



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

TÍTULO DEL PROYECTO

**CARACTERIZACIÓN DE LAS REGIONES DE ANCLAJE A LA
MATRIZ NUCLEAR DE BUCLES ESTRUCTURALES DE DNA
CORRESPONDIENTES A REGIONES ESPECÍFICAS DEL GENOMA
DE LA RATA. ESTABLECIMIENTO DE UNA CORRELACIÓN
ENTRE LA TOPOLOGÍA DEL DNA Y SU AFINIDAD POR LA MN**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

DAVID GARCÍA VILCHIS

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. ARMANDO ARANDA ANZALDO
FACULTAD DE MEDICINA, UAEMéx.**

**COTUTOR DE TESIS: Dr. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: Dr. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

CD. MX. SEPTIEMBRE, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

TÍTULO DEL PROYECTO

**CARACTERIZACIÓN DE LAS REGIONES DE ANCLAJE A LA MATRIZ NUCLEAR
DE BUCLES ESTRUCTURALES DE DNA CORRESPONDIENTES A REGIONES
ESPECÍFICAS DEL GENOMA DE LA RATA. ESTABLECIMIENTO DE UNA
CORRELACIÓN ENTRE LA TOPOLOGÍA DEL DNA Y SU AFINIDAD POR LA MN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

DAVID GARCÍA VILCHIS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. ARMANDO ARANDA ANZALDO

FACULTAD DE MEDICINA, UAEMéx.

COTUTOR DE TESIS: Dr. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: Dr. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

MÉXICO, CD. MX. SEPTIEMBRE, 2018

OFICIO FCIE/DAIP/500/2018

ASUNTO: Oficio de Jurado

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 12 de febrero de 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTOR EN CIENCIAS del (la) alumno (a) GARCÍA VILCHIS DAVID con número de cuenta 505013413 con la tesis titulada: "Caracterización de las regiones de anclaje a la matriz nuclear de bucles estructurales de DNA correspondientes a regiones específicas del genoma de la rata. Establecimiento de una correlación entre la topología del DNA y su afinidad por la matriz nuclear", realizada bajo la dirección del (la) DR. ARMANDO ARANDA ANZALDO y la Co-dirección del DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA:

Presidente: DR. FÉLIX RECILLAS TARGA
Vocal: DRA. LORENA AGUILAR ARNAL
Secretario: DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES
Suplente: DR. DAVID RENÉ ROMERO CAMARENA
Suplente: DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 18 de mayo de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGNS/MMVA/ASR/grf*

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por brindarme la oportunidad de cursar los estudios de posgrado y la calidad y calidez con que siempre me trataron.

A la Universidad Autónoma del Estado de México por brindarme la oportunidad de desarrollar mi proyecto doctoral dentro del Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias de la Facultad de Medicina.

Al CONACyT por brindarme la beca 173604 para cursar los estudios.

Al apoyo del Fondo SEP-CONACYT de Ciencia Básica convenio CB2012-176794 otorgado al Dr. Armando Aranda Anzaldo.

Al Dr. Armando Aranda Anzaldo, al Dr. Federico Martínez Montes y al Dr. Luis Felipe Jiménez por sus invaluable comentarios y asesoría que permitieron desarrollar el presente proyecto de investigación.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi madre, por guiarme y apoyarme a lo largo de todos mis estudios.

A mi hermano, por su apoyo incondicional, los grandes momentos y por ser el mejor hermano del mundo. Gracias brotherino.

A todos mis amigos, por su grata compañía, el ánimo y buen humor que infundieron en mí en los momentos difíciles.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	4
Introducción	6
Antecedentes	11
I. Matriz nuclear	11
II. Nucleoide	14
III. Configuración en bucles estructurales	18
IV. Anclajes de bucles estructurales LARs	23
V. Anclajes transitorios o facultativos	24
VI. Ensayos de afinidad <i>in vitro</i> de fragmentos de DNA por la MN	26
VII. Afinidad genérica del DNA por la MN	29
VIII. Proteínas de MN	31
IX. RNA y MN	34
X. Polímeros naturales y longitud de persistencia	36
XI. Técnicas 3C	41
Hipótesis	46
Objetivo	46
Objetivos particulares	46
Metodología	48
a) Animales experimentales	48
b) Extracción de hepatocitos	48
c) Preparación de nucleoides	49
d) Digestión de nucleoides con 0.5 u/ml de DNAsa I	49
e) Análisis <i>in silico</i> del locus albúmina	50
f) Diseño de primers	51
g) Amplificación por PCR	51
h) Purificación de los amplicones	52
i) Digestión con enzimas de restricción	52
j) Digestión de nucleoides con 8 u/ml de DNAsa I	53
k) Extracción de núcleos de hepatocitos	54
l) Digestión de núcleos de hepatocitos	54
m) Preparación de MNs a partir de núcleos de hepatocitos	55
n) Ensayo de afinidad	55
o) Determinación de motivos en los amplicones	56
p) Digestión con RNAsa I de proteínas de MN unidas a los amplicones en estudio	56
q) Microscopía de fluorescencia	53

Resultados	58
A. Determinación de la longitud promedio de los LARs	58
B. Análisis <i>in silico</i> del locus multigénico de la familia albúmina	60
C. Diseño de los amplicones correspondientes a los LARs putativos	61
D. Los LARs putativos están asociados con la MN <i>in situ</i>	64
E. Determinación de la afinidad de L1 y L4 por la MN <i>in vitro</i>	69
F. La unión de los fragmentos de DNA a la MN depende de su longitud	76
G. La unión de los fragmentos de DNA es independiente de RNA	78
H. Controles de amplificación	80
Discusión	84
La longitud de los fragmentos de DNA modula su afinidad por la MN <i>in vitro</i>	85
Correlación entre los bucles estructurales y facultativos	93
La naturaleza de las interacciones DNA-MN	97
La estructura de la MN	100
Conclusiones	103
Referencias	104
Anexo I	114

I.- García-Vilchis D y Aranda-Anzaldo A, 2017

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Imagen de microscopía electrónica de la matriz nuclear	13
Figura 2	Nucleoide teñido con bromuro de etidio y en contraste de fases	15
Figura 3	Método de mapeo topológico de los bucles estructurales	19
Figura 4	Configuración en bucles estructurales del locus multigénico de la familia albúmina	20
Figura 5	Diseño experimental para determinar MARs	26
Figura 6	Tipos de polímeros	37
Figura 7	Longitud del contorno y distancia de punta a punta	38
Figura 8	Longitud de persistencia	39
Figura 9	Longitud de Kuhn	40
Figura 10	Características de los LARs putativos	59
Figura 11	Diseño de los amplicones	61
Figura 12	Análisis de restricción de los productos de PCR de los amplicones utilizados	63
Figura 13	Los LARs putativos están asociados a la MN <i>in situ</i> (DNAsa I)	66
Figura 14	Los LARs putativos están asociados a la MN <i>in situ</i> (Enzimas de restricción)	68
Figura 15	Determinación de la afinidad de los amplicones L1 y L4 por proteínas de MN <i>in vitro</i>	70
Figura 16	Efecto de la digestión con DNAsa I en la MN.	71
Figura 17	Controles de amplificación en DNA de esperma de Arenque	72
Figura 18	Determinación de la afinidad de L1 y L4 por MNs estructuradas <i>in vitro</i>	75
Figura 19	La unión de los fragmentos de DNA a la MN depende de su longitud	76
Figura 20	La unión de los fragmentos de DNA es independiente de RNA	79

Figura 21	Efecto de la presencia de proteínas en la eficiencia de la PCR	81
Figura 22	Efecto de la topología del amplicón en la eficiencia de la PCR	82
Figura 23	Hiperenrollamiento	88
Figura 24	Modelo de la estructura de orden superior en el núcleo	91
Figura 25	Tipos de hiperenrollamiento	91
Figura 26	Modelo de la relación entre bucles estructurales y bucles facultativos	95
Figura 27	Modelo de tensegridad de la matriz nuclear	101

TABLAS

Tabla 1	Componentes nucleares	14
Tabla 2	Número de LARs por núcleo y tipo celular en distintas especies.	16
Tabla 3	Amplicones utilizados en el presente estudio	62
Tabla 4	Enzimas utilizadas para el ensayo de restricción	63
Tabla 5	Relación de los motivos encontrados en los amplicones.	78

RESUMEN

La matriz nuclear (MN) es un compartimento formado por proteínas, DNA y RNA, que resiste a la extracción con detergentes, altas concentraciones de sal y el tratamiento con nucleasas. En la interfase el genoma de las células de metazoarios se encuentra organizado en bucles hiperenrollados que se encuentran anclados a la MN mediante segmentos denominados regiones de anclaje del bucle (LARs por sus siglas en inglés). La unión o interacción entre LARs y MN resiste la extracción con alta fuerza iónica. Los LARs son tejido específico y no están necesariamente conservados entre especies aún en el mismo tipo celular. A pesar de que los LARs ocurren en gran número en el núcleo, no se ha encontrado una secuencia consenso que los determine, por el contrario, ensayos de afinidad *in vitro* demuestran que prácticamente cualquier fragmento de DNA presenta cierta afinidad por las proteínas de MN, por lo que podrían ser factores independientes a la secuencia de nucleótidos los que definan dichas interacciones. A este respecto se ha reportado que la MN tiene afinidad por plásmidos bacterianos hiperenrollados que ocupan sitios diferentes de los sitios a los que se unen fragmentos de DNA linearizados. Esto sugiere que puede ser la topología del DNA la que determine en forma primaria su afinidad por la MN. Esta topología es una propiedad emergente que resulta de la ubicación genómica de la región en el contexto del cromosoma y de las propiedades estructurales del DNA. Por lo tanto, la topología local de un segmento de DNA resulta alterada cuando es sacada de su contexto original. En solución, la longitud a la que el DNA adopta una topología lineal se denomina longitud de persistencia y se ha determinado que para el DNA de secuencia aleatoria esta corresponde a ≈ 150 pb. La longitud de

Kuhn corresponde a dos veces la longitud de persistencia y es a partir de longitudes mayores a la de Kuhn que el DNA es capaz de adoptar topologías complejas. Por lo tanto, proponemos que la afinidad de una región del DNA por la MN es una propiedad emergente vinculada a la topología local del DNA, la cual a su vez es resultado de la organización en 3D de la región genómica correspondiente. Para probar esta hipótesis identificamos dos regiones de $\approx 2\text{kb}$ que *in situ* constituyen LARs en el locus de la familia albúmina. Estos LARs, una vez aislados y desprovistos del contexto genómico natural, no tuvieron afinidad por la MN en ensayos *in vitro*. Sin embargo, subfragmentos de los LARs cuya longitud es cercana a la longitud de persistencia, se unieron a la MN *in vitro* y son resistentes a la extracción con alta fuerza iónica. Fragmentos de DNA con longitud cercana a la longitud de persistencia pero ajenos a los LARs identificados *in situ* también se unieron a la MN, *in vitro*, en forma resistente a la extracción con sal. La longitud del DNA está estrechamente relacionada con la topología que despliega el DNA en solución, nuestros resultados sugieren que una topología lineal es suficiente para que el DNA se una a la MN. Dado que la longitud del DNA modula su afinidad por la MN, se puede proponer un modelo en el cual cualquier región del genoma que manifieste una topología lineal *in situ* tendrá la capacidad potencial de establecer un anclaje con la MN. Que una región o segmento del genoma manifieste topología lineal depende de varios factores como son: la agitación termal del sistema, el estrés estructural y las restricciones o limitantes topológicas del DNA (ejemplo: hiperenrollamiento). Lo anterior, asociado con la dinámica global del núcleo, puede resultar en la formación o desprendimiento de los anclajes DNA-MN y permite establecer un punto de partida para entender el

proceso de organización estructural del genoma en el núcleo celular de los metazoarios.

ABSTRACT

The nuclear matrix (NM) is a compartment formed by proteins, DNA and RNA. This compartment is obtained by extracting the nucleus with high-ionic strength solutions, non ionic detergents and a treatment with nucleases. In the interphase the genome of metazoan cells is organized in supercoiled loops anchored to the NM by loop anchorage regions (LARs). The interaction between the NM and LARs resists extraction with high-ionic strength solutions. LARs are tissue specific but are not necessarily conserved between species even within the same cell type. Although LARs occur in large numbers in the nucleus, no consensus nucleotide sequence has been found for LARs and *in vitro* binding assays shows that virtually any DNA fragment shows a given affinity for NM proteins, so it might be that factors independent of the nucleotide sequence determine the DNA-NM interactions. Besides, it has been reported that the NM has affinity for supercoiled bacterial plasmids and they occupy sites different to those occupied by bound linearized DNA fragments. This suggests that the topology of DNA might determine its affinity for the NM. This topology is an emergent property that results from the structural properties of DNA and the location of a given genomic region within the context of the chromosome. Therefore, the local topology of a DNA segment is altered when the segment is removed from its original context. The length at which the DNA adopts a linear topology in solution is called the persistence length and corresponds to ≈ 150 bp for DNA of random sequence. The DNA may acquire complex topologies when its length goes beyond the Kuhn length that corresponds to twice the persistence length (300 bp). Therefore, we propose that the affinity of a region of DNA for the NM is an emergent property linked to the local topology of

DNA, which in turn is the result of the 3D organization of the corresponding genomic region. In order to test this hypothesis we identified two regions of $\approx 2\text{kb}$ that constitute LARs *in situ* at the albumin-family locus. These LARs, once isolated and devoid of their natural genomic context, had no affinity for the NM *in vitro*. However, subfragments of the LARs, whose length is close to the persistence length, bind to the NM *in vitro* and resist the extraction with high-ionic strength. DNA fragments unrelated to the LARs identified *in situ*, but close to the persistence length of DNA, also bind to the NM *in vitro* in a salt-resistant fashion. DNA length correlates with the topology displayed by such a DNA in solution, our results suggest that a linear topology is enough for supporting the binding of DNA to the NM. Given that the length of DNA modulates its affinity for NM, we propose a model in which any region of the genome that manifests a linear topology *in situ* has the potential for establishing an anchorage to the NM. The topology of DNA *in vivo* depends on several factors such as: the thermal agitation of the system, the structural stress and topological restrictions or constraints (supercoiling) of DNA. Such a topology together with the global dynamics within the cell nucleus may determine the actualization or cancelation of DNA-NM interactions. Our proposal is a starting point for understanding the process of structural organization of the genome in the cell nucleus of metazoans.

INTRODUCCIÓN

Sabemos que en las células eucariontes el DNA se encuentra confinado al núcleo, que este se encuentra altamente compactado y que su organización no está dictada al azar. Además, se ha propuesto que esta organización está fuertemente relacionada con su función biológica. Bajo esta premisa se han realizado esfuerzos intensos para conocer cuál es la organización en 3D del genoma.

Al interior del núcleo de la célula el DNA se encuentra dividido en cromosomas que, en interfase, ocupan sitios específicos llamados territorios cromosómicos (Cremer & Cremer, 2010). Durante la división celular los cromosomas se replican y posteriormente compactan para dar origen a los cromosomas mitóticos que serán heredados a las células hijas. El DNA se asocia a un gran número de proteínas que están involucradas en su empacamiento, transcripción y replicación, en conjunto al complejo DNA y proteínas se le denomina cromatina. Las proteínas que se asocian al DNA se dividen en dos clases: las histonas y las proteínas no histonas. Las histonas son parte fundamental de uno de los niveles de organización más importantes de la cromatina, el nucleosoma: este consiste de 147 pb de bases de DNA enrollados alrededor del octámero de histonas; los nucleosomas están unidos por un DNA *linker* cuya longitud varía entre 20-80 pb y a la sucesión de nucleosomas se le conoce como la fibra de 10 nm. De acuerdo al libro de texto, en la fibra de 10 nm los nucleosomas se suceden en promedio cada 200 pb (Alberts, *et al.*, 2002), sin embargo, se ha determinado por microscopía de alta resolución que los nucleosomas están distribuidos en grupos (nidadas) a lo

largo del DNA y que existen grandes regiones de DNA desnudo en el núcleo celular (Ricci, *et al.*, 2015). En los libros de texto también se menciona que la fibra de 10 nm al plegarse y asociarse a la histona H1 forma la fibra de 30 nm (Alberts, *et al.*, 2002), sin embargo, no existe evidencia experimental de la existencia de la fibra de 30 nm *in vivo* (Fussner, *et al.*, 2012; Maeshima, *et al.*, 2010; Maeshima, *et al.*, 2014; Ou, *et al.*, 2017), de hecho, se ha reportado que el diámetro de la fibra de cromatina oscila entre los 5-24 nm (Ou, *et al.*, 2017). El modelo actual sugiere que la conformación básica de la cromatina es la fibra de 10 nm y son arreglos de esta fibra, al asociarse a proteínas como la histona H1, mediante los cuales se alcanzan mayores niveles de compactación (Hansen *et al.*, 2018). Estudios derivados de técnicas 3C clasifican a la cromatina de acuerdo a su actividad transcripcional en compartimentos de cromatina activa (A) y cromatina inactiva (B), que se sugiere corresponden a regiones de eucromatina y heterocromatina respectivamente. De acuerdo a estos estudios los compartimentos están subdivididos en dominios de asociación topológica (TADs) delimitados por proteínas como CTCF y cohesina. Los TADs consisten de uno o varios bucles de DNA, que se forman por la asociación de una gran cantidad de proteínas de la cromatina al DNA (Lieberman-Aiden, *et al.*, 2009; Oudelaar, *et al.*, 2017; Wit & De Laat, 2012). Para determinar la función de CTCF y cohesina en este modelo, estas proteínas se eliminaron en líneas celulares y, posteriormente, se evaluaron los cambios en la organización del genoma mediante análisis 3C (Nora, *et al.*, 2017; Schwarzer, *et al.*, 2017). La eliminación de estas proteínas, llevó a la disrupción de los TADs, sin embargo, los compartimentos A y B se mantuvieron; estos resultados sugieren la existencia de niveles de organización subyacentes responsables de mantener la organización del genoma (Nora, *et al.*, 2017;

Schwarzer, *et al.*, 2017). Hasta aquí se ha hecho una breve descripción del modelo actual de organización de la cromatina en el núcleo, sin embargo, desde 1975 sabemos que si se extrae el núcleo celular con altas concentraciones de sal y detergentes no iónicos se pone en evidencia que: en el núcleo de las células de metazoarios el DNA está organizado en bucles hiperenrollados negativamente anclados a un compartimento denominado matriz nuclear (**MN**) mediante regiones denominadas **LARs** (Loop anchorage region) (Cook & Brazell, 1975, 1976). Se ha propuesto que este es el nivel de orden superior de organización en el núcleo (**NHOS**, nuclear higher order structure) (Aranda-Anzaldo, 2009, 2016; Aranda-Anzaldo, *et al.*, 2014) sobre el cual, las proteínas de la cromatina (como las histonas, CTCF y cohesina, etc.) formarían los nucleosomas, TADs y bucles funcionales de DNA; en otras palabras, el NHOS es el nivel de organización subyacente responsable de mantener la organización del genoma. La MN está definida operacionalmente como la estructura que resulta de la extracción del núcleo celular con altas concentraciones de sal, detergentes no iónicos y una digestión con DNAsas, y está compuesta principalmente de proteínas, DNA y RNA (Berezney & Coffey, 1976). La MN es un compartimento dinámico (Tsutsui, Sano, & Tsutsui, 2005) compuesta por un core de 272 proteínas (Engelke *et al.*, 2014). Solo para subrayar, los bucles de DNA a los que nos referimos en el NHOS, denominados bucles estructurales, están definidos exclusivamente por proteínas de matriz nuclear y DNA, los bucles mediados por proteínas de la cromatina se denominan facultativos y se pierden por el proceso de extracción con altas concentraciones de sal y no son objeto de estudio de la presente tesis. Ya que todo el genoma de la célula se encuentra organizado en bucles estructurales anclados a la MN mediante LARs, surge la siguiente pregunta: ¿cuáles son los

factores que gobiernan esta organización? Inicialmente se supuso que los LARs deberían estar definidos por una secuencia de nucleótidos (Boulikas, 1996), sin embargo, después de más de 40 años de investigación esta no se ha determinado (Tsutsui *et al.*, 2005), de hecho se demostró que la complejidad de secuencia de los anclajes es exactamente la misma que la del DNA total (Basler, *et al.*, 1981; Pardoll & Vogelstein, 1980; Kuo, 1982). Los LARs representan entre el 1-6% del DNA total, miden entre 0.1-3 kb (Jackson, *et al.*, 1990; Pathak, *et al.*, 2014), son tejido específico (Rivera-Mulia & Aranda-Anzaldo, 2010; Silva-Santiago, *et al.*, 2017-B) y aparentemente no están relacionados con la actividad transcripcional del gen que los contiene (Trevilla-Garcia & Aranda-Anzaldo, 2012). Además, se encuentran en gran número dentro de la célula (existen entre 10,000-110,000 LARs dependiendo del tipo celular) y son altamente dinámicos (Maya-Mendoza, *et al.*, 2005). El que regiones genómicas conservadas entre la rata y ratón tengan una configuración en bucles estructurales de DNA distinta (distintos LARs) (Silva-Santiago, *et al.*, 2017-A) sugiere que la relación DNA-MN no tiene una función estrictamente biológica y nos invita a pensar que la organización pudiera tener bases meramente estructurales. Además, el que la MN tenga afinidad por prácticamente cualquier fragmento de DNA (sección afinidad genérica del DNA por la MN) y que los sitios de unión a fragmentos lineales de DNA sean distintos a los de plásmidos hiperenrollados (Kay & Bode, 1994), sugiere que pudiera ser la topología del DNA la que defina su afinidad por la MN. Nos parece que en la mayoría de los estudios sobre la organización en 3D del genoma se han olvidado de un elemento fundamental: la comprensión de los distintos elementos del núcleo como materiales de construcción. El DNA es un material con propiedades estructurales tales como helicidad, rigidez y elasticidad; cada una de las cuales le

confiere capacidades y limitaciones específicas, que en última instancia determinan sus capacidades físicas de formar estructuras. La longitud de persistencia (L_p) del DNA es la longitud a la cual, en solución, un fragmento de DNA va a adoptar la topología de una línea recta (≈ 150 pb para DNA de secuencia al azar), la longitud de Kuhn (L_k) (es dos veces la $L_p \approx 300$ pb) corresponde a la longitud por sobre la cual el DNA va a adquirir una topología compleja en solución (Rosa & Zimmer, 2014). Este comportamiento del DNA nos permitió estudiar el efecto que tiene la topología del mismo en su afinidad por la MN. En la presente tesis demostramos que, *in vitro*, es la topología del DNA la que determina en forma primaria su afinidad por la MN y que el elemento de selección positiva es la linealidad de los fragmentos de DNA.

ANTECEDENTES

I. MATRIZ NUCLEAR

El primer antecedente de la matriz nuclear (MN) se remonta a un reporte de 1948 en el que investigadores rusos describen la existencia de proteínas no cromatínicas residuales en núcleos celulares después de realizar una extracción con sales (Zbarsky, 1998). Sin embargo, no fue sino hasta 1974 que Berezney y Coffey (Berezney & Coffey, 1974), mediante extracciones secuenciales de núcleos de hepatocitos con 2M de NaCl y digestión con DNAsa, lograron aislar una red de proteínas a la que denominaron matriz nuclear. Distintos grupos se sumaron a la investigación de esta estructura y realizaron múltiples variaciones a la técnica de extracción. Se utilizaron sales como el sulfato de amonio al 0.25M (Fey, *et al.*, 1984) o LIS (diyodosalicilato de litio) (Mirkovitch, *et al.*, 1984) para realizar la extracción. También, se hicieron variaciones en el orden en que se realizaba el tratamiento, por ejemplo, la digestión con nucleasas se realizó antes o después del proceso de extracción con sal. Es importante hacer notar que, a pesar de las variaciones técnicas mencionadas, en todos los casos se obtuvo una estructura similar, que asemeja la estructura del núcleo celular. Sin embargo, no es de extrañar que las matrices nucleares obtenidas con las diversas técnicas, si bien son semejantes, difieran en su composición. Las diferencias en composición de las matrices nucleares obtenidas resultan de las distintas concentraciones y tipos de sales empleadas para la extracción. Por ejemplo, la extracción con sulfato de amonio 0.25 M resulta ser una extracción suave cuando se le compara con la de

2M de NaCl, por lo que se espera la presencia de un mayor número de proteínas, lo cual se verifica experimentalmente (Engelke *et al.*, 2014). Las diferencias en composición han dado pie a la suposición que la matriz nuclear es un artefacto producido por la precipitación de proteínas durante la extracción con sales (Pederson, 2000). Este fenómeno, conocido como salting-out, sólo es producido por el sulfato de amonio, pero no por NaCl. Las tablas de Hofmeister, que clasifican el efecto que tienen los iones sobre la solubilidad y configuración nativa de las proteínas (caotrópico o solubilizante-desnaturalizante; cosmotrópico o estabilizante-precipitante), posicionan al Na⁺ y Cl⁻ justo en la mitad de la serie, lo que implica que no tienen un efecto significativo sobre la configuración nativa de las proteínas (Baldwin, 1996; Zhang & Cremer, 2006). Actualmente, la matriz nuclear (MN) está definida operacionalmente como la estructura que resulta de la extracción del núcleo celular con altas concentraciones de sal, detergentes no iónicos y digestión con DNAsa I (Engelke, *et al.*, 2014; Tsutsui, *et al.*, 2005). En imágenes de microscopía electrónica de matrices nucleares podemos observar la lámina nuclear, un nucléolo residual y una extensa red de ribonucleoproteínas dispersa al interior de la matriz nuclear (Figura 1) (Nickerson, 2001). Derivado de las distintas técnicas de extracción se han asociado más de 400 proteínas a la matriz nuclear (Mika & Rost, 2005); sin embargo, en un estudio en el que se comparó el proteoma de las matrices nucleares obtenidas por distintos métodos de extracción, se definió un proteoma central común de 272 proteínas (Engelke *et al.*, 2014) mismo que se obtiene en forma consistente mediante la extracción con 2 M de NaCl, que es el método de extracción empleado en el presente trabajo de tesis.

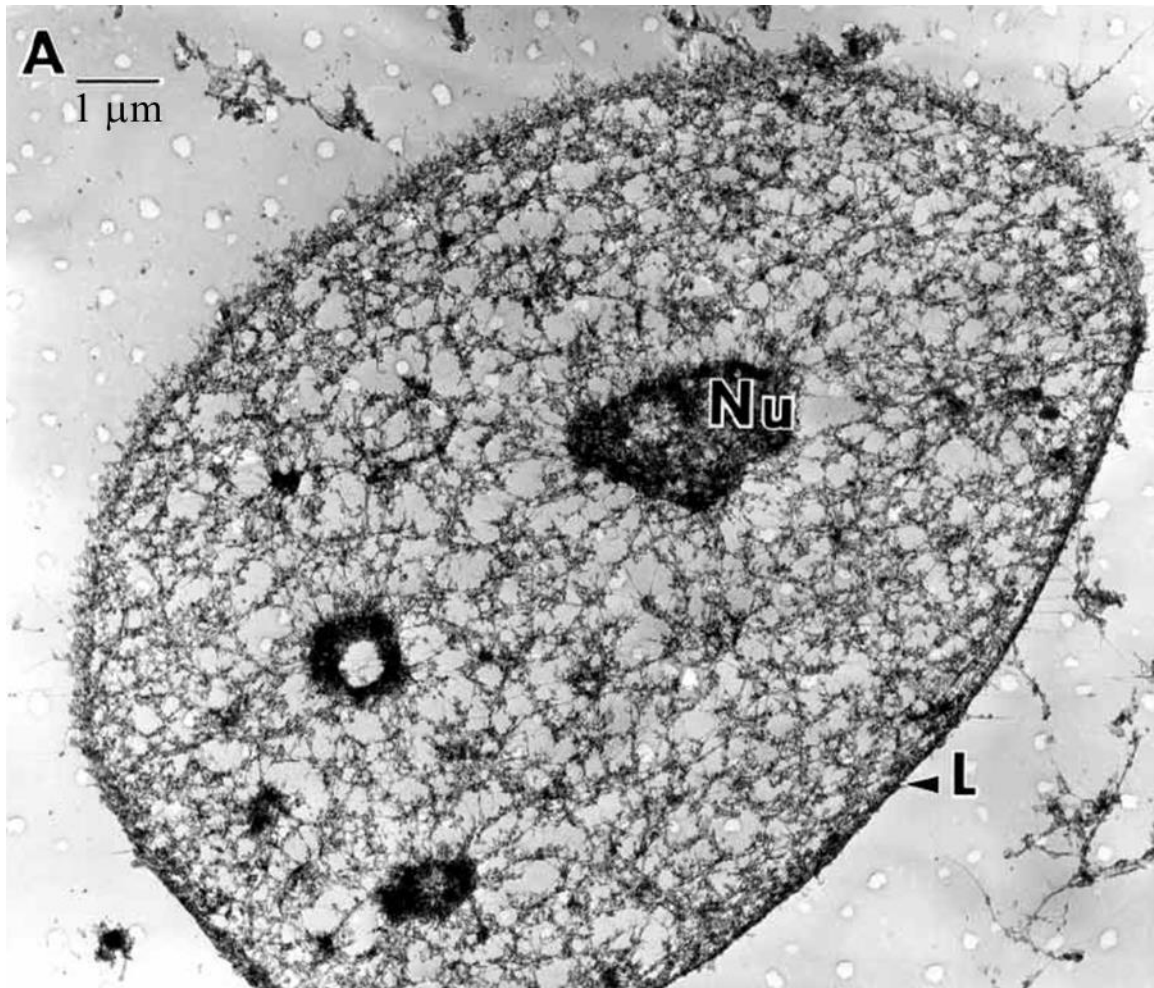


Figura 1. Matriz nuclear de célula CaSki observada por microscopía electrónica. La matriz nuclear está delimitada por las láminas (L), contiene una red de ribonucleoproteínas y remanentes nucleolares (Nu) (Nickerson, 2001).

Se ha argumentado que si la MN realmente existe en el núcleo debería ser fácilmente observable por técnicas simples de microscopía (Pederson, 2000). Sin embargo, la hipótesis planteada por Berezney y Coffey (1974) deja claro que de existir un elemento proteico que le confiera estructura al núcleo de la célula este debería ser subyacente a la cromatina y no sería observable por técnicas de microscopía clásicas, ya que estaría cubierto por esta y otros componentes del núcleo. Por esta razón, los autores mencionados realizaron extracciones

secuenciales en las que se retiraron uno a uno estos elementos. La envoltura nuclear y las proteínas solubles con detergentes, las proteínas de la cromatina con altas concentraciones de sal y finalmente se removió el DNA con nucleasas. Separaron cada fracción por gradientes de sacarosa para favorecer que se conservara la estructura. Derivado de esta técnica se concluyó que la matriz nuclear estaba compuesta principalmente de proteínas, DNA, RNA y fosfolípidos residuales (Berezney & Coffey, 1976) (Tabla 1).

	Núcleo intacto %	% removido del núcleo con la extracción	Matriz nuclear %
Proteínas	69	90	92.4
DNA	23.9	99.9	<0.1
RNA	3.4	98	1.1
Fosfolípidos	3.7	98	1

Tabla 1. Componentes nucleares. Componentes del núcleo intacto expresado en porcentaje. Porcentaje de los componentes removidos mediante la extracción con 2M de NaCl. Composición de la matriz nuclear obtenida de la extracción (Berezney & Coffey, 1976).

II. NUCLEOIDE

Para indagar sobre la organización del genoma en el núcleo en interfase un grupo de investigación omitió el paso de digestión con nucleasas en la técnica de

extracción de matrices nucleares (Cook & Brazell, 1975, 1976). Mediante esta técnica se obtuvieron nucleoides, en ellos el DNA forma bucles hiperenrollados que se encuentran anclados a la MN. Debido al proceso de extracción con 2M de NaCl se pierden las proteínas de la cromatina (incluyendo las histonas) por lo que los bucles de DNA presentan un hiperenrollamiento negativo de tipo plectonómico (Cook & Brazell, 1976). El hiperenrollamiento del bucle se pone de manifiesto cuando el bromuro de etidio, al intercalarse en el DNA, actúa como una palanca molecular que causa que el bucle se expanda, lo cual se observa como un halo fluorescente alrededor de la MN (Figura 2).

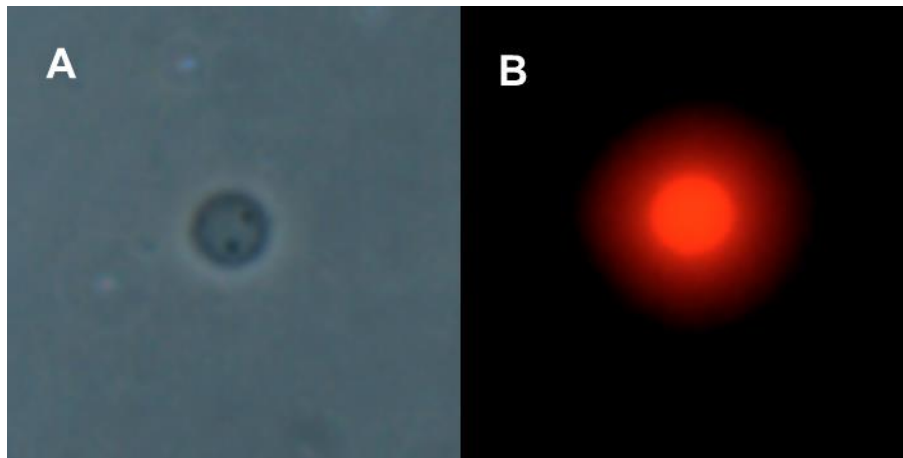


Figura 2. A) Fotografía en contraste de fases de un **nucleoide de hepatocito**. B) Nucleoide de hepatocito teñido con bromuro de etidio que muestra el halo de DNA en su máxima expansión.

Derivado de estos experimentos se concluyó que: todo el genoma se encuentra organizado en bucles que se encuentran anclados a la MN mediante regiones de DNA denominadas LARs (loop anchorage region). El radio del halo fluorescente

que se forma alrededor de la MN al agregar bromuro de etidio es directamente proporcional al tamaño promedio de los bucles de DNA (Razin, *et al.*, 1995). Esta proporción corresponde a 0.34 nm por cada par de bases, por lo que podemos determinar que, por ejemplo, si el tamaño del halo en hepatocitos es de 14.1 μm +/- 2.25 μm el tamaño del bucle (de LAR a LAR) corresponde a 41.47 kb y en neuronas, 8.24 μm +/- 1 μm son equivalentes a 24.23 kb (Silva-Santiago, *et al.*, 2017-A). La longitud promedio de los bucles se encuentra entre las 5-200 kb y es tejido específico (Tabla 2).

ORGANISMO	TIPO CELULAR	TAMAÑO DEL BUCLE (Kb)	Número de LARs	Cita
RATA (<i>Rattus norvegicus</i>)	Hepatocitos			
	P80	98	28,000	Maya-Mendoza <i>et al.</i> , 2005.
	P540	62	44,000	Maya-Mendoza <i>et al.</i> , 2005.
	Neuronas	48	57,000	Silva-Santiago <i>et al.</i> , 2017.
RATÓN (<i>Mus musculus</i>)	Hepatocitos P80	77	35,000	Silva-Santiago <i>et al.</i> , 2017.
	Neuronas	48	56,000	Silva-Santiago, Tesis Doctoral.
	Línea celular de fibroblastos			
	3T3	96	28,000	Vogelstein <i>et al.</i> , 1980.
	L cells	62	43,000	Razin <i>et al.</i> , 1979.
	FM 3 (células de carcinoma mamario)	200	13,000	Nakane <i>et al.</i> , 1978.
HUMANO (<i>Homo sapiens</i>)	Células HeLa			
	Cromosoma Metafásico	42	71,000	Paulson y Laemmli, 1977.
	Nucleoides	126	24,000	Jackson <i>et al.</i> , 1990.
	Espermatozoides	27	111,000	Barone <i>et al.</i> , 1994.
Pollo (<i>Gallus gallus</i>)	Eritrocitos	45	27,000	Ganguly <i>et al.</i> , 1983.
Mosca de la fruta (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Células GMICB	85	2,000	Benyajati y Worcel, 1976.
Hamster chino (<i>Cricetulus griseus</i>)	Células CHO	140	17,000	Hartwig, 1982.

Tabla 2. Número de LARs por núcleo y tipo celular en distintas especies.

Para obtener el número de LARs presentes por genoma haploide hay que dividir la

longitud del genoma del organismo en estudio (*Rattus norvegicus* 2743.3 Mb, *Mus musculus* 2671.82 Mb, *Drosophila melanogaster* 143.726 Mb, *Homo sapiens* 2996.42 Mb, *Gallus gallus* 1230.26 Mb, *Cricetulus griseus* 2360.13 MB) entre el tamaño promedio del bucle de cada tipo celular (hay que tener presente que dos bucles de DNA están definidos por tres anclajes debido a que comparten el anclaje central). En la tabla se aproximaron los valores al millar más cercano al resultado. P80- 80 días de vida del organismo. P540- 540 días de vida del organismo.

Por ejemplo, en un estudio comparativo entre neuronas y hepatocitos de la rata la longitud promedio de los bucles (hepatocitos 82 kb, neuronas 48 kb) resultó ser tejido específica, a pesar de que se trata de la misma secuencia de nucleótidos, lo que implica que hay factores independientes que influyen en esta organización (Silva-Santiago, *et al.*, 2017 A, B). No debemos olvidar que estos valores (Tabla 2) son el promedio de una población y que dentro de un nucleoide la longitud de los bucles puede ser muy diversa, por ejemplo: en nucleoides de células HeLa el tamaño promedio del bucle es de 123 kb, pero de manera particular los bucles de DNA pueden medir entre las 5-200 kb (Tabla 2) (Jackson, *et al.*, 1990), algo similar sucede con espermatozoides humanos ya que el tamaño promedio de los bucles es de 27 kb; sin embargo, se han encontrado bucles más pequeños (Barone, *et al.*, 1994; Schmid, *et al.*, 2001). Si bien en *Drosophila melanogaster* el tamaño del bucle promedio es de 85 kb (Benyajati & Worcel, 1976) en el cluster de los genes codificantes para las histonas el tamaño de los bucles de DNA es de ≈ 5 kb (Mirkovitch *et al.*, 1984). Incluso en el cromosoma

mitótico la longitud de los bucles de DNA oscila entre las 30-90 kb (Paulson & Laemmli, 1977). Cada uno de los bucles de DNA está definido por dos LARs, por lo que podemos calcular que existen entre $\approx 30,000$ -110,000 LARs por célula dependiendo del tejido y la especie (Tabla 2). Por otra parte, que el número de anclajes sea tejido específico, a pesar de que la misma secuencia genómica se encuentra en todos los núcleos celulares, pone en evidencia el uso selectivo de los mismos.

