoiling. Average DNA halo radii were estimated from the core nucleoid contour to the outer limit of the DNA halo with Image J: Auto Local Threshold v.1.16.1 software using the Median method that applies Adaptive-Dynamic thresholding for image analysis (<http://homepages.inf.ed.ac.uk/rbf/>

HIPR2/adpthrsh.htm). The corresponding average DNA loop size was deduced from the measurement of DNA halos as previously described [Maya-Mendoza et al., 2005].

DNASE I DIGESTION OF NUCLEOIDS

About 1.8×10^6 nucleoids from hepatocytes or from neurons, or 2.5×10^6 nucleoids from naïve B lymphocytes were suspended in 1.2 ml PBS-A and mixed with 5.1 ml of digestion buffer (10 mM MgCl₂, 0.2 mM β-mercaptoethanol, 50 mM Tris, pH 7.2). DNase I (Deoxyribonuclease I from bovine pancreas Type IV, Sigma) was added (from a stock in 0.15 M NaCl, 50% glycerol) to a final concentration of 0.5 U/ml (hepatocyte and naïve B lymphocyte nucleoids) or 0.92 U/ml (neuronal nucleoids). Digestions were carried out at 37°C for 60 min. About 1 ml aliquots from partially digested nucleoids were collected at 0, 5, 15, 30, and 60 min. In such aliquots, digestion was stopped by adding 200 μl of stop buffer (0.2 M EDTA, 10 Mm Tris, pH 7.5). The samples were spun for 10 min at 9,000 g at 4°C, the nucleoid pellet resuspended in 1 ml PBS-A and centrifuged again as above. Next, the pellet was washed twice as above in 1 ml of ice-cold deionized water (dd-H₂O) and the final pellet of partially digested nucleoids was resuspended in 200 μl dd-H₂O to be used directly as template for PCR. The amount of DNA present in each sample from a digestion curve was determined by spectrophotometry.

GENOMIC DNA PRIMERS

Pairs of primers defining 15 short amplicons spaced ~10 kb from each other along the 162 kb genomic region of the albumin-family genes (Fig. 1 and Table I) were designed so as to be highly specific and able to perform efficiently under a common PCR program and reaction conditions. It must be remarked that MARs are not suitable targets for highly specific primers because the relative enrichment of A-T and presence of repetitive DNA, features traditionally associated with MARs [Ottaviani et al., 2008], preclude an acceptable primer design. Thus, putative MARs within the region studied are likely to be excluded as valid targets by the primer-design algorithm. All pairs of primers were designed with a length of 20–25 bp, G-C content between 50% and 55% (with a difference <3%), T_m of 55–60°C (with a difference <2°C) and PCR products of 250–550 bp (Table I). Secondary structures with ΔG < –1 kcal/mol and dimmers/duplexes with ΔG < –2 kcal/mol were avoided. The specificity of each pair of primers was confirmed using the NCBI BLAST algorithm.

PCR AMPLIFICATION OF TARGET SEQUENCES ON NM-BOUND TEMPLATES

PCR amplification of target sequences was carried out on NM-bound templates. About 10 ng of NM-bound DNA from the corresponding aliquots were used for PCR amplification in a 50 μl reaction volume: 0.6 U GoTaq DNA polymerase (Promega), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM from each dNTP, and 0.1 μM from each primer. All target sequences were amplified under the same program in an Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler: initial denaturation step at 94°C for 5 min, following denaturation steps at 94°C for 45 s, annealing at 56°C for 1 min, extension at 72°C for 1 min for 35 cycles, and final extension at 72°C for 10 min. The identity of all amplicons was confirmed by restriction enzyme analysis. PCR products were resolved in 2%

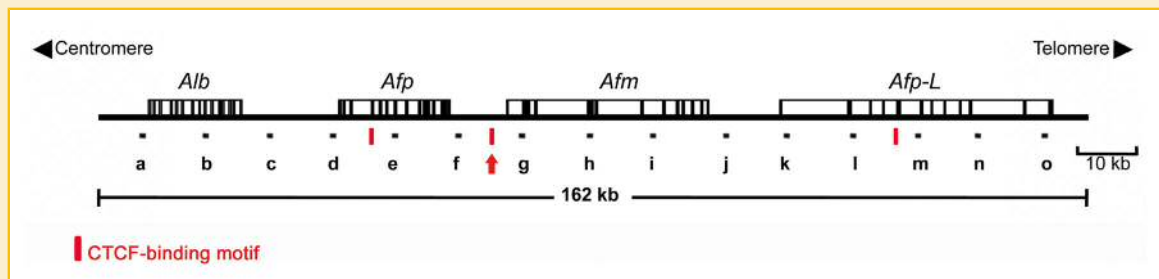


Fig. 1. The 162-kb region of the rat genome containing four members of the albumin gene family (chromosome 14): Alb (albumin), Afp (alpha-fetoprotein), Afm (afamin or alpha-albumin), Afp-L (gene similar to Afp or alpha-fetoprotein-related gene). The letters indicate the location of the target DNA sequences, spaced ~10 kb from each other, to be positionally mapped relative to the NM. The red bars indicate the position of three potential CTCF-binding sites within the region. The red arrow points the CTCF-binding site that fits within a NM-embedded region in neurons but not in hepatocytes or naïve B lymphocytes. The two other CTCF-binding sites are away of the NM in the three cell types (Fig. 5).

agarose gels and stained with ethidium bromide, recorded, and analyzed using a Kodak ID Image Analysis Software 3.5 system. Amplicons were scored as positive or negative in partially digested nucleoid samples depending on whether they are detected or not by the software using the default settings.

