



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**CARACTERIZACIÓN DE LA ORGANIZACIÓN EN BUCLES ESTRUCTURALES DE DNA DEL
EPICENTRO DEL SITIO FRÁGIL COMÚN Fra14A2/*FHIT*: CORRELACIÓN ENTRE FRAGILIDAD
CROMOSÓMICA Y ESTRUCTURA DE ORDEN SUPERIOR EN EL NÚCLEO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ROLANDO GUADARRAMA PONCE

DIRECTOR DE TESIS

DR. ARMANDO ARANDA ANZALDO

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México

COMITÉ TUTOR

DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ

Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México

DR. FERNANDO LÓPEZ CASILLAS

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO DE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

Al motor de mi vida: Mi hijo Alex

A mi compañera de vida: Erika

Por su apoyo incondicional: Mis padres

Por su ejemplo: Dr. Aranda y Dra. Dent

Por todo su cariño: Nes

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas, 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 darme la oportunidad de desarrollar mi proyecto doctoral dentro del Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias de la Facultad de Medicina.

Al CONACyT por brindarme una beca 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. Juan Pablo Pardo Vázquez y al Dr. Fernando López Casillas por sus aportaciones y asesoría, lo que permitió tanto mi desarrollo como el término del presente proyecto de investigación.

A la Dra. Claudia V. Rivera-Cerecedo del IFC-UNAM por la donación de los ratones CD-1 que permitieron la realización de este proyecto.

Agradecimientos personales

Quiero agradecer a cada una de las personas que formaron parte de mi vida durante la realización de este gran proyecto que está por terminar, ya que, sin su apoyo incondicional, paciencia y motivación no hubiera sido posible conseguir esta meta.

A mi familia que con sus palabras guiaron mis pasos y me motivaron a salir adelante a lo largo de esta gran travesía.

Agradezco de todo corazón al Dr. Aranda y la Dra. Dent por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su equipo y permitirme ser partícipe de sus ideas y proyectos, su ejemplo siempre será parte de mi vida y siempre tendrán mi admiración y respeto.

Agradezco a todos mis compañeros del laboratorio, los cuales me han apoyado a lo largo de mi formación cuestionando y aportado ideas que me hicieron crecer como persona y como estudiante.

Índice

Dedicatoria	2
Agradecimientos	3
Agradecimientos personales	4
Resumen.....	7
Abstract	8
Sitios frágiles	9
Superenrollamiento y empaquetamiento del DNA.....	21
Territorios cromosómicos.....	33
Matriz nuclear	43
Estructura de orden superior en el núcleo.....	53
Justificación.....	56
Hipótesis.....	61
Objetivo general.....	62
Objetivos particulares	62
Material y métodos.....	63
Animales experimentales	63
Purificación de células primarias.....	63
Hepatocitos.....	63
Linfocitos.....	64
Núcleos neuronales	64
Preparación de nucleoides	65
Análisis de la integridad de los nucleoides.....	66
Digestión de nucleoides con DNAsa I.....	67
Diseño de oligonucleótidos	68
Amplificación por PCR	71
Mapeo topológico.....	72
Resultados.....	77
Caracterización biofísica de la EOSN en hepatocitos, linfocitos y neuronas de ratón.....	77
Caracterización comparativa de los bucles estructurales de DNA del gen <i>FHIT</i> entre neuronas, hepatocitos y linfocitos B naive de ratón adulto	79

Cinéticas de digestión con DNAsa I de neuronas, hepatocitos y linfocitos B naive de ratón adulto....	80
Caracterización de la estructura de orden superior definida por las interacciones DNA-matriz nuclear en la región genómica de <i>FHIT</i> en neuronas, hepatocitos y linfocitos B naive de ratón adulto.....	86
Discusión	98
Conclusiones	105
Perspectivas	107
Anexo I.....	109
Referencias.....	126

Resumen

Los sitios frágiles son regiones propensas a presentar rupturas, discontinuidades, constricciones y rearrreglos en cromosomas metafásicos de células que se encuentran sometidas a estrés replicativo, estos se dividen en raros cuando se presentan solo en el 5% de la población y comunes considerados una propiedad intrínseca de los cromosomas y por lo tanto encontrados en los cromosomas de toda la población. Hasta este momento no se ha logrado determinar la causa por la cual los comunes manifiestan fragilidad, sin embargo, en los raros está bien caracterizado que su fragilidad es dependiente de la secuencia de nucleótidos. El sitio frágil común más activo en los linfocitos B humanos se encuentra dentro del gen *FHIT* y es conocido como FRA3B. *FHIT* ha sido considerado un posible gen supresor de tumor debido a su alta tasa de delección en lesiones preneoplásicas y una gran variedad de tumores sólidos. Su manifestación se ha relacionado con el estrés replicativo, ya que un análisis mostró una deficiencia de sitios de iniciación de la replicación dentro de la zona crítica de fragilidad. Es notable mencionar que los sitios frágiles se encuentran conservados en mamíferos, en el ratón el ortólogo de FRA3B es Fra14A2, un sitio frágil que muestra las mismas características que el sitio frágil humano. La caracterización de la estructura de orden superior definida por las interacciones DNA-matriz nuclear de este sitio frágil murino mostro que dentro de la zona crítica de fragilidad en linfocitos B el DNA se encuentra ampliamente anclado a la matriz nuclear, interacción que no se observa en hepatocitos y neuronas de ratón, células que no expresan fragilidad en Fra14A2.

Abstract

Fragile sites are regions prone to ruptures, discontinuities, constrictions and rearrangements in metaphase chromosomes of cells that are subject to replicative stress, these are divided into rare, that occur only in 5% of the population, and common, considered as an intrinsic property of chromosomes and found in the general population. Until now, it has not been possible to determine the cause by which the common sites manifest their fragility, but in the case of rare fragile sites it is well characterized that their fragility is sequence dependent. The most active common fragile site in human B lymphocytes is found within the *FHIT* gene and is known as FRA3B, *FHIT* has been considered a possible tumor suppressor gene due to its deletion in preneoplastic lesions and a wide variety of solid tumors. FRA3B expression is related to replicative stress and there is a deficiency of replication initiation sites within the critical fragility zone. Fragile sites are conserved in mammals and the mouse ortholog of FRA3B is Fra14A2, a fragile site that shows the same characteristics as the human fragile site. The characterization of the local nuclear higher order structure defined by the stable interactions between DNA and the nuclear matrix of this fragile murine site showed that within the critical zone of fragility the DNA is widely anchored to the nuclear matrix in B lymphocytes and yet, this kind of interaction is not observed in hepatocytes and neurons, which also do not express Fra14A2 fragility.

Sitios frágiles

Las células enfrentan el desafío de transmitir una copia intacta de su genoma durante su división, por lo tanto, la completa e íntegra replicación del DNA es un paso crucial para el logro de este objetivo. Existen áreas del genoma que manifiestan una dificultad intrínseca para su replicación, lo que genera una alta propensión al desarrollo de mutaciones en dichas regiones dentro de cromosomas específicos. Los sitios frágiles cromosómicos son clasificados como zonas de difícil replicación, pero a pesar de su gran inestabilidad genómica se encuentran ampliamente conservadas dentro de distintas especies y mismos tipos celulares, sugiriendo que podrían tener una función biológica importante (Voutsinos et al., 2018).