III. CONFIGURACIÓN EN BUCLES ESTRUCTURALES

In situ las regiones de anclaje a la MN se han clasificado en forma operacional como constitutivas si resisten a la extracción con altas concentraciones de sal, y definen bucles estructurales de DNA, y transitorias o facultativas si no resisten dicha extracción, estas últimas definen bucles facultativos (Ottaviani, *et al.*, 2008; Razin, 2001). Es decir: en este modelo se propone la existencia de bucles facultativos y estructurales. En los bucles facultativos los anclajes y estructura está definida por proteínas de la cromatina, que regulan la actividad transcripcional de los genes contenidos en estos bucles; sin embargo, al aplicar la extracción con altas concentraciones de sal las proteínas de la cromatina se eliminan y se revelan los bucles estructurales, cuyos anclajes se denominan LARs y están determinados por la interacción del DNA con las proteínas de la MN (Ottaviani, *et al.*, 2008; Razin, 2001). En el nucleoide los LARs definen los límites de bucles estructurales de DNA. En el laboratorio se diseñó un método mediante el cual es posible

determinar la configuración en bucles estructurales de cualquier región genómica (Rivera-Mulia & Aranda-Anzaldo, 2010) (Figura 3).

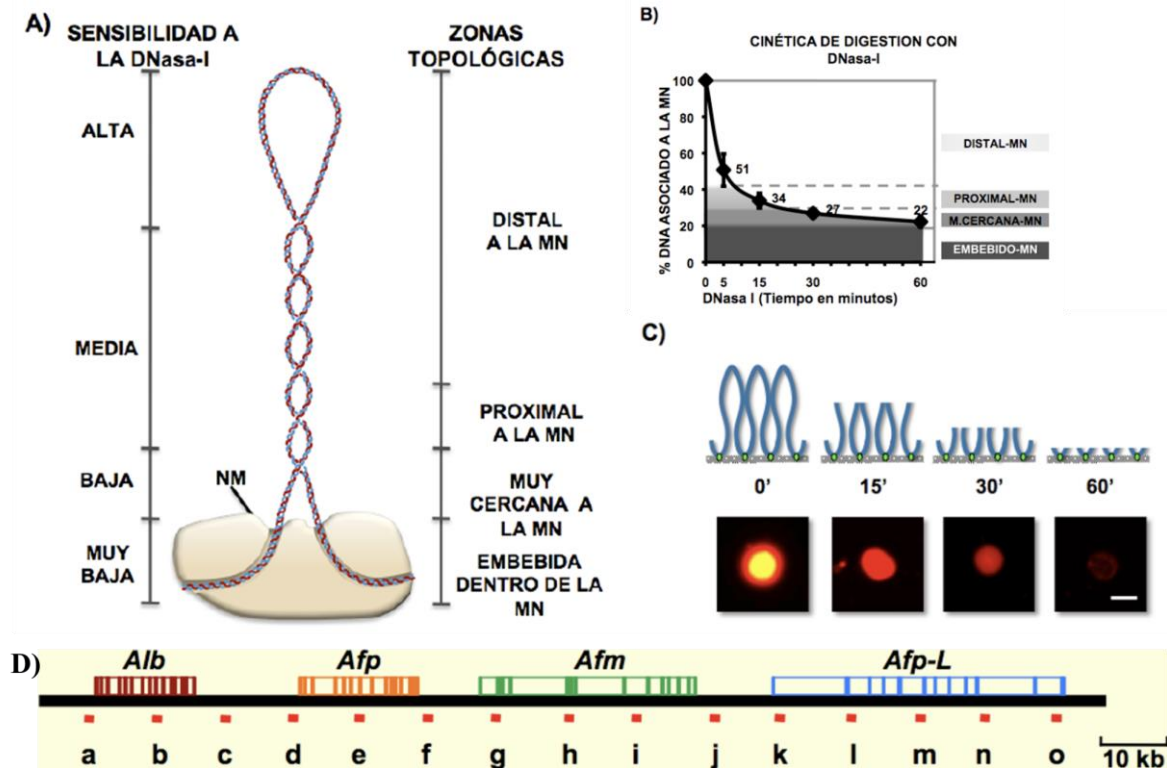


Figura 3. Método de mapeo topológico de los bucles estructurales. A) Los bucles de DNA presentan una sensibilidad inversamente proporcional a su cercanía a la MN cuando son digeridos con DNasa I, por lo tanto, B) la cinética de digestión puede asociarse con la proximidad del DNA a la MN, lo cual permite asignar zonas topológicas a dicha cinética. Por otra parte, D) si se diseñan pequeños amplicones a lo largo de una región genómica y C) se amplifican por PCR en muestras tomadas a diferentes tiempos de la digestión, puede asociarse la amplificación positiva o negativa de tales amplicones con su posición respecto a la MN. Finalmente, se unen los puntos ubicados en el espacio tomando como referente a la MN para obtener la configuración en bucles estructurales de cualquier región genómica (Figura 4) (Rivera-Mulia & Aranda-Anzaldo, 2010).

Con este método se caracterizó la configuración en bucles estructurales del locus de la familia albúmina en hepatocitos, linfocitos y neuronas de rata, la cual resultó ser tejido específica (Rivera-Mulia & Aranda-Anzaldo, 2010; Silva-Santiago, *et al.*, 2017-A) (Figura 4).

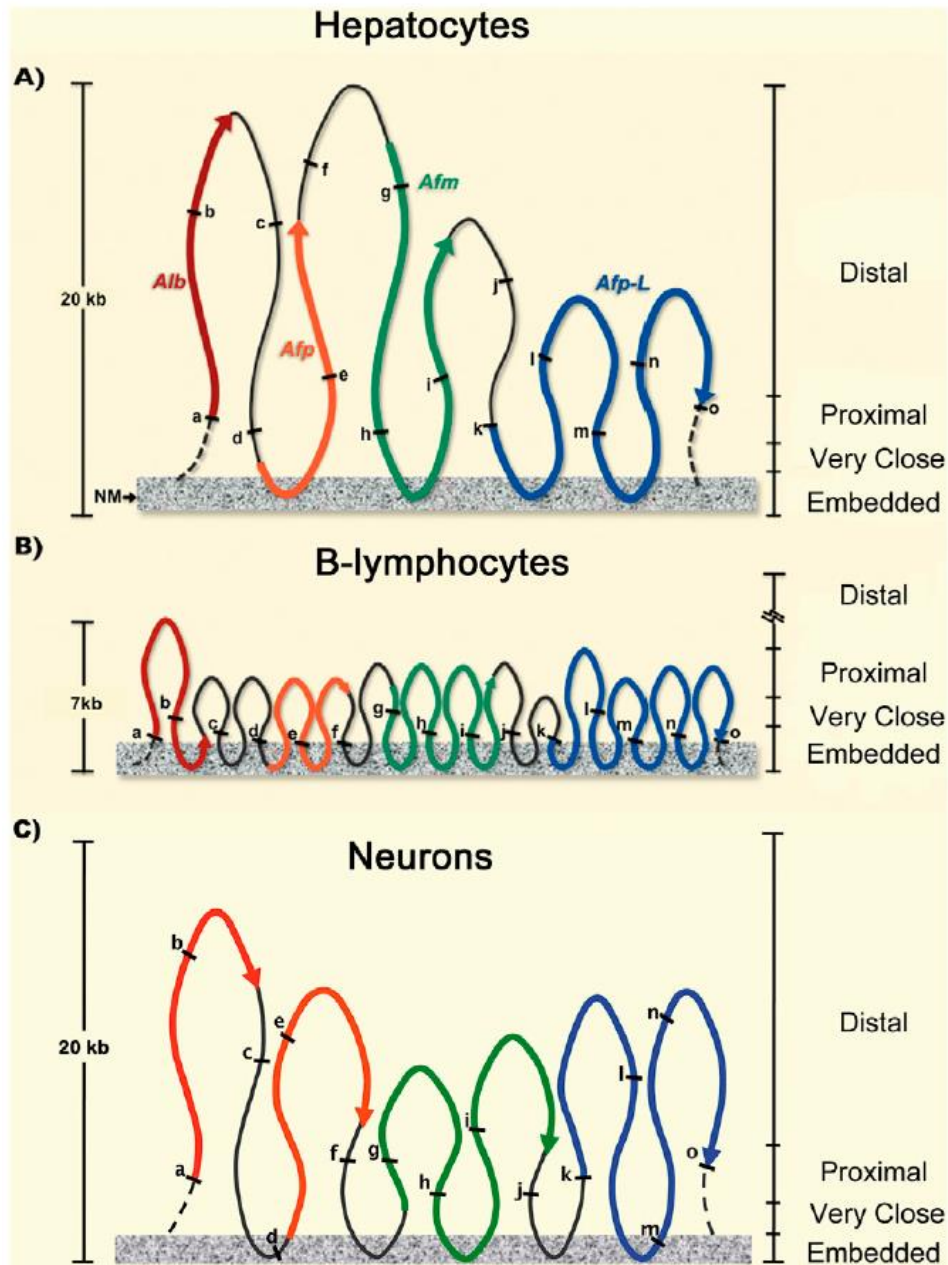


Figura 4. Configuración en bucles estructurales del locus multigénico de la familia albúmina en A) hepatocitos, B) Linfocitos y C) Neuronas de rata. (Rivera-Mulia & Aranda-Anzaldo, 2010; Silva-Santiago, *et al.*, 2017-B).

Del mismo modo, la posición de ocho regiones genómicas localizadas en seis cromosomas distintos en hepatocitos y linfocitos de rata también resultó ser tejido específico (Trevilla-Garcia & Aranda-Anzaldo, 2011), lo que indica que a nivel genómico también se observa la especificidad. Se ha propuesto que la asociación del DNA con la MN induce activación transcripcional; sin embargo, la configuración en bucles estructurales del gen *Fyn* en hepatocitos y linfocitos de rata resultó ser tejido específica a pesar de que el gen se encuentra activo en los dos tipos celulares (Trevilla-Garcia & Aranda-Anzaldo, 2012). También, se ha visto que una sola unidad de transcripción puede estar organizada en varios bucles (Iarovaia, *et al.*, 2004). Esta evidencia sugiere que la configuración en bucles estructurales no parece tener efecto en el estado transcripcional del gen o grupos de genes contenidos y es la transcripción, mediante la asociación de proteínas de la cromatina, la que tiene que adaptarse a las diferentes configuraciones de bucles estructurales presentes en la célula (Trevilla-Garcia & Aranda-Anzaldo, 2012). No hay que olvidar que las proteínas de la cromatina al asociarse a los bucles estructurales pueden formar bucles facultativos asociados con la MN, cuya estructura participe en la regulación de la actividad transcripcional de los genes contenidos en esos bucles (Ver sección “anclajes transitorios y facultativos” en introducción y sección “correlación entre los bucles estructurales y bucles facultativos” en la discusión de resultados). Al estudiar los cambios en las interacciones DNA-MN respecto al tiempo se encontró que la concentración de proteínas de MN incrementó durante el envejecimiento de la rata y también se modificó la posición de seis genes localizados en cuatro cromosomas distintos. Además, disminuyó el tamaño del halo de nucleoides en hepatocitos de ratas viejas respecto a jóvenes, lo que implica un incremento sustancial en el número de

LARs respecto al tiempo (Tabla 2) (Maya-Mendoza, *et al.*, 2005). Por otra parte, modificaciones en la morfología de la célula indujeron la actualización de un nuevo LAR, en el locus de las protaminas, y el cese de interacción DNA-MN en un LAR previamente establecido (Martinez-Ramos, *et al.*, 2005). Estos resultados indican que la configuración en bucles estructurales, además de ser tejido específico e independiente del estado transcripcional de los genes contenidos en los bucles de DNA, es dinámica en el mediano y largo plazo.

Si la relación DNA-MN tuviera alguna función biológica, esta estaría sujeta a la selección natural y, por lo tanto, habría selección positiva sobre ella y debería estar conservada cuando menos en especies cercanas. Para probar esta hipótesis se comparó la relación topológica de varias regiones de DNA localizadas en distintos cromosomas en células pertenecientes al mismo tejido, pero de diferente especie (Silva-Santiago, *et al.*, 2017-A). El patrón topológico de las secuencias determinado en hepatocitos de rata y de ratón resultó ser especie específico, por lo tanto, deben ser procesos físicos, independientes a la biología, los que establecen estas interacciones.

Se ha propuesto un modelo en el que las interacciones DNA-MN están dirigidas por parámetros termodinámicos como la entropía y el estrés torsional del DNA (Aranda-Anzaldo, 2016). Este es un modelo dialéctico en el que las interacciones DNA-MN están dirigidas por estas fuerzas, pero son también estas interacciones las que disipan el estrés estructural que sufre el DNA y evitan que este se fracture debido a la presión que ejercen las mismas. Este modelo proporciona una base

teórica que permite explicar cómo se dan las interacciones DNA-MN y las características mecánicas del núcleo.

IV. ANCLAJES DE BUCLES ESTRUCTURALES LARS

Una de las características principales de los LARs es que son regiones que resisten la digestión con nucleasas debido a que se encuentran embebidas en la MN. Los LARs son tejido específico y ocurren en gran número en el núcleo de la célula (Tabla 2), representan entre el 1-6% del DNA total y miden entre 0.1-3 kb (Jackson, *et al.*, 1990; Pathak, *et al.*, 2014). En esta área de investigación siempre se ha pensado que debería existir una secuencia común que defina las interacciones DNA-MN (Boulikas, 1996); sin embargo, no ha logrado determinarse después de más de 40 años de intensa investigación. Por el contrario, la gran cantidad de datos recolectados apunta a que las interacciones DNA-MN no dependen directamente de la secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, se demostró que la complejidad de secuencia del DNA asociado a matrices nucleares es exactamente la misma que la del DNA total (Basler, *et al.*, 1981; Pardoll & Vogelstein, 1980; Kuo, 1982) y no se encontró un motivo que defina la totalidad de los 9215 LARs, secuenciados a nivel de genoma completo, identificados en *Drosophila melanogaster* (Pathak, *et al.*, 2014). La diferencia en la cantidad de los LARs presentes en distintos tejidos de la rata (a pesar de que se trata de la misma secuencia de nucleótidos) (Tabla 2) (Rivera-Mulia & Aranda-Anzaldo, 2010; Silva-Santiago, *et al.*, 2017 A, B) (Figura 4), hace evidente que deben ser otros factores los que definen las interacciones DNA-MN, como podría ser el hecho de que

existen proteínas de MN que son comunes a todos los tejidos pero también aquellas que son tejido específicas (Dickinson, 1992; Fey & Penman, 1988; Stuurman, *et al.*, 1990; von Kries, *et al.*, 1991) lo que podría proporcionar un sustrato diferencial para la formación de los LARs. Las interacciones DNA-MN son dinámicas, ya que cambios en la morfología nuclear inducen la reorganización de bucles estructurales que resultan en la sustitución de los LARs previos por nuevas interacciones DNA-MN (Martinez-Ramos, *et al.*, 2005). Se ha observado que durante el envejecimiento de la rata el número de LARs se incrementa al mismo tiempo que lo hacen las proteínas de MN (Maya-Mendoza, *et al.*, 2005) (Tabla 2). En este proceso las interacciones DNA-MN se volvieron más estables, ya que los nucleoides extraídos de hepatocitos de ratas recién nacidas, al ser sometidos al ensayo de expansión del halo con bromuro de etidio pierden totalmente su estructura, lo que no sucede con los nucleoides de hepatocitos de ratas adultas (Maya-Mendoza, *et al.*, 2005). Para estudiar el comportamiento de los anclajes *in vivo* se insertaron en tandem varias copias de un LAR identificado en el locus de las protaminas, como resultado se observó que sólo algunas de las copias terminaron asociándose a la MN, lo que indica que hubo una selección de los anclajes que es totalmente independiente de la secuencia (Heng, *et al.*, 2004).

V. ANCLAJES TRANSITORIOS O FACULTATIVOS

Los anclajes transitorios o facultativos están mediados por proteínas accesorias de la cromatina y la mayoría están relacionados con regulación transcripcional. Como se mencionó anteriormente, estos anclajes no resisten la extracción con altas

concentraciones de sal y no son objeto directo de estudio del presente trabajo de investigación; sin embargo, es importante tener en perspectiva cuál es la interrelación que existe entre los anclajes transitorios-facultativos y los LARs. En el modelo (ver sección anclajes de bucles estructurales LARs) se propone que los bucles facultativos se organizan sobre los bucles estructurales de DNA (en los que los anclajes están definidos por las proteínas de MN). Por lo tanto, se describen brevemente dos ejemplos de anclajes transitorios o facultativos.

Se ha relacionado la formación de los anclajes o el acercamiento de las secuencias a la matriz nuclear como una manera de activar la transcripción de un gen. Esta afirmación es cierta para algunos anclajes transitorios o facultativos. Por ejemplo: Pit 1 es un factor de transcripción necesario para la diferenciación celular durante el desarrollo de la glándula pituitaria. Se demostró que es necesario que Pit1 se una al DNA y posteriormente interactúe con Matróna 3 (una proteína de MN) para poder activar sus genes blanco (Skowronska-Krawczyk, *et al.*, 2014). Por otra parte, está demostrado que la asociación de regiones genómicas a proteínas de MN resulta en el silenciamiento de los genes contenidos en dichas regiones. Por ejemplo: la proteína cKrox después de reconocer una secuencia de 10-40 pb rica en G-A, forma un complejo con HDAC3 y Lap2 β , que resulta en el reclutamiento de la región a la lámina nuclear y en el silenciamiento del gen o grupo de genes contenidos en esa sección del DNA (Zullo, *et al.*, 2012). Cabe aclarar que ni Pit 1 ni cKrox permanecen asociadas a la MN después del proceso de extracción para MN (Engelke, *et al.*, 2014), por lo que podemos asumir que los anclajes son eliminados por el proceso de extracción de MN y, por lo tanto, cumplen con la definición operacional de anclajes transitorios o facultativos. En la

sección de discusión de resultados se amplía este punto y se hacen propuestas para establecer la relación entre los dos tipos de anclajes.

VI. ENSAYOS DE AFINIDAD *IN VITRO* DE FRAGMENTOS DE DNA POR LA MN

En los estudios clásicos se les denominó de manera indistinta MARs (matrix attachment region), a regiones de DNA que *in vitro* presentaron afinidad por la MN o que permanecieron asociadas a la MN después de la digestión de nucleoides con enzimas de restricción (Figura 5) (Cockerill & Garrard, 1986).

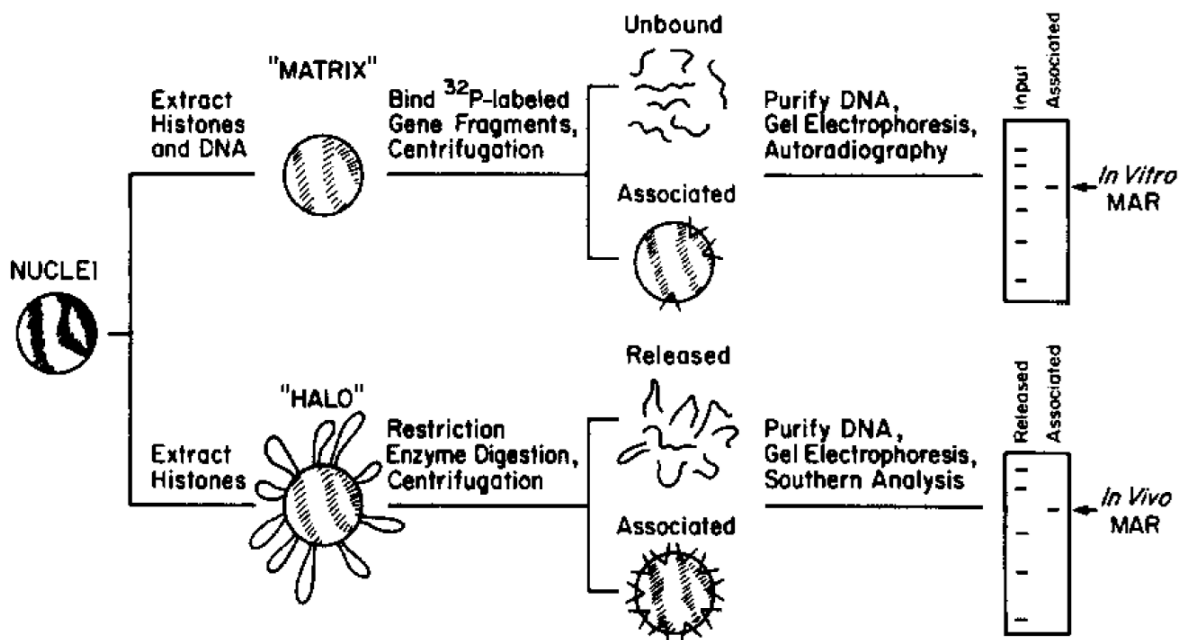


Figura 5. Diseño experimental para determinar MARs. En la parte superior: a partir de núcleos se extraen matrices nucleares con detergentes no iónicos, 2M de NaCl y digestión con DNAsa I. Fragmentos de DNA marcado se incuban con las matrices en presencia de DNA de *E. coli* como competidor, se centrifuga y se revela la presencia de las secuencias de interés en la fracción unida a la matriz nuclear (pellet) o en el sobrenadante. En la parte inferior: los nucleoides son

digeridos con enzimas de restricción. Se recolecta el DNA que permanece unido a las matrices nucleares y el liberado a la solución, posteriormente se determina en cuál de las dos fracciones se encuentra la secuencia de interés (Cockerill & Garrard, 1986).

Ambos enfoques arrojaron resultados contradictorios, ya que secuencias que daban resultados positivos con el primero daban negativos en el segundo y viceversa. Además, algunos de los MARs caracterizados *in vitro* no se encontraron asociados a la matriz nuclear cuando se buscaron *in situ* (Avramova & Paneva, 1992). Es decir, varios de los MARs caracterizados *in vitro* no eran LARs *in situ*. Otra de las contradicciones de este tipo de estudios consiste en que, en el mismo experimento, las regiones de DNA se encontraron asociadas a la MN (pellet) y estuvieron presentes en el sobrenadante. Desde nuestro punto de vista existen varias limitantes que podrían ser las causales de los resultados contradictorios. Los LARs están definidos operacionalmente como los anclajes de bucles estructurales que resisten a la extracción con altas concentraciones de sal, por lo tanto, la asociación de cualquier fragmento de DNA por la matriz nuclear *in vitro* debe resistir condiciones similares para suponer que se trata del mismo tipo de interacción; sin embargo, debe resaltarse que en ninguna de las técnicas descritas se retó la afinidad de los fragmentos de DNA por la matriz nuclear por lo que podrían tratarse de distintos tipos de interacciones. En el caso de los nucleoides digeridos con enzimas de restricción, si bien las enzimas utilizadas se consideran de corte frecuente no hay certeza de que corten en la base de los bucles de DNA y, por lo tanto, es muy probable que fragmentos de DNA pertenecientes al cuerpo

del bucle permanezcan asociadas a la matriz nuclear después de la digestión. Por otra parte, los fragmentos de DNA liberados a la solución como producto de la digestión con las enzimas de restricción podrían reasociarse de forma espuria a la MN debido a que no se realizaron lavados con alta fuerza iónica.

A pesar de las inconsistencias experimentales se dedujo que los MARs tienen una longitud de entre 100 y 2000 pb, son regiones de DNA, ricas en AT, algunos tienden a desaparecer, curvarse o formar estructuras secundarias, pueden contener motivos de reconocimiento para topoisomerasa II y, en ocasiones, son ricos en secuencias repetidas (Boulikas, 1993; Ottaviani, *et al.*, 2008). Hay que resaltar que no todos los MARs presentan estas características, la mayoría sólo presenta alguna o algunas de ellas. A partir de esta información se desarrollaron programas computacionales para tratar de predecir los MARs de una región genómica (Frisch, *et al.*, 2003; Glazko, *et al.*, 2001; Singh, *et al.*, 1997). Sin embargo, estos programas mostraron escaso valor predictivo, ya que la mayoría de los MARs caracterizados *in silico* no se encontraron asociados a la matriz nuclear cuando se buscaron *in vivo* (Evans, *et al.*, 2007). Estos estudios demostraron que si bien existen regiones del DNA con afinidad por la matriz nuclear (MARs), esta afinidad no es suficiente para que estas regiones formen los anclajes *in vivo*. A pesar de que se han caracterizado múltiples MARs no se ha encontrado una secuencia que los defina, por lo que debe haber factores independientes de la secuencia de nucleótidos que determinen las interacciones DNA-MN.

VII. AFINIDAD GENÉRICA DEL DNA POR LA MN

La visión dominante en el campo se centraba en la existencia putativa de una secuencia que definiera las interacciones DNA-MN y, por lo tanto, los resultados obtenidos de las técnicas experimentales a partir de las cuales se caracterizaron los MARs, se interpretaron bajo esta perspectiva (Boulikas, 1996). Al no encontrar una secuencia o grupo de secuencias que definieran las interacciones DNA-MN los grupos de investigación prestaron atención a otro tipo de características presentes en el DNA, como son: el contenido de AT y GC, la capacidad de curvarse o doblarse, DNAds y DNAss y el hiperenrollamiento (Boulikas, 1993; Ottaviani, *et al.*, 2008). Si bien, en algunos reportes demuestran que algunos fragmentos de DNA se unen con mayor afinidad que otros, prácticamente todos lo hacen en alguna medida. Desde nuestra perspectiva, si abandonamos el paradigma vigente, los resultados en conjunto ponen en evidencia que la MN tiene una afinidad intrínseca por el DNA y el RNA. Por ejemplo: se realizaron ensayos con proteínas de matriz nuclear o matrices nucleares completas (Hibino, *et al.*, 1992; Kay & Bode, 1994; Tsutsui, *et al.*, 1988) o proteínas de matriz nuclear específicas, como: láminas, NuMa (Kiledjian & Dreyfuss, 1992; Ludérus, *et al.*, 1994; Shoeman & Traub, 1990), Saf-A (Fackelmayer, *et al.*, 1994; Kiledjian & Dreyfuss, 1992; Romig, *et al.*, 1992) Matrina 3 (Hibino *et al.*, 2006) y se encontró que en conjunto la MN puede unirse a secuencias ricas en AT y en GC, DNAss y DNAss, DNA superenrollado o con tendencia a curvarse, y RNA (Erazo & Goff, 2015; Fackelmayer, *et al.*, 1994; Hacısuleyman, *et al.*, 2014; Hall, *et al.*, 2014; Hasegawa, *et al.*, 2010; Hibino, *et al.*, 2006; Nickerson, *et al.*, 1989; Nozawa & Gilbert, 2014; Yugami, *et al.*, 2007). Estos resultados ponen en evidencia que la

MN tiene afinidad por prácticamente cualquier tipo de ácido nucleico. Es importante recalcar que en ninguno de los artículos referidos se ha reportado una secuencia consenso que defina las interacciones DNA-MN, por el contrario, si se descarta esa opción, resulta evidente que las proteínas de MN tienen una afinidad que tiende a ser genérica tanto por el DNA como por el RNA.

En algunas proteínas de MN se han identificado los sitios de interacción con DNA y RNA, por ejemplo: matrina 3, una proteína clásica de matriz nuclear, contiene dos sitios de reconocimiento a DNA con motivos dedos de zinc y dos sitios de unión a RNA (Hakes & Berezney, 1991; Hibino, *et al.*, 2006) y Saf-A tiene un sitio que une DNA que actúa de forma independiente de un sitio que une RNA (Göhring, *et al.*, 1997). Esto indica que algunas de las proteínas de MN tienen una gran diversidad de interacción. La unión del RNA a las proteínas de MN se da principalmente mediante el dominio RGG/RG (arginine/glycine rich domains), este es el segundo dominio de unión a RNA más común (Gerstberger, *et al.*, 2014) y se encuentra preferentemente en ribonucleoproteínas (hnRNP) (Fornerod, 2012), es el único dominio de unión a RNA identificado en la proteína de MN SAF-A (Kiledjian & Dreyfuss, 1992). Es un dominio intrínsecamente desordenado y su afinidad por el RNA se ha descrito como de especificidad degenerada, cuyo reconocimiento a RNA si bien no es indiscriminado tiene una amplia flexibilidad tanto de secuencias como de estructuras (Ozdilek, *et al.*, 2017). Por otra parte, en los estudios de interacción DNA-MN se observó afinidad de plásmidos hiperenrollados y DNA lineal (Kay & Bode, 1994; K. Tsutsui, *et al.*, 1988), por lo que la topología del DNA es también un factor que influye en el proceso de interacción DNA-MN (Aranda-Anzaldo, 2016).

VIII. PROTEÍNAS DE MN

Las proteínas de MN ejercen un papel estructural en el núcleo de la célula; sin embargo, también tienen otras funciones. A pesar de que la composición de la matriz nuclear es tejido específica (Fey & Penman, 1988), existe un gran grupo de proteínas que es compartido por todas las células (Stuurman, *et al.*, 1990). Recientemente se definió un set de 272 proteínas que forman el core de la matriz nuclear (Engelke, *et al.*, 2014). Esto implica un gran número de interacciones proteína-proteína, pero se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* que proteínas pertenecientes a la MN pueden interactuar tanto con DNA como con RNA (Göhring, *et al.*, 1997; Hibino, *et al.*, 2006). Inclusive muchas de las asociaciones proteína-proteína podrían estar mediadas por DNA y RNA, ya que fueron identificadas por técnicas que no diferencian las interacciones directas y las mediadas por ácidos nucleicos. La descripción de las interacciones de las proteínas de matriz nuclear es vasta y va en aumento por lo que aquí se mencionan solo algunos ejemplos. Las láminas (lámina A/C, lámina B1 y B2) son proteínas pertenecientes a los filamentos intermedios, están codificadas por los genes LMNA, LMNB1 y LMNB2, la lámina C es producto de splicing alternativo del transcrito del gen de la lámina A. Las láminas, además de encontrarse adosadas a la cara interna de la envoltura nuclear se dispersan hacia el interior del núcleo y pueden formar estructuras bien organizadas similares a canales, por los cuales transitan las moléculas necesarias para llevar a cabo el metabolismo nuclear (Legartová, *et al.*, 2014). *In vitro* tienen afinidad de unión por distintos tipos de oligonucleótidos (Shoeman & Traub, 1990), *in vivo* unen los telómeros a la envoltura nuclear (Ludérus, *et al.*, 1996) e interactúan con el DNA para formar

bucles de cromatina mediante regiones denominadas LADs (Peric-Hupkes & van Steensel, 2010). Las láminas son cuantitativamente uno de los elementos más importantes de la MN (Engelke, *et al.*, 2014; Fey & Penman, 1988) e interactúan directamente con el DNA para formar los anclajes de bucles estructurales (LARs). Las láminas también se asocian con un grupo de proteínas conocidas como LINC proteins (links nucleoskeleton-cytoskeleton) (Simon & Wilson, 2011).

Un gran número de proteínas están asociadas a la envoltura nuclear, sin embargo, sólo dos grupos atraviesan el espacio perinuclear y conectan el interior del núcleo con el citoplasma. Estos complejos proteicos corresponden a las LINC proteins y el complejo del poro nuclear. Las LINC proteins (links nucleoesqueleto-citoesqueleto) son proteínas que al unirse forman un complejo que atraviesa la envoltura nuclear, corresponden en mamíferos, a las Nesprinas y proteínas SUN (Sad1 and UNC-84 domain-containing proteins) (Horn, 2014). Las Nesprinas mediante el dominio que queda expuesto al citoplasma interactúan con actina (nesprina 1-2), microtúbulos (nesprina 3-4) y filamentos intermedios (nesprina 3), a su vez las proteínas SUN, mediante el dominio que exponen al nucleoplasma, se unen a emerina, láminas y la cromatina (Simon & Wilson, 2011). Las proteínas SUN son parte de las proteínas de MN (Engelke, *et al.*, 2014), están codificadas por 5 genes (SUN1-5), de las cuales SUN 1 y SUN 2 se expresan en prácticamente todas las células somáticas de mamíferos, mientras que SUN 3, 4 y 5 se expresan principalmente en espermatozoides (Hieda, 2017). Si a este cúmulo de interacciones se añaden las uniones celulares, podemos apreciar la existencia de una red (DNA-láminas-LINCproteins-citoesqueleto-uniones celulares), capaz de transmitir señales mecánicas, que se extiende desde células adyacentes y la

matriz extracelular hasta el interior del núcleo de la célula (Simon & Wilson, 2011). Por su parte, el complejo del poro nuclear es una estructura que permite el intercambio de moléculas entre el citosol y el núcleo de la célula, está constituido por cerca de 30 proteínas llamadas nucleoporinas, de las cuales, Nup 43, 62, 85, 88, 93, 98, 107, 133, 153, 160, 188, 210, 214 se han identificado como parte de la MN (Engelke, *et al.*, 2014).

SAF-A es una de las proteínas clásicas de matriz nuclear, en el ser humano el gen se encuentra en el cromosoma 1 y se expresa prácticamente en todos los tejidos (<https://www.proteinatlas.org/>). Posee un sitio de interacción con DNA y un sitio que une RNA mediante un dominio RGG/RG ubicado en el extremo carboxilo terminal (arginine/glycine rich domains) (Kiledjian & Dreyfuss, 1992). Ambos sitios actúan de manera independiente (Göhring, *et al.*, 1997). *In vitro* SAF-A es capaz de polimerizar y formar complejos similares a los bucles de DNA (Fackelmayer, *et al.*, 1994), *in vivo* al polimerizar y asociarse a RNA regula la estructura de la cromatina (Hasegawa, *et al.*, 2010; Nozawa, *et al.*, 2017, ver sección RNA y MN), además, incrementa la expresión de genes específicos debido a que estabiliza RNAm (Yugami, *et al.*, 2007) y está involucrado en la edición de los transcritos porque regula la maduración de la proteína de splicing U2 (Xiao, *et al.*, 2012). Mutaciones en el gen de SAF-A están asociadas a encefalopatía epiléptica, convulsiones y retraso intelectual (Bramswig, *et al.*, 2017).

Matrina 3 fue una de las primeras proteínas de MN en ser caracterizada, tiene una distribución granular hacia el interior del núcleo (con excepción del nucléolo) y se ha determinado que tiene dos sitios de unión a DNA y dos sitios de unión a RNA

(Hibino, *et al.*, 2006). Se predice que el resto de la secuencia sería altamente desordenada por lo que podría mediar un gran número de interacciones proteína-proteína. Además de ser parte intrínseca de la matriz nuclear está implicada en procesos como regulación de la transcripción, estabilidad y edición de transcritos, reparación del DNA y proliferación celular (Coelho, *et al.*, 2016).

NuMa (nuclear mitotic apparatus) es una proteína que participa en la formación del uso mitótico durante la división celular y está distribuida ampliamente en el núcleo de células en interfase como parte de la matriz nuclear (Radulescu & Cleveland, 2010). NuMa interactúa con DNA (Ludérus, *et al.*, 1994) y puede formar hexámeros que pueden servir de centros organizadores de carácter estructural al interactuar con otras proteínas y con DNA (Harborth, *et al.*, 1999).

IX. RNA Y MN

El RNA es uno de los principales organizadores de la estructura de los cromosomas en interfase, su eliminación mediante tratamiento con RNAsas resulta en una profunda desorganización al interior de los cromosomas (Nickerson, *et al.*, 1989) y la disrupción de los territorios cromosómicos (Ma, *et al.*, 1999). La matriz nuclear está compuesta de aproximadamente 1.1% de RNA (Tabla 1), considerado RNA heterogéneo nuclear, el tratamiento con RNAsas causa la disgregación de la red interna de proteínas y el nucléolo residual (Herman, *et al.*, 1978). Lo anterior indica que a pesar de que el RNA representa un bajo porcentaje de la composición de la matriz nuclear tiene un alto valor estructural.

Recientemente se han caracterizado algunos de los RNAs que organizan y le confieren estructura a la cromatina. Muchos de estos RNAs copurifican en preparaciones para matriz nuclear o interactúan con proteínas que pertenecen a ésta. Se identificó mediante COT-1, una sonda que reconoce RNAs pertenecientes a zonas altamente repetitivas del genoma (SINEs y LINEs), que estos RNAs se asocian con la cromatina en interfase de células de mamífero (Hall, *et al.*, 2014; Nozawa & Gilbert, 2014). Estos RNAs son parte intrínseca de la matriz nuclear e interactúan con SAF-A para organizar regiones de eucromatina ya que células que no los expresan muestran zonas condensadas de cromatina que no tienen las células control (Nozawa, *et al.*, 2017; Nozawa & Gilbert, 2014). Durante la mitosis se disocian de los cromosomas y los RNAs son sintetizados en G1 para asociarse nuevamente (Hall, *et al.*, 2014). Firre (functional intergenic repeating RNA element) es un RNA largo no codificante (lncRNA) capaz de reclutar *loci* pertenecientes a distintos cromosomas a su propio sitio de transcripción, mediante su asociación con SAF-A (Nakagawa & Hirano, 2014). Se ha propuesto un modelo en el que los transcritos recién sintetizados de Firre se asocian con SAF-A y este a su vez interactúa directamente o mediante proteínas adaptadoras con el DNA (Hacisuleyman, *et al.*, 2014). En el caso de mamíferos, en las hembras es necesario silenciar uno de los dos cromosomas X. El silenciamiento está mediado por un lncRNA conocido como Xist, que al asociarse con SAF-A se acumula a lo largo del cromosoma e induce la formación de heterocromatina. La eliminación de SAF-A causa que Xist se libere al nucleoplasma y no se silencie el cromosoma X (Hasegawa, *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren un modelo en el que el RNA al asociarse con proteínas de matriz nuclear funciona como un factor de organización nuclear. Por otra parte, se

demostró en levaduras y líneas celulares humanas que existen roturas de una sola cadena en el DNA, posicionadas a una distancia aproximada de 50 kb a lo largo de todo el genoma (Székvölgyi, *et al.*, 2006). Estos cortes pueden ser marcados por la DNA polimerasa I pero no por el fragmento Klenow a menos que se realice un tratamiento con RNAsa. Los RNAs posicionados en los nicks forman R-loops que son reconocidos por un anticuerpo dirigido a híbridos DNA-RNA, el marcaje indica que los híbridos se encuentran en la base de los bucles de DNA (Székvölgyi, *et al.*, 2007). Estos datos implican que a lo largo del genoma existen discontinuidades a una distancia promedio de 50 Kb donde se encuentran híbridos DNA-RNA posicionados en la base de los bucles de DNA.