RESULTS

LARGE-SCALE COMPARISON OF THE NHOS BETWEEN HEPATOCYTES AND CORTICAL NEURONS FROM THE RAT

Nucleoids are operationally defined as the structures resulting from treating the nucleus with high salt and non-ionic detergent for eliminating the nuclear envelope and the whole set of soluble nuclear proteins including those of chromatin. The nucleoids consist of the residual NM with the naked genomic DNA firmly bound to it [Cook et al., 1976; Vogelstein et al., 1980; Roti-Roti and Wright, 1987]. The DNA is organized in supercoiled loops anchored to the NM. The loops can be visualized under the fluorescence microscope by exposing the nucleoids to the action of the dye ethidium bromide that being highly hydrophobic inserts itself between the rungs of base pairs in DNA, thus acting as a molecular lever leading to the unwinding of the formerly supercoiled loops. The result is the formation of a halo of DNA that surrounds the NM. The shape and stability of the halo after full expansion provides information about

the stability and average-distribution of the DNA-NM attachments [Maya-Mendoza et al., 2005]. The average diameter of the halo is directly proportional to the average size of the DNA loops [Razin et al., 1995]. We have previously shown that the average DNA loop size is similar between hepatocytes and naïve B lymphocytes [Trevilla-García and Aranda-Anzaldo, 2011]. Thus, we performed a comparative evaluation of the DNA halos resulting from treating with ethidium bromide samples of freshly prepared nucleoids from hepatocytes and cortical neurons from young adult rats. The results indicate that the halo is significantly larger in size in the hepatocytes when compared to that in neurons. The corresponding measures of the average halo diameters indicate that neurons have a larger number of DNA loops per unit length of DNA anchored to the NM than the hepatocytes, because in neurons the loops are significantly shorter on average than those in the hepatocytes (Fig. 2). Therefore, the number of attachments between DNA and the NM is significantly larger in neurons by comparison to the hepatocytes, indicating that there is a large-scale difference in the NHOS of neurons when compared to that of hepatocytes or naïve B lymphocytes.

COMPARATIVE KINETICS OF DIGESTION OF NM-BOUND DNA IN NUCLEOIDS FROM THREE DIFFERENT CELL TYPES

The DNA loops stably attached to the NM are topological constrained; therefore, each loop behaves as a closed DNA circle

TABLE I. Primers and Corresponding Amplicons Defining 15 Target Sequences Along the 162-kb Genomic Region of the Rat Containing Four Members of the Albumin Gene Family

Amplicon	Forward primer	Reverse primer	Amplicon length (bp)
a	TGGCAAACATACGCAAGGGA	GCGAAACACACCCCTGGAAA	275
b	GAGGACAGTTAGTGCTGTAGGGTTG	CCTCCAACGAAAGTCCCAGAAT	547
c	TCCTTTGTAACCAAGCAAGTGG	CCCATTCCAGATCCTTCACTCT	374
d	CCCAGGGTCAGAGTATATCAGTGC	CGCTGAACGTATGCTGAGTCA	305
e	TGGTAGGCAGAGATGTGAGGAAAG	CCTGTTGTCCTAATGCTGGTCTA	382
f	CTGATCTTCAGGCAATATGGCAGG	TGGCTGATGTCGTCCTGGACA	393
g	AAGGATAGGTGCTTGCTGACA	GCCCTAACCTGTGTGTATCTTG	504
h	GATCACGTAACAACCTGTCAGCT	CCTTACAGCACCCGTCATACA	263
i	GGTGCTGGGAATTTGACTAAGGC	TAAACTCAGGTGACAGGCTACGGC	465
j	AGGAACCAGGGAATCGAGTGCT	AACTTGGGGTGTCTCTCCTT	392
k	TGTCAGCATGATGTTGGCTCA	CTCGATTTGCCATGTCCTGTCT	252
l	GGGCTGGGTCCATATTGCTTGA	ATGCTTTGGGCTTGCTGAAAG	373
m	ACGACTTCCCTTCTATCCACAG	GTAGAAAGTCGTTCTGTTGCCAC	234
n	CCCTAATCTTGCTGTGGTTTGG	TGAGAGCTGGGACAGACATCAA	355
o	GGTGACAGTTGACAGAGAGCCCTC	GCTCCATGCTGACCTTGAAGTCTA	272