Los sitios frágiles son regiones cromosómicas susceptibles a presentar constricciones, discontinuidades, rupturas o rearrreglos en cromosomas metafásicos de células que se encuentran bajo estrés replicativo (figura 1). (Durkin & Glover, 2007; Irony-Tur Sinai & Kerem, 2018; Palumbo & Russo, 2019)

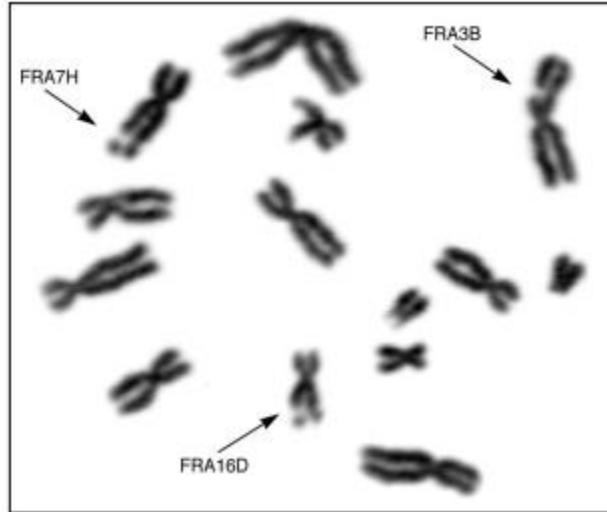


Figura 1. Cariotipo parcial humano donde se muestra la manifestación de tres sitios frágiles después de la exposición de las células a estrés replicativo inducido por afidicolina. (Sutherland et al., 1998)

Se ha estimado que la población en general expresa de forma espontánea de 3% a 5% de alteraciones cromosómicas identificables. Las regiones de fragilidad cromosómica se clasifican en dos tipos con base en su frecuencia de presentación dentro de la población. Las de menor frecuencia se denominan sitios frágiles raros (SFRs) encontrándose en menos del 5% de la población estudiada y, por otra parte, los sitios frágiles comunes (SFCs) corresponden a zonas de fragilidad presentes en la mayor parte de la población, no importando sexo o fenotipo, y como tal se les considera una característica intrínseca de los cromosomas. (Glover et al., 1998)

Se ha observado que la inducción de SFRs se puede llevar a cabo mediante cultivos celulares deficientes en folatos, inhibidores del metabolismo de folatos, inhibidores de la timidilato sintasa y también exponiendo las células a un exceso de timina (Sutherland, 1977). También se ha encontrado que el cultivo celular en medios con pH alcalino puede llegar a ser causa de fragilidad. Sin embargo, los SFRs pueden

también ser inducidos por el uso de análogos de nucleótidos como la bromodeoxiuridina (BrdU) y agentes intercalantes del DNA como la distamicina A (Kremer et al., 1991; Sutherland, 1977).

Por otra parte, los SFCs son principalmente inducidos por inhibidores de las DNA polimerasas alfa, delta y épsilon como la afidicolina y en menor grado por sustancias como BrdU y la 5'-azacitidina. Hasta este momento no han sido descritos de manera detallada los mecanismos de los diferentes inductores de los SFRs y SFCs. Sin embargo, es importante considerar que la especificidad de inducción puede estar relacionada a las limitaciones de la técnica citogenética ya que algunos sitios frágiles inducidos eficazmente por cierto tipo de sustancia, también se pueden inducir por medio de otras sustancias, aunque en menor grado. Por ejemplo, los SFCs inducidos por afidicolina también se han observado en la inducción de sitios frágiles asociada a deficiencia de folatos y algunos SFRs inducidos por deficiencia de folatos se pueden observar también en presencia de afidicolina. Sin embargo, en todos los casos esto coincide con una alteración en la replicación del genoma (Kähkönen et al., 1989).

Las técnicas moleculares han permitido determinar que los SFRs, se caracterizan por la repetición de secuencias de DNA. Por ejemplo, de 30 SFRs analizados, 10 contienen la repetición del triplete CGG y 2 portan minisatélites ricos en A-T (Zhang & Freudenreich, 2007). Estas regiones repetidas pueden generar estructuras de DNA diferentes al tipo B o conformaciones alternativas que contienen estructuras secundarias como horquillas, cuadruplex, tetraplex como se observa en la figura 2;

estructuras capaces de pausar o disminuir el avance de las horquillas de replicación tanto in vitro como in vivo (Choi & Majima, 2011; Fry & Loeb, 1994).

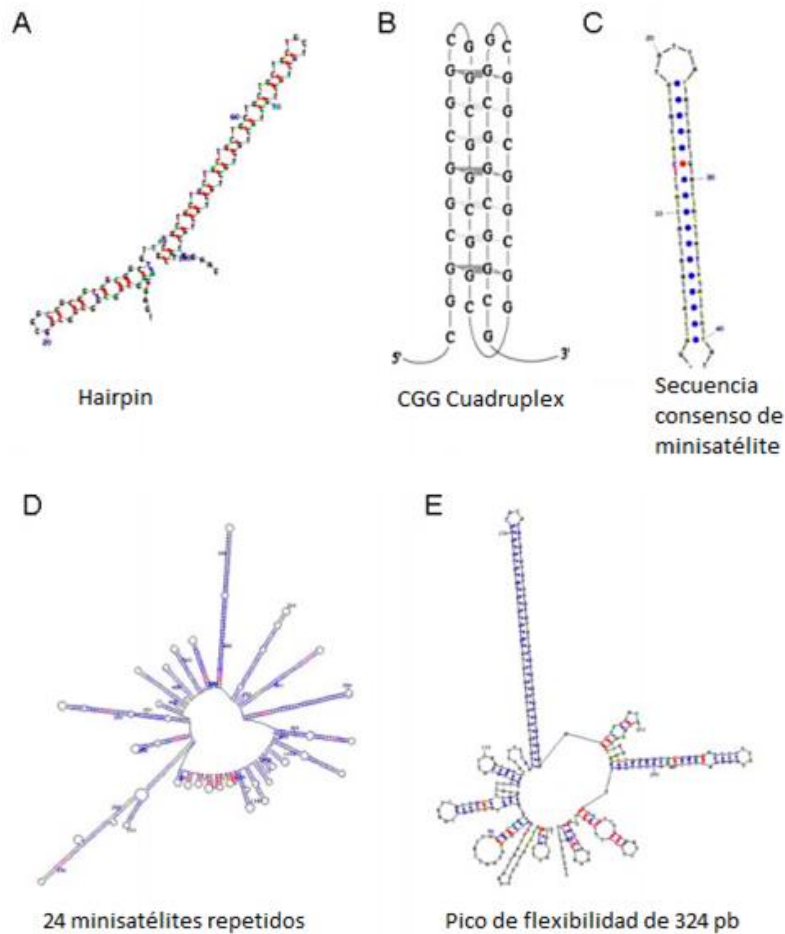


Figura 2. Estructuras secundarias formadas por secuencias repetidas presentes en SFRs (Freudenreich, 2007).

Los elementos repetidos ricos en CG se encuentran en individuos normales, sin embargo, pueden presentar expansiones significativas en ciertos individuos, resultando en la manifestación citogenética de fragilidad bajo estrés replicativo que se induce por deficiencia de folatos. Por otra parte, los SFRs no inducibles por deficiencia de folatos están relacionados a la expansión de regiones repetidas ricas

en A-T y se pueden generar mediante sustancias que se unen a dichas regiones como la distamicina A y el berenil (Kremer et al., 1991; Yu et al., 1997).

Los SFCs no se caracterizan por presentar secuencias repetidas como en los SFRs. El estudio de varios SFCs no ha mostrado un componente en la secuencia de DNA que permita explicar su fragilidad. Sin embargo, algunos de los sitios analizados poseen regiones interrumpidas ricas en AT que les confieren una alta flexibilidad y por lo tanto podrían generar tendencia a la formación de estructuras secundarias como en los SFRs y por lo tanto capaces de reducir el avance de la horquilla de replicación (Burrow et al., 2010; Le Tallec et al., 2014).