X. POLÍMEROS NATURALES Y LONGITUD DE PERSISTENCIA

Los polímeros son un tipo particular de macromolécula que se caracteriza por tener una unidad, llamada monómero, que se repite a lo largo de la molécula. Al proceso de adición de monómeros se le conoce como polimerización. Cuando están formados por pocas repeticiones de monómeros y su peso molecular es bajo se les llama oligómeros. Si toda las unidades monoméricas son idénticas se denomina homopolímero, pero si este procede de dos o más monómeros se le llama copolímero o heteropolímero. Los polímeros pueden ser lineales, ramificados o entrecruzados (Figura 6). Pueden clasificarse de acuerdo con su origen en sintéticos y biológicos. El grupo de los polímeros biológicos está constituido entre otras sustancias por los polisacáridos, como el almidón y la celulosa, las proteínas y los ácidos nucleicos. El DNA es un heteropolímero debido

a que está formado por cuatro monómeros distintos que corresponden a las bases nitrogenadas: adenina, timina, guanina y citosina.

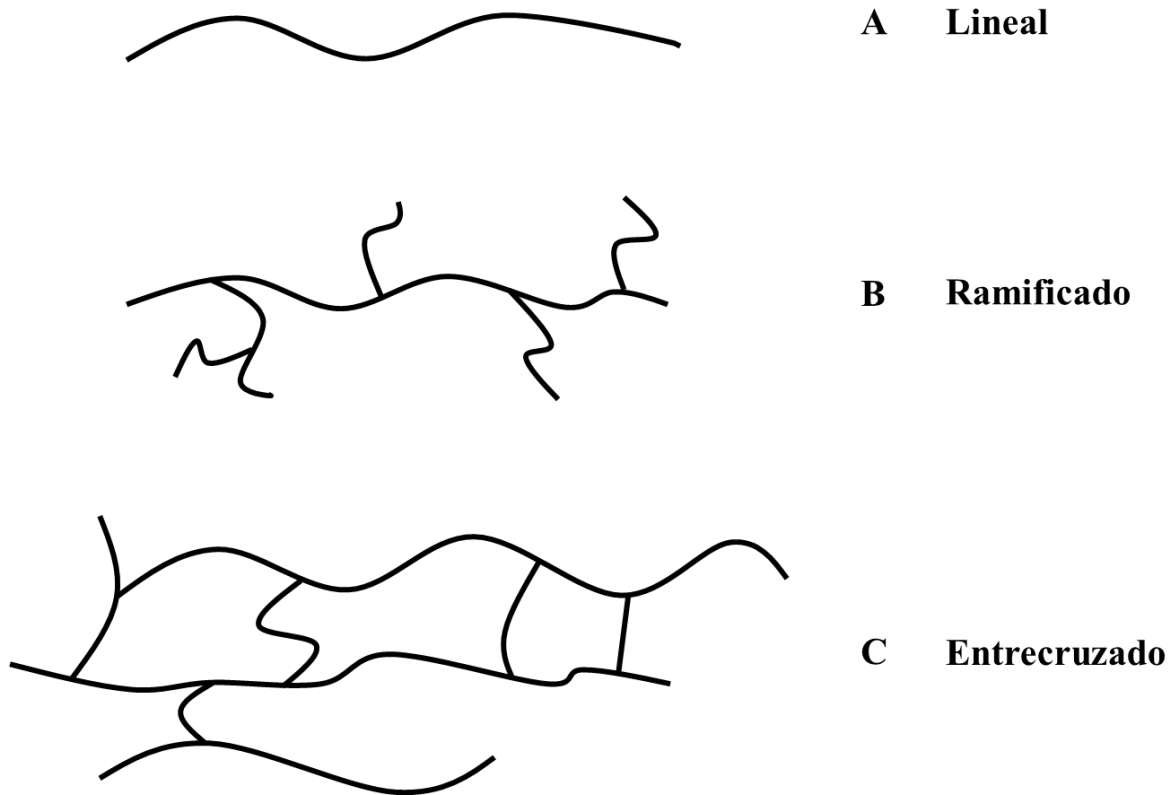


Figura 6. Tipos de polímeros. A) Lineal. B) Ramificado. C) Entrecruzado

La física de polímeros es la rama de la ciencia que se encarga del estudio de las propiedades físicas y mecánicas de los polímeros y utiliza algunos parámetros generales para describir sus propiedades. La longitud del contorno (contour length) (L) describe la longitud del polímero en su máxima extensión física. Corresponde a lo que en geometría se conoce como perímetro. Para el DNA esta medida está relacionada con la distancia genómica (s). Para una doble hélice forma B de DNA, un segmento $s=3$ pb corresponde a una longitud $L=1$ nm. Sin embargo, en solución los polímeros no se encuentran extendidos a todo su largo, adoptan distintas configuraciones que dependen de las propiedades mecánicas

del polímero y de las características de la solución. Por ejemplo, la distancia de punta a punta (R) del polímero en solución es distinta a la longitud del polímero (L) (Figura 7).

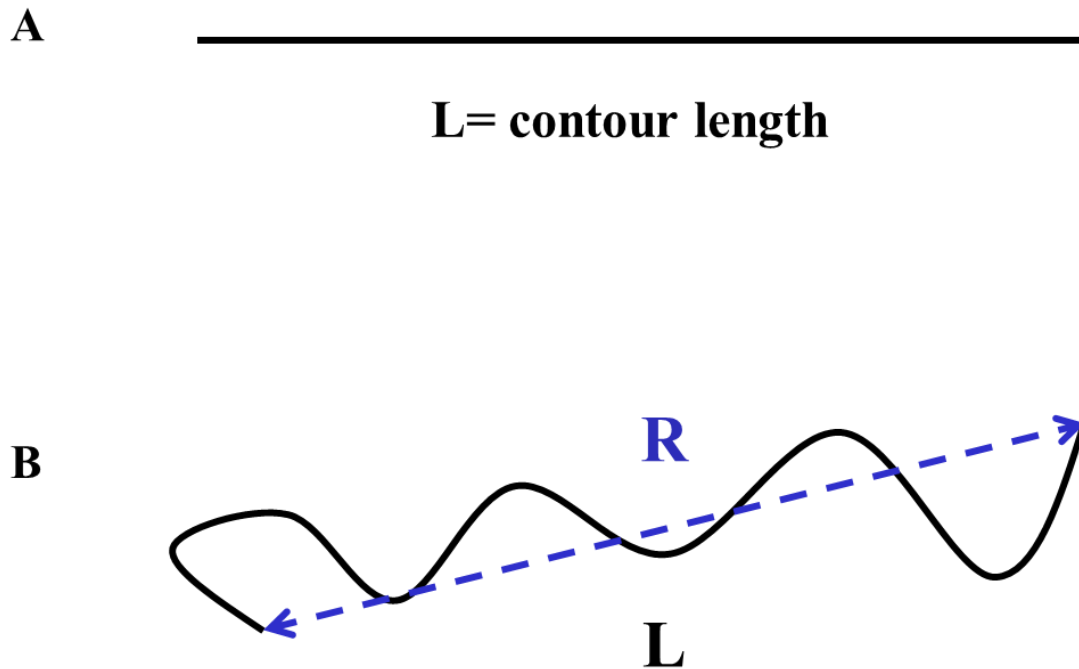


Figura 7. Longitud del contorno (L) y distancia de punta a punta (R).

Debido a lo complicado que es abordar el estudio de las propiedades mecánicas de los polímeros se han desarrollado modelos matemáticos que simplifican el problema y permiten el estudio de su comportamiento. Uno de los elementos matemáticos que permite esta simplificación es la longitud de persistencia (L_p). La longitud de persistencia corresponde a la longitud a la cual el polímero adopta una topología lineal. Matemáticamente está definida como el coseno del ángulo entre dos tangentes a la cadena que han desviado su dirección un radián (Figura 8).

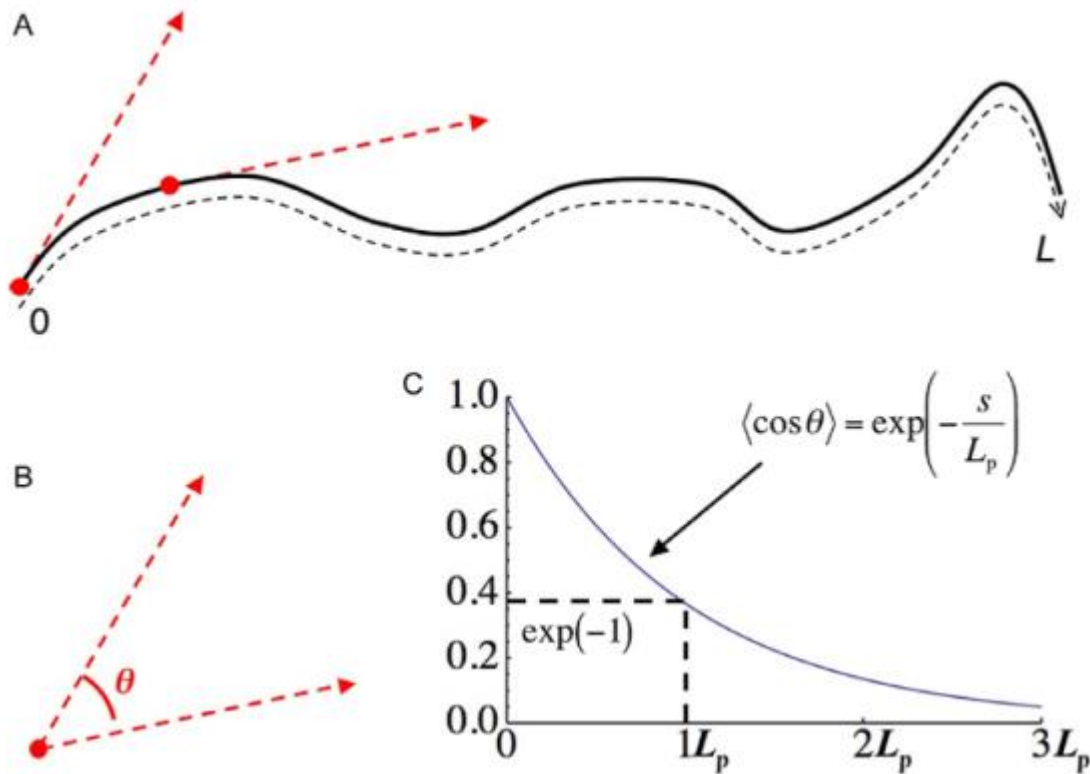


Figura 8. Longitud de persistencia. A) Modelado de un polímero tipo worm-like chain (línea negra). La línea punteada representa la longitud de contorno s del polímero que va de 0 a L . Las líneas rojas representan la tangente respecto a la cadena en dos puntos distintos. B) θ es el ángulo entre las dos tangentes. C) El promedio del coseno de θ de todas las posibles configuraciones del polímero disminuye exponencialmente respecto a s . La tasa a la que disminuye $\exp(-1)$ define la longitud de persistencia L_p (Rosa & Zimmer, 2014).

Si el polímero sobrepasa la L_p , éste comenzará a deformarse. La longitud de Kuhn L_k corresponde a $2 L_p$. Cada segmento de Kuhn puede adoptar una orientación totalmente al azar respecto a sus vecinos (Rosa & Zimmer, 2014) (Figura 9).

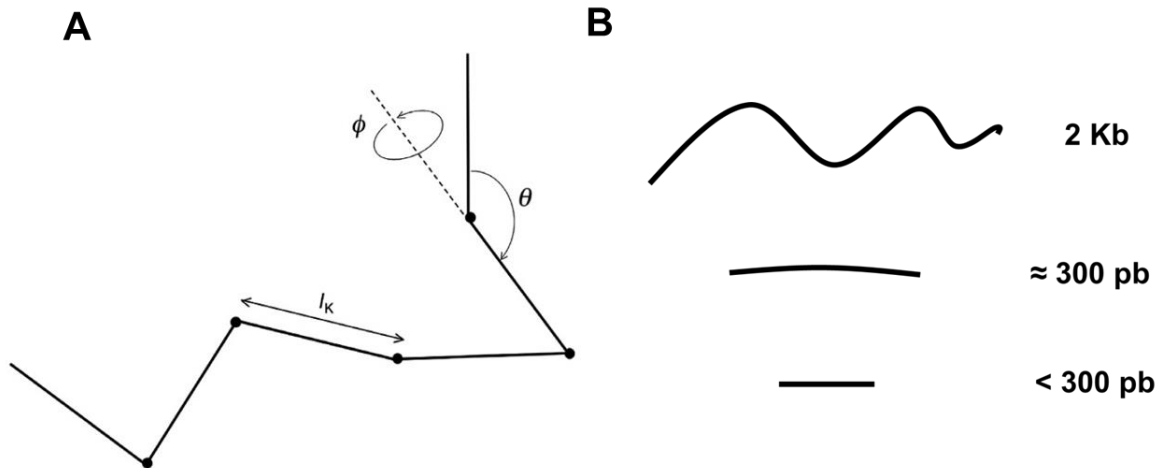


Figura 9. Longitud de Kuhn. A) La longitud de Kuhn corresponde a 2 veces la longitud de persistencia $L_k=2L_p$. Modelado de una cadena libremente articulada (freely jointed chain) compuesta de 6 segmentos de Kuhn de longitud L_k . Cada segmento puede rotar arbitrariamente en el ángulo polar θ y azimutal ϕ respecto a sus vecinos (Rosa & Zimmer, 2014). B) Predicción del comportamiento topológico de 3 segmentos de DNA de diferente longitud.

En el caso particular del DNA la secuencia de los monómeros que contiene no se encuentra dictada al azar y mucho menos demuestra una distribución homogénea a lo largo de la cadena. Se sabe, por ejemplo, que el enriquecimiento de una base en particular en un segmento de la cadena tiene impacto en la flexibilidad del polímero total. Por lo tanto, las mediciones de longitud de persistencia determinadas experimentalmente se presentan en rangos y en el caso del DNA debe especificarse si se trata de una secuencia al azar o si se encuentra enriquecida en alguna base nitrogenada. Existen diferentes técnicas experimentales para determinar la longitud de persistencia de los polímeros. Entre

ellas están: dispersión de luz, dicroísmo fluido, ciclización catalizada por ligasa y pinzas ópticas.

Los valores experimentales de la longitud de persistencia se encuentran en un rango de entre 50 y 200 nm; sin embargo, los promedios experimentales y la longitud de persistencia determinada mediante modelos matemáticos permite establecer una L_p de 150 pb (50 nm) para DNA de secuencia al azar (Calladine, *et al.*, 2004; Travers & Thompson, 2004), por lo que podemos predecir teóricamente el comportamiento topológico de fragmentos de DNA de distinta longitud (Figura 9 B). Existen algunos factores que cambian los valores de L_p experimentalmente. Por ejemplo, la L_p del DNA disminuye conforme se incrementa la fuerza iónica de la solución debido a que los iones al neutralizar las cargas negativas de los grupos fosfato permiten que tanto las cadenas de DNA que forman la doble hélice como las cadenas de DNA adyacentes se acerquen entre ellas.

XI. TÉCNICAS 3 C

Hasta aquí se han descrito las interacciones DNA-MN (LARs) y las características de los bucles estructurales que han sido estudiadas principalmente bajo la técnica de extracción con altas concentraciones de sal. Sin embargo, existe un grupo de técnicas moleculares denominadas 3C (chromosome conformation capture) que al establecer las interacciones físicas entre diferentes *loci* puede reconstruir la imagen en 3D de la cromatina. La familia de herramientas de captura de

conformación del cromosoma (3-4-5 C, HiC) es un set de técnicas bioquímicas que se utilizan para determinar las interacciones funcionales entre distintas regiones genómicas. Difieren principalmente en el método de detección y el número de interacciones que pueden interrogarse. Sin embargo, de manera general existen 5 pasos comunes a todas las técnicas. 1.- Se fija la cromatina, generalmente con formaldehído (con esto se fijan las interacciones físicas de distintas regiones genómicas). 2.- Se digiere la cromatina con enzimas de restricción que dejen extremos cohesivos, recientemente se han utilizado otras nucleasas (Hsieh, *et al.*, 2016; Ma, *et al.*, 2014, 2018) 3.- Se ligan nuevamente las cadenas de DNA en condiciones diluidas que favorecen la unión de extremos que se encuentren en el mismo complejo sobre uniones al azar. 4.- Los fragmentos generados se utilizan como templado y son detectados y cuantificados por diferentes técnicas de biología molecular. 5.- Mediante un análisis computacional se establece la frecuencia y el número de interacciones capturadas en el paso 1. De acuerdo con el número de eventos de religado entre regiones distales del genoma se establece la conformación en 3D de un cromosoma o de todo el genoma (De Wit & De Laat, 2012). Estas técnicas permitieron establecer que los cromosomas están organizados en dominios de interacción preferencial (self-interacting-domains) a los que se les denominó TADs (topologically associated domains).

Los resultados obtenidos por estas técnicas confirman la existencia de los territorios cromosómicos, la proximidad espacial de regiones ricas en genes dentro de un mismo cromosoma y la interacción de regiones pertenecientes a distintos

cromosomas (Lieberman-Aiden, *et al.*, 2009), además, permitieron revelar una captura preferencial de loci inactivos con otras regiones inactivas del genoma, pertenecientes incluso a otros cromosomas. Estas regiones inactivas forman clusters que incluyen regiones peri y centroméricas, telómeros y regiones inactivas a lo largo del genoma (Lieberman-Aiden, *et al.*, 2009; Simonis, *et al.*, 2006). En el locus de la β -globina se demostró que un enhancer localizado corriente arriba del locus interactúa con los genes de globina transcripcionalmente activos, lo que implica que el enhancer tiene que formar un loop de entre 30-50 kb para alcanzar el gen (Tolhuis, *et al.*, 2002). Estas interacciones son dinámicas y cambian con el estado transcripcional de los genes contenidos en el locus, cambio que resulta del desarrollo y diferenciación celular. Con la técnica 3C fue posible detectar esta y otras regiones regulatorias no descritas que entran en contacto con genes pertenecientes a otros locus, como es el caso del locus H19-Igf2, la interleucina TH2 y el locus de la α -globina (De Wit & De Laat, 2012).

De manera general se ha encontrado correlación entre los TADs y las marcas epigenéticas, el estado transcripcional, el tiempo de replicación y se ha sugerido que están conservados entre diferentes tipos celulares y entre diferentes especies (Oudelaar, *et al.*, 2017). No hay que olvidar que el tipo de interacciones descritas por las diferentes técnicas del 3C están mediadas por proteínas de la cromatina. En la sección de discusión de resultados se hace una propuesta para tratar de establecer una correlación entre los datos aportados por las técnicas que involucran la extracción para MN y los aportados por las técnicas que involucran la interacción de las proteínas de la cromatina como el 3C. No obstante todas las

técnicas experimentales tienen limitantes. El protocolo del 3C se basa en la suposición de que los complejos proteínas-DNA pueden fijarse con formaldehído para posteriormente ser digeridos con enzimas de restricción (De Wit & De Laat, 2012). Sin embargo, es probable que no se capturen todas las interacciones presentes, ya que existen diferencias en la eficiencia de fijación entre las proteínas y el DNA (Gavrilov, *et al.*, 2015). Si bien es cierto que se han utilizado otros fijadores, como el disuccinil glutarato (DSG) y el etilen glicol-bis (succinimidil succinato) (EGS), que incrementan la relación señal-ruido en experimentos 3C llevados a cabo con nucleasa micrococcal (Hsieh, *et al.*, 2016), estos fijadores no son los empleados por la gran mayoría de los reportes que utilizan estas técnicas y no se ha indagado por microscopía, el efecto que tienen sobre la cromatina. De hecho, no se ha demostrado experimentalmente la existencia de las llamadas “hairy-balls” (que se forman después de la fijación y digestión del DNA con nucleasas) que representan la fijación de las interacciones del genoma y que son la base teórica de las técnicas 3C. Sin embargo, se sabe que el tratamiento con formaldehído forma una red de fibras rígidas de cromatina que persisten después del tratamiento con enzimas de restricción (Gavrilov, *et al.*, 2015) por lo que la detección de las interacciones de la cromatina podría verse afectada. El uso de enzimas como la nucleasa micrococcal (Hsieh, *et al.*, 2016), DNAsa I (Ma, *et al.*, 2014, 2018) o métodos físicos como la sonicación para fragmentar la cromatina podrían salvar estas limitantes. Además de que los ensayos de religado por proximidad son probabilísticos por naturaleza (O’Sullivan, *et al.*, 2013) se ha reportado una baja eficiencia en la reacción con relación a la cantidad de subfragmentos de DNA presentes (Gavrilov, *et al.*, 2013) y diferencias en los resultados arrojados por los distintos métodos computacionales comúnmente

empleados en el análisis de los datos generados por las técnica Hi-C (Forcato, *et al.*, 2017). A esto pueden sumarse las inconsistencias reportadas entre las interacciones determinadas por métodos 3C y las detectadas por técnicas de microscopia de fluorescencia como FISH (Williamson, *et al.*, 2014).

HIPÓTESIS

La afinidad de una región del DNA por la MN es una propiedad emergente vinculada a la topología local del DNA, la cual a su vez es resultado de la organización en 3D de la región genómica correspondiente. Por lo tanto, la mayoría de los LARs identificados *in situ* en células primarias no tendrán afinidad significativa por la MN *in vitro*, cuando se encuentren linearizados y desprovistos de su topología nativa derivada del contexto genómico específico.

OBJETIVO

Determinar el papel de la topología del DNA en la afinidad de regiones específicas del genoma por la MN.

OBJETIVOS PARTICULARES

1- Caracterización experimental de las regiones de anclaje a la MN *in vivo* (LARs) previamente inferidas en las regiones genómicas correspondientes a: 162 kb del locus multi-génico de la familia albúmina.

2- Evaluación de la afinidad de las regiones que contienen LARs, previamente aisladas y linearizadas, por la MN de hepatocitos bajo condiciones isotónicas *in vitro*.

3- Evaluación de la afinidad de las regiones que contienen LARs, previamente aisladas y linearizadas, por la MN de hepatocitos bajo condiciones de alta fuerza iónica *in vitro*.

4- Evaluación de la afinidad de fragmentos de ≈ 200 pb, derivados de las regiones que contienen a los LARs *in vivo*, por la MN de hepatocitos bajo condiciones isotónicas y de alta fuerza iónica *in vitro*.

METODOLOGÍA

a) ANIMALES EXPERIMENTALES

En todos los experimentos se utilizaron ratas Wistar macho de entre 250-300 g de peso alimentadas ad libitum. Los animales fueron sacrificados bajo anestesia con éter o una solución de Ketamina- Xilacina a una concentración 90-15 mg/Kg respectivamente. El manejo de los animales se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado, y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

b) EXTRACCIÓN DE HEPATOCITOS

Para la extracción de hepatocitos las ratas se anestesiaron con éter o una solución Ketamina-Xilacina (90-15 mg/Kg respectivamente) y se realizó una abertura para exponer la cavidad abdominal. Se canuló la vena porta hepática con una aguja calibre 18 conectada a una bomba peristáltica y se perfundió el hígado con PBS-A a 37°C durante 5 minutos a una velocidad de 15 mL/minuto. Al inicio de la perfusión se cortó la vena cava a la altura de los riñones para drenar el hígado. A continuación, se perfundió el hígado con una solución de Colagenasa tipo IV durante 15 minutos. Se extrajo el hígado, se maceró y se filtró sobre tela de organza con PBS-A. Los hepatocitos se purificaron mediante sedimentación por gravedad durante 12 minutos a 4°C. Finalmente los hepatocitos aislados se

cuantificaron en un hemocitómetro y se utilizaron inmediatamente para los experimentos (Maya-Mendoza & Aranda-Anzaldo, 2003).

c) PREPARACIÓN DE NUCLEOIDES

El aislamiento de nucleoides se realizó mediante la técnica de extracción con altas concentraciones de sal (Maya-Mendoza & Aranda-Anzaldo, 2003). Los hepatocitos se resuspendieron en PBS-A y alícuotas de 50 μ L con 3×10^5 hepatocitos se mezclaron con 150 μ L de solución de lisis (2.6 M NaCl, 1.3 mM EDTA, 2.6 mM Tris base, 0.6% de TRITON X 100, pH 8). Los hepatocitos se lisaron por 20 minutos a 4°C. Posteriormente los nucleoides se lavaron con 14 mL de PBS-A a 4°C y se centrifugaron 5 minutos a 1,500 g. El pellet resultante que contiene a los nucleoides se recuperó en un volumen de 200 μ L.

d) DIGESTIÓN DE NUCLEOIDES CON 0.5 U/mL de DNAsa I

3.6×10^6 nucleoides en 2.4 mL de PBS-A se agregaron a 10.2 mL de buffer de digestión (10 mM de MgCl₂, 0.2 M de β -mercaptoetanol, 50 mM Tris base, pH 7.2) y se digirieron durante una hora a 37°C con 0.5 U/mL de DNAsa I (SIGMA) con agitación constante. Se tomaron por duplicado muestras de 1 mL de la digestión de nucleoides a los 0 y 60 minutos. A las muestras se les agregaron 200 μ L de solución de paro (0.2M EDTA, 10 mM de Tris base, pH 7.5) y se centrifugaron por 10 minutos a 9,000 g a 4°C. El pellet de nucleoides se resuspendio y se lavó con 1 mL PBS-A, se centrifugó a 9,000 g durante 10 minutos a 4°C. Se realizaron dos lavados más con la misma técnica solo que con agua bidestilada. El pellet

resultante se resuspendió en 200 µL de agua bidestilada, la cantidad de DNA residual se determinó por espectrofotometría y se corrió en un gel de agarosa al 2%. Los nucleoides digeridos se utilizaron como templado para determinar la localización de los LARs.

e) ANÁLISIS *in silico* DEL LOCUS ALBÚMINA

El análisis *in silico* del locus de la familia albúmina se realizó con el programa VECTOR NTI Advance 11.0 a partir de la secuencia disponible en el GenBank para el locus multigénico de la familia albúmina. Se determinaron algunas de las características reportadas en la literatura que se ha propuesto definen a los MARs (Ottaviani, *et al.*, 2008). El locus se dividió en segmentos de 500 pb para su análisis. Se localizaron los motivos de reconocimiento para Topoisomerasa II (RnYnnCnnGYnGKTnYnYnY) y (GTnWAYATTnATnATnnG) que corresponden a topoisomerasa de eritrocitos de pollo y de *Drosophila*, respectivamente (Sander & Hsieh, 1985; Spitzner & Muller, 1988). Se buscaron también regiones con un contenido mayor al 70% de A-T. Se determinó la localización del motivo reportado para los MARs en *Arabidopsis* (TAWAWWWnnAWWRTAAnnWWG) (Van Drunen, *et al.*, 1997). Nomenclatura IUPAC: R= A-G Y= T-C W=A-T K=G-T. Todos los motivos reportados tienen una similaridad mayor al 90%. También se identificaron sitios con regiones variables en la secuencia de albúmina que van desde 50-2000 pb.

f) DISEÑO DE PRIMERS

Los oligos se diseñaron en el programa VECTOR NTI en la región correspondiente a los LARs inferidos a partir de la configuración en bucles estructurales del locus multigénico de la familia albúmina previamente caracterizada (Rivera-Mulia & Aranda-Anzaldo, 2010). Los amplicones diseñados cubren regiones de ≈ 2 kb, ≈ 300 pb y ≈ 100 pb dentro de los LARs inferidos (Figura 11) (Tabla 3). Todos los oligos tienen una longitud de entre 20-25 nucleótidos, contenido de G-C de 50-55%, temperatura de fusión (T_m) de 55-60°C, una diferencia de T_m entre los pares de oligos menor de 2°C y de G-C menor a 5%. Se evitaron todos los oligos que forman dímeros o estructuras secundarias con valores de energía libre menor a -2 Kcal/mol y -1 Kcal/mol respectivamente. Se probó la especificidad de cada oligo con los algoritmos de búsqueda de alineamientos del NCBI, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y Primer-BLAST. La identidad de los amplicones se verificó mediante análisis de restricción.

g) AMPLIFICACIÓN POR PCR

Para los amplicones de ≈ 2 kb se utilizaron 30 ng de DNA como templado, 0.7 U de GoTaq DNA polimerasa (Promega), 2.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 μM de cada oligo. Para el resto de los amplicones se utilizaron 10 ng de DNA como templado, 0.7 U de GoTaq DNA polimerasa (Promega), 2.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de cada dNTP, 0.1 μM de cada oligo. La amplificación de todas las secuencias se realizó con el mismo programa, desnaturalización inicial de 94°C (5 minutos), 35 ciclos de desnaturalización (94°C 45 s), alineamiento (56°C 1 minuto)

y extensión (72°C 1 minuto), una extensión final (72°C 10 minutos). 16% del producto generado se analizó en geles de agarosa al 1 o 2 % teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). La electroforesis se realizó en TBE 1 X a 100V y 450 mA y los geles se visualizaron con luz UV. El análisis de las imágenes obtenidas se realizó con el programa Kodak 1D Image Analysis Software 3.5 System con los parámetros estándar.

h) PURIFICACIÓN DE LOS AMPLICONES

A 500 µL de producto de PCR (10 reacciones de PCR) se les agregaron 50 µL de una solución de acetato de sodio 3M y 1.5 mL de etanol absoluto. Se homogenizó la muestra y se congeló a -70°C durante toda la noche. La muestra se descongeló y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El pellet resultante se lavó tres veces con 500 µL de etanol al 70% bajo las mismas condiciones. El pellet se secó a 45°C durante 24 horas. El producto de PCR purificado se resuspendió en agua y se cuantificó por espectrofotometría. La identidad del amplicón se verificó al comprobar que 1 µg del DNA purificado generara una banda homogénea en el rango del tamaño esperado después de correrlo en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. El amplicón purificado se utilizó para realizar los ensayos de afinidad.

i) DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

300 x10³ nucleoides se digirieron con 200 Unidades de las enzimas de restricción Hind III, Apa I o EcoRV. Los nucleoides se colocaron en 178 µL del buffer de

digestión proporcionado por el fabricante para cada una de las enzimas de restricción. Se agregó BSA (0.1 mg/mL) y 20 μ L de cada una de las enzimas de restricción (10 U/ μ L). Se incubó durante 4 horas a 37°C con agitación constante. Se agregaron 200 μ L de buffer de paro (0.2 M EDTA, 10 mM de Tris base, pH 7.5) y se centrifugó a 9,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se lavó el pellet una vez con 1 mL de PBS-A y dos veces con 1 mL de agua bidestilada. El sobrenadante de todos los lavados se recolectó en un solo tubo y el pellet se resuspendió en 200 μ L de agua bidestilada. El DNA presente en el pellet y en el sobrenadante se cuantificó por espectrofotometría y se utilizó como templado para determinar en cuál de las dos fracciones se encontraban los LARs.

j) DIGESTIÓN DE NUCLEOIDES CON 8 U/mL de DNAsa I

3.6×10^6 nucleoides en 2.4 mL de PBS-A se agregaron a 10.2 mL de buffer de digestión (10mM de MgCl₂, 0.2M de β -mercaptoetanol, 50mM Tris base, pH 7.2) y se digirieron durante una hora a 37°C con 8 U/mL de DNAsa I (SIGMA) con agitación constante. Se tomaron 2 muestras de 1 mL de la digestión de nucleoides a los 0 minutos y 10 muestras de 1 mL a los 60 minutos. A las muestras se les agregaron 200 μ L de solución de paro (0.2 M EDTA, 10 mM de Tris base, pH 7.5) y se centrifugaron por 10 minutos a 9,000 g a 4°C. El pellet de nucleoides se resuspendió y se lavó con 1 mL PBS-A, se centrifugó a 9,000 g durante 10 minutos a 4°C. Se realizaron dos lavados más con la misma técnica solo que con agua bidestilada. El pellet resultante se resuspendió en 200 μ L de agua bidestilada. Se determinó la cantidad de DNA a los 0 y 60 minutos por espectrofotometría. Las proteínas de MN obtenidas de los nucleoides digeridos

durante 60 minutos con 8 U/mL de DNasa I se recolectaron y se utilizaron para los ensayos de afinidad.

k) EXTRACCIÓN DE NÚCLEOS DE HEPATOCITOS

5×10^6 hepatocitos se resuspendieron en 3 mL de buffer hipotónico (10 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM PMSF, 0.5 % TRITON X 100). Se incubaron durante 5 minutos en hielo y se pasaron 3 veces en una jeringa con una aguja calibre 21. La mezcla homogénea resultante se centrifugó 8 minutos a 400 g. Los núcleos se recuperaron del pellet formado en el tubo (Maya-Mendoza, *et al.*, 2005).

l) DIGESTIÓN DE NÚCLEOS DE HEPATOCITOS

3.6×10^6 núcleos de hepatocitos se resuspendieron en 1 mL de buffer de digestión (10 mM de MgCl₂, 0.2 M de β -mercaptoetanol, 50 mM Tris base, pH 7.2) y se digirieron con 8 U/mL de DNasa I durante una hora a 37°C con agitación constante en tubos de 14 mL. A los 60 minutos se les agregaron 200 μ L de solución de paro (0.2 M EDTA, 10 mM de Tris base, pH 7.5) y posteriormente se agregó PBS-A hasta aforar el tubo a 14 mL. El tubo se centrifugó a 1,500 g durante 3 minutos. Los núcleos digeridos se recuperaron del pellet del tubo y se lisaron para obtener MNs.

m) PREPARACIÓN DE MNs A PARTIR DE NÚCLEOS DE HEPATOCITOS

3.6×10^6 núcleos, sin tratamiento para el tiempo cero o digeridos una hora con 8 U/mL de DNAsa I, se resuspendieron en 100 μ L de PBS-A y se lisaron con 300 μ L de solución de lisis (2.6 M NaCl, 1.3 mM EDTA, 2.6 mM Tris base, 0.6% de TRITON X 100, pH 8) durante 20 minutos a 4°C. Los nucleoides se lavaron con PBS-A y se centrifugaron 2 minutos a 1,500 g. Para cuantificar el DNA remanente las MNs se lavaron una vez con 1 mL de PBS y dos veces con 1 mL de H₂O bidestilada, se centrifugaron a 9,000 g durante 10 minutos a 4°C. Finalmente se resuspendieron en 200 μ L de H₂O bidestilada y se cuantificó el DNA por espectrofotometría.

n) ENSAYO DE AFINIDAD

Se colocaron 14.4×10^6 matrices nucleares extraídas de núcleos de hepatocitos digeridos con DNAsa I o 1 mg proteínas de matriz nuclear extraídas de nucleoides digeridos con DNAsa I, en 300 μ L de buffer de ensayo de afinidad (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂) en presencia de 120 ng de los LARs de \approx 2kb o 40 ng de cada uno del resto de los amplicones. Se agregaron 30 μ g de DNA de esperma de arenque (Promega) como competidor y BSA a una concentración final en la solución de 0.025 mg/mL (Promega). Se incubaron 1 hora a 37°C en agitación constante. Se agregaron 500 μ L de buffer de ensayo de afinidad y se centrifugó 1 minuto a 12,000 g a 4°C. Se decantó y se agregó 1 mL de buffer de ensayo de afinidad al pellet, se homogenizó y se centrifugó la muestra a 12,000 g durante 1 minuto a 4°C. Se decantó y se agregaron 300 μ L de agua

ultrapura. Se homogenizó la muestra y se hicieron tres alícuotas de 100 μ L cada una. La alícuota 1 sin más lavados. La alícuota 2 tres lavados con agua ultrapura, la alícuota 3 dos lavados con una solución hipertónica (2 M NaCl) y un lavado con agua ultrapura. Se centrifugó la muestra 10 minutos a 12,000 g a 4°C para cada lavado. El pellet se resuspendió en 200 μ L de agua ultrapura. Se cuantificó el DNA por espectrofotometría y se utilizó como templado para detectar la afinidad de los LARs en estudio por PCR.

o) DETERMINACIÓN DE MOTIVOS EN LOS AMPLICONES

Se buscaron motivos en los amplicones utilizados en los ensayos de afinidad con el programa GLAM2 (Gapped Local Alignment of Motifs) que busca motivos con saltos o discontinuidades mediante alineamientos entre dos o más secuencias (Frith, *et al.*, 2008). Debido a que los amplicones utilizados en el presente estudio se sobrelapan, no se realizó un análisis tipo “todos contra todos” debido a que el programa detecta las regiones que se sobrelapan como motivos comunes entre las secuencias. Por esta razón, el análisis de las secuencias se realizó entre los amplicones de la misma longitud que no se sobrelapan. El programa GLAM2 es parte de MEME Suit-Motif-based sequence analysis tools (<http://meme-suite.org/>).

p) DIGESTIÓN CON RNAsa I DE PROTEÍNAS DE MN UNIDAS A LOS AMPLICONES EN ESTUDIO

Proteínas de MN recuperadas después de realizar el ensayo de afinidad con los LARs putativos se digirieron con 8 U/mL de RNAsa I en 1 mL de buffer RNAsa I

(PBS-A con 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂), durante 1 hora a 37°C con agitación constante. Posteriormente la muestra se centrifugó a 12,000 g durante 10 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en 200 µL de H₂O, se cuantificó el DNA remanente por espectrofotometría y se utilizó como templado para detectar la presencia de los amplicones por PCR.

q) MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

En todos los casos se tomaron muestras de 10 µL a los 0 y 60 minutos directamente del tubo de donde se realizaba la digestión de los nucleoides o núcleos y se colocaron en un portaobjetos. Posteriormente se agregaron 10 µL de una solución de bromuro de etidio (160 µg/µl). Se colocó un cubreobjetos y se observaron en un microscopio Olympus BX60 con una cámara acoplada (CoolSnap Pro color camera) y fueron procesados con el software Image-Pro Plus digital image analysis system versión 4.5 (Media-Cybernetics).