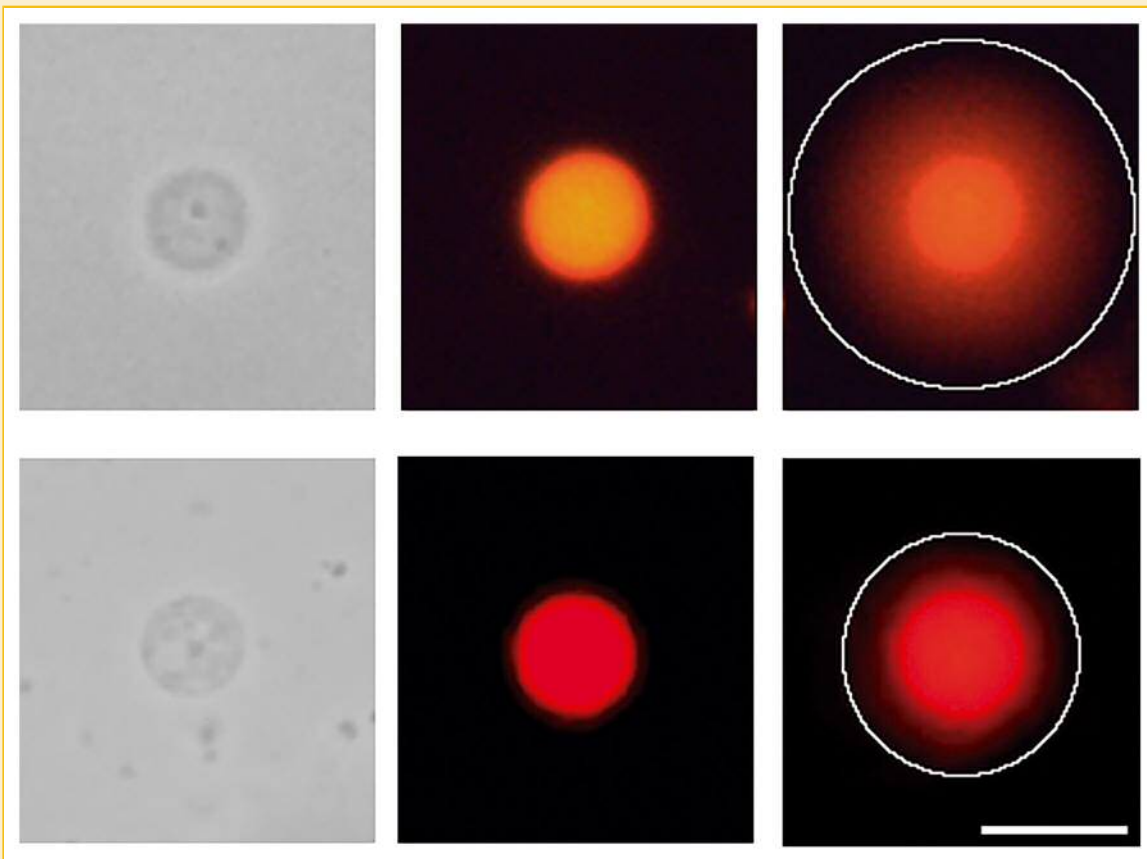


Fig. 2. Nucleoid DNA halos. Typical nucleoids from primary rat hepatocytes (upper row) or cortical rat neurons (lower row) stained with 80 $\mu\text{g/ml}$ of ethidium bromide for inducing unwinding and relaxation of the supercoiled DNA loops anchored to the nuclear matrix (NM). The phase contrast micrographs display the contour of the NM. After 30 s of halo expansion, the contour of the DNA halo, as measured by image analysis software, is highlighted (white circles) in the corresponding fluorescence micrograph. Images were taken with a 40 \times lens. The estimated average loop size from base to tip was $14.1 \pm 2.25 \mu\text{m}$ (41.47 kbp) for hepatocytes ($n = 32$) and $8.24 \pm 1 \mu\text{m}$ (24.23 kbp) for neurons ($n = 43$). These values correspond to half of the whole average DNA length per loop. Bar = 15 μm .

[Mirkin, 2001; Bates and Maxwell, 2005]. This coupled to the intrinsic structural stress of the double helix leads to negative supercoiling as a mean for dissipating the stress without breaking the DNA fiber [Mirkin, 2001; Bates and Maxwell, 2005]. The presence of negative supercoiling provides a differential sensitivity to a non-specific nuclease such as DNase I depending on the position of a given DNA segment within a loop relative to the NM. Supercoiling is a relative barrier for the cutting activity of DNase I [Rhodes and Klug, 1980] as well as the steric hindrance posed by the embedding of naked DNA within the NM framework. In the loops there is a gradient of supercoiling that goes from less at the tip of the loop to more at the regions closer to the anchorages to the NM. Therefore, when using a very limited concentration of DNase I for digesting nucleoids, there is a reproducible trend for cutting first those loops regions that are less supercoiled and farther from the NM (the tip of the loops) and later the regions that are closer to the NM since supercoiling must be first reduced by DNA unwinding, resulting from the random single-stranded cutting activity of the enzyme, for improving the accessibility of DNase I to the substrate closer to the NM [Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010]. Hence, large nucleoid samples subjected to digestion with a small concentration of DNase I display

a highly reproducible kinetics of digestion of NM-bound DNA. The partial slopes of the corresponding digestion curve allow us to define four topological regions relative to the NM: distal, proximal, very close, and embedded, each region corresponding to a specific fraction of bulk DNA. Nucleoids from primary hepatocytes and naïve B lymphocytes display clearly different kinetics of digestion of NM-bound DNA when treated with 0.5 U/ml of DNase I (Fig. 3). The slope of the digestion curve in the embedded region is close or equal to zero and remains like that even after very long incubation times. The amount of bulk DNA in the NM-embedded region is about 22% in hepatocytes and only about 3% in the case of naïve B lymphocytes (Fig. 3). This is consistent with the fact that the NM of naïve B lymphocytes is less dense than that of hepatocytes because of the lack of lamins A/C [Röber et al., 1990] which are a major component of a mature NM [Maya-Mendoza et al., 2005; Engelke et al., 2014]. However, nucleoids of neurons exposed to the same concentration of DNase I are resistant to digestion and so after 60 min of digestion the slope of the digestion curve is zero despite the fact that $\sim 50\%$ of bulk DNA remains bound to the NM. Thus, only by increasing the concentration of DNase I to 0.92 U/ml, it is possible to obtain a digestion curve for neuronal nucleoids whose morphology is