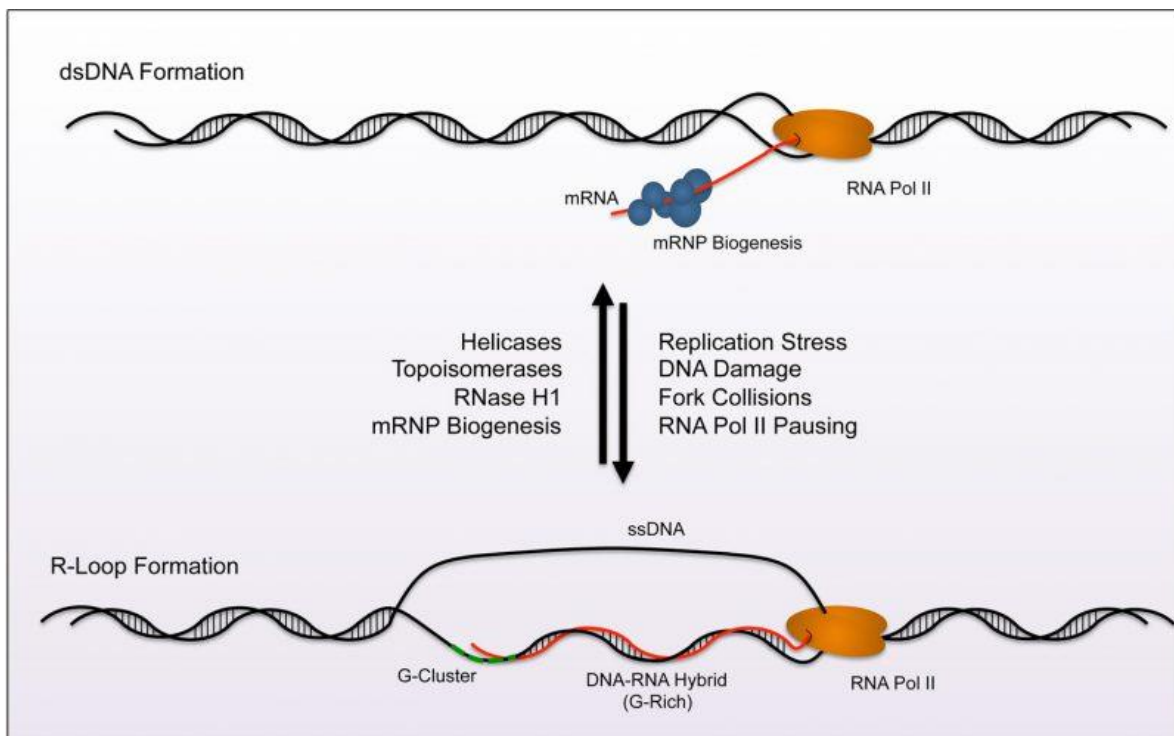


Figura 3. Formación de R-loops mediante estrés replicativo, daños al DNA, colisión entre la maquinaria de replicación y transcripción y estancamiento de la RNA Pol II. (Allison & Wang, 2019)

El estudio del sitio frágil encontrado en el cromosoma X mostró que su replicación se encontraba retrasada o era incompleta, debido a una progresión lenta de las horquillas de replicación (Hansen et al., 1993), lo que puso sobre la mesa un modelo atractivo para el desarrollo de sitios frágiles en el genoma. Estudios posteriores mostraron que los SFCs presentaban un tiempo de replicación tardía, sin embargo, no todos los sitios frágiles se replican tardíamente (Le Beau et al., 1998; Palakodeti et al., 2004), algunos inclusive presentan una replicación temprana (El Achkar et al., 2005; Handt et al., 2000; Hansen et al., 1993).

Esto conlleva a hipotetizar que la replicación tardía puede estar relacionada a la posible colisión entre las maquinarias de replicación y de transcripción (Brison et al., 2019; Helmrich et al., 2011). También se ha propuesto que la deficiencia en el sistema de reparación del DNA puede ser la causa de fragilidad (Ozeri-Galai et al., 2014), pero la lógica indica que la necesidad de este sistema de reparación en las regiones correspondientes a sitios frágiles está relacionada a un problema en el proceso de replicación, lo que nos lleva al problema inicial y esto indica que debe haber otros factores sobre los cuales recae la inestabilidad de los sitios frágiles, como pueden ser dificultades en la iniciación o progresión de la replicación, o su conflicto con la transcripción (Helmrich et al., 2011; Le Tallec et al., 2014).

Otro mecanismo involucrado en la manifestación de fragilidad en los SFCs es la formación de R-loops (híbridos DNA/RNA) en los orígenes de replicación de regiones de difícil replicación (figura 3). Se ha observado que los R-loops generan cambios epigenéticos en las regiones donde se presentan e inducen la formación

de heterocromatina, lo que podría impedir la progresión normal de la horquilla de replicación. La formación de R-loops puede comprometer la estabilidad genómica mediante colisiones entre la maquinaria de replicación y la de transcripción como se ha observado en la formación de algunos SFCs, específicamente en genes grandes mayores a 700 Kb (D. I. Smith et al., 2007), los cuales inician su transcripción durante la interfase de un ciclo celular y la terminan en el siguiente ciclo celular como se observa en *FHIT* (gen de la tríada frágil de histidina diadenosina trifosfatasa). Sin embargo, el estudio de otros genes grandes dentro del genoma no ha mostrado la manifestación de fragilidad esperada por la posible colisión entre la replicación y la transcripción (Helmrich et al., 2011; Madireddy et al., 2016).

Aunque se ha encontrado una correlación directa entre la formación de estructuras secundarias y el enlentecimiento de las horquillas de replicación en los SFRs, la evidencia para la implicación de estos mecanismos en los SFCs ha sido contradictoria (Hellman et al., 2000; Letessier et al., 2011; Palakodeti et al., 2004). En un principio se había encontrado que la replicación en las regiones que manifestaban SFCs era más lenta que en el resto del genoma, sin embargo, estudios recientes utilizando técnicas de peinado de DNA han mostrado que la velocidad de las horquillas de replicación no difiere entre las regiones con SFCs y el resto del genoma (figura 4) aún en presencia de concentraciones limitadas de afidicolina (Le Beau et al., 1998; Letessier et al., 2011; Palumbo et al., 2010).

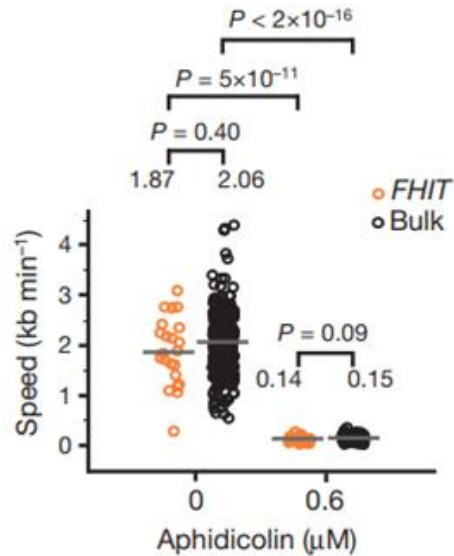


Figura 4. Distribución comparativa de la velocidad de las horquillas de replicación entre el genoma en general y el locus de *FHIT* en células linfoblásticas. (Letessier et al., 2011)

FRA3B es el SFC más activo y frágil del genoma humano y su zona de fragilidad se extiende sobre más de 500 Kb dentro del gen *FHIT* que mide aproximadamente 1.5 Mb aunque existen reportes en donde se ha mostrado que la fragilidad se puede observar en el rango de megabases y se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 3 en la región 3p14.2 (Becker et al., 2002). El gen contiene 10 exones que dan origen a un cDNA de 1.1 Kb (Shiraishi et al., 2001). Los primeros cuatro y el último exón son no codificantes, mientras que los exones del 5 al 9 codifican a una proteína de 16.8 kD que corresponde a una trifosfato-hidrolasa cuyas posibles acciones como supresor de tumores son objeto de intenso estudio, alrededor del exón 5 se ubica el epicentro o zona crítica de fragilidad cromosómica (figura 5) (Debatisse et al., 2012; Wali, 2010).

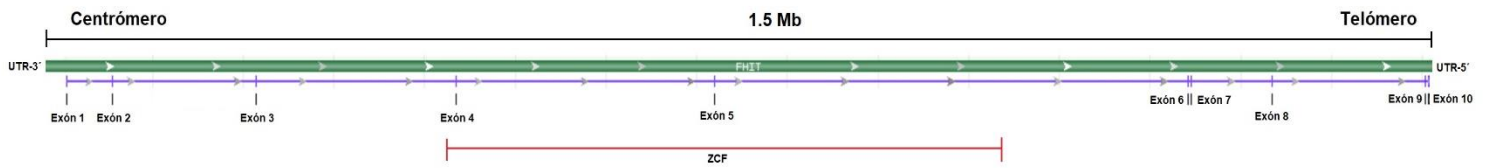


Figura 5. Gen *FHIT* con sus exones, la zona crítica de fragilidad se encuentra alrededor del exón 5. (Letessier et al., 2011)

La manifestación de los SFCs es tejido-específica como lo mostró la comparación entre fibroblastos y linfocitos, en donde los primeros no muestran la manifestación de fragilidad en la misma región que lo hacen los linfocitos demostrando así el error en la cual la fragilidad se conservaba en diferentes tipos celulares y por lo tanto era dependiente de la secuencia (Letessier et al., 2011), la notable manifestación de FRA3B en linfocitos B se correlaciona con la carencia de sitios de iniciación de la replicación (SIRs) a lo largo de 700 kb de *FHIT* que se traslapan con FRA3B, mientras que la manifestación de FRA3B es insignificante en fibroblastos que muestran una densidad normal SIRs en la misma región de 700 kb (Debatisse et al., 2012; Le Tallec et al., 2014; Letessier et al., 2011). La presencia de horquillas de replicación que viajan largas distancias a partir de SIRs muy espaciados se correlaciona con la fragilidad de FRA3B, pero no es suficiente para explicarla pues otras zonas del genoma también presentan escasez de SIRs sin mostrar dicha fragilidad como se observa en la figura 6 (Le Tallec et al., 2014; Letessier et al., 2011).