RESULTADOS

A. Determinación de la longitud promedio de los LARs

La configuración en bucles estructurales del locus de la familia albúmina (Rivera-Mulia & Aranda-Anzaldo, 2010) permite inferir la existencia de cuatro regiones embebidas en la MN que pudieran corresponder a los LARs. Sin embargo, para abordar su estudio es necesario tener una idea más precisa de la longitud de estos LARs putativos. Debido a que el DNA embebido en la MN es resistente a la digestión con DNAsa I, se procedió a preparar nucleoides de hepatocitos (que corresponden a la totalidad de los bucles de DNA anclados a la MN) para posteriormente digerirlos con DNAsa I (0.5 U/mL, 60 minutos). Posteriormente, el DNA resistente a la digestión y asociado a la MN fue liberado mediante la digestión de la MN con proteinasa K. El DNA remanente corresponde al $\approx 22\%$ del DNA total. Este DNA fue analizado en geles de agarosa al 2% para determinar su tamaño (Figura 10 A). Los resultados indican la presencia de un barrido de $\approx 2\text{kb}$ a 75 pb, siendo la señal más intensa en la región que corresponde a 500 pb (Figura 10 A carriles 4 y 5). Por otra parte, el DNA liberado a la solución como producto de la digestión con DNAsa I es reducido a nucleótidos o fragmentos muy pequeños que no son detectables en el gel (Figura 10 carril 2), en contraste, en la muestra control que corresponde a nucleoides de hepatocitos sin digerir, el DNA total es retenido en el pozo de carga, debido a que los nucleoides son muy grandes e incapaces de migrar a través de los poros del gel (Figura 10 carril 3). Estos resultados permiten establecer que los LARs putativos tienen una longitud $\leq 2\text{ kb}$.

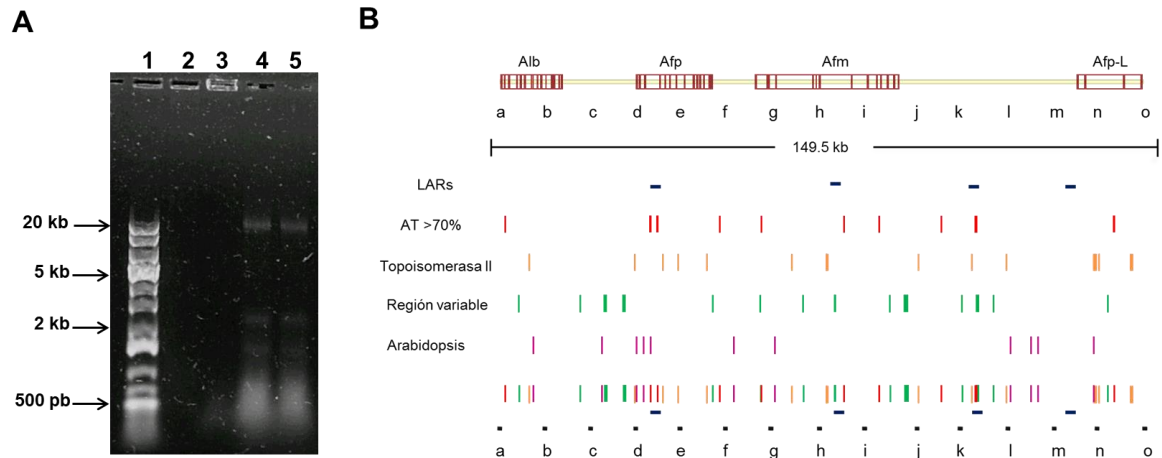


Figura 10. Características de los LARs putativos. A) Determinación de la longitud promedio de los LARs putativos. Los nucleoides de hepatocitos, con el DNA total asociado a la MN como bucles estructurales, se digirieron con DNAsa I (0.5 U/mL, 60 minutos). Posteriormente, se recolectó el DNA producto de la digestión para su análisis en un gel de agarosa al 2%. Carril 1. Marcador de tamaño. 2. DNA liberado a la solución como producto de la digestión. 3. Nucleoides sin digerir con el total de los bucles estructurales de DNA asociados a la MN (Nucleoides control). 4-5. Fracción de DNA embebida en la MN y resistente a la digestión con DNAsa I (DNA correspondiente a los LARs). B) Análisis *in silico* del locus de la familia albúmina (149.5 kb). Los 4 LARs putativos están representados por las barras horizontales en color azul, las letras (a-o) corresponden a los marcadores empleados para el mapeo de la región previamente reportado (Rivera-Mulia & Aranda-Anzaldo, 2010). Las líneas verticales corresponden a: regiones con un contenido de AT $\geq 70\%$ (rojo), motivos de reconocimiento a topoisomerasa II de mamífero (Spitzner & Muller, 1988) y de *Drosophila* (Sander & Hsieh, 1985) (naranja), regiones variables (verde), el motivo para MARs reportado en *Arabidopsis thaliana* (Van Drunen, *et al.*, 1997). En la

sumatoria presentada en la parte baja de la figura podemos observar que ninguna de las características en estudio es compartida por todos los LARs putativos.

B. Análisis *in silico* del locus multigénico de la familia albúmina

En la literatura están descritas ciertas características asociadas a los MARs; sin embargo, ninguna de éstas contiene una secuencia o motivo consenso que permita identificarlos a priori. A pesar de esto, se realizó un análisis bioinformático de la región de los genes de la familia albúmina, la cual se dividió en bloques de 500 pb, para identificar y localizar regiones que contuvieran varias o alguna de las siguientes características asociadas con los MARs: contenido de AT $\geq 70\%$, la presencia de secuencias o motivos de reconocimiento a topoisomerasa II de mamífero o de *Drosophila melanogaster* (Sander & Hsieh, 1985; Spitzner & Muller, 1988); regiones de secuencia variable; la presencia de un motivo reportado en *Arabidopsis thaliana* (Van Drunen, *et al.*, 1997) (Figura 10 B). El propósito de este análisis fue establecer si alguno de los 4 LARs putativos (Rivera-Mulia & Aranda-Anzaldo, 2010) en estudio presentaba varias o alguna de las características asociadas con los MARs. Los resultados mostraron que ninguna de estas cuatro características es compartida por la totalidad de los LARs putativos y, que en ninguno de los LARs estudiados están presentes todas las características estudiadas. De hecho, el LAR putativo L4 no presenta ninguna de estas. Este resultado es consistente con la evidencia de que no es posible determinar si un fragmento de DNA corresponde a un MAR/LAR a partir de la sola inspección de la secuencia de nucleótidos.

C. Diseño de los amplicones correspondientes a los LARs putativos

Nuestros resultados indicaron una longitud ≤ 2 kb para los fragmentos de DNA embebido en la MN que pueden ser o contener a los LARs. Con el objetivo de determinar si los LARs putativos en estudio realmente están asociados *in situ* con la MN, se diseñaron amplicones específicos de ≈ 2 kb que cubren las regiones correspondientes a los LARs putativos L1 a L4 (Figura 11 A).

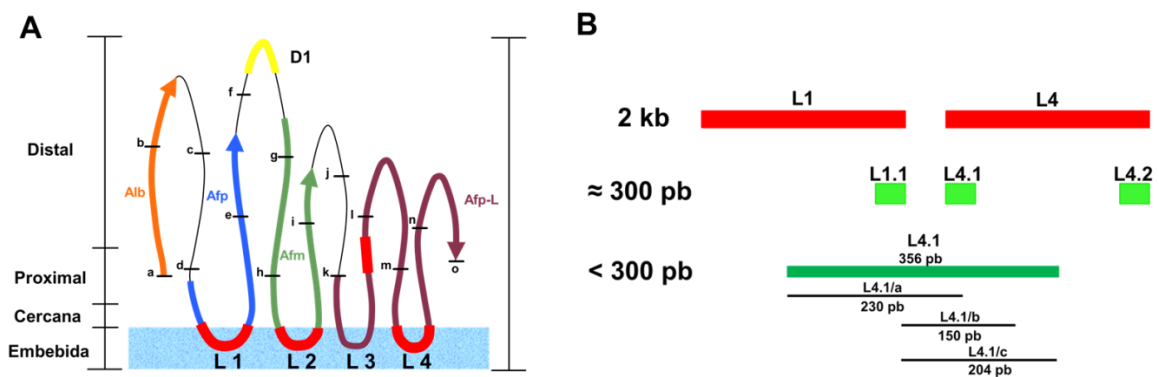


Figura 11. Diseño de los amplicones. A) Representación gráfica de la configuración en bucles estructurales del locus multigénico de la familia albúmina, la región embebida en la MN corresponde a los 4 LARs putativos L1-L4. En color rojo se muestra la región sobre la que se diseñaron los amplicones específicos para determinar su localización (Imagen modificada de Rivera-Mulia & Aranda-Anzaldo, 2010). B) Representación gráfica del diseño de los amplicones anidados en L1, L4 y L4.1. El objetivo primordial del diseño consistió en reducir gradualmente la longitud de los amplicones anidados y, al mismo tiempo, conservar una alta especificidad de los mismos.

No fue posible, debido a la baja complejidad de secuencia, diseñar un amplicón específico sobre la región que corresponde al LAR 3. Sin embargo, se diseñó un

amplicón específico de ≈ 1.3 kb en la región aledaña pero no continua del extremo 3' de L3 (Figura 11 A). En la tabla 3 se muestran las características de los primers diseñados y los amplicones correspondientes.

Amplicón	Primer sentido	Primer antisentido	Longitud (pb)	Contenido GC % del amplicón
L1	ACTTAGGCACAGGGAAATCACTCC	CACTGAGATTGGACAAGACCAGAAT	1909	44.5
L2	AGATAACCCCTTGTCCCTTGCC	ACAGTTCAGCCCTAACCGAGA	1952	45.9
L3	TCTCGTTAGAAAATACCTGCCCCTG	GCTTCCAGAGAACTTTGTATGCGA	1296	43.4
L4	GGTTCCTCTCAGTGTACTTTGTGGC	GGGGAAGTCATGGATTCTGGGTAT	1946	41.7
D1	TGAGATCGCTTCCCGTATGAG	GTGTTAGACAGTCTTTGCCGCTA	1950	44.4
L1.1	CCCAAAGCCCTTCTTATTCGG	AGTCAACCCACCTTAGGAAAATCTTC	376	41.8
L4.1	CCTCTCAGTGTACTTTGTGGCATG	GGGAAACAAGTGGACCAGCA	356	36.9
L4.2	CTAGTCGTCTGTGGTCCCAACATG	GGGGAAGTCATGGATTCTGGGTAT	284	40.9
L4.1/a	CCTCTCAGTGTACTTTGTGGCATG	TGGACATCTAGCTGGGGTTTG	230	36.2
L4.1/b	ATTAATAAACCAATGAGTGGGC	TTTTTGTGCCTAAATGCCAA	150	42.9
L4.1/c	ATTAATAAACCAATGAGTGGGC	GGGAAACAAGTGGACCAGCA	204	41.9
c	TCCTTTGTAACCAAGCAAGTGG	CCCATTTCCAGATCCTTCACTCT	374	49.3
f	CTGATCTTCAGGCAATATGGCAGG	TTGGCTGATGTCGTCTGGACA	392	45.5

Tabla 3. Amplicones utilizados en el presente estudio. Se indican los primers, el tamaño y contenido GC de los amplicones.

Los amplicones diana fueron amplificados utilizando como templado DNA genómico de hepatocitos de rata. Los productos resultantes fueron analizados en geles de agarosa al 2% y su identidad fue confirmada por restricción con las enzimas correspondientes (Figura 12) (Tabla 4).

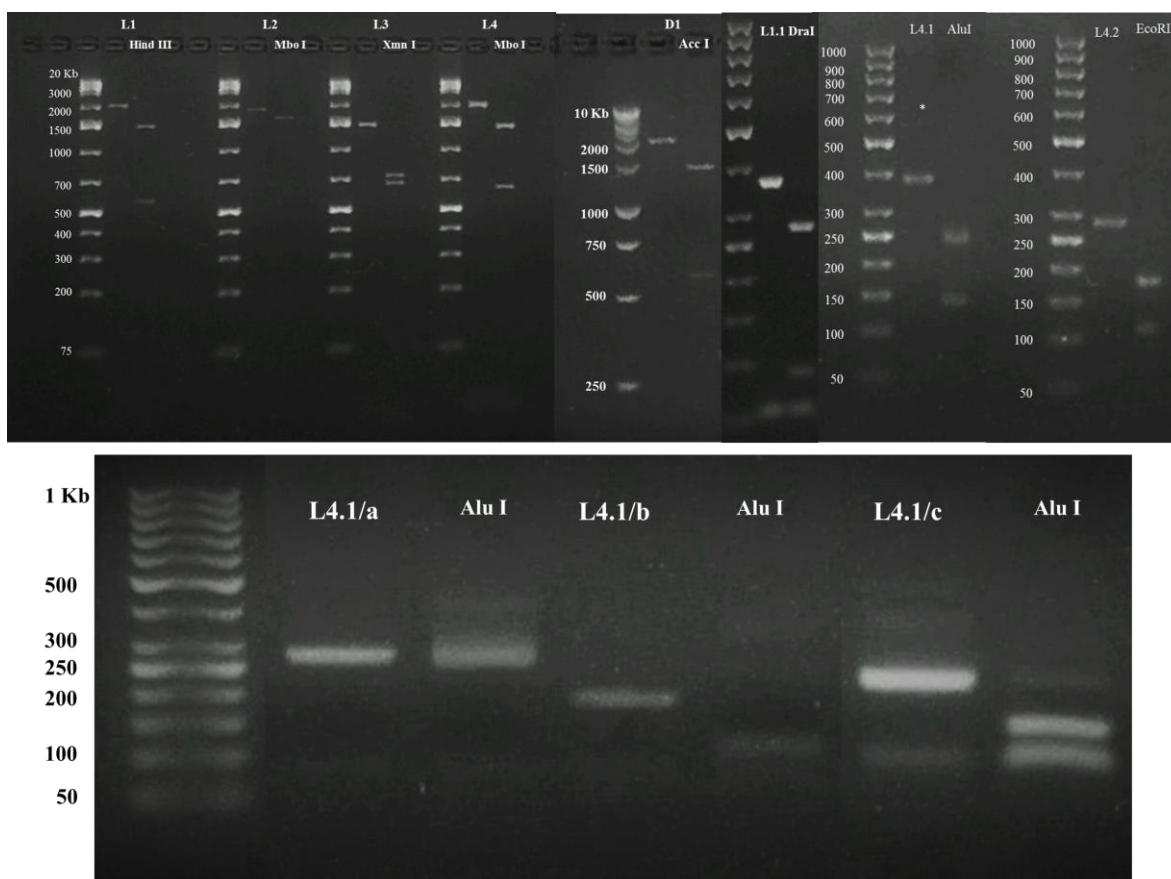


Figura 12. Análisis de restricción de los productos de PCR de los amplicones utilizados.

Amplicón	Longitud (pb)	Enzima de restricción	Fragmentos
L1	1909	Hind III	1357 / 552
L2	1952	Mbo I	1748 / 204
L3	1296	Xmn I	650 / 646
L4	1946	Mbo I	1317 / 629
D1	1950	Acc I	1369 / 561
L1.1	376	Dra I	276 / 100
L4.1	356	Alu I	218 / 138
L4.2	284	Eco RI	178 / 108
L4.1/a	230	Alu I	215 / 15
L4.1/b	150	Alu I	83 / 67
L4.1/c	204	Alu I	139 / 66

Tabla 4. Enzimas utilizadas para el ensayo de restricción. Se muestra el tamaño del amplicón, la enzima utilizada y la longitud de los fragmentos esperados después de la digestión.

D. Los LARs putativos están asociados con la MN *in situ*

Para verificar experimentalmente que los LARs putativos están asociados con la MN *in situ* se procedió a amplificarlos en nucleoides sin digerir con el 100% del DNA organizado en bucles. Los resultados indicaron que la amplificación de L2 era ineficiente e inestable, por lo cual se decidió descartar este amplicón en futuros experimentos (Figura 12). Por otra parte, aunque el amplicón L3 se amplifica con eficiencia, la localización aledaña a L3 y no embebida, lo hacen inútil para revelar la relación de L3 con la MN (Figura 11 A), por lo cual se decidió no utilizar este amplicón en futuros experimentos y concentrarnos en los amplicones L1 y L4 que amplifican con eficiencia en nucleoides con el total del DNA genómico. Para verificar que los LARs putativos L1 y L4 efectivamente se encuentran asociados a la MN *in situ* se utilizó como templado nucleoides digeridos con DNAsa I (0.5 U/mL, 60 minutos) que solamente conservan la fracción de DNA embebida en la MN. Los resultados fueron negativos (Figura 13). Esto pudiera parecer contradictorio si es que realmente L1 y L4 corresponden a los LARs *in situ*, de hecho, este comportamiento es consistente con el que tiene el amplicón D1 (≈ 2 kb), que se utilizó como control debido a que se localiza en la punta del bucle (Figura 11), y, que de acuerdo con lo esperado tampoco es detectado en la fracción de DNA que corresponde a los LARs (Figura 13). Sin embargo, considerando que la MN es un impedimento estérico que dificulta pero no impide en forma absoluta la acción de la DNasa I sobre el DNA embebido en la MN y que el tamaño promedio de los fragmentos asociados con la MN resistentes a la enzima es de ≈ 500 pb (Figura 10 A), entonces es probable que los templados de ≈ 2 kb para L1 y L4 pudieran ser parcialmente digeridos o “nickeados” por la

enzima de modo que los amplicones correspondientes no resultaran amplificables en las muestras tratadas con DNasa I. Para corroborar esta hipótesis, se diseñaron amplicones anidados en L1 y L4 que fueran muy específicos o sea, exclusivos de tales regiones genómicas, pero con un tamaño netamente inferior a 500 pb (Figura 11 B) para reducir la posibilidad de que los templados pudieran ser parcialmente digeridos por la DNasa I. Dichos amplicones anidados resultaron amplificables en los nucleoides que contienen solamente el DNA embebido en la MN (Figura 13, L1.1, L4.1 y L4.2), indicando que L1 y L4 si están asociados *in situ* con la MN. No se utilizó un amplicón de ≈ 300 pb ubicado en el cuerpo del bucle como control negativo, debido a que para la caracterización de los bucles estructurales del locus de la familia albúmina (Rivera-Mulia & Aranda-Anzaldo, 2010) (que sirve como base para el presente estudio) se utilizaron 15 amplicones de ≈ 300 pb, los cuales, bajo las mismas condiciones experimentales (Figura 13), no son detectables en la fracción de DNA que corresponde a los LARs, por lo que podemos descartar que la presencia de los amplicones anidados L1.1, L4.1 y L4.2 (≈ 300 pb) en esta fracción se trate de un artefacto experimental.

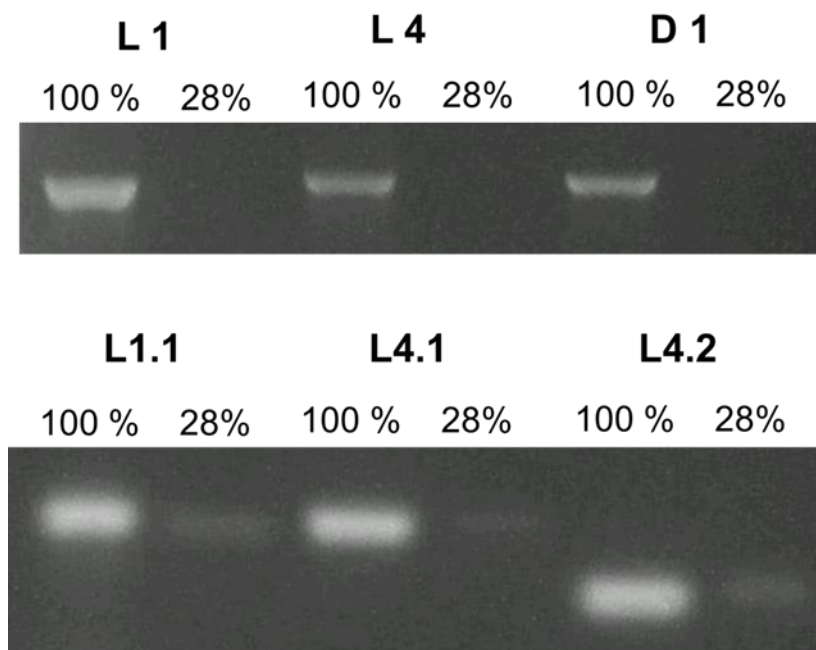


Figura 13. Los LARs putativos están asociados a la MN *in situ*. Se utilizó como templado nucleoides con el 100% de DNA genómico y la fracción de DNA correspondiente a los LARs (28 % del DNA total) para amplificar L1 y L4 (≈ 2 kb) y sus amplicones anidados (L1.1, L4.1 y L4.2, de ≈ 300 pb). El amplicón D1 (≈ 2 kb) se localiza en la punta del bucle y se utilizó como control negativo. Solamente los amplicones anidados en L1 y L4 son detectables en la fracción de DNA que corresponde a los LARs.

Con base en lo anterior y para demostrar que L1 y L4 realmente corresponden a LARs asociados con la MN *in situ*, se decidió digerir muestras de nucleoides con enzimas de restricción que pueden cortar en sitios adyacentes a L1 y L4 pero no al interior de tales templados (Figura 14 A y B). Si L1 y L4 son LARs deben permanecer íntegros y, por lo tanto, ser amplificables en nucleoides sometidos a digestión exhaustiva con las enzimas de restricción correspondientes. Además, para evitar falsos positivos y demostrar que L1 y L4 son realmente LARs, se

decidió también aplicar un protocolo de lavados seriados a las muestras digeridas de nucleoides, incluyendo un lavado con alta fuerza iónica (ver Materiales y Métodos) (Figura 14 C). Esto se hizo con el fin de evitar la reasociación espuria con la MN de los fragmentos de DNA cortados por las enzimas de restricción y demostrar que el DNA remanente en los nucleoides digeridos continúa siendo resistente a la extracción con altas concentraciones de sal, propiedad intrínseca de los LARs y que los distingue de los MARs en general (ver antecedentes). Se procedió a realizar las digestiones exhaustivas de nucleoides con las enzimas de restricción y posteriormente se utilizó como templado para amplificar L1 y L4 tanto el DNA liberado por las enzimas y recuperado del sobrenadante (fracción sobrenadante) como el DNA que permaneció firmemente asociado a la MN después de la digestión y lavados correspondientes (fracción pellet) (Figura 14 D). Los resultados demostraron la amplificación eficiente de L1 y L4 en el pellet mientras que dicha amplificación fue prácticamente negativa en el sobrenadante. Por otra parte, en el caso de Hind III que es capaz de hacer un corte al interior de L1 pero no de L4, se observa en el pellet una reducción relativa de la intensidad del amplicón correspondiente (Fig.14 C). Estos resultados indican que L1 y L4 corresponden a verdaderos LARs asociados *in situ* a la MN en forma resistente a la extracción con altas concentraciones de sal.

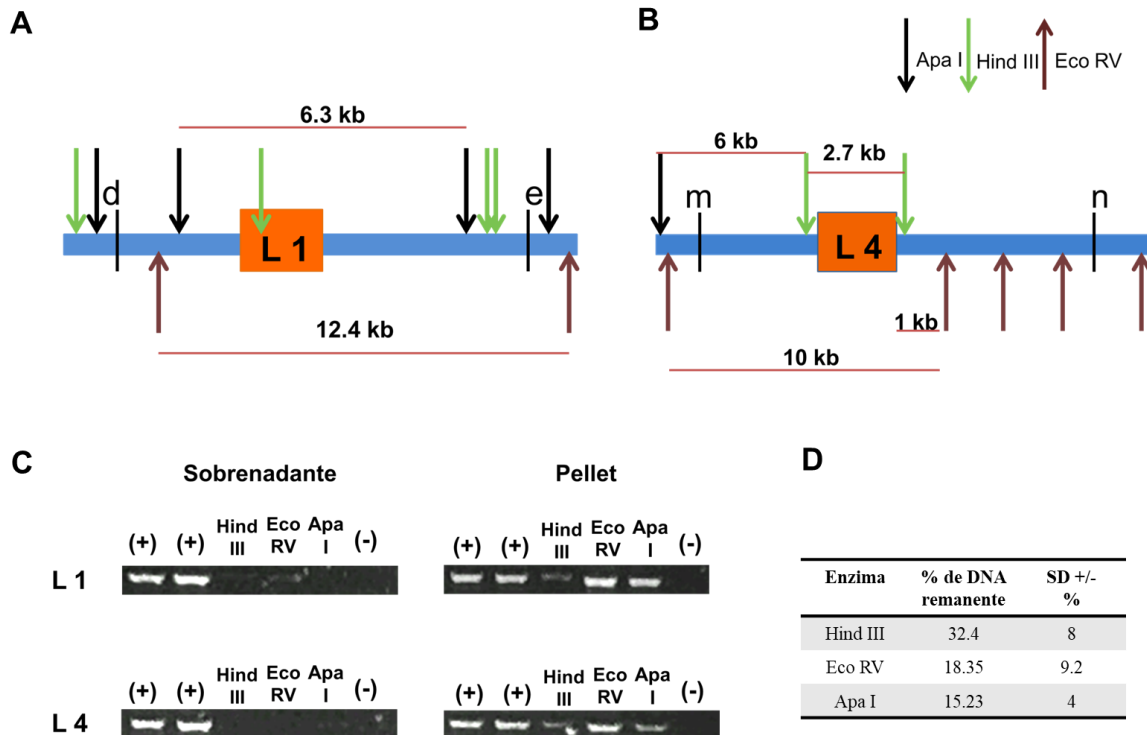


Figura 14. Los LARs putativos están asociados a la MN *in situ*. A-B) Las flechas muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción que flanquean a los amplicones L1 y L4 y se muestra la distancia relativa entre ellos. C) Los nucleoides fueron digeridos con cada una de las enzimas de restricción (Hind III, Eco RV, Apa I), posteriormente, el DNA liberado a la solución (Sobrenadante) y el que permaneció unido a la MN (pellet) se utilizó como templado para amplificar L1 y L4. (+) Control positivo, DNA genómico. (-) Control negativo sin templado. D) Porcentaje de DNA que permanece unido a la MN (pellet) después de la digestión de nucleoides con cada una de las enzimas de restricción (N=3).

E. Determinación de la afinidad de L1 y L4 por la MN *in vitro*

Con el objetivo de abordar el estudio de los factores que determinan las interacciones DNA-MN y partiendo de que L1 y L4 están asociados a la MN *in situ*, evaluamos la afinidad de L1 y L4 por la MN *in vitro*. Si la interacción de L1 y L4 con la MN está determinada por factores intrínsecos a la secuencia de nucleótidos, podemos esperar que los amplicones L1 y L4, que están asociados a la MN *in situ*, se unan con alta afinidad a la MN *in vitro*, una vez que se encuentren aislados y desprovistos del contexto genómico. De no ser así, podemos inclinarnos a pensar que se trata de factores independientes a la secuencia de nucleótidos los que determinan dichas interacciones. Para realizar el ensayo de afinidad, se propuso utilizar MN de hepatocitos obtenidas de nucleoides digeridos exhaustivamente con DNAsa I (8 U/mL, 60 minutos) (Figura 15 A). En contraste a los nucleoides digeridos con 0.5 u/mL de DNAsas I (Figura 16 B y F) los nucleoides sometidos a la digestión con 8 U/mL de DNAsa I perdieron su estructura y solamente pudieron observarse disgregados de proteínas (Figura 16 C y G), por lo tanto, las proteínas de MN obtenidas de los nucleoides digeridos con 8 U/mL de DNasa I se recolectaron y se utilizaron para los ensayos de afinidad. A diferencia de los estudios clásicos que emplean DNA de bacteria como competidor (ver MARs en introducción) nosotros empleamos DNA de un metazoario (DNA de Arenque) (Figura 17 A), lo anterior debido a que existen grandes diferencias entre la complejidad de secuencia de una bacteria y un metazoario, por lo que consideramos que el DNA bacteriano no es un buen competidor.

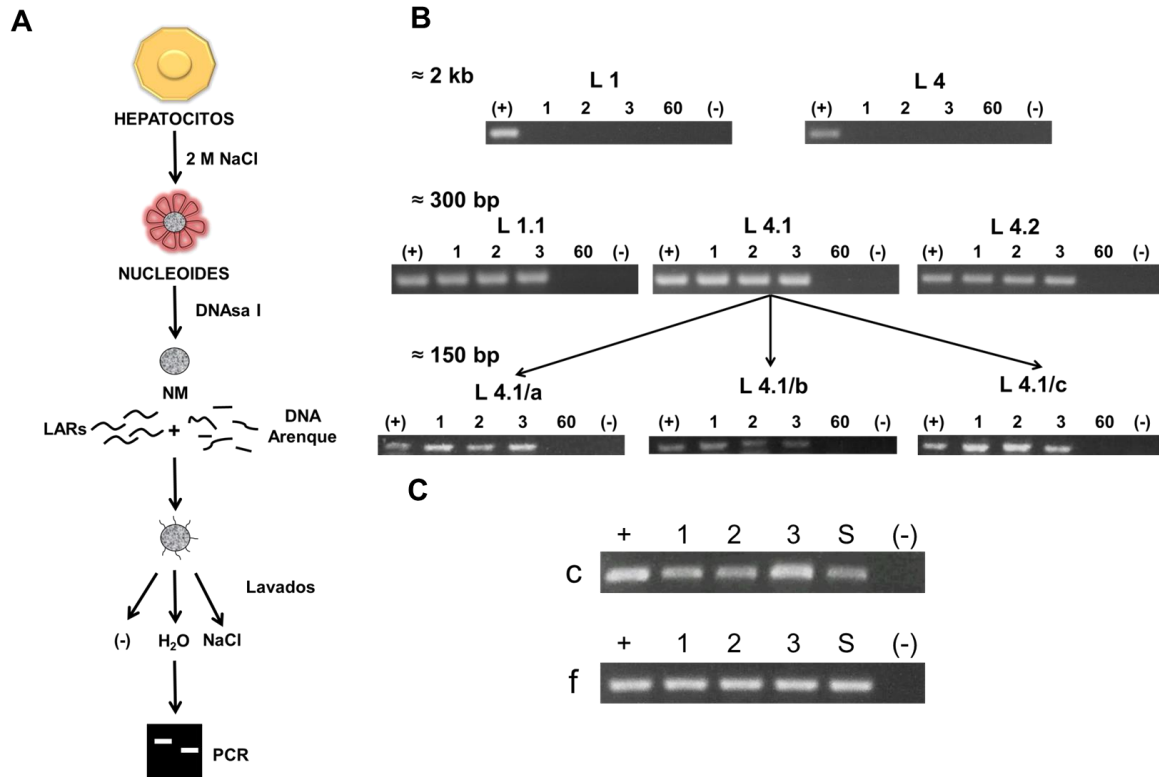


Figura 15. Determinación de la afinidad de los amplicones L1 y L4 por proteínas de MN *in vitro*. A) Diseño experimental del ensayo de afinidad. A partir de hepatocitos se obtuvieron nucleoides que son digeridos exhaustivamente con DNAsa I. Las proteínas de MN obtenidas se colocaron en solución junto con los amplicones en estudio y DNA de Arenque. La afinidad de los amplicones se retó mediante lavados específicos. 1. Buffer de ensayo de afinidad (isotónico) (BF). 2. Agua bidestilada (Hipotónico). 3. 2 M de NaCl (Hipertónico). B) Se verificó la presencia de los amplicones por PCR utilizando el DNA que permaneció unido a las proteínas de MN después de los lavados. Los productos generados se analizaron en geles de agarosa al 2%. (+) Control positivo, DNA genómico. (-) Control Negativo, sin templado. (60) Control negativo en el que se utilizó como templado el DNA asociado a las proteínas de MN obtenidas de la digestión de nucleoides con 8 U/mL (60 minutos) para demostrar que este no es la fuente de

amplificaciones espurias de las secuencias blanco. C) Representación gráfica del diseño de los amplicones anidados en L1, L4 y L4.1.

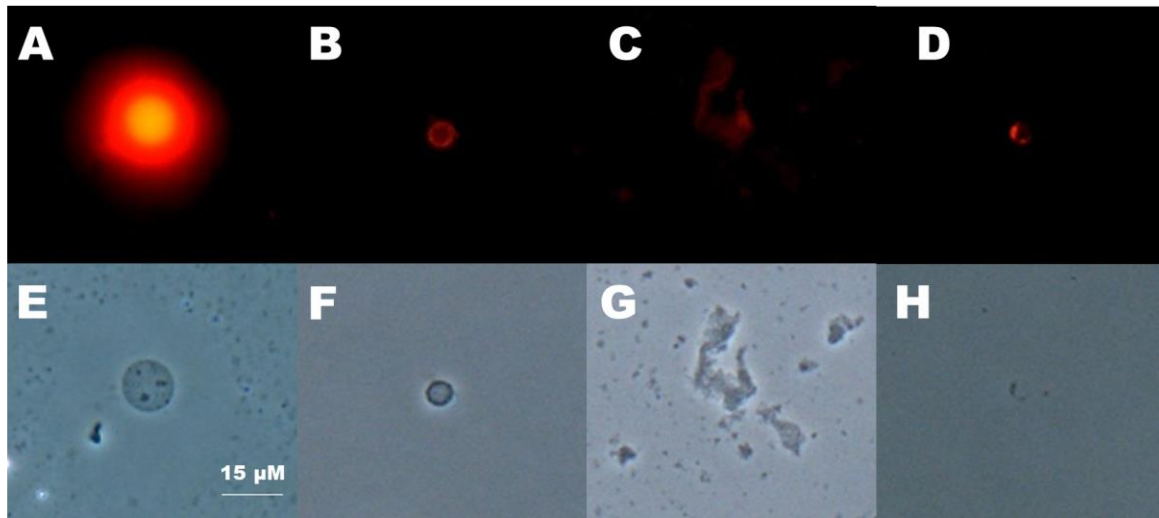


Figura 16. Efecto de la digestión con DNAsa I en la MN. Los nucleoides de hepatocitos con el DNA total asociado a la MN como bucles estructurales (Nucleoides control, A, E) se digirieron con 0.5 (B, F) y 8 (C, G) U/mL de DNAsa I durante 60 minutos. A diferencia de los disgregados de proteínas que se observan cuando los nucleoides se digieren directamente con altas concentraciones de DNAsa I (C, G), si la digestión se realiza en núcleos celulares (8 U/mL, 60 minutos) la MN resultante conserva su estructura (D, H).

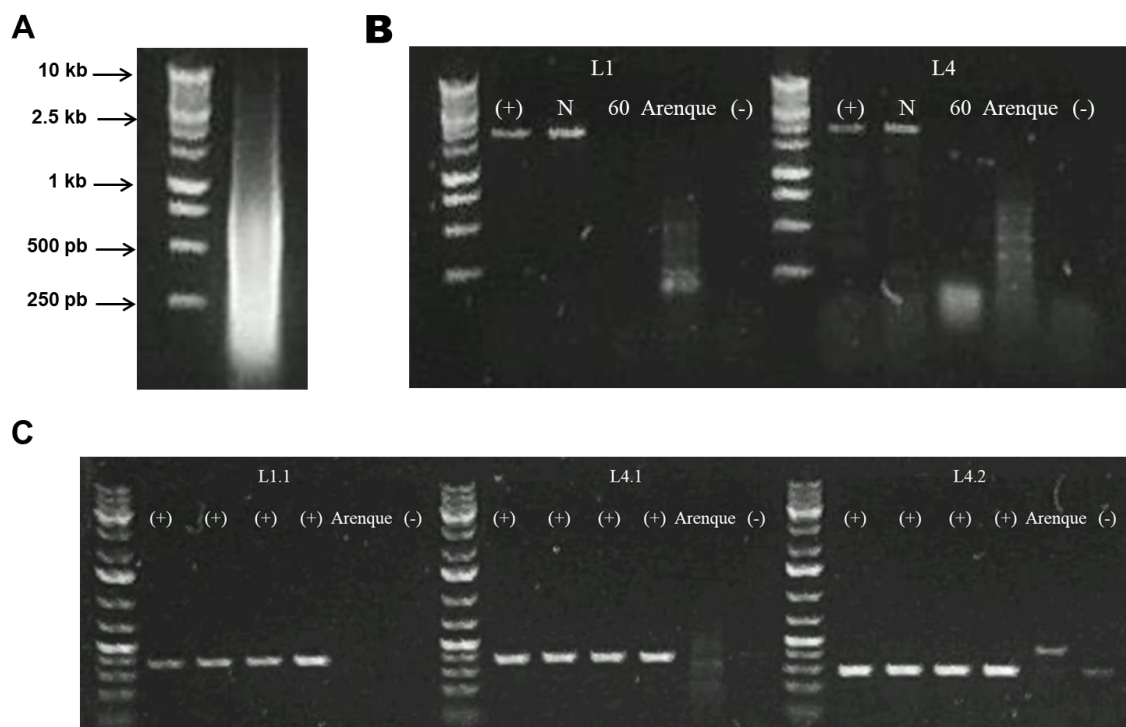


Figura 17. Controles de amplificación en DNA de esperma de Arenque. A) Análisis en gel de agarosa al 2% del DNA de esperma de Arenque utilizado en los ensayos de afinidad como competidor. B) Se utilizó el DNA de Arenque como templado para detectar amplificaciones espurias de los amplicones utilizados. (+) Control positivo, DNA genómico. N Control positivo, nucleoides con el DNA total asociado. (60) Control negativo en el que se utilizó como templado el DNA asociado a la MN obtenida de la digestión de nucleoides con 8 U/mL, 60 minutos (LARs) para demostrar que este no es la fuente de amplificaciones espurias de las secuencias blanco. (-) Control negativo, sin templado.

Para asegurarnos que el DNA de Arenque no generara productos espurios y con esto causara falsos positivos, este se utilizó como templado para amplificar los amplicones L1, L4 y sus amplicones anidados, los resultados fueron negativos por lo que pudo utilizarse como DNA competidor sin problema (Figura 17 B y C). Por

otra parte, el ensayo de afinidad incluye tres protocolos distintos de lavados (Figura 15 A), que, a diferencia de los estudios previos, retan la afinidad de los amplicones por las proteínas de MN. De hecho, ya que por definición los LARs resisten a la extracción con altas concentraciones de sal, el protocolo de lavado 3 incluye el uso de alta fuerza iónica (2M de NaCl) y, por lo tanto, si L1 y L4 se unen *in vitro* de forma similar a como lo hacen *in situ* éstos deberán resistir los retos que imponen los protocolos de lavados propuestos.