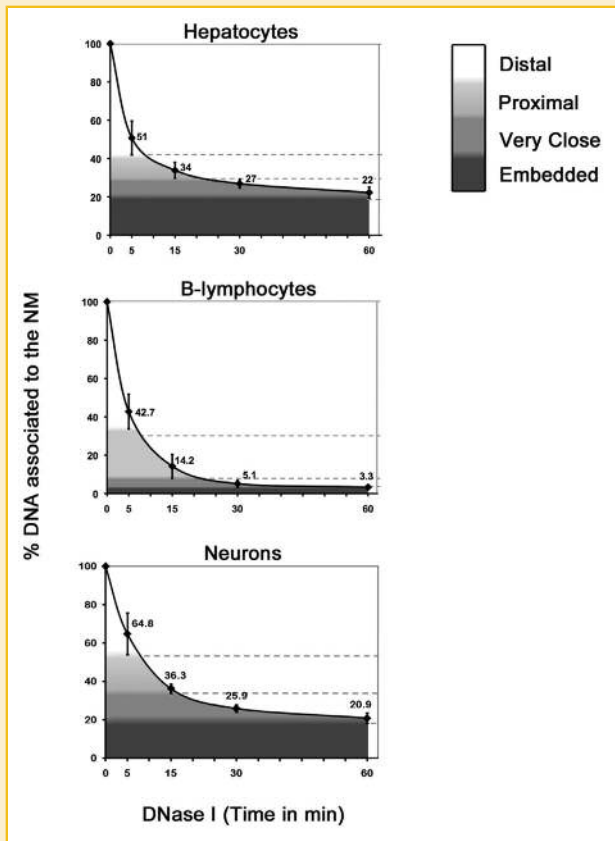


Fig. 3. Kinetics of nucleoid DNA digestion. Nucleoids were digested with DNase I (0.5 U/ml for hepatocyte and naïve B lymphocyte nucleoids; 0.92 U/ml for neuronal nucleoids). Each time-point value is the average of separate experiments with samples obtained from separate animals ($n=9$). Bars indicate the corresponding SD. The topological zones relative to the NM (distal; proximal; very close; embedded) defined by the partial slopes of the curves, correspond to decreasing percentages of total DNA bound to the NM. The slope of the digestion curves becomes close or equal to zero by 60 min of DNase I treatment and remains like that even after 120 min of incubation with the enzyme.

amenable for defining the four topological zones relative to the NM (Fig. 3). In this case, the fraction of bulk DNA in the embedded region is about 21% thus rather similar to that in hepatocytes. However, the fact that it is necessary to increase the concentration of DNase I for obtaining the corresponding digestion curve implies on the one hand a tighter degree of supercoiling in the neuronal DNA loops and on the other hand that a larger percentage of bulk DNA is relatively closer to the NM, which is consistent with the shorter-on-average size of neuronal DNA loops when compared to the structural DNA loops in hepatocytes (Fig. 2). These results confirm the cell-type specificity of the NHOS at the large-scale.

DETERMINATION OF THE NHOS OF THE 162 KB REGION OF THE ALBUMIN-FAMILY GENES IN CORTICAL NEURONS

As previously mentioned, DNA attaches to the NM by means of MARs/LARs that in mammals lack any consensus sequence or general property that may help to their clear-cut identification by

simple inspection [Ottaviani et al., 2008]. However, by mapping the position relative to the NM of regularly spaced but short and unique target sequences belonging to a given DNA region, it is possible to deduce the trajectory of the corresponding DNA fiber in 3D and so to define the DNA loops without the need of knowing in advance which are the MARs/LARs for such a region. With this approach, we have previously defined the structural DNA loop organization in the 162 kb region of the albumin-family genes in hepatocytes and naïve B lymphocytes [Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010]. Thus, using the previously reported 15 target sequences spaced approximately each 10 kb along the 162 kb genomic region (Fig. 1 and Table I), we mapped their position relative to the NM in nucleoids from rat cortical neurons. The mapping protocol involves the amplification of the target sequences by PCR in NM-bound DNA aliquots corresponding to the specific time points of the corresponding DNase I digestion curve. In this protocol, the actual strength of the amplicon bands is non-relevant since location is a spatial but not a quantitative property. Therefore, the topological zone assigned to each target sequence corresponds to the last one where the amplicon is detected by image-analysis software in the corresponding gel (Fig. 4 and Table II). The target sequences are amplified under common PCR protocol and they were designed so as to preclude any differential amplification due to size or base composition. Figure 5 depicts the corresponding organization into structural DNA loops of the 162 kb region resulting from plotting the data in Table II and it also displays, for comparison purposes, the corresponding organization of the same region in hepatocytes and naïve B lymphocytes [Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010]. It is clear that there is no common structural signature at the level of loop number, loop size, or DNA regions embedded and/or attached to the NM among the three type of cells, confirming that the NHOS is cell-type specific both at the local level and at the large-scale.

CTCF is a ubiquitously expressed nuclear protein that participates in establishing insulators that affect gene expression in vertebrates by preventing the spread of heterochromatin and restricting enhancers from activating unrelated promoters, and it has thousands of potential binding sites in the genome defined by a CpG rich consensus sequence that is rather conserved in mammals [Kang et al., 2009; Kim et al., 2015]. Hi-C, a variation of the 3C chromatin/chromosome conformation capture assay, has allowed the identification of megabase-sized chromatin interaction domains that define large topological domains within the mammalian genome and there is an enrichment of CTCF at the boundary regions of such domains [Dixon et al., 2012]. Moreover, although CTCF is not a member of the NM-core proteome CTCF associates with NM proteins and it is known to mediate the formation of chromatin loops attached to the NM some of which may resist extraction with high salt [Yusufzai and Felsenfeld, 2004; Engelke et al., 2014; Kim et al., 2015]. Therefore, we searched the 162 kb region of the albumin-family genes for the presence of potential CTCF-binding sites. We found three CTCF-binding sites as defined by the corresponding consensus sequence in the rat [Kang et al., 2009]. However, only one of them clearly fits within a NM-embedded region in neurons, while the three CTCF-binding sites are located away from the NM in hepatocytes and naïve B lymphocytes (Figs. 1 and 5) indicating that most high salt-resistant attachments to the NM are independent of CTCF.