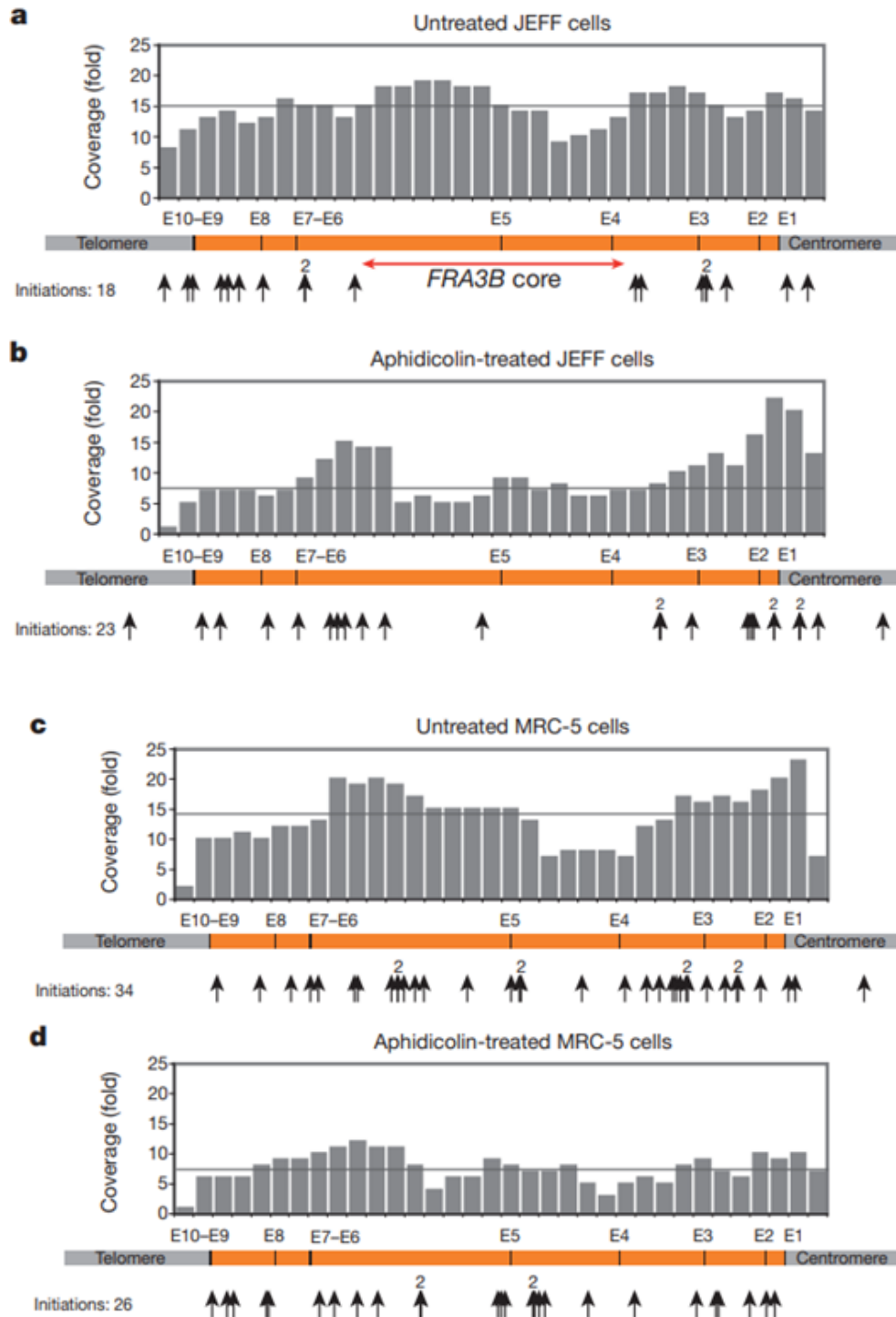


Figura 6. Las dos imágenes superiores muestran los histogramas donde se observa la cobertura del locus en una ventana de 50 Kb. Cada barra representa el número de fibras que se superponen completamente a la secuencia correspondiente. Las líneas grises horizontales representan las medianas de cobertura. (a) Células linfoblásticas sin tratamiento con afidicolina en donde se observa la carencia de sitios de iniciación de la replicación en una región de aproximadamente 500 Kb centrada en el exón 5, el cual corresponde a la zona crítica de fragilidad. (b) Células linfoblásticas que han sido tratadas con afidicolina donde se observa una disminución en la cobertura de la región

por las horquillas de replicación. (c) y (d) Comparativo entre fibroblastos tratados con afidicolina y no tratados, en donde se observa solo una disminución en la cobertura por las horquillas de replicación debido al enlentecimiento de las polimerasas, sin embargo, no se observa una deficiencia en sitios de iniciación de la replicación en ninguno de los dos casos, lo que demuestra que la manifestación de fragilidad es tejido específico. (Letessier et al., 2011)

El hecho de que las horquillas de replicación tengan que viajar largas distancias para poder llevar a cabo la replicación de las regiones desprovistas de SIRs puede crear conflictos con el proceso de transcripción y por lo tanto inducir la manifestación de fragilidad, una posible causa de este conflicto por el efecto de la transcripción es la formación de R-loops, los cuales podrían ser un obstáculo para el avance de la replicación, sin embargo la evidencia de que existen genes largos que no manifiestan fragilidad sugiere que la transcripción no siempre puede inducir fragilidad. (LeTallec et al., 2013)

No se puede descartar que un ambiente epigenético alterado en la región frágil podría ser causa de la inestabilidad, sin embargo, la única característica epigenética que se ha encontrado en estas regiones es la hipoacetilación de histonas observada en diferentes SFCs cuando se comparan con el resto del genoma (Koch et al., 2007), sugiriendo que estas regiones podrían estar organizadas en forma de heterocromatina (Savelyeva & Brueckner, 2014).

Los sitios frágiles han sido asociados tanto a inestabilidad genética como epigenética. En este momento ya se conocen los genes implicados en 11 SFRs, los cuales han sido mapeados a nivel molecular (aquellos que han sido secuenciados en su totalidad) y se mostró que varios de ellos se encuentran asociados con

enfermedades humanas, en su mayoría relacionados a desórdenes neurológicos (Miles, 2011; C. Smith et al., 2010). Los SFRs inducidos por deficiencia de folatos se han relacionado con enfermedades neuropsiquiátricas tales como la esquizofrenia, autismo y retraso mental. Sin embargo, un gen no es capaz de explicar el fenotipo que caracteriza estas enfermedades, por lo tanto, es razonable pensar que la fragilidad cromosómica tiene un impacto a nivel global en la expresión génica y en la síntesis de proteínas (Uhlen et al., 2010).

En su mayoría los SFRs se encuentran asociados a desórdenes. Los SFCs usualmente se encuentran asociados a carcinogénesis o cáncer (K. Ma et al., 2012), aunque ya se ha mencionado que estos sitios han sido implicados también en el desarrollo de desórdenes neurológicos (Galloway & Nelson, 2009) y en una variedad de enfermedades caracterizadas por inmunodeficiencia, enfermedades óseas e infertilidad (Fu et al., 2003).

La evidencia indica que los SFCs humanos están conservados y se expresan en primates y roedores, y que los ortólogos de tales SFCs corresponden a secuencias genómicas muy conservadas entre estos mamíferos (Helmrich et al., 2006; Schwartz et al., 2006). El ortólogo de *FRA3B/FHIT* ha sido plenamente caracterizado en el cromosoma 14 del ratón (*Fra14A2/FHIT*), el cual también corresponde a un SFC en el ratón y su zona crítica de fragilidad se centra en el exón 5 de forma similar a la descrita en el humano (figura 7), el estudio y comparación de secuencias demostraron una identidad del 85% entre ambos genes, por lo cual el

locus murino es un modelo adecuado para estudiar las causas de la fragilidad de los SFCs humanos (Shiraishi et al., 2001)(Glover et al., 1998).