Después de realizar el ensayo de afinidad se estableció por PCR que los amplicones L1 y L4 no se unieron a las proteínas de MN *in vitro* bajo ninguno de los protocolos de lavado (Figura 15 B \approx 2 kb). Sin embargo, los amplicones anidados en L1 y L4, de longitudes de \approx 300 pb, sí se unen a las proteínas de MN y resisten los tres protocolos de lavados (Figura 15 B). De existir alguna secuencia dentro de los amplicones anidados (L1.1, L4.1 y L4.2) responsable de su asociación con las proteínas de MN es difícil imaginar por qué estas mismas secuencias no permiten que L1 y L4 se unan bajo las mismas condiciones (Figura 15 C). Para indagar al respecto, se evaluó la afinidad de los amplicones anidados en L4.1. Los tres amplicones anidados (L4.1/abc), \leq 240 pb, se unieron con alta afinidad a las proteínas de MN (Figura 15 B). En este caso es posible suponer que la región sobrelapada entre los tres amplicones es la responsable de su unión a las proteínas de MN, sin embargo, la secuencia contenida en dicha región no se encuentra en los amplicones L1.1 y L4.2 que también se unieron a las proteínas de MN.

Como se mencionó anteriormente, las MN digeridas exhaustivamente con DNAsa I (8 U/mL, 60 minutos) perdieron la estructura (Figura 16 C y G) y los ensayos de afinidad se realizaron con las proteínas de MN resultantes. Esto implica que la estructura de la MN quedó fuera de la evaluación en el ensayo de afinidad realizado (Figura 15 A y B) y no sabíamos si esto pudo afectar los resultados obtenidos. Por lo tanto, realizamos el ensayo de afinidad con MN que si conservan su estructura (Figura 18 A, Figura 16 D y H). Para obtener la MN, la digestión con DNAsa I se realizó en núcleos de hepatocitos y, posteriormente, el protocolo de extracción de la MN (Figura 18 A). Aparentemente el que la digestión con DNAsa I se lleve a cabo en presencia de las proteínas de la cromatina (en el núcleo celular y no directamente sobre los nucleoides) y que la extracción de MN se realice después de dicha digestión contribuye a conservar la estructura de la MN (Figura 16 D, H). Después de realizar el ensayo de afinidad con las MNs obtenidas, se estableció por PCR que los amplicones L1 y L4 nuevamente no se unieron a la MN bajo ninguno de los protocolos de lavado; sin embargo, los amplicones anidados en L1 y L4 sí se unieron a la MN. Probamos la afinidad de los amplicones anidados en L4.1 y verificamos que estos amplicones sí se unen a la MN. El que obtuviéramos los mismos resultados en los ensayos de afinidad realizados con las MN estructuradas y los realizados con proteínas de MN indican que son las proteínas de MN *per se*, y no la interrelación que existe entre ellas, las responsables de la unión de los amplicones anidados en L1 y L4 (Figura 18 B).

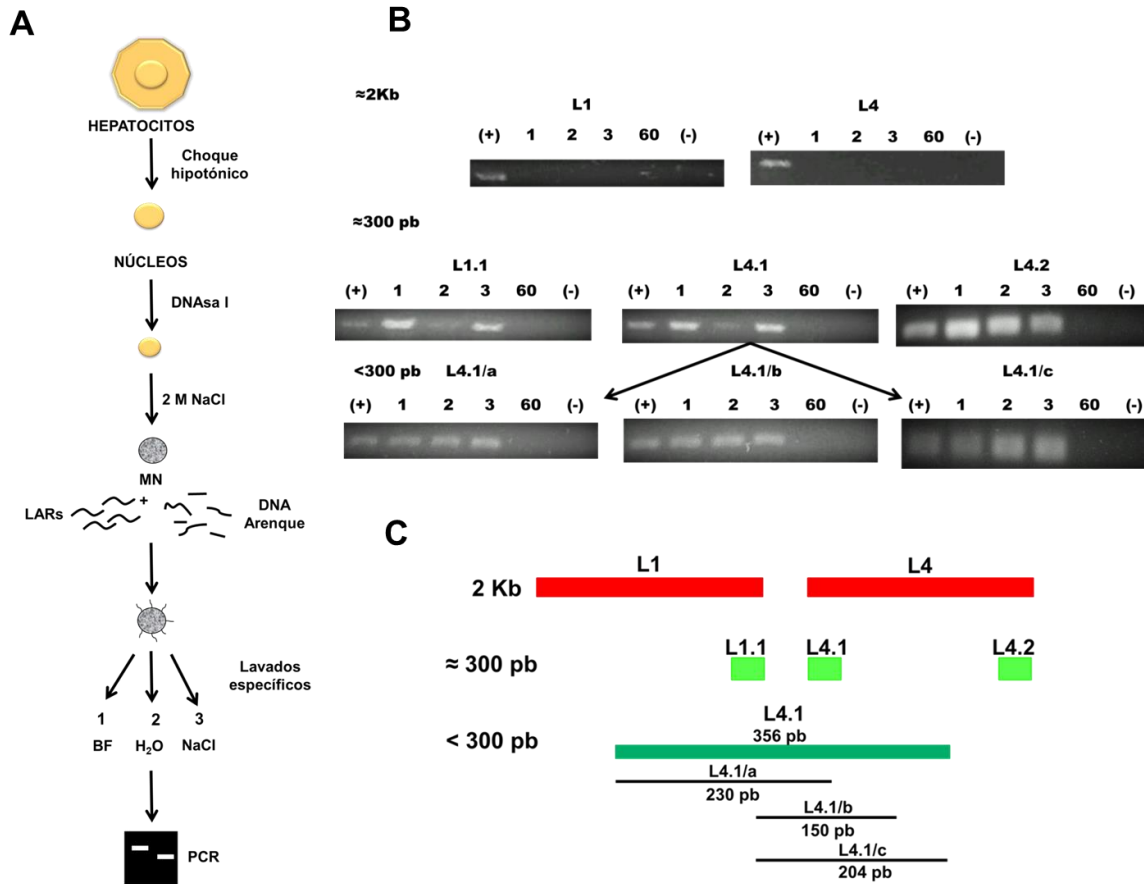


Figura 18. Determinación de la afinidad de L1 y L4 por MNs estructuradas *in vitro*. A) Diseño experimental. Los núcleos extraídos de hepatocitos se digieren con DNAsa I (8 U/mL, 60 minutos) y posteriormente se extrae la MN. La MN se coloca en solución junto con los amplicones en estudio y DNA de Arenque. La afinidad de los amplicones se retó mediante lavados específicos. 1. Buffer de ensayo de afinidad (isotónico) (BF). 2. Agua bidestilada (Hipotónico). 3. 2 M de NaCl (Hipertónico). B) Se verificó la presencia de los amplicones por PCR utilizando el DNA que permaneció unido a la MN después de los lavados. Los productos generados se analizaron en geles de agarosa al 2%. (+) Control positivo. DNA genómico. (-) Control Negativo. Sin templado. (60) Control negativo en el que se utilizó como templado el DNA asociado a la MN obtenida de la digestión de nucleoides con 8 U/mL (60 minutos) para demostrar que este no es la

fuelle de amplificaciones espurias de las secuencias blanco. C) Representación gráfica del diseño de los amplicones anidados en L1, L4 y L4.1.

F. La unión de los fragmentos de DNA a la MN depende de su longitud

Para evaluar la posibilidad de que la unión de los fragmentos de DNA a la MN obedezca a la presencia de una secuencia, buscamos motivos y secuencias consenso dentro de los amplicones probados. En la figura 19 A se muestran los 6 motivos encontrados en los diferentes amplicones.

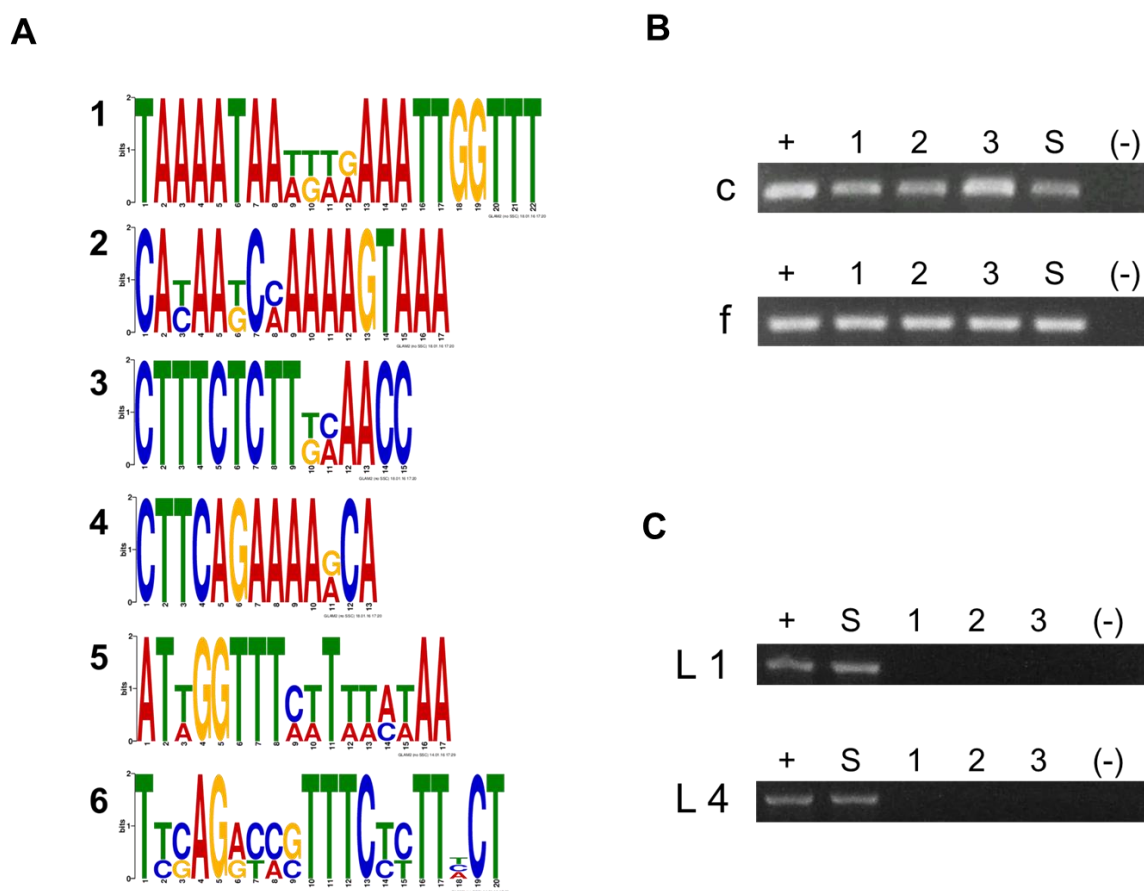


Figura 19. La unión de los fragmentos de DNA a la MN depende de su longitud. A) Motivos encontrados en los amplicones no superpuestos. La región

sobrelapada entre los amplicones L4.1/a-c no se tomó en cuenta para la determinación. Únicamente el motivo 5 es compartido por todos los amplicones (Tabla 5). B) Los amplicones c y f, con una longitud ≤ 392 pb y localizados en el cuerpo del bucle de DNA, se unen con alta afinidad a la MN *in vitro*. C) Ensayo de afinidad con los amplicones L1 y L4 donde se demuestra que sólo pueden ser amplificados en la fracción que corresponde al sobrenadante del lavado 1 (S) y no se asocian a la MN. (+) Control positivo, DNA genómico. (-) Control Negativo sin templado.

Podemos darnos cuenta que únicamente los motivos 5 y 6 están presentes en todos los amplicones (Tabla 5). Debido a que el motivo 6 está incompleto en el amplicón L4.1/a, podemos suponer que la unión de los fragmentos de DNA a la MN depende del motivo 5, sin embargo, tomando en cuenta la amplia evidencia que sugiere la falta de una secuencia consenso que defina las interacciones DNA-MN, nos inclinamos a pensar que debe ser otro factor el que determine tales interacciones. El diseño de los amplicones estudiados involucra una reducción secuencial en su longitud (Figura 17 C), de hecho, son los fragmentos de ≈ 300 y menores los que se unen consistentemente a la MN, por lo que podemos suponer que la longitud de los fragmentos de DNA podría ser un determinante en su unión a la MN. Para probar esta hipótesis probamos la afinidad *in vitro* de dos amplicones ≤ 392 pb, que también pertenecen al locus de la familia albúmina pero que están localizados en el cuerpo del bucle de DNA (Figura 11 A, amplicones c y f). Ambos amplicones se unen a la MN *in vitro* y, al igual que los amplicones anidados en L1 y L4, una vez unidos resisten a la extracción con altas

concentraciones de sal (Figura 19 B). Por otra parte, el análisis de su secuencia de nucleótidos indica que estos amplicones no contienen ninguno de los motivos descritos en la figura 19 A. Estos resultados indican que es la longitud de los fragmentos de DNA y no su secuencia la que determina su unión con la MN.

Amplicón	Motivo					
	1	2	3	4	5	6
L1	x	x	x	x	x	x
L4	x	x	x	x	x	x
L1.1		x			x	x
L4.1					x	x
L4.2	x		x		x	x
L4.1/a					x	x 4 nt
L4.1/b					x	x
L4.1/c					x	x

Tabla 5. Relación de los motivos encontrados en los amplicones. Sólo se encuentran 4 nucleótidos del motivo 6 en el amplicón L4.1/a.

G. La unión de los fragmentos de DNA es independiente de RNA

El RNA es parte fundamental de la MN (Tabla 1) y se ha visto que al asociarse a algunas proteínas de MN causa cambios locales en la configuración de la cromatina (Herman, *et al.*, 1978; Ma, *et al.*, 1999; Nickerson, *et al.*, 1989). Además, está reportado que proteínas de matriz nuclear pueden interactuar tanto con DNA como RNA, de hecho, se han identificado los sitios específicos de unión

en algunas de estas proteínas (ver introducción Proteínas de MN). Por lo tanto, para evaluar si la unión de los amplicones L1.1, L4.1 y L4.2 a la MN depende de la asociación de RNA, sometimos a digestión con RNAsa I las proteínas de MN con los amplicones asociados (el producto del ensayo de afinidad). Posteriormente, se estableció por PCR que los amplicones permanecieron asociados a la MN después de la digestión con RNasa I, por lo que la unión de los amplicones a las proteínas de MN no depende de RNA (Figura 20).

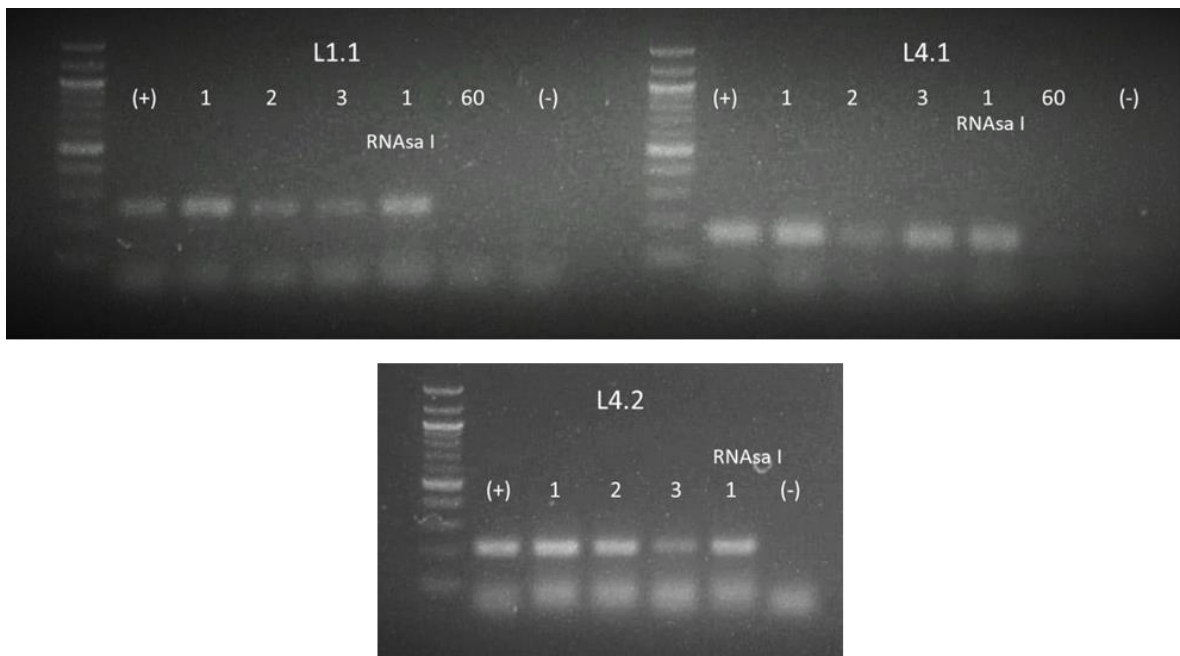


Figura 20. La unión de los fragmentos de DNA es independiente de RNA. Se realizó el ensayo de afinidad con los amplicones L1.1, L4.1 y L4.2 de acuerdo a los descrito en la figura 17 y se constató que los amplicones están unidos a las proteínas de MN después de los lavados específicos (1, 2, 3), posteriormente, los amplicones unidos a las proteínas de MN se digirieron con 8 U/mL de RNAsa I (60 minutos) y se estableció por PCR que los amplicones permanecieron unidos a las proteínas de MN después de la digestión (RNAsa I). (+) Control positivo con DNA genómico como templado. (60) Control negativo en el que se utilizó como templado el DNA asociado a la MN obtenida de la digestión de nucleoides con 8

U/mL (60 minutos) para demostrar que este no es la fuente de amplificaciones espurias de las secuencias blanco. (-) Control negativo sin templado.

H. Controles de amplificación

De acuerdo a los resultados presentados los LARs L1 y L4 de ≈ 2 kb no se asociaron consistentemente a las matrices nucleares ni a las proteínas de matriz nuclear; sin embargo, nos preguntamos si esto podría deberse a alguna limitante técnica en el método de detección (PCR).

La matriz nuclear

A pesar de que los amplicones L1 y L4 son eficientemente amplificados en nucleoides con el total de los bucles de DNA anclados a la MN, el hecho de que la matriz nuclear proteja del corte por nucleasas a la fracción de DNA que corresponde a los LARs, abre la posibilidad de que impida la acción de otras proteínas. Por lo tanto, es probable que después del ensayo de afinidad los amplicones L1 y L4 no sean amplificables debido a que la MN impide el paso de la DNA polimerasa. Para evaluar esta posibilidad, después de realizar el ensayo de afinidad se eliminó la MN mediante digestión con proteinasa K, el DNA asociado se recolectó y se utilizó como templado para amplificar L4. No se encontró señal del amplicón en los fragmentos de DNA recuperados, incluso cuando se incrementó la eficiencia de la reacción de PCR (P) (Figura 21). De hecho, después del ensayo de afinidad los amplicones L1 y L4 se localizan en el sobrenadante del

ensayo de afinidad, lo que confirma que efectivamente no se unen a la MN *in vitro* (Figura 19 C).

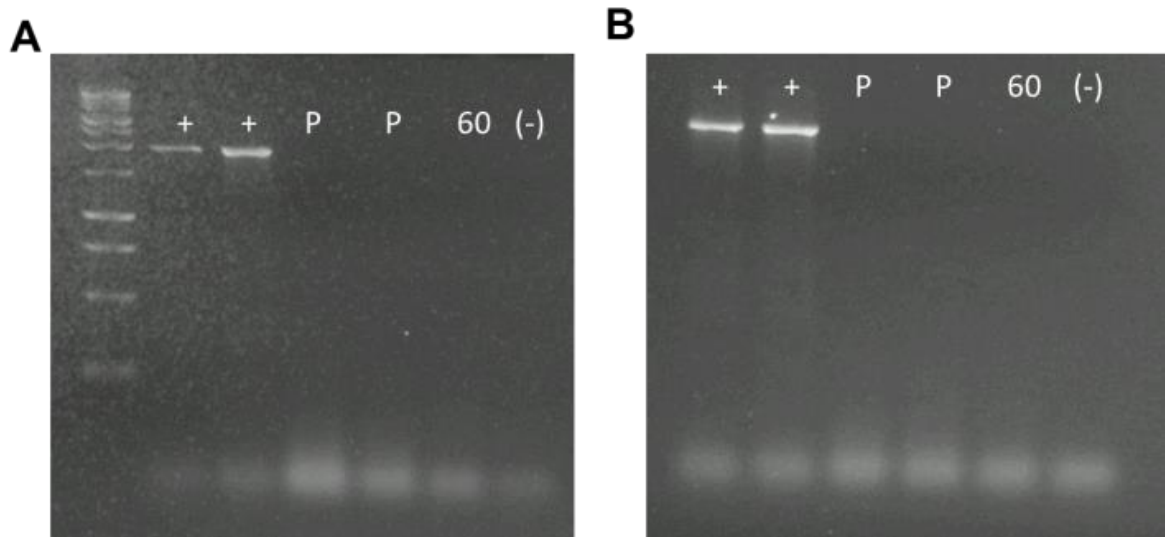


Figura 21. Efecto de la presencia de proteínas en la eficiencia de la PCR. A) El DNA asociado a la MN después del ensayo de afinidad se liberó mediante digestión con proteinasa K, posteriormente, se recolectó y se utilizó como templado para amplificar L1 bajo las condiciones estándar de PCR (1 minuto de elongación durante 35 ciclos) (P) y B) se incrementó el tiempo de elongación a 2 minutos durante 45 ciclos. En ambos casos la amplificación de L1 es eficiente. (+) Control positivo, DNA genómico. (-) Control negativo sin templado. (60) Control negativo en el que se utilizó como templado el DNA asociado a la MN obtenida de la digestión de nucleoides con 8 U/mL (60 minutos) para demostrar que este no es la fuente de amplificaciones espurias de las secuencias blanco.

La topología del amplicón

Debido a que los amplicones de $\approx 2\text{kb}$ pueden adquirir una topología compleja, existe la posibilidad de que el DNA al encontrarse curvado, doblado, formando nudos, o en constante movimiento, impidan el paso de la DNA polimerasa o el correcto alineamiento de los cebadores con sus secuencias blanco, y como resultado disminuya la eficiencia de la reacción de PCR. Para evaluar si este era el caso se utilizó el amplicón L1 aislado como templado para amplificar L1 (Figura 22.1), la amplificación fue positiva.

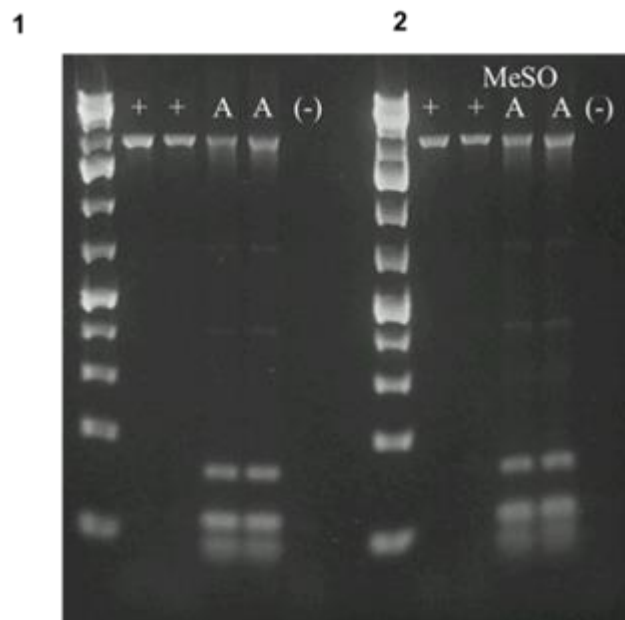


Figura 22. Efecto de la topología del amplicón en la eficiencia de la PCR. 1)

Se utilizó el amplicón L1 como templado para detectar L1 y evaluar si la topología de los amplicones impide su amplificación. 2) Se evaluó si la presencia de dimetil sulfóxido al 2% hace más eficiente la amplificación. (+) Control positivo con DNA genómico, (A) amplicón L1 como templado, (-) Control negativo sin templado.

Está reportado que el uso de dimetil sulfóxido al 2 % en la reacción de PCR hace más eficiente la amplificación de fragmentos de DNA ≥ 1 kb, sin embargo, en el caso del amplicón L1 no puede apreciarse una diferencia considerable en la eficiencia de amplificación (Figura 22.2). Estos resultados indican que la ausencia de señal en la fracción de DNA unida a la MN después del ensayo de afinidad *in vitro* de los amplicones L1 y L4, se debe a que efectivamente los amplicones no se unen a la MN (se localizan en la fracción de DNA sobrenadante, figura 19 C) y no a deficiencias en el método de detección de los amplicones.

DISCUSIÓN

Sabemos que el DNA se encuentra altamente compactado al interior del núcleo y que su organización no está dictada por el azar. A partir de este hecho surgen dos preguntas: ¿Cuál es el mecanismo por el cual surge esta organización? y ¿cuáles son los factores que la gobiernan? Para ahondar en el tema me gustaría poner sobre la mesa dos puntos de vista extremos. Primero, imaginemos que el DNA está empacado al interior del núcleo sin ninguna organización, solo necesita caber, y la secuencia del DNA es capaz de guiar todos los procesos genómicos como la transcripción y la replicación. En el otro extremo, la célula tiene que organizar el genoma de una forma precisa, es decir, el genoma cabe en una sola forma. La primera suposición resulta falsa ya que la evidencia experimental sugiere que la organización del genoma va mucho más allá del azar (Cook & Brazell, 1975; Cremer & Cremer, 2010; Markaki, *et al.*, 2010; Oudelaar, *et al.*, 2017). En cuanto al segundo planteamiento es evidente que la organización precisa de una fibra polimérica tan grande como el DNA estaría sujeta a un gran margen de error y, por lo tanto, la probabilidad de fallo sería muy alta. Las instrucciones de tan preciso empaquetamiento tendrían que estar especificadas en el genoma y el gasto de energía para seguirlas sería enorme, además, la compactación del genoma no puede depender de secuencias concretas, porque cualquier delección, inserción o sustitución interferiría con el proceso de ensamblaje provocando que este fracase. El fallo en este caso implicaría muerte celular por lo que prácticamente no podría desarrollarse la vida. Por lo tanto, podemos suponer que se requiere un mecanismo sencillo que guíe la organización, que no dependa

de secuencias y sea insensible a la prevalencia de uno o de otro nucleótido en el genoma; este mecanismo debería estar gobernado por parámetros generales, es decir, principios físicos y termodinámicos. La capacidad del DNA de adoptar diversas topologías (que surgen en principio de parámetros físicos), aunado a la evidencia de que lecturas indirectas de la topología del DNA impactan en la afinidad de éste por diversas proteínas y, la existencia de sitios en las proteínas capaces de unir DNA o RNA, sin reconocer ninguna secuencia específica (sección “afinidad genérica del DNA por la MN”) nos llevó a proponer como hipótesis que la topología del DNA, una característica primaria de cualquier polímero, podría ser la responsable de dirigir las interacciones DNA-MN.

La longitud de los fragmentos de DNA modula su afinidad por la MN *in vitro*

Debido a que los amplicones L1 y L4 se encontraron en la fracción de DNA que permaneció asociada a la MN después de la digestión con DNAsa I y enzimas de restricción, podemos afirmar que estas regiones forman los anclajes de bucles estructurales *in situ* (Figura 13 y 14). Esto nos permitió estudiar el comportamiento de asociación a la MN *in vitro* de regiones de DNA que sabemos forman anclajes de bucles estructurales *in situ*. Además del hecho evidente de que durante el ensayo de afinidad *in vitro* los amplicones L1 y L4 carecen del contexto genómico con el cual se convirtieron en LARs de manera natural, la topología de los fragmentos de DNA usados en los ensayos de afinidad se controló al variar la longitud de los mismos (Figura 11 B). En solución cualquier fragmento de DNA de secuencia al azar tiende a adoptar la topología de una línea recta conforme se

acerca a la longitud de persistencia (Sección “polímeros naturales y longitud de persistencia”, Figura 9 B). El ensayo de afinidad *in vitro* encontramos que a pesar de que *in situ* los amplicones L1 y L4 (≈ 2 kb) corresponden a los LARs, estos no se asociaron a proteínas de MN ni a MNs que conservan su estructura, esto implica que de acuerdo a lo propuesto en la hipótesis del proyecto, el eliminar el contexto genómico con el cual se formaron estos anclajes *in situ* impacta de forma negativa en su afinidad por la MN *in vitro*. Por otra parte, los amplicones anidados en L1 y L4 (de una longitud ≤ 356 pb), que tienen un comportamiento topológico lineal, se unieron con alta afinidad (ya que resisten a los lavados con alta fuerza iónica) tanto a proteínas de MN como a MNs estructuradas. Esta afinidad no puede depender de la secuencia de nucleótidos, ya que las mismas secuencias de los amplicones anidados se encuentran en L1 y L4, entonces, la topología lineal de los fragmentos es la responsable de su afinidad por la MN. Confirmamos esta aseveración experimentalmente, ya que dos regiones que no presentan similitud de secuencia con los amplicones L1 y L4 y que se encuentran en el cuerpo del bucle de DNA *in situ*, una vez que se encontraron linearizadas tuvieron una alta afinidad por la MN *in vitro*. Entonces, la topología lineal favorece la asociación del DNA por la MN; estos resultados concuerdan con los numerosos reportes en los que prácticamente cualquier secuencia de DNA presentó afinidad por la MN (sección “afinidad genérica del DNA por la MN”). Desde nuestra perspectiva el elemento común en estos experimentos fue que la mayoría de los fragmentos de DNA probados tienden a la linearidad ya que están cercanos a la longitud de Kuhn, lo que explica la afinidad genérica del DNA por la MN observada. De acuerdo a estos resultados y los antecedentes mostrados (sección “afinidad genérica del DNA por la MN”), teóricamente todo fragmento de DNA con una

longitud cercana a la longitud de persistencia va a tener cierta afinidad por las proteínas de MN, por esta razón no debiera existir un fragmento de DNA con una afinidad nula por la MN. Esto hace teóricamente imposible incluir como control negativo, a los ensayos de afinidad, un fragmento de DNA con una longitud cercana a la longitud de persistencia que no se una a la MN bajo las condiciones experimentales utilizadas.

Desde esta perspectiva, el que cualquier región del genoma puede en potencia formar un anclaje, explica en parte, por qué un locus determinado puede generar anclajes tejido específico a pesar de contener la misma secuencia de nucleótidos (Tabla 2, Figura 4). A este respecto, debemos tomar en cuenta que la MN incluye proteínas que son tejido específico (Dickinson, 1992; Fey & Penman, 1988; von Kries, *et al.*, 1991) y, debido a que este es el sustrato al cual se ancla el DNA, estas deben contribuir a establecer estas diferencias. Si la topología lineal del DNA es la que determina su afinidad por la MN, se puede proponer que es suficiente que cualquier región del genoma esté lo suficientemente expuesta de manera lineal a las proteínas de MN para que genere un anclaje.

Sin embargo, antes de continuar es necesario considerar lo siguiente: una propiedad intrínseca del DNA es su capacidad de hiperenrollarse cuando carece de extremos libres. Un segmento de DNA-B consiste de dos cadenas de DNA apareadas en contrasentido que giran alrededor de su eje aproximadamente cada 10.5 pb. Sin embargo, en un DNA sin extremos libres el agregar o quitar giros introduce tensión en la fibra de DNA que se manifiesta como hiperenrollamiento (Wr) (Figura 23).

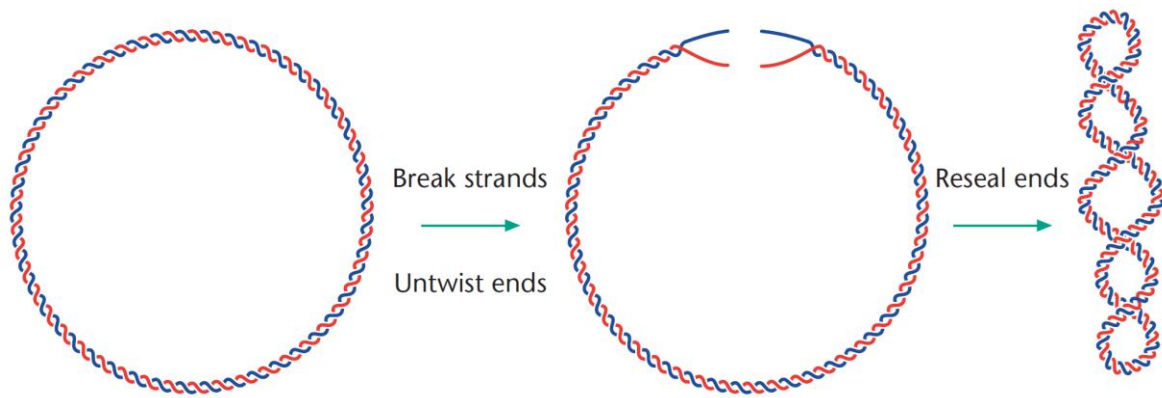


Figura 23. Hiperenrollamiento. Reducir el número de veces que dos cadenas de DNA cerrado se sobrecruzan induce hiperenrollamiento negativo en el DNA (Lindsley, 2005).

La topología es la rama de las matemáticas que estudia las propiedades de los cuerpos que, a menos que sufran una rotura, permanecen constantes a pesar de que el cuerpo en estudio sea distorsionado. Una de las propiedades topológicas de un DNA cerrado es el **Linking number (Lk)**, el Lk es el número de veces que las cadenas se enrollan una sobre otra. El linking number de un DNA **relajado** (Lk°) es igual al número de pares de bases del segmento de DNA en estudio (N) entre el número de pares de bases por vuelta (h), h es igual a 10.5 pb tomando en consideración la estructura del DNA-B. Así, el LK° del plásmido pBR 322 (4361 pb) es $Lk^\circ = 4361/10.5 = 415.3$. En el caso particular de un DNA cerrado cuando el Lk° es diferente del Lk real ($Lk^\circ \neq Lk$) va a surgir el hiperenrollamiento o writhe (Wr) del DNA (Figura 23). Si el Lk es menor al Lk° ($Lk - Lk^\circ$ es <0) va a surgir hiperenrollamiento negativo (Figura 23), si el Lk es mayor al Lk° ($Lk - Lk^\circ$ es >0) va a surgir hiperenrollamiento positivo, si el Lk es igual al Lk° ($Lk = Lk^\circ$) el DNA está relajado.

Ya que existe una interdependencia entre el Lk y el hiperenrollamiento (Wr), para un DNA cerrado donde $Lk \neq Lk^\circ$, topológicamente el Lk es la suma de dos propiedades geométricas, $Lk = Tw + Wr$. Tw (Twist) es el número de veces que una cadena de la doble hélice del DNA pasa una sobre otra (sobre el eje de la hélice), Wr (Writhe) es formalmente el hiperenrollamiento, y corresponde al número de veces que el eje de la hélice pasa sobre sí mismo. Empíricamente se ha determinado que la diferencia entre $Lk - Lk^\circ$ se distribuye en 75% hiperenrollamiento (Wr) y 25% Twist (Tw) (para un DNA con longitud $>3Kb$). Por ejemplo: para un plásmido circular pBR 322 con un Lk de 390 la diferencia entre $Lk - Lk^\circ \approx -25$ ($390 - 415$), de este -25 el 75% es $Wr \approx -19$ y el resto (-6) se le restan al Tw que es 415, entonces la ecuación queda $Lk = 409$ (Tw) + (-19) (Wr), esto quiere decir que (debido al signo menos del Wr) el plásmido va a dar 19 vueltas de hiperenrollamiento negativo.

El DNA hiperenrollado representa un estado del DNA con alta energía, la relación entre la energía libre de Gibbs (ΔG) y el Lk es proporcional a $(Lk - Lk^\circ)^2$. La energía libre de Gibbs (ΔG) es la energía disponible para realizar un trabajo, y se ha determinado empíricamente que esta corresponde a: $\Delta G = 10RTN\sigma^2$, donde R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura absoluta, N es el número de pares de bases y σ es la proporción $(Lk - Lk^\circ)/Lk^\circ$. Ambas ecuaciones se aplican para fragmentos de DNA $>2Kb$. Es esta energía libre la que hace al hiperenrollamiento tan importante a nivel biológico, ya que puede causar cambios locales en la estructura del DNA, como desnaturalización, formación de estructuras cruciformes, formación del DNA-Z y H. Además, el hiperenrollamiento

negativo favorece que las proteínas puedan abrir la doble hélice del DNA (paso esencial para realizar la transcripción y replicación) y es, en parte, lo que favorece la formación del nucleosoma (Lusser & Kadonaga, 2004). Por esta razón, es necesario invertir energía (en forma de ATP) para desplazar/quitar nucleosomas por las proteínas remodeladoras de la cromatina (Lindsley, 2005; Lusser & Kadonaga, 2004). Es decir, el estado basal del DNA es desplegar hiperenrollamiento y favorecer la unión de las histonas gracias a la energía contenida en este hiperenrollamiento, para modificar este estado se necesita la inversión de ATP.

En la célula los bucles de DNA anclados a la MN son el equivalente de un DNA circular ya que no cuentan con extremos libres por lo que van a manifestar hiperenrollamiento negativo (sección nucleoide, figura 24 A). Se ha propuesto que esta es la estructura de orden superior en el núcleo (**EOSN**) de la célula sobre la cual van a asociarse las proteínas de la cromatina (Aranda-Anzaldo, 2009, 2016; Aranda-Anzaldo *et al.*, 2014). Esto implica que el hiperenrollamiento que despliega el DNA es previo a la formación del nucleosoma porque es intrínseco al DNA. La transición del hiperenrollamiento de plectonómico a toroidal equivale a la transición del hiperenrollamiento que despliegan los bucles estructurales sin histonas al que despliegan cuando se forma el nucleosoma al asociarse un octámero de histonas por cada vuelta de hiperenrollamiento presente en el bucle de DNA (Figura 24 A y B), proceso que se favorece debido a la energía libre de Gibbs (ΔG) contenida en el hiperenrollamiento.