Fig. 4. Positional mapping relative to the NM of specific target DNA sequences by PCR. Neuronal nucleoids were treated with DNase I for different times (Fig. 3). The residual NM-bound DNA was directly used as template for PCR amplification of the target sequences (a–o). The specific amplicons were resolved in 2% agarose gels stained with ethidium bromide. The amplicons were scored as positive or negative by image-analysis software using the default settings. C, control. Topological zones relative to the NM: D, distal; P, proximal; VC, very close; E, embedded within NM. (–) Negative control (no template); (+) positive control (pure genomic DNA as template). This typical amplification pattern was consistently reproduced in separate experiments with samples from independent animals ($n \geq 4$).

DISCUSSION

Some 40 years ago, evidence was provided that nuclear DNA of metazoans is organized during the interphase in negatively supercoiled loops anchored to a residual compartment or substructure known as the NM [Cook and Brazell, 1976; Cook et al., 1976; Vogelstein et al., 1980] that results from extracting the nucleus with high-salt and non-ionic detergents [Nickerson, 2001; Engelke et al., 2014]. The structural interactions between DNA and the NM are of high affinity since transcription factors and other regulatory DNA-binding proteins as well as the proteins of chromatin cannot resist the extraction procedure for obtaining the NM and yet in the so-called nucleoids the naked DNA loops remain supercoiled and bound to the NM. This classical observation has stood the test of time [Woodcock and Ghosh, 2010]. In the present study, we confirm and

TABLE II. Location of the Target Sequences (Amplicons) in the Specific Topological Zones Relative to the NM From Rat Neurons

Amplicon	Topological zones relative to NM ($n \geq 4$)			
	Distal	Proximal	Very close	Embedded
a	+	+		
b	+			
c	+			
d	+	+	+	+
e	+			
f	+	+		
g	+	+		
h	+	+		
i	+			
j	+	+		
k	+	+		
l	+			
m	+	+	+	+
n	+			
o	+	+		

The amplicons were scored either as positive or as negative (Fig. 4) depending on whether or not they were detected by a digital image-analysis system using the default settings. *Indicates that in ~50% of the experiments the corresponding target sequence mapped to the previous topological zone.

further expand the previous evidence that the NHOS, defined by the set of structural interactions between nuclear DNA and the NM, is cell-type specific [Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García and Aranda-Anzaldo, 2011, 2012]. Here, we show that the NHOS of neurons is clearly different at the large-scale from that in hepatocytes (as reflected by the significant difference in the average DNA loop size, Fig. 2) as well as from that in naïve B lymphocytes, considering that we have previously reported the overall similarity in DNA-loop size between hepatocytes and naïve B lymphocytes [Trevilla-García and Aranda-Anzaldo, 2011]. This implies that there is a larger number of shorter and so necessarily more homogeneously sized DNA loops bound to the NM of neurons (Fig. 2). The kinetics of digestion of NM-bound DNA confirms the cell-type specificity of the NHOS at the large scale, since the three cell types show differential sensitivity to digestion by DNase I of their NM-bound DNA (Fig. 3). On the other hand, by mapping the position relative to the NM of 15 short target sequences located about 10 kb from each other along the 162 kb region of the albumin-family genes (Figs. 1 and 4), we determined the trajectory in 3D of such genomic region and deduced the organization of the region into structural DNA loops bound to the NM (Fig. 5). In neurons, the region is organized in six loops that differ in number and size from those loops present in the same region in hepatocytes (5) and naïve B lymphocytes (14). Moreover, the regions inferred as embedded into the NM (and so necessarily containing whichever MAR/LARs bound to the NM) are different in the three cell types (Fig. 5). The region under study presents three potential CTCF-binding sites and only one of them is embedded or bound to the NM in neurons but no one of them is bound to the NM in hepatocytes or naïve B lymphocytes (Figs. 1 and 5), indicating that most high salt-resistant structural attachments to the NM are independent of CTCF. These results suggest that most if not all MARs/LARs do not correspond to specific nucleotide sequences that a priori determine the affinity for the NM and also that NM proteins may not necessarily bind to specific DNA sequences, otherwise there should be significant