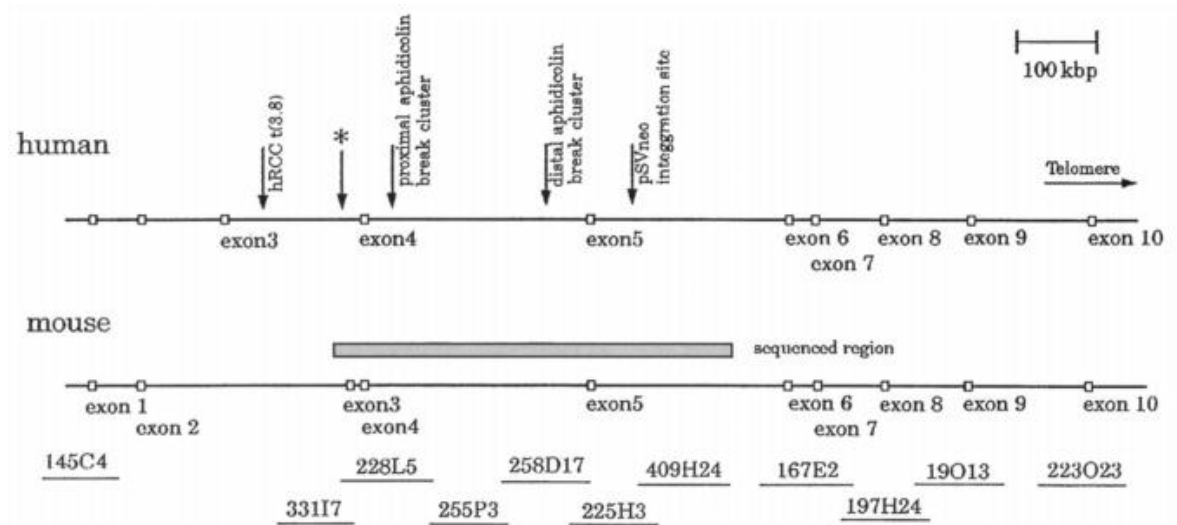


Figura 7. Comparativo del locus *FHIT* humano y *FHIT* murino, la identidad entre ambas regiones corresponde al 85%, el estudio demostró que estos genes son ortólogos (Shiraishi et al., 2001).

Superenrollamiento y empaquetamiento del DNA

Los genomas eucarióticos muestran una organización elaborada y dinámica dentro del núcleo celular. El conocimiento de los principios físicos y la maquinaria molecular que determina la organización del genoma en tercera dimensión es clave para la comprensión de las relaciones entre la estructura del genoma y su función.

El DNA de las células eucariotas se encuentra muy compactado, lo que implica un alto grado de organización estructural. Sin embargo, el mecanismo de empaquetamiento del DNA debe permitir acceder a la información contenida en el DNA para poder llevar a cabo los procesos de replicación y transcripción. Para

entender el empaquetamiento de una hebra tan larga como lo es el DNA de cada cromosoma se recurre a la física de polímeros. La evidencia experimental indica que la hebra de DNA de secuencia aleatoria tiene una longitud de persistencia de aproximadamente 150 pb que corresponde a una longitud de 50 nm y por debajo de esta medida el DNA se comporta como una hebra rígida (Bennink et al., 1999); cuando se duplica la longitud de persistencia se alcanza la longitud de Kuhn, en donde la fibra tiene la capacidad de formar un círculo con ella misma (Bouchiat et al., 1999), es importante mencionar que en el caso de la cromatina la longitud de persistencia es directamente proporcional a la cantidad de histonas que contiene la hebra de DNA , demostrando que la eliminación de una porción de histonas induce un mayor grado de compactación (figura 8), estos experimentos muestran que las histonas se requieren para mantener la cromatina en su forma expandida y así estar disponible de manera laxa para interactuar con las maquinarias de replicación y transcripción (Iyer et al., 2011), por lo menos en este grado de compactación.

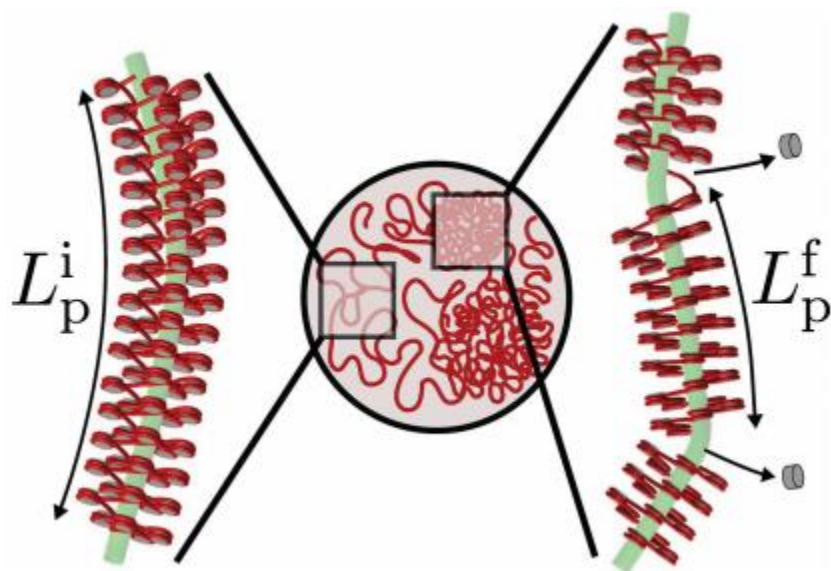


Figura 8. Esquema del experimento en el cual se han depletado nucleosomas, se observa su impacto sobre la longitud de persistencia y las consecuencias en los cambios de conformación local dentro del núcleo, la parte izquierda corresponde a la longitud de persistencia inicial y la derecha a la longitud de persistencia final del experimento. (Iyer et al., 2011)

Cada cromosoma al tener una relación tan desigual entre su largo y su diámetro muestra una propiedad conocida como superenrollamiento, en el cual la doble hélice de DNA se enrolla alrededor de su eje imaginario. El enrollamiento adicional del DNA sobre tal eje produce el superenrollamiento del DNA (figura 9) (Mirkin, 2001). El superenrollamiento del DNA es por lo general consecuencia de estrés estructural, estrés generado por la gran rigidez que imponen los enlaces fosfodiéster y su restricción topológica, consecuencia de su interacción con proteínas nucleares (Lilley, 2001).

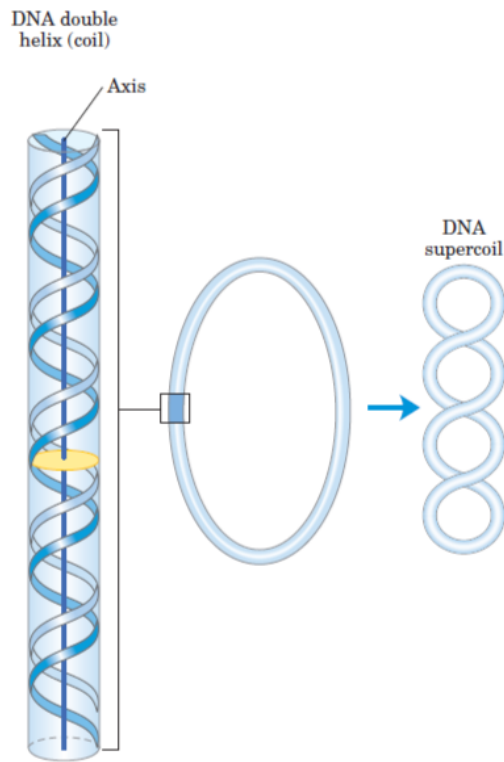


Figura 9. Cuando el eje de la doble hélice de DNA se enrolla sobre sí mismo forma una hélice nueva (superhélice). La superhélice de DNA se denomina habitualmente un superenrollamiento. (Nelson & Cox, 2017)

El superenrollamiento es una característica intrínseca de la estructura terciaria del DNA que se manifiesta en todos los DNA circulares o sin extremos libres y que se encuentra estrictamente regulada en todas las células, esto se demostró cuando se realizó la extracción de DNA circular y este permanecía altamente superenrollado incluso después de ser extraído de las células, purificado de proteínas y otros restos celulares, comportándose como si fuera DNA dentro de un núcleo densamente empaquetado (figura 10) (Deweese et al., 2009; Mirkin, 2001).