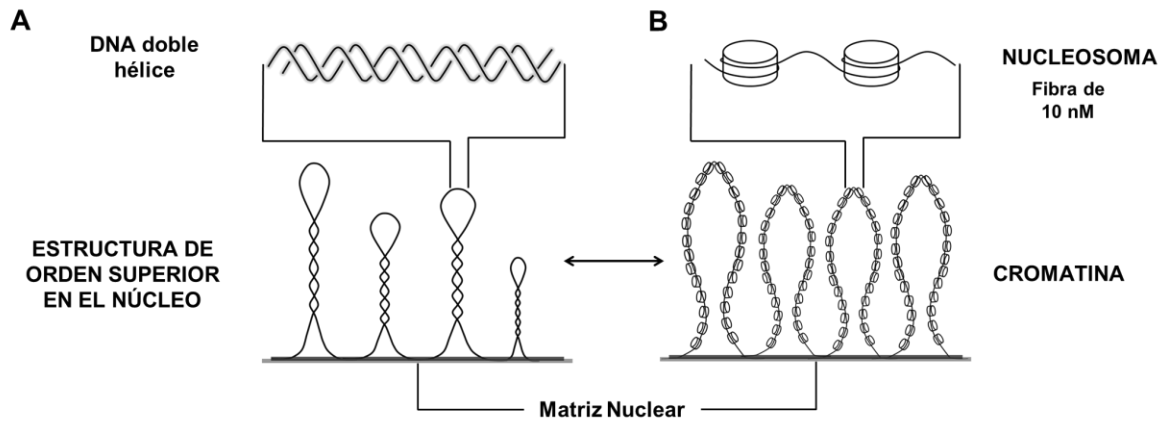


Figura 24. Modelo de la estructura de orden superior en el núcleo. A) La estructura de orden superior en el núcleo (**EOSN**) corresponde al DNA que forma bucles estructurales hiperenrollados anclados a la MN. B) La cromatina se forma al asociarse el octámero de histonas a una vuelta del hiperenrollamiento presente en el bucle de DNA que define la estructura de orden superior en el núcleo.

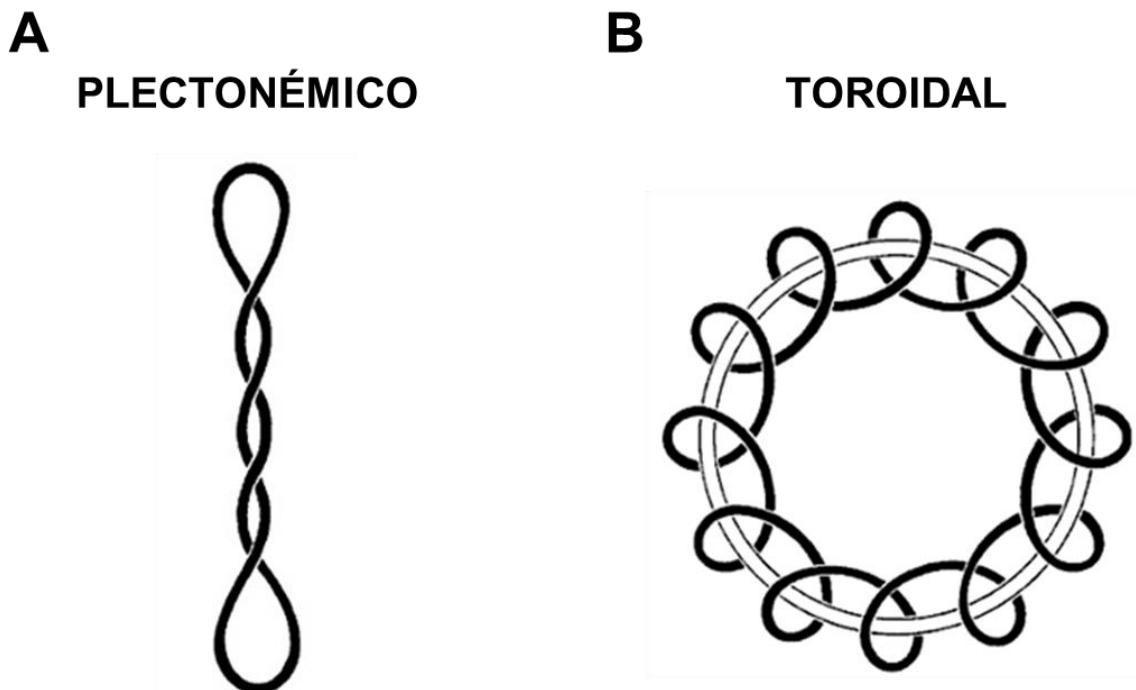


Figura 25. Tipos de hiperenrollamiento. A) Plectonómico. B) Toroidal.

Si bien existen proteínas remodeladoras de la cromatina capaces de poner y quitar nucleosomas con gasto de ATP, el ensamble de los nucleosomas a nivel genómico implicaría un gasto energético muy grande, es el hiperenrollamiento negativo presente en los bucles el responsable del ensamble de los nucleosomas (Lusser & Kadonaga, 2004). El número de vueltas que da el DNA sobre sí mismo (Linking number) es el mismo en el bucle plectonómico que en el toroidal, de hecho se ha determinado que hay aproximadamente una vuelta de supercoiling cada ≈ 200 pb en los bucles estructurales, frecuencia que se corresponde con la procesión de los nucleosomas a lo largo de la fibra de 10 nm. Además, para reconstituir nucleosomas *in vitro*, sin costo energético, es necesario que el DNA se encuentre hiperenrollado, de otra manera hay que agregar proteínas remodeladoras y ATP (Lusser & Kadonaga, 2004). Aplicando la navaja de Ockham, es más sencillo que el hiperenrollamiento presente en el DNA de manera natural sea el responsable del ensamble de los nucleosomas y no un gasto energético desmedido en forma de ATP y proteínas remodeladoras de la cromatina. Tenemos claro que las proteínas de la cromatina pueden formar bucles de DNA (bucles facultativos), sin embargo, la evidencia experimental indica que tales proteínas no participan en las interacciones estructurales entre el DNA y la MN. Por otra parte, es contundente la evidencia reciente de que la distribución de los nucleosomas a lo largo del genoma es mucho más heterogénea que lo consignado en los libros de texto, indicando que en el genoma son frecuentes las regiones desprovistas de nucleosomas (Ricci, *et al.*, 2015).

El siguiente modelo de formación de bucles solo considera las interacciones entre DNA desnudo (desprovisto de nucleosomas) y las proteínas de la MN. En solución

el DNA se encuentra en constante movimiento debido a la agitación termal, este movimiento permite que ciertas regiones del DNA adopten una topología lineal (de acuerdo a nuestros resultados esta topología favorecería la unión de estas regiones a proteínas de MN). Si tenemos un fragmento de DNA en solución en presencia de las proteínas de MN, las regiones de DNA que adopten una topología lineal mostrarían una tendencia a asociarse con las proteínas de MN. Este proceso equivaldría a la formación de anclajes estructurales *in vitro* ya que como demostramos anteriormente, la unión de fragmentos de DNA (con una longitud cercana a la longitud de persistencia) a proteínas de MN *in vitro* resisten los lavados con alta fuerza iónica, característica principal de los LARs caracterizados *in situ*.

Este proceso de formación de bucles estructurales está gobernado por parámetros generales, como son: la agitación termal del medio circundante y el estrés estructural; factores que finalmente impactan de manera local en la topología del DNA, lo que modula la afinidad de este por las proteínas de MN, y todo esto en forma independiente a la secuencia de nucleótidos, lo que incrementa la adaptabilidad y redundancia del sistema estructural.

Correlación entre los bucles estructurales y los bucles facultativos

In situ las regiones de anclaje a la MN se han clasificado en forma operacional como constitutivas si resisten a la extracción con altas concentraciones de sal y transitorias o facultativas si no resisten dicha extracción (Ottaviani, *et al.*, 2008).

Los anclajes que resisten a la extracción con altas concentraciones de sal se denominan LARs y definen bucles estructurales de DNA (Ottaviani, *et al.*, 2008) (Figura 24 A), los bucles facultativos o transitorios están determinados por interacciones del DNA con las proteínas de la cromatina y la MN (Figura 24 A y B). En el sistema experimental utilizado en el presente proyecto no podemos estudiar a los bucles facultativos ya que las proteínas de la cromatina son eliminadas por el proceso de extracción con altas concentraciones de sal. Se ha propuesto que la estructura de orden superior en el núcleo (EOSN) es el nivel de organización subyacente a los niveles de organización que surgen de la interacción del DNA con las proteínas de la cromatina (Aranda-Anzaldo, 2009, 2016; Aranda-Anzaldo, *et al.*, 2014) (Figura 24 A y B). La asociación de las proteínas de la cromatina, como CTCF y cohesina, al EOSN resulta en una organización funcional en 3D del genoma. O sea, es a partir de los bucles estructurales pre-existentes que las proteínas de la cromatina forman los bucles facultativos (Aranda-Anzaldo, 2009, 2016; Aranda-Anzaldo, *et al.*, 2014) (Figura 24 A y B).

Me parece necesario poner a prueba esta hipótesis y establecer experimentalmente la relación entre los bucles estructurales y los bucles facultativos. A este respecto mediante técnicas de 3C se puso en evidencia que las interacciones detectadas son distintas en ambos niveles de organización (Gavrilov, *et al.*, 2010) y la eliminación de algunas de las proteínas de la cromatina como cohesina y CTCF, revelan niveles de organización subyacentes que sugieren una complejidad mayor que una simple organización jerárquica (Nora, *et al.*, 2017; Schwarzer, *et al.*, 2017). Queda claro que establecer la relación entre los bucles estructurales y facultativos constituye una línea de investigación que

deberá abordarse desde múltiples ángulos experimentales. Para ello primero debemos proponer un modelo que describa cuál es la probable relación entre los bucles estructurales y facultativos para ponerlo a prueba (Figura 26).

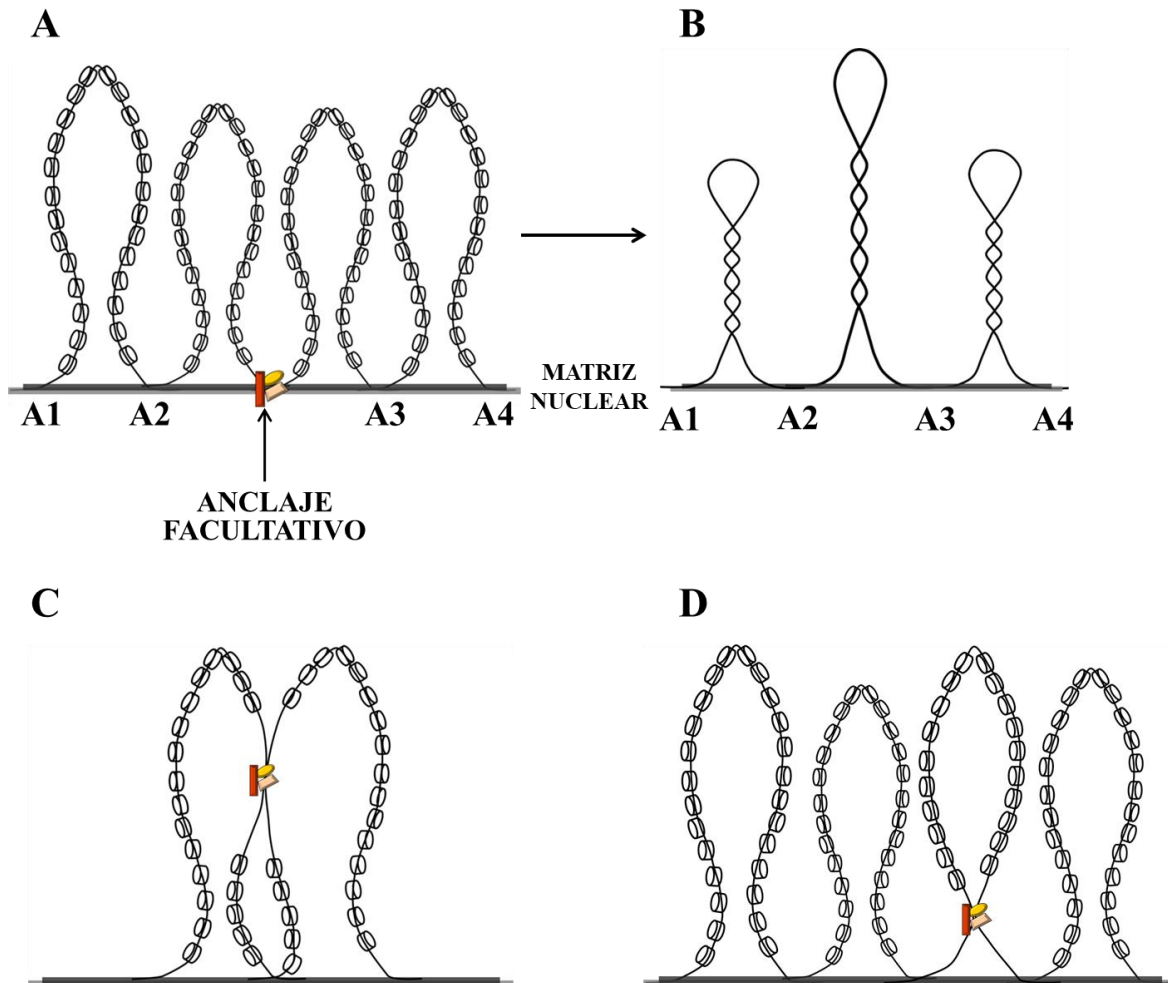


Figura 26. Modelo de la relación entre bucles estructurales y bucles facultativos. A) Anclaje facultativo mediado por Pit1 (rojo), β -catenina (amarillo) y SATB1 (rosa). A1, A2, A3 y A4 son anclajes estructurales (LARs). B) Al eliminar las proteínas de la cromatina presentes en A se revelan tres bucles estructurales definidos por los anclajes A1-A4. C) y D) Ejemplos de posibles estructuras resultado de interacciones facultativas sobre bucles estructurales.

Para proponer el modelo tomemos como ejemplo: Pit 1 es un factor de transcripción necesario para la diferenciación celular durante el desarrollo de la pituitaria y tiene que unirse al DNA, SATB1 y posteriormente a la matriz nuclear (Matrina 3) para activar sus genes blanco (Skowronska-Krawczyk *et al.*, 2014) (sección anclajes transitorios o facultativos). La interacción Pit1-DNA y matriz nuclear equivale a un anclaje facultativo (ya que no resiste a la extracción con altas concentraciones de sal) (Figura 26 A), de acuerdo al modelo este anclaje (que define un bucle facultativo) debe estar contenido en un bucle estructural (Figura 26 A), si se eliminan las proteínas de la cromatina, se elimina el anclaje facultativo y se revelan los bucles estructurales (Figura 26 B). Podemos imaginar una gran cantidad de interacciones y situaciones similares (Figura 26 C y D), que pudieran estar mediadas por distintas proteínas, como CTCF y cohesina, o interacciones enhancer-promotor.

Poner a prueba el presente modelo, permitirá, mediante el monitoreo experimental de los anclajes facultativos y estructurales, establecer la relación existente entre los mismos. Además, si los experimentos se realizan bajo condiciones fisiológicas podría revelar los bucles estructurales sin utilizar la extracción con altas concentraciones de sal y revelar la naturaleza de las interacciones del DNA con las proteínas de matriz nuclear.

Desde mi perspectiva cualesquiera que fuesen los resultados, permitirían unificar la distancia conceptual existente entre la organización que confiere la matriz nuclear (sección proteínas de MN) y la que orquestan las proteínas de la cromatina.

La naturaleza de las interacciones DNA-MN

Los LARs están definidos operacionalmente como los anclajes de bucles estructurales que resisten a la extracción con altas concentraciones de sal. En el presente proyecto para indagar si la afinidad de los amplicones por la MN *in vitro* es de la misma naturaleza que la observada en los LARs, se retó la afinidad de los amplicones mediante lavados con altas concentraciones de sal (2M NaCl). Todos los amplicones anidados en L1 y L4 que se unieron tanto a proteínas de MN como a MN estructuradas resistieron a los lavados con alta fuerza iónica, por lo que cumplen con el criterio operacional de un LAR (Figura 17 y 18). Ahora podemos preguntarnos ¿Qué tipo de interacción DNA proteína resiste a una extracción con una solución 2M de NaCl? Se sabe que entre el 1-4% del DNA total corresponde a los LARs (Berezney & Coffey, 1976) y que esta fracción de DNA resiste a las condiciones más severas de digestión con nucleasas. Para que una fracción del DNA sea resistente a este tipo de digestiones, éste debe estar fuertemente protegido al interior de una proteína o de un complejo proteico. Si la interacción DNA-Proteína es de tipo electrostático, estas interacciones deben tener un alto nivel energético o deben encontrarse protegidas de la interacción con los iones presentes en la solución debido a que se encuentran inmersas en las proteínas. Por otro lado, uniones covalentes DNA-MN podrían ser las responsables de este tipo de uniones; sin embargo, la dinámica en la formación de los LARs parecería no apoyar este último punto o al menos no de todos los LARs. Por ejemplo, se ha visto que los LARs cesan la interacción con las proteínas de MN mientras otros se actualizan si se inducen cambios en la morfología de células HeLa (Martinez-Ramos, *et al.*, 2005). *In vivo* está bien documentada la formación de nuevos

anclajes con respecto al tiempo, lo cual, correlaciona con un incremento en la cantidad de proteínas de matriz nuclear (Maya-Mendoza, *et al.*, 2005). Por lo tanto, resulta difícil visualizar un tipo de interacción DNA-Proteína, tan estable como los enlaces covalentes, que a la vez tenga la alta dinámica observada experimentalmente. Además, en el caso de los amplicones anidados en L1 y L4 que se unieron tanto a proteínas de MN como a MN estructuradas *in vitro* y resistieron a los lavados con alta fuerza iónica, es difícil imaginar un mecanismo por el cual se formaron enlaces covalentes entre el DNA y las proteínas de MN bajo las condiciones en que se realizaron los ensayos de afinidad, además, no está registrado que alguna de las proteínas de la MN sea capaz de catalizar este tipo de reacciones.

Se han descrito interacciones DNA-proteínas que resisten a las condiciones más severas de extracción. Estas proteínas, denominadas *tightly binding-proteins*, se caracterizan por permanecer unidas al DNA después de ser sometidas a tratamiento con 2% SDS a 80°C, desproteinización con fenol-cloroformo o salting-out (Sjakste, *et al.*, 2012). Se trata de un grupo heterogéneo de proteínas entre las que se encuentran cinasas (C1D), fosfatasas (PP2A- protein phosphatase regulatory subunit A, serpinas (MENT- myeloid and erythroid nuclear termination stage-specific protein), proteínas del sistema de reparación del DNA (RHC31- homólogo de RAD31, RAD7) y proteínas de MN (BAF factor-barrier to autointegration factor) (Sjakste, *et al.*, 2012). Algunas de ellas se unen al DNA mediante enlaces covalentes; sin embargo, existe una fracción que se une por interacciones electrostáticas. Derivado de experimentos realizados sobre matrices nucleares se determinó que este tipo de interacciones pueden darse en la región

de los LARs (Bodnar, *et al.*, 1983); sin embargo, se estima que esta es una pequeña fracción comparada con el total de interacciones que se encuentran a nivel genómico (Sjakste, *et al.*, 2012).

Lo cierto es que a pesar de que existen entre $\approx 30,000$ - $110,000$ LARs por célula dependiendo del tejido y la especie (Tabla 2), se desconoce cuál es el tipo de interacción que existe entre la matriz nuclear y el DNA en estas regiones. El riesgo de trabajar con definiciones operacionales de las que surgen este tipo de anclajes cuya naturaleza es difícil de explicar, es que conlleva a la sospecha de artefactos experimentales por parte de algunos investigadores (también pueden poner en evidencia fenómenos que salen de los paradigmas vigentes). Aunque pueden darse argumentos válidos y eliminar estas sospechas, me parece que la mejor vía es demostrar por otra metodología la existencia *in vivo* de estos anclajes. En caso de que el método experimental propuesto anteriormente permita revelar a los bucles estructurales y, por lo tanto, los anclajes, sin utilizar la extracción con altas concentraciones de sal, nos permitiría, además de estudiar su naturaleza, abandonar la definición operacional de los LARs y, por consiguiente, también deberíamos abandonar en el concepto de orden superior de organización en el núcleo las definiciones operacionales e incluir conceptos más generales e incluyentes.

La estructura de la MN

A diferencia de la MN obtenida de nucleoides digeridos con 0.5 U/mL de DNAsa I (22% de DNA remanente) la MN de nucleoides digeridos con altas concentraciones de DNAsa I perdió totalmente su estructura (8 % del DNA total) (Figura 15). Estos resultados indican que al perderse el DNA la MN se colapsa, por lo que podemos concluir que el DNA tiene un papel estructural preponderante. La MN está compuesta por proteínas, DNA y RNA (Tabla 1); sin embargo, debido a que la MN está compuesta por >90% por proteínas y a que la microscopía electrónica solo permite observar preparaciones fijas, se asumió que la extensa red que se observa después de la extracción y digestión debería ser un continuo de ribonucleoproteínas (Berezney & Coffey, 1976; Nickerson, 2001). Sin embargo, la única manera de explicar nuestros resultados es asumir que debe existir una interdependencia estructural entre los elementos de la MN. Debido a que la unión de los amplicones anidados (L1.1, L4.1 y L4.2) a las proteínas de MN no depende de la presencia de RNA (Figura 20) podemos concluir: en primer lugar, que los sitios a los que se unen los amplicones en las proteínas operan de manera independiente a los sitios de unión a RNA; en segundo lugar, que la unión de los amplicones anidados no se debe a la formación de híbridos DNA-RNA y, finalmente, que las interacciones DNA-proteína son preponderantes en mantener la estructura de la MN. Sin embargo, es bien conocido que el RNA es capaz de causar cambios estructurales en la cromatina al asociarse a proteínas de MN y que su pérdida involucra cambios locales en la estructura de la MN (sección RNA y MN) por lo que será motivo de futuros estudios evaluar el papel estructural del RNA. Existe evidencia experimental reciente que sugiere que, contrario a lo que

sugerían las imágenes de microscopía electrónica, con excepción de las láminas, las proteínas de MN no forman un continuo y se encuentran distribuidas de forma heterogénea al interior del núcleo (Nozawa, *et al.*, 2017; Zeitz, *et al.*, 2009). Se ha propuesto en el laboratorio un modelo estructural en el cual los bucles de DNA al anclarse a las proteínas de MN funcionan como un “conector” entre estos grupos de proteínas, el DNA, además de darle continuidad a la estructura, aporta mediante el hiperenrollamiento una tensión que le confiere estabilidad (Figura 27) (Aranda-Anzaldo, 2009, 2016; Aranda-Anzaldo, *et al.*, 2014).

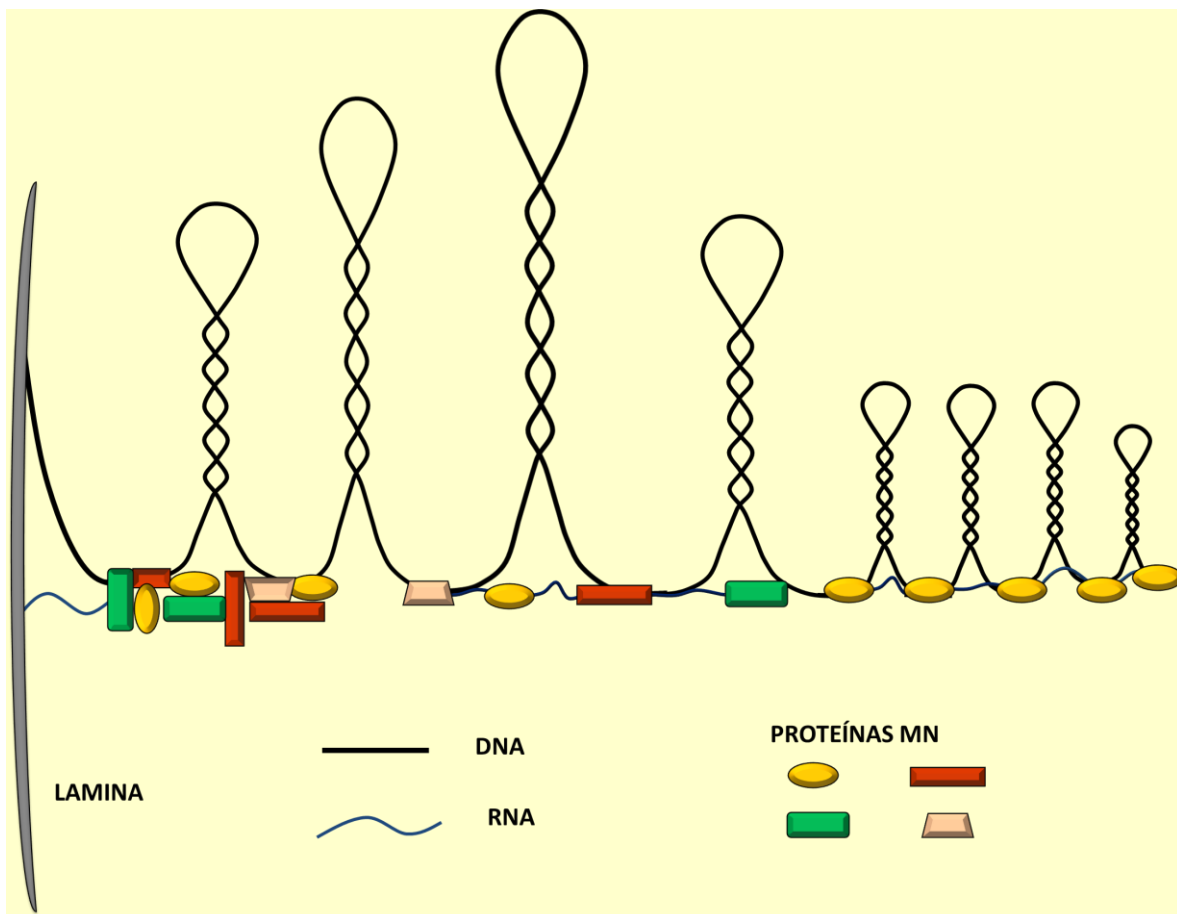


Figura 27. Modelo de tensegridad de la matriz nuclear. Los bucles estructurales de DNA se anclan a proteínas de la matriz nuclear, nótese que estas proteínas no forman un continuo, se propone que el hiperenrollamiento de los bucles le confiere tensión a la estructura con lo cual la estabiliza. El DNA en los

extremos se une a la lámina nuclear mediante los telómeros (Aranda-Anzaldo, 2016).

Estas características concuerdan con las estructuras basadas en tenseguridad (Ingber, 2003), en este caso las proteínas de MN funcionarían como los elementos discontinuos de compresión y el DNA como el elemento continuo de tensión (Aranda-Anzaldo, 2009, 2016; Aranda-Anzaldo, *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

- I. Los LARs 1 y 4 forman anclajes de bucles estructurales de DNA con la MN en el locus multigénico de la familia albúmina *in situ*.
- II. Los LARs 1 y 4 (≈ 2 kb) perdieron la afinidad por la MN una vez que fueron aislados de su contexto genómico natural.
- III. Los subfragmentos ≤ 356 pb de los LARs 1 y 4 muestran afinidad por la MN en forma resistente a la fuerza iónica.
- IV. La afinidad de los subfragmentos ≤ 356 pb de los LARs 1 y 4 es independiente de la secuencia de nucleótidos.
- V. La topología lineal del DNA favorece su unión o interacción con la MN.
- VI. Probablemente el DNA es un componente estructural de la MN.
- VII. La unión a la MN de fragmentos de DNA con topología lineal no está mediada por RNA.

REFERENCIAS

1. Alberts, B., Jhonson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the cell*. 6th edition. Chapter 4. 173-234.
2. Aranda-Anzaldo, A. (2009). A structural basis for cellular senescence. *Aging*, 1(7), 598–607. <https://doi.org/10.18632/aging.100074>
3. Aranda-Anzaldo, A. (2016). The interphase mammalian chromosome as a structural system based on tensegrity. *Journal of Theoretical Biology*, 393, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.01.005>
4. Aranda-Anzaldo, A., Dent, M.A.R., & Martinez-Gomez, 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. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.02.002>
5. Avramova, Z., & Paneva, E. (1992). Matrix attachment sites in the murine alpha-globin gene. *Biochemycal and Biophysical Research Communication*, 182(1), 78–85.
6. Baldwin, R.L. (1996). How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophysical Journal*, 71(4), 2056–2063. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79404-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79404-3)
7. Barone, J.G., De Lara, J., Cummings, K.B., & Ward, W.S. (1994). DNA organization in human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 15(2), 139–144.
8. Basler, J., Berezney, R., Hastie, N. D., Pietras, D., Matsui, S. I., & Sandberg, A. A. (1981). Hybridization of Nuclear Matrix Attached Deoxyribonucleic Acid Fragments. *Biochemistry*, 20(24), 6921–6929. <https://doi.org/10.1021/bi00527a027>
9. Benyajati, C., & Worcel, A. (1976). Isolation, characterization, and structure of the folded interphase genome of *Drosophila melanogaster*. *Cell*, 9(3), 393–407. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(76\)90084-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(76)90084-2)
10. Berezney, R., & Coffey, D. (1974). Identification of a nuclear protein matrix. *Biochemical and Biophysical Research communication*, 60(4), 1410–1417. [https://doi.org/0006-291X\(74\)90355-6](https://doi.org/0006-291X(74)90355-6) [pii]
11. Berezney, R., & Coffey, D. S. (1976). The nuclear protein matrix: isolation, structure, and functions. *Advances in Enzyme Regulation*, 14, 63–100. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=970274
12. Bodnar, J. W., Jones, C. J., Coombs, D. H., Pearson, G. D., & Ward, D. C. (1983). Proteins tightly bound to HeLa cell DNA at nuclear matrix attachment sites. *Molecular and Cellular Biology*, 3(9), 1567–1579. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6355827
13. Boulikas, T. (1993). Nature of DNA sequences at the attachment regions of genes to the nuclear matrix. *Journal of Cellular Biochemistry*, 52(1), 14–22. <https://doi.org/10.1002/jcb.240520104>
14. Boulikas, T. (1996). Chromatin Domains and Prediction of MAR Sequences. *International Review of Cytology*, 162(C), 279–388. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61234-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61234-6)
15. Bramswig, NC., Ludecke, HJ., Hamdan, FF., Altmuller, J., Beleggia, F., Elcioglu, NH., Freyer, C., Gerkes, EH., Demirkol, YK., Knupp, KG., Kuechler, A., Li, Y., Lowenstein, DH., Michaud, JL., Park, K., Stegmann, APA., Veenstra-Knol, HE.,

- Wieland, T., Wollnik, Engel, H., Strom, TM., Kleefstra, T., Wieczorek, D. (2017). Heterozygous HNRNPU variants cause early onset epilepsy and severe intellectual disability. *Human Genetics*, 136(7), 821–834. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1795-6>
16. Calladine, C. R., Drew, H. R., Luisi, B. F., & Travers, A. A. (2004). Chapter 5 - Curving in Three Dimensions. In C. R. Calladine, H. R. Drew, B. F. Luisi, & A. A. B. T.-U. D. N. A. (Third E. Travers (Eds.) (pp. 94–115). Oxford: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012155089-9/50005-3>
17. Cockerill, P. N., & Garrard, W. T. (1986). Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell*, 44(2), 273–282. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90761-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90761-0)
18. Coelho, M. B., Attig, J., Ule, J., & Smith, C. W. J. (2016). Matrin3: Connecting gene expression with the nuclear matrix. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 7(3), 303–315. <https://doi.org/10.1002/wrna.1336>
19. Cook, P. R., & Brazell, I. A. (1975). Supercoils in human DNA. *Journal of Cell Science*, 19, 261–279. <http://jcs.biologists.org/content/19/2/261.abstract>
20. Cook, PR., Brazell, IA., Jost, E. (1976). Characterization of Nuclear Structures Containing Superhelical DNA. *Journal of Cell Science*. 22:303-324. <http://jcs.biologists.org/content/19/2/261.abstract>
21. Cremer, T., & Cremer, M. (2010). Chromosome territories. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(3), 1–22. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003889>
22. 23. Dickinson, LA., Joh, T., Kohwi, Y., Kohwi-Shigematsu, T. (1992). A tissue-specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition. *Cell*, 70(4), 631–645. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90432-C](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90432-C)
23. 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. *Journal of Proteome Research*, 13(9), 3940–3956. <https://doi.org/10.1021/pr500218f>
24. Erazo, A., & Goff, S. P. (2015). Nuclear matrix protein Matrin 3 is a regulator of ZAP-mediated retroviral restriction. *Retrovirology*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0182-4>
25. Evans, K., Ott, S., Hansen, A., Koentges, G., & Wernisch, L. (2007). A comparative study of S/MAR prediction tools. *BMC Bioinformatics*, 8, 1–29. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-71>
26. Fackelmayer, FO., Dahm, K., Renz, A., Ramsperger, U., Richter, A. (1994), Nucleic-acid-binding properties of hnRNP-U/SAF-A, a nuclear-matrix protein which binds DNA and RNA in vivo and in vitro. *European Journal of Biochemistry*, 221: 749-757. <https://doi:10.1111/j.1432-1033.1994.tb18788.x>
27. Fey, E. G., Wan, K. M., & Penman, S. (1984). Epithelial Cytoskeletal Framework and Three-dimensional Organization and Protein Composition Nuclear Matrix-Intermediate Filament Scaffold. *Journal of Cell Biology*, 98(6):1973-1984. <http://jcb.rupress.org/content/98/6/1973.abstract>
28. Fey, E. G., & 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(1), 121–125. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.1.121>
29. Forcato, M., Nicoletti, C., Pal, K., Livi, C. M., Ferrari, F., & Bicciato, S. (2017). Comparison of computational methods for Hi-C data analysis. *Nature*

- Methods, 14(7), 679–685. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4325>
30. Fornerod, M. (2012). RS and RGG repeats as primitive proteins at the transition between the RNA and RNP worlds. *Nucleus*, 3(1), 4–5.
31. Frisch, M., Frech, K., Klingenhoff, A., Cartharius, K., Liebich, I., & Werner, T. (2003). In Silico Prediction of Scaffold / Matrix Attachment Regions in Large Genomic Sequences. *Genome Research*, 12, 349–354. <https://doi.org/10.1101/gr.206602>.
32. Frith, M. C., Saunders, N. F. W., Kobe, B., & Bailey, T. L. (2008). Discovering sequence motifs with arbitrary insertions and deletions. *PLoS Computational Biology*, 4(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000071>
33. Fussner, E., Strauss, M., Djuric, U., Li, R., Ahmed, K., Hart, M., 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. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.139>
34. Ganguly, A., Bagchi, B., Bera, M., Ghosh, A. N., and Sen, A. (1983). Estimation of domain length of chicken erythrocyte chromatin. *Biochimica et biophysica acta*, 739:286-290. <http://jcs.biologists.org/content/114/3/463.abstract>
35. Gavrilov, A. A., Zukher, I. S., Philonenko, E. S., Razin, S. V., & Iarovaia, O. V. (2010). Mapping of the nuclear matrix-bound chromatin hubs by a new M3C experimental procedure. *Nucleic Acids Research*, 38(22), 8051–8060. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq712>
36. Gavrilov, A. A., Golov, A. K., & Razin, S. V. (2013). Actual Ligation Frequencies in the Chromosome Conformation Capture Procedure. *PLoS ONE*, 8(3), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060403>
37. Gavrilov, A., Razin, S. V., & Cavalli, G. (2015). In vivo formaldehyde cross-linking: It is time for black box analysis. *Briefings in Functional Genomics*, 14(2), 163–165. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elu037>
38. Gerstberger, S., Hafner, M., & Tuschl, T. (2014). A census of human RNA-binding proteins. *Nature Reviews Genetics*, 15(12), 829–845. <https://doi.org/10.1038/nrg3813>
39. Glazko, G. V., Rogozin, I. B., & Glazkov, M. V. (2001). Comparative study and prediction of DNA fragments associated with various elements of the nuclear matrix. *Biochimica. Biophysica Acta* 1517(3), 351–364. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167478100002979>
40. Göhring, F., Schwab, B. L., Nicotera, P., Leist, M., & Fackelmayer, F. O. (1997). The novel SAR-binding domain of scaffold attachment factor A (SAF-A) is a target in apoptotic nuclear breakdown. *EMBO Journal*, 16(24), 7361–7371. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.24.7361>
41. Hacisuleyman E., Goff, LA., Trapnell, C., Williams, 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., Flaver, R., Raj, A., Rinn, J. L. (2014). Topological organization of multichromosomal regions by the long intergenic noncoding RNA Firre. *Nature Structural and Molecular Biology*, 21(2), 198–206. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2764>
42. Hakes, D. J., & Berezney, R. (1991). Molecular cloning of matrin F/G: A DNA binding protein of the nuclear matrix that contains putative zinc finger motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(14), 6186–6190. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.14.6186>
43. Hall, L. L., Carone, D. M., Gomez, A. V., Kolpa, H. J., Byron, M., Mehta, N.,

- Fackelmayer, FO, Lawrence, J. B. (2014). Stable COT-1 repeat RNA is abundant and is associated with euchromatic interphase chromosomes. *Cell*, 156(5), 907–919. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.042>
44. Hansen, JC., Connoly, M., McDonald, CJ., Pan., A., Pryamkova., A., Ray, K., Seidel, E., Tamura, S., Rogge, R., Maeshima, K. (2018). The 10-nm chromatin fiber and its relationship to interphase chromosome organization. *Biochemical Society Transactions*, 46(1), 67–76. <https://doi.org/10.1042/BST20170101>
45. Harborth, J., Wang, J., Gueth-Hallonet, C., Weber, K., & Osborn, M. (1999). Self assembly of NuMA: multiarm oligomers as structural units of a nuclear lattice. *The EMBO Journal*, 18(6), 1689–1700. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.6.1689>
46. Hartwig, M. (1982). Organization of mammalian chromosomal DNA: Supercoiled and folded circular DNA subunits from interphase cell nuclei. *Acta Biologica et Medica Germanica*. 37:421-432.
47. Hasegawa, Y., Brockdorff, N., Kawano, S., Tsutui, K., Tsutui, K., & Nakagawa, S. (2010). The matrix protein hnRNP U is required for chromosomal localization of xist RNA. *Developmental Cell*, 19(3), 469–476. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.08.006>
48. 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. *Journal of Cell Science*, 117(7), 999–1008. <https://doi.org/10.1242/jcs.00976>
49. Herman, R., Weymouth, L., & Penman, S. (1978). Heterogeneous nuclear RNA-protein fibers in chromatin-depleted nuclei. *The Journal of Cell Biology*, 78(3), 663–674. <https://doi.org/10.1083/jcb.78.3.663>
50. Hibino, Y., Nakamura, K., Asano, S., & Sugano, N. (1992). Affinity of a Highly Repetitive Bent DNA for Nuclear Scaffold Proteins from Rat Liver. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 184(2), 853–858.
51. Hibino, Y., Usui, T., Morita, Y., Hirose, N., Okazaki, M., Sugano, N., & Hiraga, K. (2006). Molecular properties and intracellular localization of rat liver nuclear scaffold protein P130. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1759(5), 195–207. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2006.04.010>
52. Hieda, M. (2017). Implications for diverse functions of the LINC complexes based on the structure. *Cells*, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/cells6010003>
53. Horn, H. F. (2014). LINC Complex proteins in development and disease. *Current Topics in Developmental Biology*, 109:287-321. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397920-9.00004-4>
54. Hsieh, T. H. S., Fudenberg, G., Goloborodko, A., & Rando, O. J. (2016). Micro-C XL: Assaying chromosome conformation from the nucleosome to the entire genome. *Nature Methods*, 13(12), 1009–1011. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4025>
55. Iarovaia, O. V., Bystritskiy, A., Ravcheev, D., Hancock, R., & 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh532>
56. Ingber, D. E. (2003). Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *Journal of Cell Science*, 116(7), 1157–1173. <https://doi.org/10.1242/jcs.00359>
57. Jackson, D. A., Dickinson, P., & Cook, P. R. (1990). The size of chromatin loops in HeLa cells. *The EMBO Journal*, 9(2), 567–571.
58. Kay, V., & Bode, J. (1994). Binding Specificity of a Nuclear Scaffold:

- Supercoiled, Single-Stranded, and Scaffold-Attached-Region DNA. *Biochemistry*, 33(1), 367–374. <https://doi.org/10.1021/bi00167a047>
59. Kiledjian, M., & Dreyfuss, G. (1992). Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *The EMBO Journal*, 11(7), 2655–2664. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05331.x>
60. Legartová, S., Stixová, L., Laur, O., Kozubek, S., Sehnalová, P., & Bártoová, E. (2014). Nuclear structures surrounding internal lamin invaginations. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(3), 476–487. <https://doi.org/10.1002/jcb.24681>
61. Lieberman-Aiden, E., Van Berkum, N. L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., Sandstrom, R., Bernstein, B., Bender, M.A., Groudine, M., Gnirke, A., Stamatoyannopoulos, J., Mirny, L.A., Lander, E.S Dekker, J. (2009). Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*, 326(5950), 289–293. <https://doi.org/10.1126/science.1181369>
62. Lindsley, J. E. (2005). DNA Topology: Supercoiling and Linking. *Encyclopedia of Life Science*, (c), 1–7. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0003904>
63. Ludérus, M. E., den Blaauwen, J. L., de Smit, O. J., Compton, D. A., & van Driel, R. (1994). Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. *Molecular and Cellular Biology*, 14(9), 6297–6305. <https://doi.org/10.1128/MCB.14.9.6297>
64. Ludérus, M. E. E., Van Steensel, B., Chong, L., Sibon, O. C. M., Cremers, F. F. M., & De Lange, T. (1996). Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex. *Journal of Cell Biology*, 135(4), 867–881. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.4.867>
65. Lusser, A., & Kadonaga, J. T. (2004). Strategies for the reconstitution of chromatin. *Nature Methods*, 1(1), 19–26. <https://doi.org/10.1038/nmeth709>
66. Ma, H., Siegel, A. J., & Berezney, R. (1999). Association of chromosome territories with the nuclear matrix: disruption of human chromosome territories correlates with the release of a subset of nuclear matrix proteins. *The Journal of Cell Biology*, 146(3), 531–542.
67. Ma, W., Ay, F., Lee, C., Gulsoy, G., Deng, X., Cook, S., Hesson, J., Cavanaugh C., Ware, CB., Krumm, A., Schendure, J., Blau, CA., Disteche, CM., Noble, WS, Duan, Z. (2014). Fine-scale chromatin interaction maps reveal the cis-regulatory landscape of human lincRNA genes. *Nature Methods*, 12(1), 71–78. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3205>
68. Ma, W., Ay, F., Lee, C., Gulsoy, G., Deng, X., Cook, S., Duan, Z. J. (2018). Using DNase Hi-C techniques to map global and local three-dimensional genome architecture at high resolution. *Methods*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.01.014>
69. Maeshima, K., Hihara, S., & Takata, H. (2010). New insight into the mitotic chromosome structure: Irregular folding of nucleosome fibers without 30-nm chromatin structure. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 75, 439–444. <https://doi.org/10.1101/sqb.2010.75.034>
70. Maeshima, K., Imai, R., Tamura, S., & Nozaki, T. (2014). Chromatin as dynamic 10-nm fibers. *Chromosoma*, 123(3), 225–237. <https://doi.org/10.1007/s00412-014-0460-2>
71. Markaki, Y., Gunkel, M., Schermelleh, L., Beichmanis, S., Neumann, J., Heidemann, M., Leonhardt, H., Eick, D., Cremer, C, Cremer, T. (2010). Functional nuclear organization of transcription and DNA replication: A topographical marriage

- between chromatin domains and the interchromatin compartment. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 75, 475–492. <https://doi.org/10.1101/sqb.2010.75.042>
72. Martinez-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. *Journal of Cellular Biochemistry*, 96(1), 79–88. <https://doi.org/10.1002/jcb.20428>
73. 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. *Analytical Biochemistry*, 313(2), 196–207.
74. Maya-Mendoza, A., Hernandez-Munoz, R., Gariglio, P., & 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 Ageing and Development*, 126(6–7), 767–782. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.01.011>
75. Mika, S., & Rost, B. (2005). NMPdb: Database of nuclear matrix proteins. *Nucleic Acids Research*, 33(DATABASE ISS.), 160–163. <https://doi.org/10.1093/nar/gki132>
76. Mirkovitch, J., Mirault, M.-E., & Laemmli, U. K. (1984). Organization of the higher order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffolds. *Cell*, 39, 223–232.
77. Nakagawa, S., & Hirano, T. (2014). Gathering around Firre. *Nature Structural and Molecular Biology*, 21(3), 207–208. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2782>
78. Nakane, M., Ide, T., Anzai, K., Ohara, S., and Andoh, T. (1978). Supercoiled DNA folded by nonhistone proteins in cultured mouse carcinoma cells. *Journal of Biochemistry*. 84:145-157. <http://jcs.biologists.org/content/114/3/463.abstract>
79. Nickerson, J. A. (2001). Experimental observations of a nuclear matrix. *J. Cell Science.*, 114, 463–474. <http://jcs.biologists.org/content/114/3/463.abstract>
80. Nickerson, J. A., Krochmalnic, G., Wan, K. M., & Penman, S. (1989). Chromatin architecture and nuclear RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(1), 177–181. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.1.177>
81. Nora, E. P., Goloborodko, A., Valton, A. L., Gibcus, J. H., Uebersohn, A., Abdennur, N., Dekker, J., Mirny, LA, Bruneau, B. G. (2017). Targeted Degradation of CTCF Decouples Local Insulation of Chromosome Domains from Genomic Compartmentalization. *Cell*, 169(5), 930–944.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.004>
82. Nozawa, R. S., Boteva, L., Soares, D. C., Naughton, C., Dun, A. R., Buckle, A., Ramsahoye, B., Bruton, P.C., Saleeb, R.S., Arnedo, M., Hill, B., Duncan, R.R., Maciver, S.K., Gilbert, N. (2017). SAF-A Regulates Interphase Chromosome Structure through Oligomerization with Chromatin-Associated RNAs. *Cell*, 169(7), 1214–1227.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.029>
83. Nozawa, R. S., & Gilbert, N. (2014). Interphase chromatin LINEd with RNA. *Cell*, 156(5), 864–865. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.005>
84. O'Sullivan, J. M., Hendy, M. D., Pichugina, T., Wake, G. C., & Langowski, J. (2013). The statistical-mechanics of chromosome conformation capture. *Nucleus (United States)*, 4(5). <https://doi.org/10.4161/nucl.26513>
85. Ottaviani, D., Lever, E., Takousis, P., & Sheer, D. (2008). Anchoring the genome. *Genome Biology*, 9(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-1-201>

86. Ou, H. D., Phan, S., Deerinck, T. J., Thor, A., Ellisman, M. H., & O'Shea, C. C. (2017). ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science*, 357(6349). <https://doi.org/10.1126/science.aag0025>
87. Oudelaar, A. M., Hanssen, L. L. P., Hardison, R. C., Kassouf, M. T., Hughes, J. R., & Higgs, D. R. (2017). Between form and function: The complexity of genome folding. *Human Molecular Genetics*, 26(R2), R208–R215. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx306>
88. Ozdilek, B. A., Thompson, V. F., Ahmed, N. S., White, C. I., Batey, R. T., & Schwartz, J. C. (2017). Intrinsically disordered RGG/RG domains mediate degenerate specificity in RNA binding. *Nucleic Acids Research*, 45(13), 7984–7996. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx460>
89. Pardoll, D. M., & Vogelstein, B. (1980). Sequence analysis of nuclear matrix associated DNA from rat liver. *Experimental Cell Research*, 128(2), 466–470.
90. Pathak, R. U., Srinivasan, A., & Mishra, R. K. (2014). Genome-wide mapping of matrix attachment regions in *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics*, 15(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1022>
91. Paulson, J. R., & Laemmli, U. K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell*, 12(3), 817–828.
92. Pederson, T. (2000). Half a century of “the nuclear matrix”. *Molecular Biology of the Cell*, 11(3), 799–805. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.3.799>
93. Peric-Hupkes, D., & van Steensel, B. (2010). Role of the nuclear lamina in genome organization and gene expression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 75, 517–524. <https://doi.org/10.1101/sqb.2010.75.014>
94. Radulescu, A. E., & Cleveland, D. W. (2010). NuMA after 30 years: The matrix revisited. *Trends in Cell Biology*, 20(4), 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.01.003>
95. 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 & Molecular Biology Letters*, 6(1), 59–69.
96. Razin, S. V., Gromova, I. I., & Iarovaia, O. V. (1995). Specificity and functional significance of DNA interaction with the nuclear matrix: new approaches to clarify the old questions. *International Review of Cytology*, 162B, 405–448.
97. Ricci, M. A., Manzo, C., García-Parajo, M. F., Lakadamyali, M., & Cosma, M. P. (2015). Chromatin fibers are formed by heterogeneous groups of nucleosomes in vivo. *Cell*, 160(6), 1145–1158. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.054>
98. 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 Research*, 17(1), 23–35. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsp027>
99. Romig, H., Fackelmayer, F. O., Renz, A., Ramsperger, U., & Richter, A. (1992). Characterization of SAF-A, a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements. *The EMBO Journal*, 11(9), 3431–3440. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1992.TB05422.X>
100. Rosa, A., & Zimmer, C. (2014). Chapter Nine - Computational Models of Large-Scale Genome Architecture. In R. Hancock & K. W. B. T.-I. R. of C. and M. B. Jeon (Eds.), *New Models of the Cell Nucleus: Crowding, Entropic Forces, Phase Separation, and Fractals* (Vol. 307, pp. 275–349). Academic Press.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800046-5.00009-6>

101. Sander, M., & Hsieh, T. S. (1985). Drosophila topoisomerase II double-strand DNA cleavage: analysis of DNA sequence homology at the cleavage site. *Nucleic Acids Research*, 13(4), 1057–1072. <https://doi.org/10.1093/nar/13.4.1057>
102. Schmid, C. (2001). Sperm nuclear matrix association of the PRM1-PRM2-TNP2 domain is independent of Alu methylation. *Molecular Human Reproduction*, 7(10), 903–911. <https://doi.org/10.1093/molehr/7.10.903>
103. Schwarzer, W., Abdennur, N., Goloborodko, A., Pekowska, A., Fudenberg, G., Loe-Mie, Y., Fonseca, N.A., Huber, W., Haering, C., Mirny, L., Spitz, F. (2017). Two independent modes of chromatin organization revealed by cohesin removal. *Nature*, 551(7678), 51–56. <https://doi.org/10.1038/nature24281>
104. Shoeman, R. L., & Traub, P. (1990). The in vitro DNA-binding properties of purified nuclear lamin proteins and vimentin. *Journal of Biological Chemistry*, 265(16), 9055–9061.
105. Silva-Santiago, E., Pardo, J. P., Hernandez-Munoz, R., & Aranda-Anzaldo, A. (2017-A). 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. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.10.023>
106. Silva-Santiago, E., Rivera-Mulia, J. C., & Aranda-Anzaldo, A. (2017-B). 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. <https://doi.org/10.1002/jcb.25852>
107. Simon, D. N., & Wilson, K. L. (2011). The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic “network of networks.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(11), 695–708. <https://doi.org/10.1038/nrm3207>
108. Simonis, M., Klous, P., Splinter, E., Moshkin, Y., Willemsen, R., De Wit, E., Van Steensel, B., De Laat, W. (2006). Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C). *Nature Genetics*, 38(11), 1348–1354. <https://doi.org/10.1038/ng1896>
109. Singh, G. B., Kramer, J. A., & Krawetz, S. A. (1997). Mathematical model to predict regions of chromatin attachment to the nuclear matrix. *Nucleic Acids Research*, 25(7), 1419–1425. <https://doi.org/10.1093/nar/25.7.1419>
110. Sjakste, N., Bielskiene, K., Bagdoniene, L., Labeikyte, D., Gutcaits, A., Vassetzky, Y., & Sjakste, T. (2012). Tightly bound to DNA proteins: Possible universal substrates for intranuclear processes. *Gene*, 492(1), 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.09.019>
111. Skowronska-Krawczyk, D., Ma, Q., Schwartz, M., Scully, K., Li, W., Liu, Z., Taylor, H., Tollkuhn, S., Ohgi, K.A., Notani, D., Kohwi, Y., Kohwi-Shigematsu, T., Rosenfeld, M. G. (2014). Required enhancer-matrix-3 network interactions for a homeodomain transcription program. *Nature*, 514(7521), 257–261. <https://doi.org/10.1038/nature13573>
112. Spitzner, J. R., & Muller, M. T. (1988). A consensus sequence for cleavage by vertebrate DNA topoisomerase II. *Nucleic Acids Research*, 16(12), 5533–5556.
113. Stuurman, N., Meijne, A. M., van der Pol, A. J., de Jong, L., van Driel, R., & van Renswoude, J. (1990). The nuclear matrix from cells of different origin. Evidence for a common set of matrix proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(10), 5460–5465.
114. Székvölgyi, L., Hegedüs, É., Molnár, M., Bacsó, Z., Szarka, K., Beck, Z., Dombrádi, V., Austin, C., Szabó, G. (2006). Nick-forming sequences may be involved in the organization of eukaryotic chromatin into ~50 kbp loops.

Histochemistry and Cell Biology, 125(1–2), 63–73. <https://doi.org/10.1007/s00418-005-0073-1>

115. Székvölgyi, L., Rákosy, Z., Bálint, B. L., Kókai, E., Imre, L., Vereb, G., Bacsó, Z., Goda, K., Varga, S., Balazs, M., Dombrádi, V., Nagy, L., Szabó, G. (2007). Ribonucleoprotein-masked nicks at 50-kbp intervals in the eukaryotic genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(38), 14964–14969. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702269104>

116. The human protein atlas. <https://www.proteinatlas.org/>

117. Tien Kuo, M. (1982). Analysis of DNA attached to the chromosome scaffold. *Journal of Cell Biology*, 93(2), 278–284. <https://doi.org/10.1083/jcb.93.2.278>

118. Tolhuis, B., Palstra, R. J., Splinter, E., Grosveld, F., & De Laat, W. (2002). Looping and interaction between hypersensitive sites in the active β -globin locus. *Molecular Cell*, 10(6), 1453–1465. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00781-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00781-5)

119. Travers, A. A., & Thompson, J. M. T. (2004). An introduction to the mechanics of DNA. *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, 362(1820), 1265–1279. <https://doi.org/10.1098/rsta.2004.1392>

120. Trevilla-Garcia, C., & Aranda-Anzaldo, A. (2011). Cell-type-specific organization of nuclear DNA into structural looped domains. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(2), 531–540. <https://doi.org/10.1002/jcb.22943>

121. Trevilla-Garcia, 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), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.11.050>

122. Tsutsui, K., Tsutsui, K., & Muller, M. T. (1988). The nuclear scaffold exhibits DNA-binding sites selective for supercoiled DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(15), 7235–7241.

123. Tsutsui, K. M., Sano, K., & Tsutsui, K. (2005). Dynamic view of the nuclear matrix. *Acta Medica Okayama*, 59(4), 113–120. <https://doi.org/10.18926/AMO/31953>

124. Van Drunen, C. M., Oosterling, R. W., Keultjes, G. M., Weisbeek, P. J., Van Driel, R., & Smeekens, S. C. M. (1997). Analysis of the chromatin domain organisation around the plastocyanin gene reveals an MAR specific sequence element in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, 25(19), 3904–3911.

125. von Kries, J. P., Buhrmester, H., & Strätling, W. H. (1991). A matrix/scaffold attachment region binding protein: Identification, purification, and mode of binding. *Cell*, 64(1), 123–135. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90214-J](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90214-J)

126. 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 fluorescence in situ hybridization. *Genes & Development*, 28(24), 2778–2791. <https://doi.org/10.1101/gad.251694.114>

127. Wit, E. De, & De Laat, W. (2012). A decade of 3C technologies: insights into nuclear organization. *Genes & Development*, 26(1), 11–24. <https://doi.org/10.1101/gad.179804.111>

128. Xiao, R., Tang, P., Yang, B., Huang, J., Zhou, Y., Shao, C., Li, H., Sun, H., Fu, X. D. (2012). Nuclear Matrix Factor hnRNP U/SAF-A Exerts a Global Control of Alternative Splicing by Regulating U2 snRNP Maturation. *Molecular Cell*, 45(5), 656–668. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.009>

129. Yugami, M., Kabe, Y., Yamaguchi, Y., Wada, T., & Handa, H. (2007). hnRNP-U enhances the expression of specific genes by stabilizing mRNA. *FEBS Letters*, 581(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.11.062>
130. Zbarsky, I. B. (1998). On the history of nuclear matrix manifestation. *Cell Research*, 8(2), 99–103. <https://doi.org/10.1038/cr.1998.10>
131. Zeitz, M. J., Malyavantham, K. S., Seifert, B., & Berezney, R. (2009). Matrin 3: Chromosomal distribution and protein interactions. *Journal of Cellular Biochemistry*, 108(1), 125–133. <https://doi.org/10.1002/jcb.22234>
132. Zhang, Y., & Cremer, P. S. (2006). Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(6), 658–663. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.09.020>
133. Zullo, J. M., Demarco, I. A., Piqué-Regi, R., Gaffney, D. J., Epstein, C. B., Spooner, C. J., Singh, H. (2012). DNA sequence-dependent compartmentalization and silencing of chromatin at the nuclear lamina. *Cell*, 149(7), 1474–1487. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.035>

ANEXO I

DNA Length Modulates the Affinity of Fragments of Genomic DNA for the Nuclear Matrix In Vitro

David García-Vilchis 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

Classical observations have shown that during the interphase the chromosomal DNA of metazoans is organized in supercoiled loops attached to a compartment known as the nuclear matrix (NM). Fragments of chromosomal DNA able to bind the isolated NM in vitro are known as matrix associated/attachment/addressed regions or MARs. No specific consensus sequence or motif has been found that may constitute a universal, defining feature of MARs. On the other hand, high-salt resistant DNA–NM interactions in situ define true DNA loop anchorage regions or LARs, that might correspond to a subset of the potential MARs but are not necessarily identical to MARs characterized in vitro, since there are several examples of MARs able to bind the NM in vitro but which are not actually bound to the NM in situ. In the present work we assayed the capacity of two LARs, as well as of shorter fragments within such LARs, for binding to the NM in vitro. Paradoxically the isolated (≈ 2 kb) LARs cannot bind to the NM in vitro while their shorter (≈ 300 pb) sub-fragments and other non-related but equally short DNA fragments, bind to the NM in a high-salt resistant fashion. Our results suggest that the ability of a given DNA fragment for binding to the NM in vitro primarily depends on the length of the fragment, suggesting that binding to the NM is modulated by the local topology of the DNA fragment in suspension that it is known to depend on the DNA length. *J. Cell. Biochem.* 118: 4487–4497, 2017. © 2017 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: CHROMOSOME; DNA LOOP; DNA SUPERCOILING; DNA TOPOLOGY; LOOP ATTACHMENT REGION; MATRIX ATTACHMENT REGION; NUCLEOID

Classical observations have shown that during the interphase the chromosomal DNA of metazoans is organized in supercoiled loops attached or anchored to elements of a proteinaceous compartment or substructure known as the nuclear matrix [Cook et al., 1976; Roti-Roti and Wright, 1987; Thomas and Thomas, 1989; Razin et al., 1995; Ottaviani et al., 2008; Woodcock and Ghosh, 2010] that results from extracting the nucleus with high-salt, non-ionic detergents, and nucleases [Berezney and Coffey, 1974; Nickerson, 2001; Engelke et al., 2014]. The attachment of DNA to the nuclear matrix (NM) is largely independent of chromatin proteins since the standard procedures for observing the supercoiled loops attached to the NM require the release by high-salt extraction of the whole set of histones and other chromatin proteins and yet the naked DNA loops remain supercoiled and firmly attached to the NM, thus, implying that the DNA–NM interactions are of higher affinity than those between DNA and chromatin proteins. Fragments of chromosomal DNA of varied length (100–1000 bp) able to interact

with the isolated NM in vitro are commonly known as matrix associated/attachment/addressed regions or MARs [Cockerill and Garrard, 1986a; Boulikas, 1993; Razin, 2001; Tsutsui et al., 2005]. A remarkable fact is that in metazoans no specific consensus sequence or motif has been found that may constitute a universal, defining feature of MARs, although some generic features such as the presence of topoisomerase II recognition sites, relative enrichment of AT and the presence of repetitive sequences have been associated with MARs [Boulikas, 1993, 1995; Razin et al., 1995; Ottaviani et al., 2008, Pathak et al., 2014]. Moreover, in situ/in vivo DNA–NM interactions have been operationally classified as structural-constitutive or transient-facultative depending on whether or not such interactions resist high-salt extraction [Boulikas, 1993; Razin et al., 1995; Maya-Mendoza et al., 2003]. The high-salt resistant DNA–NM interactions in situ correspond to true DNA loop attachment regions or LARs [Razin, 2001] that might in principle correspond to a subset of the potential MARs but are not necessarily

Abbreviations: LAR, loop attachment region; MAR, matrix attachment region; NHOS, Nuclear higher-order structure; NM, nuclear matrix.

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

Grant sponsor: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico; Grant number: CB2012-176794.

*Correspondence to: Prof. Armando Aranda-Anzaldo, M.D., Ph.D., 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: 24 February 2017; Manuscript Accepted: 1 May 2017

Accepted manuscript online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 2 May 2017

DOI 10.1002/jcb.26106 • © 2017 Wiley Periodicals, Inc.

identical to MARS characterized *in vitro*. Indeed, there are several known examples of MARS able to bind to the NM *in vitro* but which are not actually bound to the NM *in situ* [Avramova and Paneva, 1992; Boulikas, 1995; Razin et al., 1995; Razin, 2001]. On the other hand, experiments in which constructions in tandem of well-characterized MARS were transfected into cell lines or introduced in the genome of transgenic mice show that not all of such MARS actually bind to the NM *in vivo* [Heng et al., 2004]. These results indicate that MARS have the potential to interact with the NM but their nucleotide sequence is not enough for determining their binding to the NM *in vivo*.

Thus, since there is no universal feature characteristic of MARS there is no reliable method for a priori determining which MARS/LARs are actually involved in the binding of a given genomic region to the NM *in situ* [Evans et al., 2007]. Therefore, some time ago we developed a method for determining the organization into structural DNA loops of any genomic region of random, non-repetitive, sequence, that do not depends on the previous identification of the MAR/LARs in the region. This method is based on the elementary

topological principle that the trajectory a deformable fiber (DNA) in 3D space can be determined by knowing the position of points located in such a fiber (short amplicons) relative to an invariant taken as the positional reference (the NM). Using this approach we were able to determine, in primary rat hepatocytes, the organization into structural DNA loops (bound to the NM) of the genomic region comprising the genes of the albumin family (Fig. 1A) as well as establishing, later on, that the organization into structural DNA loops of this and perhaps most other genomic regions is cell-type specific [Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García and Aranda-Anzaldo, 2011, 2012; Silva-Santiago et al., 2017b]. This evidence implies that different sets of LARs interact with the NM in different tissues from the same organism. Such method allows us to infer the boundaries of the DNA segments that are naturally embedded into the NM and so that may either contain or correspond to the LARs of a given genomic region, which in the case of the aforementioned albumin-family genomic region correspond to four DNA segments each roughly 2 kb in length (Fig. 1A). In the present work we assayed the capacity of two of such ≈ 2 kb segments, as well

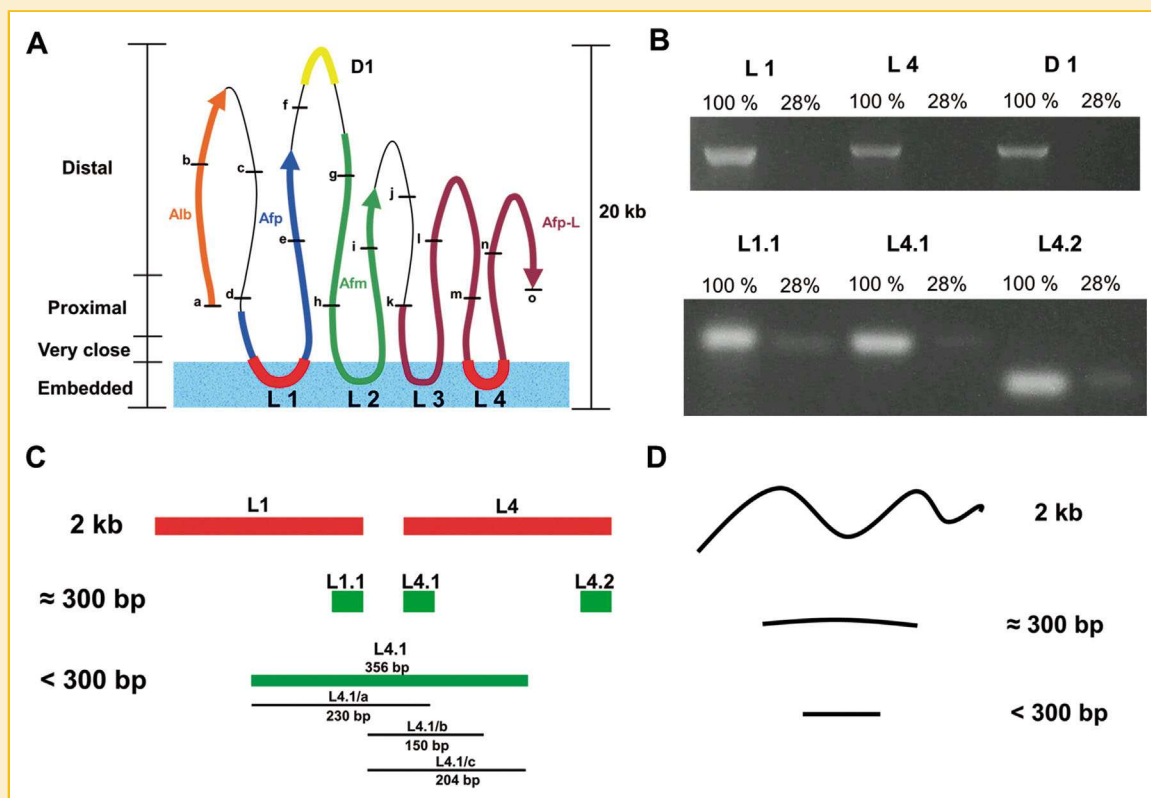


Fig. 1. Presence of putative loop attachment regions (LARs) in the NM-embedded DNA fraction. (A) The organization into structural DNA loops bound to the NM of the genomic region of the rat genome containing four genes of the albumin family (Alb; Afp; Afp; Afp-L). The lower-case letters indicate the position relative to the NM of short targets sequences used to infer the spatial organization of the DNA loops (redrawn from Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010). D1 is a ≈ 2 kb region located far away from the NM. L1-L4 indicate four ≈ 2 kb regions likely to be embedded within the NM that may correspond to or contain LARs. (B) L1 and L4 full-length target sequences can be readily amplified in undigested nucleoid samples containing 100% of NM-bound DNA but cannot be detected in DNase I-digested nucleoids containing $\sim 28\%$ of NM-bound DNA that corresponds to the NM-embedded fraction [Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010]. A similar situation occurs with the D1 sequence that is located far away of the NM ($n = 4$). However, shorter (≈ 300 bp) nested amplicons within L1 and L4 can be readily amplified in the NM-embedded fraction of genomic DNA that resists digestion with DNase I ($n = 6$), suggesting that L1 and L4 are bound *in situ* to the NM. (C) Diagram showing the relative size of the L1 and L4 master amplicons and their corresponding nested amplicons. (D) Diagram showing the potential for deformation and adoption of a contorted (complex) topology of the target amplicons while in suspension.

as of shorter fragments within the chosen segments (once isolated and so devoid of their original chromosomal context) for binding to the NM *in vitro*. Our results suggest that the ability of a given DNA fragment for binding to the NM *in vitro* primarily depends on the length of the fragment but not on a specific nucleotide sequence, also suggesting that binding to the NM is modulated by the local topology of the DNA fragment in suspension that it is known to depend on the DNA length [Shore et al., 1981; Shore and Baldwin, 1983; Bates and Maxwell, 2005]. In such a way that only those fragments whose topology is simple (non-contorted) may bind to the NM in a high-salt resistant fashion.

MATERIALS AND METHODS

ANIMALS

Primary cells were obtained from adult male Wistar rats (weight: 250–300 g) feed *ad libitum*. Animals were euthanized under general anesthesia with ether or using Ketamine–Xylazine solution (90–15 mg/kg, respectively). Animals were kept and handled according to the Official Mexican Norm for breeding and handling of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999).

CELLS

Primary mouse hepatocytes from adult male rats 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.

NUCLEOID PREPARATION

Nucleoids are operationally defined as the structures consisting of the residual NM with the naked but looped genomic DNA firmly bound to it. For obtaining the nucleoids 50 μl aliquots with 3×10^5 hepatocytes in PBS-A were gently mixed with 150 μl of lysis buffer (2.6 M NaCl, 1.3 mM EDTA, 2.6 mM Tris, 0.6% Triton X-100, pH 8.0) 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 for 5 min at 1500 g. The final nucleoid pellets were gently re-suspended in 200 μl of PBS-A.

DIGESTION OF NUCLEOIDS WITH DNase I

For assays involving the amplification of LARs (in situ NM-bound target sequences), 3.6×10^6 nucleoids suspended in 2.4 ml of PBS-A

were mixed with 10.2 ml of digestion buffer (10 mM MgCl_2 , 0.2 M beta-mercaptoethanol, 50 mM Tris, pH 7.2) and digested for 1 h at 37°C with 0.5 U/ml of DNase I (Deoxyribonuclease I from bovine pancreas type IV, SIGMA) from a stock in 0.15 M NaCl, 50% glycerol. The mixture was divided in 1 ml aliquots ($\approx 3 \times 10^5$ nucleoids/each) and digestion was stopped by adding 200 μl of stop buffer (0.2 M EDTA, 10 mM Tris, pH 7.5) and ice-cooling at 4°C. Digested nucleoids were centrifuged for 10 min/9000g at 4°C. The pelleted nucleoids were re-suspended and further washed for 10 min/9000 g at 4°C in 1 ml PBS-A (once) and twice in 1 ml dd- H_2O . The final pellet was re-suspended in 200 μl of dd- H_2O and the residual DNA concentration was estimated by spectrophotometry. For obtaining the DNA-depleted NM preparations to be used in the *in vitro* DNA–NM binding assays, nucleoids were digested for 1 h as above but with 8 U/ml of DNase I. Such DNA-depleted NM preparations contained $8 \pm 4\%$ of total NM-bound DNA.

DIGESTION OF NUCLEOIDS WITH RESTRICTION ENZYMES

Hepatocyte nucleoids were digested with each of the following restriction enzymes (separate 3×10^5 nucleoid aliquots for each enzyme): HindIII, Apa I, EcoRV. The nucleoids were suspended in 178 μl of the corresponding digestion buffer supplied by the manufacturer (Promega), then BSA (0.1 mg/ml, Promega) and 200 U of the corresponding restriction enzyme (10 U/ μl) were added to the mixture. The samples were incubated 4 h at 37°C under constant agitation. Digestions were stopped by adding 200 μl of stop buffer (0.2 M EDTA, 10 mM Tris base pH 7.5). Next the samples were centrifuged at 9000 rpm \times 10 min at 4°C and the resulting pellets were re-suspended (1 ml) and similarly washed by centrifugation once in PBS-A and twice in dd- H_2O , the final pellets were re-suspended in 200 μl dd- H_2O . Also the supernatants from all the centrifugation steps were pooled and the residual DNA was recovered for further use by standard precipitation with ethanol.

GENOMIC DNA PRIMERS

The DNA sequence from the region under study is freely and publicly available at rgd.mcw.edu. PCR primers were designed using the Vector NTI Advance 11.0 software. The primers defined highly specific target amplicons corresponding to/or within the putative LARs and to other target sequences in the genomic region of the albumin-family genes (Table I and Fig. 1A and C). All primers were 20–25 bp in length, G-C content 50–55% (with a difference $\leq 5\%$), T_m 55–60°C (with a difference $\leq 2^\circ\text{C}$), avoiding primers that might form secondary

TABLE I. Characteristics of the Target Amplicons

Amplicon	Forward primer	Reverse primer	Amplicon length (bp)	Amplicon GC content %
L1	ACTTAGGCACAGGGAATCACTCC	CACTGAGATTGGACAAGACCAGAAT	1909	44.5
L4	GGTTCCTCTCAGTGTACTTTGTGGC	GGGGAAGTCATGGATTCTGGGAT	1946	41.7
D1	TGAGATCGCTTCCCGTATGAG	GTGTCAGACAGTCTTGGCCGTA	1950	44.4
L1.1	CCCAAAGCCCTCTTATTCCG	AGTCAACCCTTAGGAAAATCTTC	376	41.8
L4.1	CCTCTCAGTGTACTTTGTGGCATG	GGGAAACAAGTGGACCAGCA	356	36.9
L4.2	CTAGTCGTCTGTGGTCTCAACATG	GGGGAAGTCATGGATTCTGGGAT	284	40.9
L4.1/a	CCTCTCAGTGTACTTTGTGGCATG	TGGACCTATCTAGCTGGGGTTTG	230	36.2
L4.1/b	ATTAATAAACCAATGAGTGGGC	TTTTTGTGCCTAAATGCCAA	150	42.9
L4.1/c	ATTAATAAACCAATGAGTGGGC	GGGAAACAAGTGGACCAGCA	204	41.9
c	TCCTTTGTAACCAGGCAAGTGG	CCCATTCCCAGATCCTTCACTCT	374	49.3
f	CTGATCTTCAGGCAATATGGCAGG	TTGGCTGATGTCGTCTGGACA	392	45.5

structures with $\Delta G < -1$ kcal/mol or dimer/duplexes with $\Delta G < -2$ kcal/mol. The specificity of the primers was confirmed using the NCBI BLAST algorithms.

PCR AMPLIFICATION

Either purified genomic DNA or NM-bound DNA was used as template for PCR amplification of target sequences (Table I). A total of 30 ng of the corresponding template were used for the amplification of targets ~ 2 kb in length using 0.7 U of GoTaq DNA polymerase (Promega), 2.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM of each dNTP, and 0.2 μM of each primer. A total of 10 ng of the corresponding template were used for the amplification of targets ≤ 392 bp in length using 0.7 U of GoTaq DNA polymerase, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM of each dNTP, and 0.1 μM of each primer. PCR reactions were 50 μl in dd- H_2O . Amplifications were carried out under the same program in an Applied Biosystems 2720 ThermalCycler: initial denaturation step 94°C 5 min, following denaturation steps at 94°C 45 s, annealing at 56°C 1 min, extension at 72°C 1 min for 35 cycles, and final extension 72°C 10 min. PCR products were resolved in 2% agarose gels (electrophoresis in TBE buffer 1X, 100 V/450 mA) and stained with ethidium bromide (0.5 $\mu g/ml$), recorded and analyzed using Kodak 1D Image Analysis Software 3.5. The identity of all amplicons was confirmed by restriction-enzyme analysis.

PURIFICATION OF SPECIFIC AMPLICONS FOR DNA-NM BINDING ASSAYS

A total of 50 μl of sodium acetate 3M and 1.5 ml of absolute ethanol were added to 500 μl of a given final PCR reaction. After thorough mixing the sample was frozen overnight at $-70^\circ C$. The frozen sample was melted and centrifuged at 12,000 rpm for 10 min at 4°C. The pellet was re-suspended in 500 μl of 70% ethanol and centrifuged as above. The resulting pellet was further washed twice with 70% ethanol. The final pellet was dried at 45°C for 24 h. The purified PCR product was re-suspended in 200 μl of dd- H_2O and quantified by spectrophotometry, an aliquot was run in a 2% agarose gel for confirming its purity as a single homogeneous DNA band, and the identity of the amplicon was further confirmed by restriction analysis.

IN VITRO DNA-NM BINDING ASSAY

A total of 300 μl aliquots of DNA-depleted NM preparations ($\sim 3.6 \times 10^6$ nucleoids) in binding-assay buffer (BB): 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1 mM $MgCl_2$, were mixed either with 120 ng of the appropriate purified ≈ 2 kb amplicon or 40 ng of the appropriate purified ≤ 392 bp amplicon (Table I). A total of 30 μg of herring sperm DNA (Promega, 0.1–3 kb size range) as competitor and 0.025 mg/ml BSA (Promega) were added to each binding reaction that was incubated at 37°C for 1 h under mild but continuous agitation. Then, after further addition of 500 μl of BB, the samples were centrifuged 1 min/12,000g at 4°C. The supernatant was recovered for further use and the pellet was re-suspended in 1 ml BB and centrifuged 1 min/12,000g at 4°C. Next the supernatant was recovered for further use and the pellet was re-suspended in 300 μl of dd- H_2O and then split in three aliquots 100 μl each. Aliquot 1 was added 100 μl of dd- H_2O and used as source of template for PCR amplification of the appropriate targets. Aliquot 2 was further washed three times (10 min/12,000 g at 4°C) with dd- H_2O and finally

re-suspended in 200 μl dd- H_2O and then used as source of template for PCR. Aliquot 3 was washed twice (10 min/12,000 g at 4°C) with 2 M NaCl and once with dd- H_2O before final re-suspension in 200 μl dd- H_2O and then used as source of template for PCR. In all samples residual DNA, either bound to the NM or precipitated from NM-free supernatants, was estimated by spectrophotometry before using it as template for PCR. All DNA-NM binding experiments included DNA-depleted NM aliquots to which no specific purified amplicons were added and that were used as source of template for negative controls showing that the residual (in situ NM-bound DNA) present in such DNA-depleted NM samples, was never the source of any of the specific PCR products that might be detected after the corresponding in vitro DNA-NM binding assay.