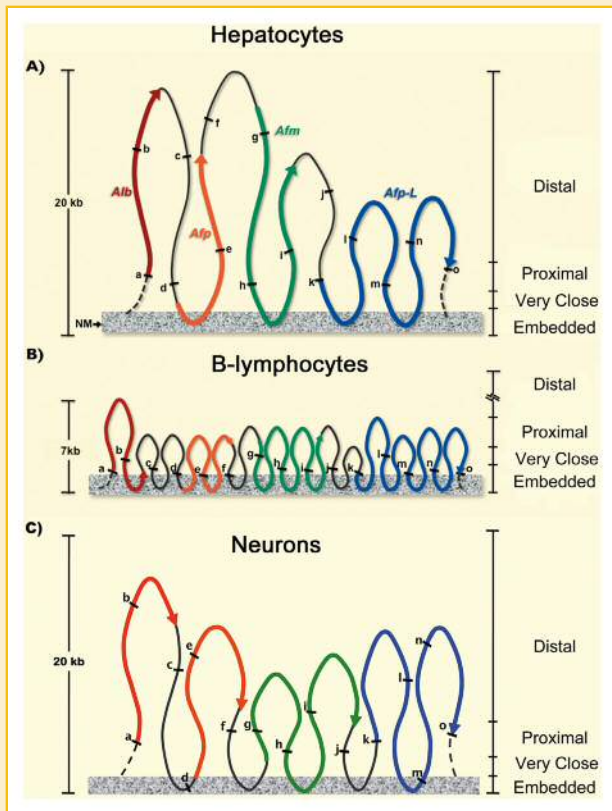


Fig. 5. Comparative structural DNA loop organization of the 162-kb genomic region of the rat containing four members of the albumin gene family. The figures A and B were redrawn from Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo [2010]. Figure C results from plotting the data in Table II. The letters indicate the position of the target sequences within the DNA loops. The bold color lines indicate the position of the corresponding genes: red (Alb); orange (Afp); green (Afm); blue (Afp-L). The dashed lines indicate projected loop regions outside of the region studied. The left bar indicates the relative DNA loop size from tip to base; hence, the whole DNA loop length is approximately the double of such value. The right bar indicates the topological zones relative to the NM according to the kinetics of nucleoid DNA digestion (Fig. 3). The linear nucleotide position and number is the source of the uniform/isotropic scaling used for depicting the 162 kb region in 3D and so the illustration is according to scale in kb along the x and y axes.

similarity in the regions embedded and/or bound to the NM in the three cell types.

Neurons are postmitotic but can be induced to replicate DNA under experimental or pathological conditions although most of the times the result of this is neuronal death [Aranda-Anzaldo and Dent, 2016]. However, the significant presence of polyploid and aneuploid neurons in normal brains suggests that DNA replication in neurons occurs more often than expected [Mosch et al., 2007]. Therefore, considering the evidence that the structural DNA loops bound to the NM correspond to the actual replicons in vivo [Vogelstein et al., 1980; Buongiorno-Nardelli et al., 1982; Razin, 2001; Lemaitre et al., 2005; Courbet et al., 2008; Rivera-Mulia et al., 2011] and the obvious differences, at the large and local scale, in loop number and size between the three cell types studied, it can be suggested that replication is not imposing any specific constraint on the NHOS at the

level of loop number, loop size or specific anchors to the NM as DNA replication may occur successfully in hepatocytes and naïve B lymphocytes but also occurs in postmitotic neurons under particular circumstances [Aranda-Anzaldo and Dent, 2016]. On the other hand, the very short DNA loops reported for the 162 kb region in naïve B lymphocytes [Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010] suggest the inability of such loops for performing the “looping-out,” away from its corresponding chromosome territory and towards pre-assembled transcription factories, that has been suggested as a necessary step for transcription in vivo [Linnemann and Krawetz, 2009; Chakalova and Fraser, 2010; Rieder et al., 2012]. This was apparently consistent with the stable repression of the albumin-family genes in naïve B lymphocytes. However, in neurons, the 162 kb region displays six DNA loops which are obviously larger than those in naïve B lymphocytes (Fig. 5). In particular, the loop containing the albumin gene is rather similar in size between hepatocytes and neurons, in both cases the region corresponding to the first exon (labeled “a” in Fig. 5) and so next to the corresponding core promoter is clearly away from the NM and yet the *alb* gene is actively expressed in adult hepatocytes but not in postmitotic neurons. Therefore, we can suggest that the structural relationships between DNA and NM are not critical for determining whether a given gene is expressed or not, implying that transcription is adapted to work efficiently upon different kinds of NHOS but it is not imposing functional constraints on such NHOS. This is consistent with our previous report that a large gene (*fyn*) is differentially organized in structural DNA loops in two different cell types (hepatocytes and naïve B lymphocytes) that nevertheless express the gene in a similar fashion despite the lack of a common NHOS for the gene [Trevilla-García and Aranda-Anzaldo, 2012].

The fact that MARs display no obvious consensus sequence nor other features that may allow their identification by simple inspection of the genomic sequence, coupled to the fact that few specific MAR-binding proteins exist [Wang et al., 2010], suggest that the structural interactions between DNA and the NM do not depend on direct readouts as those between specific DNA sequences and transcription factors. A current suggestion is that stable DNA-NM interactions result from indirect readouts that depend on the topology (3D configuration) of the interacting partners but not on specific nucleotide or amino-acid sequences [Aranda-Anzaldo, 2016]. Recently, a common core-NM proteome has been defined [Engelke et al., 2014] but nevertheless there is ample evidence that cell-type specific NM proteins occur [Stuurman et al., 1990; Dent et al., 2010] as well as quantitative changes in the composition of the NM related to cell differentiation and development [Maya-Mendoza et al., 2005]. Considering that in a given organism the nucleotide sequence of the genome is basically the same in all cells, it is likely that qualitative and quantitative differences in NM composition are mainly responsible for the cell-type specificity of the NHOS. However, there is evidence that the NHOS is not conserved between similar cell types from two closely related species and considering that the set of proteins of a given cell type should be rather similar in the corresponding cells from the two closely related species, it has been suggested that known differences in the disposition of the syntenic blocks of nucleotides along the chromosomes of the species compared may result in different 3D configurations or topologies for

the corresponding DNA fibers [Silva-Santiago et al., 2017]. Indeed, DNA is a heteropolymer whose stiffness or flexibility varies along the chromosome depending on nucleotide composition [Travers, 2004]. Thus a tendency to adopt differential configurations in 3D of the DNA fibers corresponding to each chromosome may also contribute to the species and cell-type specificity of the NHOS. Interestingly, each of the primary cell types used in the present study has a different embryonic origin: ectoderm (neurons), endoderm (hepatocytes), and mesoderm (naïve B lymphocytes). Therefore, it can be speculated that there might be a structural signature for the NHOS depending on the ancestral tissue of origin but this remains to be explored by comparing the NHOS of different cell types derived from the same embryonic layer.