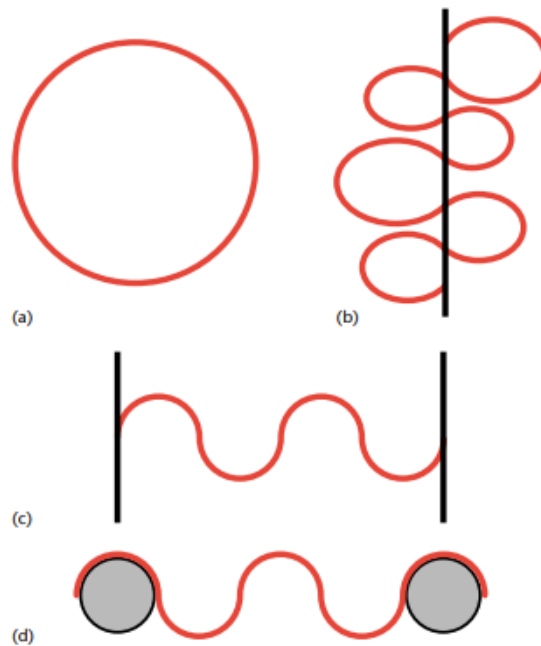


Figura 10. Ejemplos de dominios topológicos. (a) DNA circular, (b) Bucles de DNA cromosómico, (c) DNA lineal anclado a la membrana, (d) DNA lineal anclado a agregados de proteínas. (Mirkin, 2001)

Si una molécula de DNA circular cerrado adquiere una conformación Watson y Crick, con una vuelta de la doble hélice cada 10.4 pb, la hebra se encontrará relajada

y no superenrollada. El superenrollamiento se produce cuando el DNA está sometido a algún tipo de tensión estructural y se ha observado que es tejido específico (Nelson & Cox, 2017).

Usualmente el estrés es resultado de un subenrollamiento de la doble hélice en el DNA circular cerrado, lo que significa que la hebra de DNA tiene menos vueltas de hélice de lo que se espera en el DNA tipo B. Cuando un segmento de DNA circular relajado tipo B pierde una vuelta de la hélice supondría una desviación respecto a la forma más estable del DNA, y como resultado la molécula sufriría de estrés estructural. Normalmente, la mayor parte del estrés se absorbe por el enrollamiento del eje del DNA sobre sí mismo para formar una superhélice; una parte de la tensión en este segmento simplemente se dispersaría en el conjunto de la molécula mayor de DNA (Nelson & Cox, 2017). Sin embargo, existe otra posibilidad, el estrés se puede absorber separando las dos hebras de DNA, pero esta desestabiliza la doble hélice. En el DNA circular purificado, el estrés producido por el subenrollamiento es absorbido habitualmente por el superenrollamiento, no por la separación de las hebras, porque la generación de una espiral por el eje del DNA requiere menos energía que la rotura de los puentes de hidrógeno que estabilizan los pares de bases (Deweese et al., 2009; Mirkin, 2001; Nelson & Cox, 2017).

Las células subenrollan activamente su DNA con la ayuda de enzimas conocidas como topoisomerasas y el estrés estructural resultante constituye una forma de almacenamiento de energía. Las células mantienen el DNA en un estado subenrollado para facilitar su compactación por superenrollamiento (Deweese et al.,

2009; Lodish et al., 2000). Además, el subenrollamiento del DNA es importante para las enzimas que requieren interactuar con él, ya que facilita la separación de las hebras (figura 11) (Nelson & Cox, 2017).

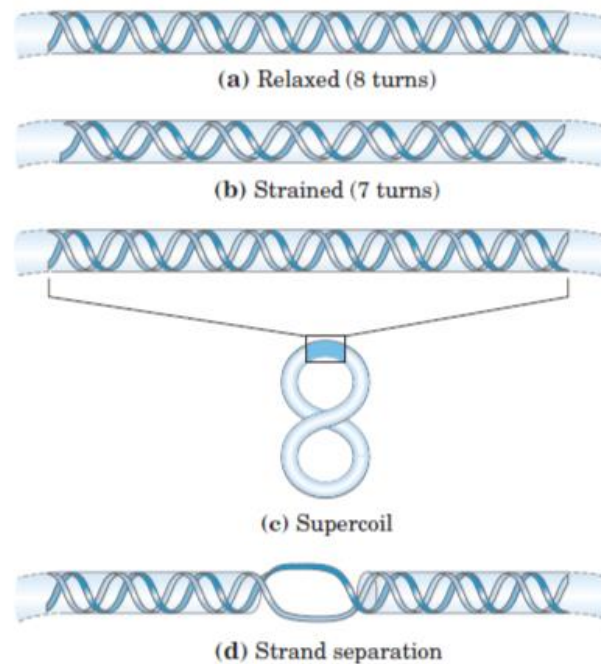


Figura 11. Efectos del DNA subenrollado. (a) Segmento de una molécula de DNA circular cerrado de 84 pb en su forma relajada con ocho vueltas de hélice. (b) La eliminación de una vuelta genera una tensión estructural. (c) La tensión es amortiguada por el superenrollamiento. (d) El subenrollamiento del DNA también facilita la separación de las hebras. En principio cada vuelta eliminada debería facilitar la separación de las hebras en una longitud de 10 pb. Sin embargo, los puentes de hidrogeno de los pares de bases impiden la separación de las hebras sobre distancias tan cortas y el efecto solo resulta importante en cadenas de DNA más largo y con niveles superiores de subenrollamiento. (Nelson & Cox, 2017)

Sin embargo, el estado subenrollado solo se puede mantener si el DNA es un círculo cerrado o si se encuentra unido y estabilizado por proteínas, de manera que las hebras no tengan libertad de rotación una en torno de la otra. Si se produce un corte en una de las cadenas de un DNA circular libre de proteínas, la libre rotación en ese punto hará que el DNA subenrollado revierta de modo espontáneo al estado relajado. Sin embargo, en una molécula de DNA circular cerrado, el número de

vueltas de la hélice es fijo y no puede cambiar sin al menos un corte transitorio en una de las hebras. Por lo tanto, el número de vueltas de la hélice de una molécula de DNA constituye una representación precisa del superenrollamiento (Deweese et al., 2009; Nelson & Cox, 2017).

El superenrollamiento se puede medir mediante un concepto conocido como número de enlace o “*linking number*” (Lk) que corresponde a una propiedad topológica del DNA de doble cadena, pues no varía a consecuencia de la curvatura o la deformación del DNA, siempre que las dos cadenas permanezcan intactas, definiéndose como el número de veces que una de las cadenas se cruza sobre la otra cadena, por lo tanto, siempre será un número entero (figura 12) (Mirkin, 2001).

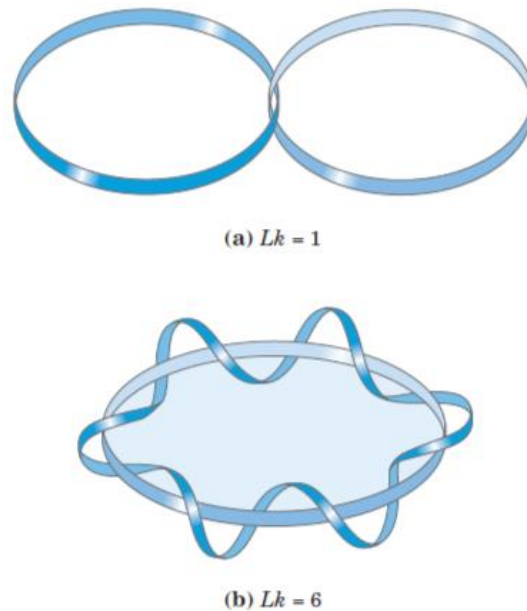


Figura 12. Cada cinta azul representa una molécula de DNA de doble cadena. La molécula en (a) tiene un $LK = 1$. La molécula en (b) tiene un $LK = 6$. Una de las hebras de (b) se representa sin torsión para definir así el borde de una superficie imaginaria. El número de veces que la hebra con torsión cruza esta superficie define con precisión el número de enlace. (Nelson & Cox, 2017)

Por convención, si los enlaces entre las dos cadenas están dispuestos de tal forma que las dos hebras del DNA se hallen entrelazadas siguiendo una hélice dextrógira, el número de enlace se considera positivo (+). El número de enlace es negativo (-) para un entrelazamiento en hélice levógira (figura 13) (Nelson & Cox, 2017).