IN SILICO SEARCH AND ANALYSIS OF MAR-RELATED FEATURES

The genomic region of the rat albumin-family genes was searched, using the VECTOR NTI Advance 11.0 software, for tagging some sequence features that have been associated with MARs [Ottaviani et al., 2008]. Thus DNA segments (500 bp) with AT content $\geq 70\%$ were tagged. Also were tagged motifs for topoisomerase II recognition (GTnWAYATTnATnATnnG;RnYnnCnnGYnGKTnY-nYnY) previously described in *Drosophila melanogaster* [Sander and Hsieh, 1985] and chicken erythrocytes [Spitzner and Muller, 1988], and a MAR-associated motif (TAWAWWWnnAWWR-TAAnnWWG) reported in *Arabidopsis thaliana* [Van Drunen et al., 1997]. IUPAC nomenclature: R = A-G Y = T-C W = A-T K = G-T. Finally, regions (50–2000 bp) with highly variable sequence were also tagged.

SEARCH FOR COMMON MOTIFS IN DNA FRAGMENTS WITH AFFINITY FOR THE NM

Shared nucleotide motifs potentially associated with DNA affinity for the NM were searched, using the GLAM2 (Gapped Local Alignment of Motifs) program [Frith et al., 2008] included in the suite MEME 4.11.1 (available at <http://meme-suite.org>). Non-overlapping but similar-sized DNA fragments either bound in situ to the NM or showing affinity for the NM in vitro were compared so as to find any putative NM-binding motifs. In the case of the three overlapping fragments derived from amplicon L 4.1 (Fig. 1C) this search was non-relevant because the program identified, by default, the sequence of the overlapping region as the relevant motif.

RESULTS

DEMONSTRATION THAT PUTATIVE LARs IN THE GENOMIC REGION OF THE ALBUMIN GENE FAMILY ARE BOUND TO THE NM IN SITU

Our first task was to determine whether the four putative LARs inferred to be in the genomic region of the albumin gene family [Rivera Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010] are actually bound in situ to the NM of hepatocytes (Fig. 1A). We carried out an analysis in silico of the genomic region between markers a and o (Fig. 1A) in order to establish whether any of four generic features, traditionally associated with MARs, could be present and so being shared among the four putative LARs. The results show that only L1 and L3 contain regions with AT $>70\%$ while L2 and L3 contain highly variable

regions, yet L4 completely lacks any of the four MAR-associated features, confirming that not a single MAR-associated feature is common to the four putative LARs (Fig. 2). Therefore, we designed PCR primers able to generate specific amplicons spanning the ≈ 2 kb putative LARs, in order to establish whether they could be amplified in the NM-embedded DNA fraction [Rivera Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010]. It must be remarked that our experimental approach requires that any chosen target sequence is unique to the genomic region under study and so the primers defining such target amplicons should not bind to other regions of the rat genome, also there is the requirement that all primers must work under the same PCR program and reaction conditions. Therefore, following these criteria, not any desirable target is actually feasible. Indeed, the actual complexity of the sequence of the putative LARs made impossible to design specific primers for L2, L3. Also it was not possible to design nested primers within such putative LARs that may generate shorter but specific amplicons within L2, L3. Therefore, we were left with L1 and L4 given that it was possible to design specific primers for the ≈ 2 kb amplicons as well as some nested primers able to generate highly specific but shorter amplicons within L1 and L4 (Fig. 1B; Table I). The original procedure for mapping the relative position of genomic sequences relative to the NM [Maya-Mendoza and Aranda-Anzaldo, 2003; Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010] depends on the use of nucleoids (in this case isolated from primary rat hepatocytes). The nucleoids, resulting from the extraction of cells with non-ionic detergent and high-salt, correspond to the whole complement of naked supercoiled DNA loops bound to the NM [Cook et al., 1976; Roti-Roti and Wright, 1987; Thomas and Thomas, 1989] then a limited concentration of DNase I (0.5 U/ml) is used for digesting the NM-bound DNA, under such conditions both supercoiling and the NM proteins become

relative barriers that hinder the action of DNase I resulting in a highly reproducible trend for digesting loop DNA in an inversely proportional relationship to its proximity to the NM so that DNA farther from the NM is digested first and that closer to the NM is digested later in a timed digestion curve. Indeed, DNA embedded in the NM is quite resistant to extensive digestion by the limited concentration of DNase I used but lengthy DNA regions may nevertheless be nicked or partially digested by DNase I as the NM confers to the DNA only a relative protection from nuclease action. Indeed, the original mapping protocol depends on the use of short (~ 500 bp) target sequences less likely to be nicked or partially digested by DNase I, since the average size of DNA fragments generated by DNase I is in the 0.8–1.5 kb range [Maya-Mendoza and Aranda-Anzaldo, 2003; Maya-Mendoza et al., 2003; Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010]. Therefore, given that L1 and L4 are ≈ 2 kb in length it was quite possible that they could be nicked by DNase I despite being bound to the NM and so they may not be amplifiable in the NM-embedded DNA fraction. Figure 1B shows that such is the case since L1 and L4 can be amplified in undigested samples of nucleoids, containing the whole complement of DNA loops bound to the NM, but they cannot be amplified in nucleoids digested for 1 h that only contain the fraction of DNA embedded in the NM, corresponding to $\sim 28\%$ of total NM-bound DNA, thus, behaving in a similar fashion to a region known to be at the tip of a DNA loop and so not present in the NM-embedded fraction of genomic DNA (D1 in Fig. 1A and B, and Table I). However, nested amplicons, corresponding to short ≈ 300 bp fragments (Fig. 1C; Table I), within L1 and L4 are readily amplified in both the undigested and the 1 h digested samples (Fig. 1B). Contrastingly, the short sequences f (392 bp) and g (504 bp) that bracket the DNA region that contains D1 (Fig. 1A) have always been found in the DNA fraction distal to the NM but never in the NM-embedded fraction [Rivera Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010; Silva-Santiago et al., 2017b]. These results indicated that L1 and L4 are present in the NM-embedded DNA fraction.

Next we used a set of restriction enzymes able to cleave the genomic DNA adjacent to L1 or L4 but not able to cut within such putative LARs (Fig. 3A and B). Hepatocyte nucleoids were thoroughly digested with the chosen enzymes (independent digestions for each enzyme) and both the supernatant and the NM-bound residual DNA fractions were subjected to PCR amplification of the full length ≈ 2 kb putative LARs. The results show that L1 and L4 were readily amplified in the NM-bound fraction but not in the supernatant (Fig. 3C) confirming that L1 and L4 are bound in situ to the NM of high-salt extracted nucleoids, thus, satisfying the definition of LARs as DNA regions bound to the NM in situ that resist extraction with high-salt.

TESTING THE AFFINITY OF ISOLATED LARs FOR THE NM IN VITRO

Next we performed specific assays for testing the affinity of L1 and L4 for the NM in vitro. The flow chart of the protocol for the DNA-NM binding assays is shown in Figure 4A. We used the NM isolated from primary hepatocytes but digested with a larger concentration of DNase I (8 U/ml) for testing the ability of L1 and L4 to bind the DNA-depleted NM. However, at a difference of classical protocols for assaying MAR binding activity that use bacterial DNA for

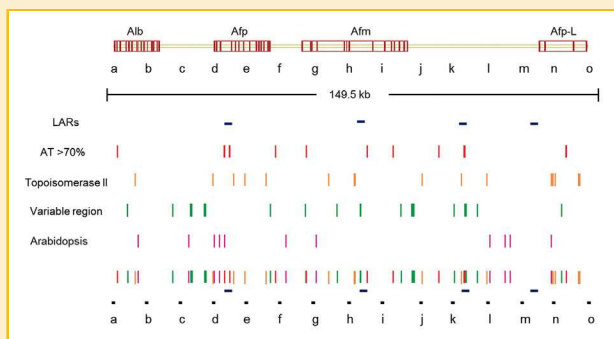


Fig. 2. Localization of MAR-associated features along the genomic region of the rat albumin-family genes. The diagram indicates the position of the four genes (Alb; Afp; Afm; Afp-L) as well as of fifteen target sequences (lower-case letters), spaced ≈ 10 kb from each other, used for determining the organization of the region into structural DNA loops [Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010]. The position of four segments inferred to be the putative loop attachment regions (LARs) naturally attached in situ to the NM, is indicated (blue horizontal bars), as well as the position of segments rich in AT (red bars), recognition motifs for topoisomerase II (yellow bars), regions with highly variable sequence (green bars), and a motif associated with MARs in *Arabidopsis thaliana* (magenta bars). It is clear that none of the four MAR-associated features is actually shared by the four putative LARs.

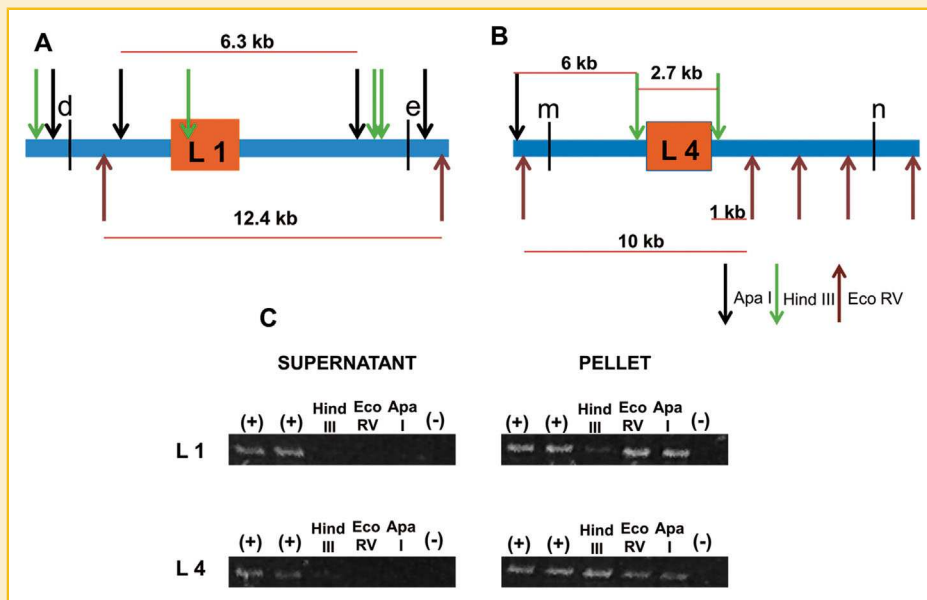


Fig. 3. Confirmation that L1 and L4 correspond to LARs bound in situ to the NM. (A) Map indicating the location of the cleavage sites adjacent to L1 for three restriction enzymes (black arrows Apa I sites; green arrows Hind III sites; brown arrows Eco RV sites). (B) Map indicating the location of the cleavage sites adjacent to L4 for the three restriction enzymes. (C) Aliquots of nucleoid samples were thoroughly digested with each of the three restriction enzymes and either the precipitated DNA supernatant fraction or the pelleted NM-bound DNA fraction were used as source of template for PCR amplification of full length L1 and L4 amplicons. Both amplicons are readily detected in the NM-bound fraction but not in the supernatant ($n = 4$), indicating that L1 and L4 are true LARs naturally bound in situ to the NM. (+) Positive control: purified genomic DNA template. (-) Negative control: no template.

competing the binding of the tested MAR fragments to the NM, we used DNA from another metazoan (herring DNA) since the nucleotide sequence complexity is quite different between bacteria and metazoans and so it might be that bacterial DNA is not a reliable competitor for binding to the NM. Yet we first performed standard amplification of L1, L4 and their nested amplicons in genomic herring DNA (size range 0.1–3 kb). The results were negative indicating that herring DNA was a suitable non-specific competitor for the binding of L1 and L4 to the NM and so unable to generate any spurious positive PCR signal (data not shown). Also at a difference of many previous works in our case we challenged the affinity of the DNA fragments bound to the NM in vitro by using three separate washing protocols (1, 2, 3 in Fig. 4A), including a washing with high-ionic strength (corresponding to protocol 3) since true LARs must be resistant to extraction from the NM by high-salt (see Materials and Methods section). The results shown in Figure 4B indicate that full length L1 and L4 purified fragments are unable to bind to the NM in vitro as they cannot be amplified after the binding reaction in the corresponding pelleted NM fractions. Indeed, the samples resulting from the three washing protocols are negative. However, purified nested fragments derived from L1 and L4 but measuring ≈ 300 bp in length (L 1.1; L 4.1; L 4.2 in Table I and Fig. 4B and C) are readily amplified, after the binding assay, in the NM fraction and resist the three washing protocols including the one with high-salt. In principle this might suggest that only some sub-fragments of L1 and L4 are actually involved in the binding to the NM. Yet considering that the nested fragments positive for the high-salt resistant binding to the NM are

within L1 or L4 (Fig. 4C) it is strange that they cannot promote or support the binding of the full-length LARs to the NM. Nevertheless, we carried out the same kind of NM-binding assay using three purified nested fragments (≤ 230 bp) derived from the L 4.1 fragment (Fig. 4C). The results indicate that the three sub-fragments bind to the NM in a high-salt resistant fashion (Fig. 4B) suggesting that the overlapping sequence shared by L 4.1 and its three sub-fragments (Fig. 4C) could be responsible for their affinity to the NM. However, such a sequence is not present in the L1.1 and L 4.2 fragments also able to bind the NM in vitro in a high-salt resistant fashion. It must be remarked that in all cases the positive amplicons result from the templates that happened to bind to the NM in vitro and not from the residual in situ NM-bound DNA that resists digestion with high DNase I for 1 h (Fig. 4B), step necessary for generating the DNA-depleted NM samples used for the in vitro DNA-NM binding assay (Fig. 4A).

BINDING TO THE NM DEPENDS ON DNA FRAGMENT LENGTH

We carried out a bioinformatic search in order to find any consensus nucleotide sequence or motif that might support the affinity for the NM in all the non-overlapping fragments that were bound in situ to the NM or that resulted positive in the NM-binding assay (Materials and Methods section). Figure 5A shows the six motifs found and the Table II indicates the presence or not of such motifs within each of the DNA fragments analyzed. It can be appreciated that only the motifs 5 and 6 are present in all fragments, although motif 6 is incomplete in the sub-fragment L 4.1/a. However, although it could be tempting to suggest that motifs 5 and 6 determine the affinity for

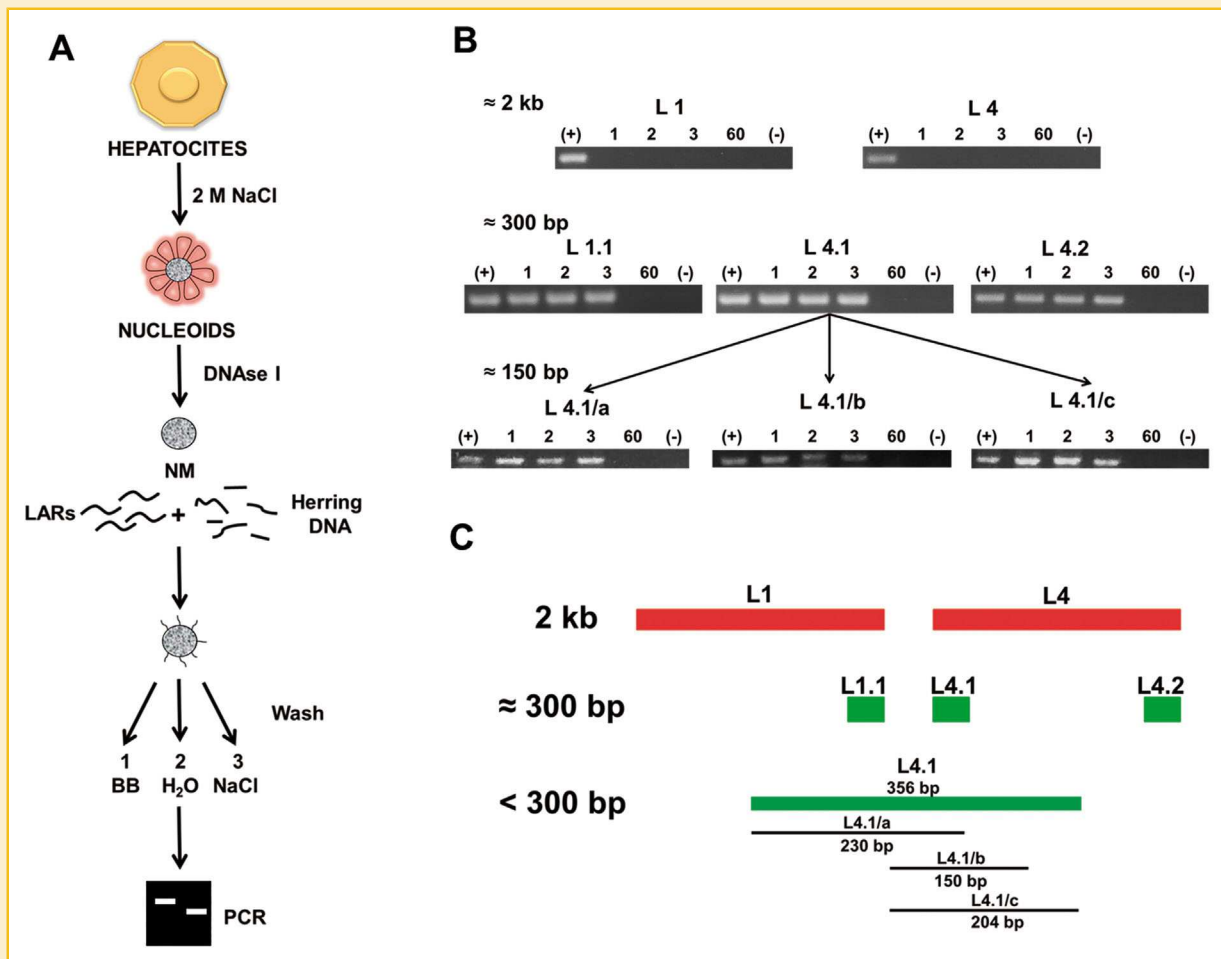


Fig. 4. In vitro DNA-NM binding assay. (A) Flow chart diagram showing the protocol for obtaining DNA-depleted NM preparations used for assaying the affinity of the full-length isolated LARs and their corresponding nested amplicons for the NM in vitro. The assay includes the challenging of the affinity of any DNA fragment bound to the NM (after the binding reaction) by using three separate washing protocols: 1 two washes in binding buffer; 2 three washes with dd-H₂O; 3 two washes with 2 M NaCl and one with dd-H₂O. (B) The upper row shows that the isolated L1 and L4 LARs cannot bind the NM in vitro, since they cannot be amplified after the binding assay in the pelleted NM fraction resulting from the corresponding washing protocol ($n = 4$). The middle row shows that three short (≈ 300 bp) nested fragments derived either from L1 or L4 can bind in a high-salt resistant fashion to the NM in vitro, as they can be readily amplified after the binding assay in the pelleted NM fraction corresponding to each of the three washing protocols ($n = 6$). The lower row shows that three overlapping fragments (≤ 230 bp) derived from the nested amplicon L 4.1 also bind in a high-salt resistant fashion to the NM in vitro ($n = 3$). The lane 60 is a negative control showing that DNA-depleted NM (obtained after 1 h digestion with 8 U/ml of DNase I) incubated without the corresponding target DNA fragments cannot be the source of a spurious positive PCR amplification of the target sequences. (+) Positive control: purified genomic DNA template. (-) Negative control: no template. (C) Diagram showing the purified isolated full-length LARs and their nested fragments used for the in vitro DNA-NM binding assays.

the NM, we also considered the published evidence indicating the lack of a consensus sequence or motif in MARs [Boulikas, 1995; Ottaviani et al., 2008; Pathak et al., 2014].

Indeed, our results also suggested that DNA fragment length could be a determinant of the binding affinity for the NM in vitro. Thus, we used two short (≤ 392 bp) fragments that also belong to the genomic region of the albumin gene family but which are known to be far from the NM in vivo (c and f in Fig. 1A and Table I) for assaying their binding to the NM in vitro. The results indicate that both fragments bind to the NM and once bound to it they resist the extraction with high salt (Fig. 5B). Moreover, since the analysis of their corresponding nucleotide sequence indicated that both c and f fragments are devoid of any of the motifs described in Figure 5A, this result suggests that DNA fragment length and not a specific

nucleotide sequence is the critical factor that modulates the affinity for the NM.

Nevertheless, despite the evidence that the L1 and L4 bound in situ to the NM can be readily amplified (Fig. 3C) it could be the case that for some unknown reason binding of L1 and L4 to the NM in vitro precluded the amplification of such fragments. Thus we performed again the binding assays with L1 and L4 but next the pelleted NM-bound fraction was subject to proteinase K digestion after the corresponding washing protocol and any resulting protein-free DNA was precipitated and used as template for PCR. In this case, the amplifications were completely negative for L1 and L4 (not shown). However, in the supernatant fraction from the washing protocol 1 both amplicons were readily detected (Fig. 5C) confirming that such LARs did not bind to the NM in vitro. Also we performed the in vitro

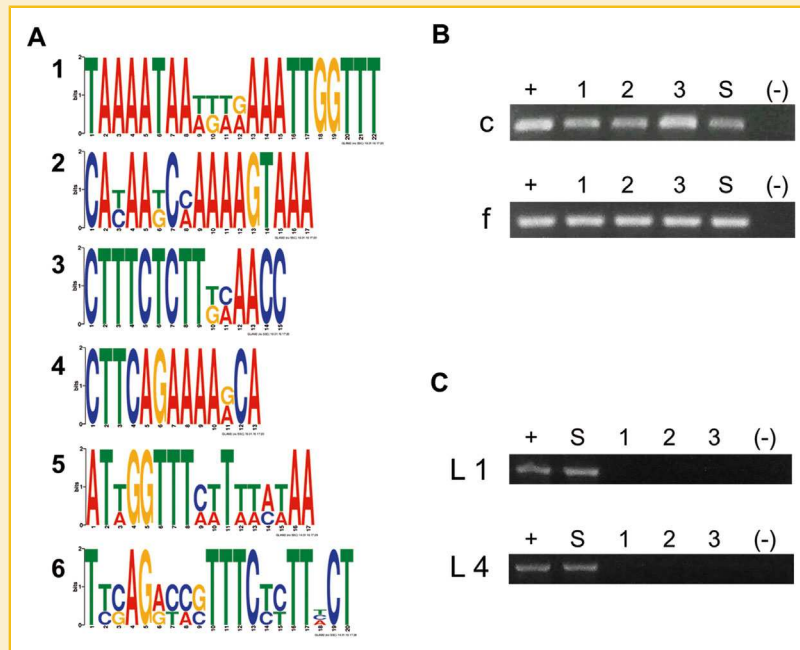


Fig. 5. DNA length determines the affinity for the NM *in vitro*. (A) Nucleotide motifs found in the L1 and L4 LARs and their non-overlapping nested fragments able to bind the NM. The overlapping region from fragments L4.1/a–c (Fig. 4C) was not considered for this analysis (Materials and Methods section). Only motif 5 is common to all the relevant DNA fragments (Table II). (B) Two short (≤ 392 bp) DNA fragments, c and f, naturally away from the NM (Fig. 1A) and lacking any of the motifs in A) are able to bind the NM *in vitro* in a high-salt resistant fashion since they can be amplified in the pelleted NM-bound fraction ($n = 4$) resulting from each of the three washing steps (1–3). (C) Contrastingly the L1 and L4 full-length LARs can only be amplified in the precipitated DNA from the pooled supernatant fraction (lane S) from the first washing protocol (1) as described in the legend to Figure 4 ($n = 4$), confirming that they cannot bind to the NM *in vitro*. (+) Positive control: purified genomic DNA template. (–) Negative control: no template.

binding assay for L1 and L4 and then used the nested primers, defining the amplicons L 1.1, L 4.1, L 4.2, in order to see if these shorter fragments could be amplified in the pelleted NM-bound fraction, but again the results were completely negative. Thus strengthening the notion that the fragment length is the key parameter that modulates the binding of DNA to the NM *in vitro*.

DISCUSSION

Classical reports defined MARs as those DNA fragments able to bind DNA-depleted NM preparations *in vitro* [Cockerill and Garrard, 1986a,b]. Nevertheless, in these reports it was not

TABLE II. Presence of the Nucleotide Motifs, Shown in Figure 5A, Within the Assayed Amplicons

Amplicon	Sequence motifs					
	1	2	3	4	5	6
L1	x	x	x	x	x	x
L4	x	x	x	x	x	x
L1.1		x			x	x
L4.1					x	x
L4.2	x		x		x	x
L4.1/a					x	x
L4.1/b					x	x
L4.1/c					x	x

challenged the affinity of the *in vitro*-defined MARs by further re-extraction with high-salt thus, making difficult to relate such MARs to LARs which are naturally bound *in situ* to the NM and resist extraction by high-salt [Razin, 2001]. On the other hand, constructions in tandem of a MAR sequence known to bind to the NM both *in vitro* and *in vivo* do not bind in a lump to the NM [Heng et al., 2004] suggesting that the structural interactions between DNA and the NM do not depend on direct readouts as those between specific DNA sequences and transcription factors and that chromosomal context is an important determinant for NM-binding activity. A current suggestion is that stable DNA–NM interactions might 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].

Available evidence indicates that the nuclear higher-order structure (NHOS) defined by the set of stable, high-salt resistant interactions between LARs and the NM is cell-type specific [Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García and Aranda-Anzaldo, 2011, 2012; Silva-Santiago et al., 2017b] despite the fact that the genomic DNA sequence is the same in most if not in all cells from a given organism. Such a differential could be explained in part by the known cell-type specific differences in NM composition [Röber et al., 1990; Stuurman et al., 1990; Dent et al., 2010]. However, there is also evidence that similar cell types from closely related species show significant differences in their NHOS [Silva-Santiago et al., 2017a]. Thus considering that equivalent cell types

performing the same functions in two closely related species possess quite similar sets of constituting proteins, then it is unlikely that the species-specific differences in NHOS could be explained by significant differences in NM-protein composition.

Chromosomal DNA contains well-identified syntenic blocks of nucleotide sequences. However, the order and distribution of such syntenic blocks varies significantly between the chromosomes of closely related species [Zhao et al., 2004; Graphodatsky et al., 2011]. DNA is a heteropolymer whose stiffness or flexibility varies along its length depending on the local nucleotide sequence [Travers, 2004]. In a thermal medium, “entropic forces” act upon the long fibers of chromosomal DNA suspended in that medium so that spontaneous bending and looping occurs [Neumann, 1977] but continuous, unrestrained bending and looping puts at risk the integrity of the DNA fiber that may thus break apart. However, by anchoring to nodes of NM proteins the DNA reduces the bending dynamics and stabilizes the loops [Aranda-Anzaldo, 2016] that become topologically constrained and thus spontaneously supercoil, as this is thermodynamically favorable [Mirkin, 2001; Bates and Maxwell, 2005]. On the other hand, the chromosome sites where bending and looping preferentially occur will significantly differ between chromosomes having the same syntenic blocks but in a different order. Indeed, for any fibrous polymer the persistence length P defines the length under which the polymer path remains straight independently of any applied stress (it behaves as a rigid rod). DNA persistence length depends on nucleotide composition yet for a typical random-sequence DNA the persistence length is about 150 bp or 50 nm [Travers, 2004]. On the other hand, the Kuhn length, equivalent to $2P$, corresponds to the length of the segments of a given polymer that can be considered as freely jointed to each other so that under applied stress they can randomly orient in any direction relative to each other, and so the spatial conformation of the polymer can only be described statistically as a 3D random walk [Peters and Maher, 2010; Teif and Bohinc, 2011]. Indeed, any DNA fragment >300 bp in length spontaneously deforms while suspended in a thermal medium and the magnitude of bending and contortion is greater (although not in a linear fashion) as the DNA increases in length. For example, experimental analysis of the ring closure (cyclization) probability of DNA fragments with cohesive ends showed that it is low for fragments ≤ 300 bp because of their stiffness, while such a probability is higher and quite similar for fragments within the 0.5–2.3 kb range [Shore et al., 1981; Shore and Baldwin, 1983; Bates and Maxwell, 2005]. Thus DNA fragments significantly longer than 300 bp behave as contorted random coils while in suspension [Bates and Maxwell, 2005; Peters and Maher, 2010]. Therefore, the isolated ≈ 2 kb L1 and L4 fragments develop complex contorted topologies while in suspension but not their nested fragments of ≤ 376 bp which are unlikely to deform significantly from the straight path while in suspension (Fig. 1D). The same applies for the fragments c and f (≤ 392 bp) that display high-salt resistant affinity for the NM proteins of hepatocytes in vitro despite not being bound in situ to the NM from such cells (Figs. 1A and 5B). Therefore, the interaction between NM-proteins, endowed with affinity for DNA whose topology is not contorted, with chromosomal DNA that displays spontaneous bending and looping (particularly at weaker or more flexible sites depending on

the local nucleotide sequence), would be enough for determining a stable NHOS according to species and cell type.

This proposal is consistent on the one hand with the fact that despite intensive search there is no consensus sequence or motif for metazoan MARs [Boulikas, 1995; Ottaviani et al., 2008; Pathak et al., 2014 and Fig. 2] and on the other to the fact that few specific MAR-binding proteins exist [Wang et al., 2010], since binding to the NM appears to be not primarily dependent on the nucleotide sequence [Heng et al., 2004]. In several classical studies MARs were found to co-localize with DNA regions relatively richer in AT [reviewed in Boulikas, 1995; Razin et al., 1995], but this does not necessarily mean that the AT-rich sequences are directly responsible of the binding to the NM. However, such AT-rich sequences, having a shorter persistence length and so being more easily bent and deformed [Travers, 2004], might mark the boundaries within which there could be a relatively straight DNA segment able to bind the NM. Indeed, classical reports indicated that the DNA tightly bound to the NM corresponds to fragments in the 50–200 bp range [Jackson et al., 1984; Cockerill and Garrard, 1986a] thus much shorter than the reference Kuhn length for DNA of ~ 300 bp. Our proposal is also consistent with the apparent conservation of MARs through evolution [Cockerill and Garrard, 1986b], since any DNA fragment short enough so as to be close to the straight path will bind to NM proteins from most metazoans, and it is also consistent with the fact that many MARs able to bind the NM in vitro are not bound to the NM in situ [reviewed in Boulikas, 1995; Razin et al., 1995] because they may not have a simple topology while included within their natural chromosomal context. Contrastingly, LARs naturally embedded in the NM of hepatocytes (Fig. 1A) are unable to bind the same NM when isolated from their chromosomal context (Fig. 4B), implying their spontaneous adoption, while in suspension, of complex topologies with poor affinity for the NM. On the other hand, any DNA fragment short enough so as to remain non-contorted while in suspension will also display affinity for NM proteins, no matter if the fragment belongs to a LAR or to a segment of DNA that is far away from the NM in situ (Fig. 5B).

Nevertheless, a rather unlikely possibility is that full length L1 and L4 cannot bind to the NM in vitro because their official sites are already occupied by the equivalent L1 and L4 segments bound in situ to the NM and so remaining in the DNA-depleted nucleoids. Accordingly, only the short sub-fragments of L1 and L4 may bind to the NM in vitro in a non site-specific fashion. Yet the fact that L1 and L4 cannot be directly amplified in DNA-depleted nucleoids (Fig. 4B) indicates that the corresponding template is either too scarce or so badly damaged after exposure to DNase I so as to be non-amplifiable in such samples. On the other hand, since the L1 and L4 fragments contain sub-fragments able to bind to the NM in vitro, then in principle they should also bind to the NM, at least in a non site-specific fashion, yet such is not the case. Therefore, our suggestion that DNA fragment length is the variable that modulates the binding to the NM in vitro explains the present results in a simple, coherent fashion.

It is known that some NM components have strong affinity for supercoiled DNA as represented by covalently closed plasmids, but the sites responsible for binding linear MARs or supercoiled DNA are distinct non-overlapping entities [Kay and Bode, 1994]. DNA loops are

topologically equivalent to circular plasmids but only after becoming topologically constrained and thus supercoiled by binding to the NM [Mirkin, 2001; Bates and Maxwell, 2005]. Hence binding of linear DNA to the NM appears to be a necessary first step for the eventual presence of supercoiled DNA with affinity for other sites in the NM.

ACKNOWLEDGMENTS

David García-Vilchis was a CONACYT Research Scholar while performing this work, registered within the Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias-UNAM. This work partially fulfils the requirements of D.G-V to obtain the Ph.D. degree. We thank Drs. Federico Martínez-Montes and Luis Felipe Jiménez-García for their valuable comments and suggestions on this work. We thank Dr. Claudia V. Rivera-Cerecedo and IFC-UNAM for providing laboratory rats.

REFERENCES

- Aranda-Anzaldo A. 2016. The interphase mammalian chromosome as a structural system based on tensegrity. *J Theor Biol* 393:51–59.
- Avramova Z, Paneva E. 1992. Matrix attachment sites in the murine alpha-globin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 182:78–85.
- Bates AD, Maxwell A. 2005. DNA topology 2nd ed., Chapter 2: DNA supercoiling, U.K: OUP, Oxford. pp. 25–82.
- Berezney R, Coffey DS. 1974. Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 60:1410–1417.
- Boulikas T. 1993. Nature of DNA sequences at the attachment regions of genes to the nuclear matrix. *J Cell Biochem* 52:14–22.
- Boulikas T. 1995. Chromatin domains and prediction of MAR sequences. *Int Rev Cytol* 162A:279–388.
- Cockerill PN, Garrard WT. 1986a. Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell* 44:273–282.
- Cockerill PN, Garrard WT. 1986b. Chromosomal loops anchorage sites appear to be evolutionarily conserved. *FEBS Lett* 204:5–7.
- Cook PR, Brazell IA, Jost E. 1976. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J Cell Sci* 22:303–324.
- 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.
- 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.
- Evans K, Ott S, Hansen A, Koentges G, Wernisch L. 2007. A comparative study of S/MAR prediction tools. *BMC Bioinformatics* 8:71.
- Frith MC, Saunders NFW, Kobe B, Bailey TL. 2008. Discovering sequence motifs with arbitrary insertions and deletions. *PLoS Comput Biol* 4(5):e1000071.
- Graphodatsky AS, Trifonov VA, Stanyon R. 2011. The genome diversity and karyotype evolution of mammals. *Mol Cytogenet* 4:22.
- Heng HHQ, Goetze S, Ye JC, Liu G, Stevens JB, Bremer SW, Wykes SM, Bode J, Krawetz SA. 2004. Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. *J Cell Sci* 117:999–1008.
- Jackson DA, Cook PR, Patel SB. 1984. Attachment of repeated sequences to the nuclear cage. *Nucleic Acids Res* 17:6709–6726.
- Kay V, Bode J. 1994. Binding specificity of a nuclear scaffold: Supercoiled, single-stranded, and scaffold-attached-region DNA. *Biochemistry* 33:367–374.
- 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.
- Mirkin SM. (May 2001) DNA topology: Fundamentals. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd., Chichester. <http://www.els.net> [doi: 10.1038/npg.els.0001038].
- Neumann RM. 1977. The entropy of a single Gaussian molecule in a non-interacting solvent. *J Chem Phys* 66:870–871.
- Nickerson JA. 2001. Experimental observations of a nuclear matrix. *J Cell Sci* 114:463–474.
- Ottaviani D, Lever E, Takousis P, Sheer D. 2008. Anchoring the genome. *Genome Biol* 9(1):201.
- Pathak RU, Srinivasan A, Mishra RK. 2014. Genome-wide mapping of matrix attachment regions in *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics* 15:1022.
- Peters JP, Maher LJ, III. 2010. DNA curvature and flexibility in vitro and in vivo. *Q Rev Biophys* 43:23–63.
- 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.
- 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.
- 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.
- Sander M, Hsieh T. 1985. *Drosophila topoisomerase II* double-strand DNA cleavage: Analysis of DNA sequence homology at the cleavage site. *Nucleic Acids Res* 13:1057–1072.
- Shore D, Langowski J, Baldwin RL. 1981. DNA flexibility studied by covalent closure of short fragments into circles. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:4833–4837.
- Shore D, Baldwin RL. 1983. Energetics of DNA twisting: I. Relation between twist and cyclization probability. *J Mol Biol* 170:957–981.
- Silva-Santiago E, Pardo JP, Hernández-Muñoz R, 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.
- Silva-Santiago E, Rivera-Mulia JC, Aranda-Anzaldo A. 2017b. The set of structural DNA-nuclear matrix interactions in neurons is cell-type specific and rather independent of functional constraints. *J Cell Biochem* <https://doi.org/10.1002/jcb.25852>
- Spitzner JR, Muller MT. 1988. A consensus sequence for cleavage by vertebrate DNA topoisomerase II. *Nucleic Acids Res* 16:5533–5556.
- 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.
- Teif VB, Bohinc K. 2011. Condensed DNA; condensing the concepts. *Prog Biophys Mol Biol* 105:208–222.
- Thomas EA, Thomas CA. 1989. Nucleoid halo expansion indirectly measures DNA damage in single cells. *Exp Cell Res* 183:149–158.
- 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.
- Tsutsui KM, Sano K, Tsutsui K. 2005. Dynamic view of the nuclear matrix. *Acta Med Okayama* 59:113–120.
- Van Drunen C, Oosterling RW, Keultjes GM, Weisbeek PJ, van Driel R, Smeekens SCM. 1997. Analysis of the chromatin domain organisation around the plastocyanin gene reveals a MAR-specific sequence element in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* 25:3904–3922.
- 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.
- Woodcock CL, Ghosh RP. 2010. Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000596.
- Zhao S, Shetty J, Hou L, Delcher A, Zhu B, Osegawa K, de Jong P, Nierman WC, Strausberg RL, Fraser CM. 2004. Human, mouse and rat genome, large-scale rearrangements: Stability versus speciation. *Genome Res* 14:1851–1860.