Recently, a 3C-like comparative study, between a normal and an equivalent tumor-derived cell line, addressed the genome-wide characterization of NM-associated DNA. The protocol included the artificial cross-linking of all standing DNA–NM interactions before proceeding to extract the NM-fraction for the further sequencing and identification of the DNA fragments bound to the NM [Dobson et al., 2016]. The results indicate that the fraction of genomic DNA bound to the NM is significantly different between normal and tumor cells suggesting that DNA–NM interactions are highly context-dependent. However, the protocol applied in this study did not allow the distinction between structural and facultative (perhaps functional) DNA–NM interactions. Indeed, a previous but more limited comparative study, with avian cell lines, in which the 3C approach was coupled to extraction with high salt (instead of artificial cross-linking) for examining DNA–NM interactions, revealed that not all DNA–NM interactions are of equal affinity thus segregating into high salt-resistant and high salt-labile [Gavrilov et al., 2010]. Therefore, the high salt-resistant structural DNA loops naturally anchored to the NM remain a poorly characterized subset of the many different chromatin loops revealed by 3C and related assays that usually do not challenge or rate the affinity of the interactions fixed by artificial cross-linking. Nevertheless, it might be that a cell-type specific NHOS, primarily determined by non-functional constraints, could be the basis for building up the cell-type specific functional organization of chromatin [Dixon et al., 2012] that is further defined and tuned by the many varied interactions between regulatory/chromatin proteins and DNA.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank two anonymous referees for their suggestions for improving the manuscript. E.S.-S. was recipient of a CONACYT Research Scholarship within the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas at IFC-UNAM. We thank Dr. Claudia V. Rivera-Cerecedo and IFC-UNAM for providing laboratory rats.

REFERENCES

Alva-Medina J, Dent MAR, Aranda-Anzaldo A. 2010. Aged and post-mitotic cells share a very stable higher-order structure in the cell nucleus in vivo. *BioGerontology* 11:703–716.

Anachkova B, Djeliova V, Russev G. 2005. Nuclear matrix support of DNA replication. *J Cell Biochem* 96:951–961.

Aranda-Anzaldo A. 2012. The post-mitotic state in neurons correlates with a stable nuclear higher-order structure. *Commun Integr Biol* 5:134–139.

Aranda-Anzaldo A. 2016. The interphase mammalian chromosome as a structural system based on tensegrity. *J Theor Biol* 393:51–59.

Aranda-Anzaldo A, Dent MAR. 2016. Why cortical neurons cannot divide, and why do they usually die in the attempt? *J Neurosci Res* DOI: 10.1002/jnr.23765

Bates AD, Maxwell A. 2005. Chapter 2: DNA supercoiling. In: *DNA topology*, 2nd edition. Oxford, U.K: Oxford University Press pp 25–82.

Berezney R, Coffey DS. 1974. Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 60:1410–1417.

Buongiorno-Nardelli M, Micheli G, Carri MT, Marilley M. 1982. A relationship between replicon size and supercoiled loop domains in the eukaryotic genome. *Nature* 298:100–102.

Chakalova L, Fraser P. 2010. Organization of transcription. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010(2):a000729.

Cook PR, Brazell IA. 1976. Conformational constraints in nuclear DNA. *J Cell Sci* 22:287–302.

Cook PR, Brazell IA, Jost E. 1976. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J Cell Sci* 22:303–324.

Courbet S, Gay S, Armoult N, Wronka G, Anglana M, Brison O, Debatisse M. 2008. Replication fork movement sets chromatin loop size and origin choice in mammalian cells. *Nature* 455:557–560.

Dent MAR, Segura-Anaya E, Alva-Medina J, Aranda-Anzaldo A. 2010. NeuN/Fox3 is an intrinsic component of the neuronal nuclear matrix. *FEBS Lett* 584:2767–2771.

Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Shen Y, Hu M, Liu JS, Ren B. 2012. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485:376–380.

Dobson JR, Hong D, Rasim Barutcu A, Wu H, Imbalzano AN, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Nickerson JA, Stein GS. 2016. Identifying nuclear matrix-attached DNA across the genome. *J Cell Physiol* DOI: 10.1002/jcp.25596

Elcock LS, Bridger JM. 2008. Exploring the effects of a dysfunctional nuclear matrix. *Biochem Soc Trans* 36:1378–1383.

Engelke R, Riede J, Hegermann J, Wuerch A, Eimer S, Dengjel J, Mittler G. 2014. The quantitative nuclear matrix proteome as a biochemical snapshot of nuclear organization. *J Proteome Res* 13:3940–3956.

Gavrilov AA, Zukher IS, Philonenko ES, Razin SV, Iarovaia OV. 2010. Mapping of the nuclear matrix-bound chromatin hubs by a new M3C experimental procedure. *Nucleic Acids Res* 38:8051–8060.

Gavrilov A, Razin SV, Cavalli G. 2015. In vivo formaldehyde cross-linking: It is time for black box analysis. *Brief Funct Genomics* 14:163–165.

Kang K, Chung JH, Kim J. 2009. Evolutionary conserved motif finder (ECMfinder) for genome-wide identification of clustered YY1- and CTCF-binding sites. *Nucleic Acids Res* 37:2003–2013.

Kim S, Yu N-K, Kaang B-K. 2015. CTCF as a multifunctional protein in genome regulation and gene expression. *Exp Mol Med* 47:e166.