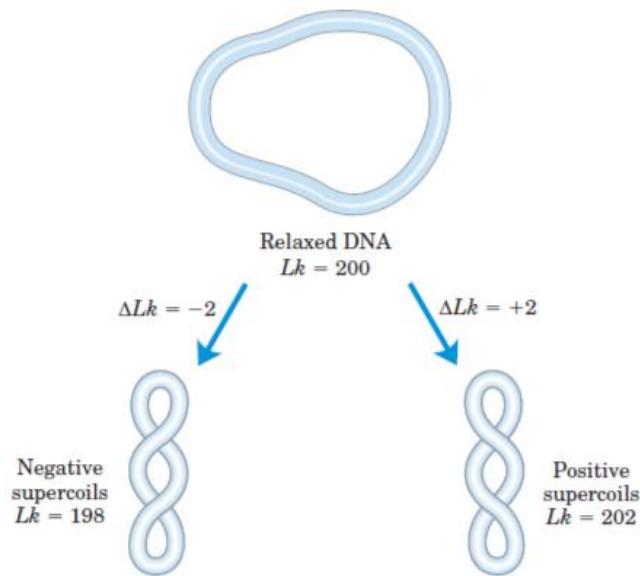


Figura 13. En la molécula relajada un subenrollamiento o un sobrenrollamiento de dos vueltas helicoidales ($LK = 198$ ó 202) producirá un superenrollamiento negativo o positivo, respectivamente. Obsérvese que el eje del DNA se tuerce en direcciones opuestas en ambos casos. (Nelson & Cox, 2017)

A menudo resulta conveniente expresar la variación en el número de enlace en términos de una magnitud independiente de la longitud de la molécula de DNA. Esta magnitud, denominada diferencia de enlace específica o densidad superhelicoidal (σ), es una medida del número de vueltas eliminadas con respecto a las presentes en el DNA relajado (Mirkin, 2001; Nelson & Cox, 2017).

$$\sigma = \frac{\Delta LK}{LK}$$

El grado de subenrollamiento del DNA celular suele oscilar entre un 5% y un 7%; es decir, $\sigma = -0.05$ a -0.07 . El signo negativo indica que la variación del número de enlace se debe al subenrollamiento del DNA. El superenrollamiento inducido por el subenrollamiento se define, por tanto, como superenrollamiento negativo. El número de enlace puede descomponerse en dos elementos estructurales uno denominado torsión (Tw) y retorcimiento (Wr) (figura 14). (Nelson & Cox, 2017)

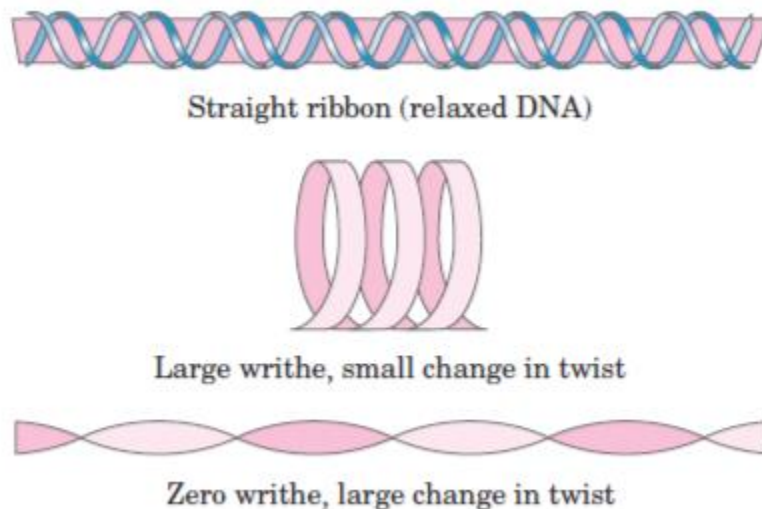


Figura 14. Modelo de cintas para ilustrar la torsión y el retorcimiento. La cinta representa el eje de una molécula de DNA relajada. La tensión producida por la torsión de la cinta (subenrollamiento del DNA) puede manifestarse como un cambio en el retorcimiento o en la torsión. Los cambios topológicos del número de enlace suelen estar acompañados por cambios geométricos tanto en el retorcimiento como en la torsión. (Nelson & Cox, 2017)

El retorcimiento es una medida del enrollamiento del eje de la hélice mientras que la torsión depende de la torsión local, es decir, del ángulo entre pares de bases adyacentes. Cuando se produce un cambio en el número de enlace, la tensión resultante es compensada en parte por el retorcimiento (superenrollamiento) y, en parte, por cambios en la torsión, con la siguiente relación (Deweese et al., 2009; Mirkin, 2001).

$$LK = Tw - Wr$$

Tanto la torsión como el retorcimiento no necesariamente son números enteros. El giro y la torsión son propiedades geométricas, no topológicas, ya que varían a consecuencia de la deformación de la molécula de DNA circular cerrado. Además de causar el superenrollamiento y favorecer la separación de las hebras, el subenrollamiento del DNA facilita la aparición de cambios estructurales en la molécula, como la formación de estructuras cruciformes que contienen algunas bases desapareadas (figura 15); el subenrollamiento del DNA permite mantener la necesaria separación de las hebras, también el subenrollamiento de una hélice dextrógira facilita la formación de cortas regiones de Z-DNA levógiro en el DNA nuclear (Deweese et al., 2009; Mirkin, 2001).

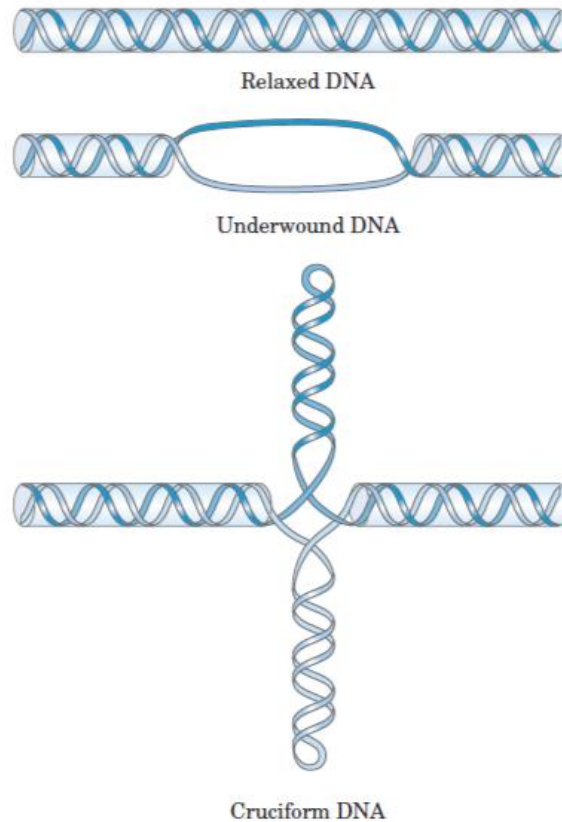


Figura 15. El subenrollamiento del DNA favorece la formación de estructuras cruciformes. (Nelson & Cox, 2017)

El proceso de superenrollamiento del DNA es un proceso regulado de forma precisa que tiene influencia sobre la fisiología del DNA, en los procesos en los cuales se requieren cambios en la estructura del DNA se encuentran involucradas dos tipos de enzimas que se conocen como topoisomerasas (I y II) capaces de alterar la topología del DNA en un LK de 1 o 2 respectivamente (Deweese et al., 2009).

El DNA superenrollado tiende a adoptar una forma extendida y estrecha en lugar de compacta, y suele presentar ramificaciones múltiples. Con los valores de densidad superhelicoidal normalmente presentes en la célula, la longitud del eje de la

superhélice, ramificaciones incluidas, es un 40% de la longitud del DNA. Este tipo de enrollamiento se denomina plectonómico, sin embargo, existe otra forma de superenrollamiento conocida como solenoidal o toroidal, este incorpora vueltas compactas hacia la izquierda (figura 16), las dos formas pueden interconvertirse con facilidad, la forma plectonómica es más estable en disolución, pero la forma solenoidal puede estabilizarse mediante la unión de proteínas, y es la forma en la que se encuentra el DNA en la cromatina de los cromosomas eucarióticos (Mirkin, 2001).