Lemaître JM, Danis E, Pasero P, Vassetzky Y, Méchali M. 2005. Mitotic remodeling of the replicon and chromosome structure. *Cell* 123:787–801.

Linnemann AK, Krawetz SA. 2009. Maintenance of a functional higher order chromatin structure: The role of the nuclear matrix in normal and disease states. *Gene Ther Mol Biol* 13:231–243.

Maya-Mendoza A, Hernández-Muñoz R, Gariglio P, Aranda-Anzaldo A. 2003. Gene positional changes relative to the nuclear substructure correlate with the proliferating status of hepatocytes during liver regeneration. *Nucleic Acids Res* 31:6168–6179.

Maya-Mendoza A, Hernández-Muñoz R, Gariglio P, Aranda-Anzaldo A. 2005. Natural ageing in the rat liver correlates with progressive stabilization of DNA-nuclear matrix interactions and withdrawal of genes from the nuclear substructure. *Mech Ageing Dev* 126:767–782.

- Mirkin SM. 2001. DNA topology: Fundamentals. In: eLS. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. <http://www.els.net> DOI: 10.1038/npg.els.0001038
- Mosch B, Morawski M, Mittag A, Lenz D, Tarnok A, Arendt A. 2007. Aneuploidy and DNA replication in the normal human brain and Alzheimer's disease. *J Neurosci* 27:6859–6867.
- Nickerson JA. 2001. Experimental observations of a nuclear matrix. *J Cell Sci* 114:463–474.
- O'Sullivan JM, Hendy MD, Pichugina T, Wake GC, Langowski J. 2013. The statistical mechanics of chromosome conformation capture. *Nucleus* 4:390–398.
- Ottaviani D, Lever E, Takousis P, Sheer D. 2008. Anchoring the genome. *Genome Biol* 9(1):201.
- Razin SV. 2001. The nuclear matrix and chromosomal DNA loops: Is there any correlation between partitioning of the genome into loops and functional domains? *Cell Mol Biol Lett* 6:59–69.
- Razin SV, Gromova II, Iarovaia OV. 1995. Specificity and functional significance of DNA interactions with the nuclear matrix: New approaches to clarify old questions. *Int Rev Cytol* 162B:405–448.
- Rhodes D, Klug A. 1980. Helical periodicity of DNA determined by enzyme digestion. *Nature* 286:573–578.
- Rieder D, Trajanosky Z, McNally JG. 2012. Transcription factories. *Front Gene* 3:221.
- Rivera-Mulia JC, Aranda-Anzaldo A. 2010. Determination of the in vivo structural DNA loop organization in the genomic region of the rat albumin locus by means of a topological approach. *DNA Res* 17:23–35.
- Rivera-Mulia JC, Hernández-Muñoz R, Martínez F, Aranda-Anzaldo A. 2011. DNA moves sequentially towards the nuclear matrix during DNA replication in vivo. *BMC Cell Biol* 12:3.
- Röber RA, Sauter H, Weber K, Osborn M. 1990. Cell of the immune and hematopoietic system of the Mouse lack lamins A/C: Distinction versus other somatic cells. *J Cell Sci* 95:587–598.
- Roti-Roti JL, Wright WD. 1987. Visualization of DNA loops in nucleoids of HeLa cells; assays for DNA damage and repair. *Cytometry* 8:461–467.
- Silva-Santiago E, Pardo JP, Hernández-Muñoz R, Aranda-Anzaldo A. 2017. 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.
- Stuurman N, Meijne AML, van Der Pol AJ, de Jong L, van Driel R, van Renswoude J. 1990. The nuclear matrix from cells of different origin. *J Biol Chem* 265:5460–5465.
- Travers AA. 2004. The structural basis of DNA flexibility. *Phil Trans R Soc Lond A* 362:1423–1438.
- Trevilla-García C, Aranda-Anzaldo A. 2011. Cell-type-specific organization of nuclear DNA into structural looped domains. *J Cell Biochem* 112:531–540.
- Trevilla-García C, 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* 493:1–8.
- Vogelstein B, Pardoll DM, Coffey DS. 1980. Supercoiled loops and eukaryotic DNA replication. *Cell* 22:79–85.
- Wang T-Y, Han Z-M, Chai Y-R, Zhang J-H. 2010. A mini review of MAR-binding proteins. *Mol Biol Rep* 37:3553–3560.
- Wei X, Samarabandu J, Devdhar RS, Siegel AJ, Acharya R, Berezney R. 1998. Segregation of transcription and replication sites into higher order domains. *Science* 281:1502–1506.
- Williamson I, Berlivet S, Eskeland R, Boyle S, Illingworth RS, Paquette D, Dostie J, Bickmore WA. 2014. Spatial genome organization: Contrasting views from chromosome conformation capture and in situ hybridization. *Genes Dev* 28:2778–2791.
- Wilson RHC, Coverley D. 2013. Relationship between DNA replication and the nuclear matrix. *Genes Cells* 18:17–31.
- Woodcock CL, Ghosh RP. 2010. Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000596.
- Yusufzai TM, Felsenfeld G. 2004. The 5'-HS4 chicken beta-globin insulator is a CTCF-dependent nuclear matrix-associated element. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:8620–8624.

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 Dent, M. A. R. (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. R., 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^{-/-} 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 α -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.
 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. Gavrilov, 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. Gavrilov, 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., Brassat, 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 α . *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 scaffold 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. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology LXXV* (Vol. 75, pp.475-492). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2010.
 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., Izaguirre-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 Comparision during Polymeraase 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 Laminsa 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*. 5th 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. *Chapman and Hall*.
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). α 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.