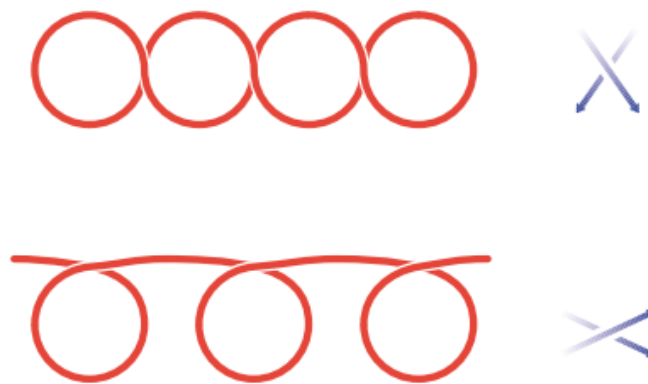


Figura 16. Forma plectonómica (arriba) y toroidal (abajo) del DNA superenrollado. Las flechas ilustran que ambas moléculas se encuentran negativamente superenrolladas a pesar de su diferente conformación espacial. (Mirkin, 2001)

Territorios cromosómicos

El genoma se encuentra dividido en un número de moléculas independientes de DNA conocidas como cromosomas. Dentro de estos cromosomas se encuentran los genes, que codifican para proteínas. El genoma humano en este momento se considera contiene aproximadamente 21,000 genes de proteínas (Willyard, 2018).

Algo muy evidente es que el material genético no se encuentra distribuido dentro del núcleo de manera aleatoria, por el contrario, su grado de organización es extremadamente elevado, encontrándose como una masa compacta confinada en un volumen limitado, por lo cual, los procesos tanto de replicación, como de transcripción también se deben llevar a cabo dentro de este espacio restringido.

Para poder tener una mejor comprensión del problema estructural arriba mencionado podemos ejemplificarlo considerando que la longitud del DNA como molécula extendida excede de manera significativa las dimensiones del núcleo que lo contiene, por lo que se considera que el DNA se debe encontrar muy restringido para poder mantenerse dentro del núcleo; esto es debido a que el DNA de una célula humana contiene 6×10^9 pb (pares de bases) que corresponden aproximadamente a 2 metros en los 23 pares de cromosomas diploides, los cuales se condensan dentro de un núcleo que tiene un diámetro de 6 micras en promedio. Por lo tanto, la imagen habitual de DNA como una hebra de doble hélice extendida es la excepción, la regla es encontrarlo estructuralmente deformado para adquirir una estructura más compacta. Sin embargo, al realizar un cálculo en donde se

considera la hebra de DNA como un cilindro de 2 metros de longitud y un diámetro de 2.34 nanómetros obtenemos un volumen aproximado de $8.6 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ y al compararlo con el volumen de una esfera de 6 micras de diámetro que es de $1.13 \times 10^{-16} \text{ m}^3$, encontramos que el DNA ocupa únicamente un aproximado del 7.6% del volumen disponible (figura 17), el hecho de encontrarlo interactuando con histonas, el efecto de los colorantes y fluoróforos para detectarlo genera un concepto erróneo sobre el porcentaje de ocupación dentro del núcleo.

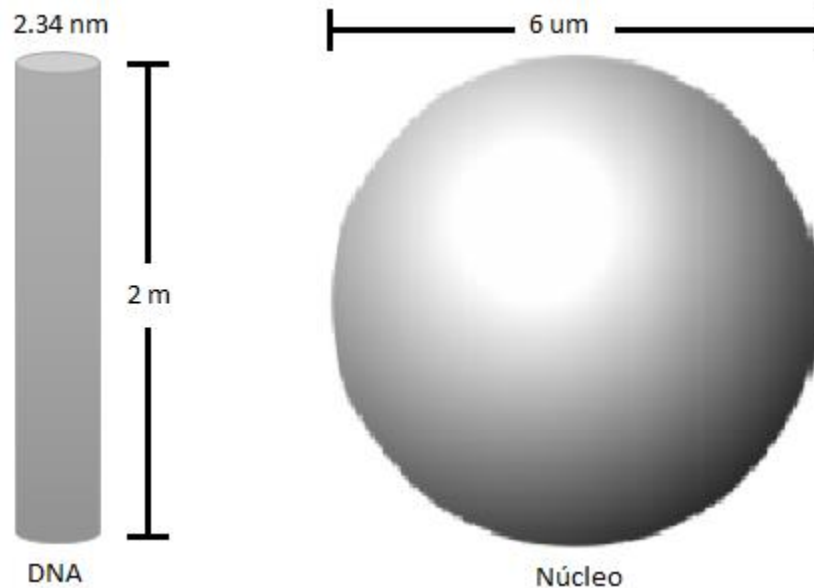


Figura 17. El cilindro representa los 2 metros de DNA de los cromosomas representados en forma lineal, la esfera representa el núcleo con un diámetro promedio de 6 micrómetros de diámetro.

Aunque la densidad del DNA en este compartimento suele ser muy alta, en el núcleo de eucariotas suele ser de aproximadamente 100 mg/mL, tal concentración en solución sería el equivalente a un gel de gran viscosidad. En este momento no se comprende completamente las implicaciones fisiológicas de tal concentración de DNA, así como el efecto que tiene sobre la capacidad de las proteínas para encontrar sus sitios de fijación (Ou et al., 2017).

El empaquetamiento de la cromatina es distinto durante las diferentes fases del ciclo celular. En el momento de la división (mitosis o meiosis), el material genético alcanza un grado máximo de compactación generando los cromosomas metafásicos observables de manera individual. El empaquetamiento puede describirse mediante la relación de la longitud del DNA dividido entre la longitud de la unidad que lo contiene; por ejemplo, el cromosoma 21 que es en el humano el más pequeño, contiene aproximadamente 4.6×10^7 pb, lo que equivale aproximadamente a 1.56 cm de DNA extendido. En el grado máximo de condensación durante la metafase, el cromosoma llega a medir aproximadamente 2 micras de longitud. Así, la relación de empaquetamiento de DNA en un cromosoma puede llegar a ser de hasta 7800 (Krebs et al., 2018; Pederson & Marko, 2014).

Por el momento no es posible determinar de manera experimental la relación de empaquetamiento de la cromatina de manera exacta debido al gran dinamismo y las estructuras amorfas que tiene la cromatina de las células eucariotas. Sin embargo, se acepta de manera general que los cromosomas mitóticos suelen ser 5 a 10 veces más compactos que la cromatina en interfase, lo que nos permite inferir una relación de empaquetamiento entre 1000 y 2000 (Fey et al., 1986; Krebs et al., 2018; Pederson & Marko, 2014).

Cada cromosoma contiene una doble cadena de DNA muy larga, consistiendo en una fibra continua que forma bucles a lo largo del cromosoma debido al estrés

estructural inducido a su rigidez por los enlaces fosfodiéster y la restricción que presenta al libre giro por estar anclado a proteínas del núcleo. Para poder explicar la cromatina en interfase y la estructura del cromosoma mitótico es necesario entender que la condensación de esta molécula de DNA extremadamente larga tiene que realizarse de tal manera que permita se lleven a cabo los procesos de transcripción y replicación mediante la relajación y condensación cíclica de la molécula (Rivera-Mulia & Aranda-Anzaldo, 2010).

Durante la mayor parte del ciclo de vida de la célula eucariótica su material genético ocupa un área del núcleo en la cual los cromosomas individuales no se pueden observar por microscopia convencional, mientras que, en la metafase durante la mitosis, se observan los cromosomas como unidades compactas e individuales. La estructura global de la cromatina en interfase no parece cambiar notablemente entre las divisiones celulares o incluso durante el periodo de replicación, cuando la cantidad de cromatina se duplica (Krebs et al., 2018).

La cromatina es fibrilar, observaciones realizadas mediante microscopia de alta resolución, hibridación *in situ* por fluorescencia e imágenes de célula viva han empezado a mostrar aspectos adicionales de la estructura de la cromatina y la arquitectura nuclear.

La cromatina se puede dividir en dos tipos; en la mayoría de las regiones la cromatina se encuentra menos densamente condensada que en el cromosoma mitótico. Este material es conocido como eucromatina, se encuentra relativamente

dispersa y ocupa la mayoría del nucleoplasma. Algunas regiones de cromatina se encuentran densamente compactas, mostrando un grado de compactación comparable al de el cromosoma mitótico. Este material es conocido como heterocromatina, encontrándose típicamente en los centrómeros, los telómeros y regiones con secuencias altamente repetitivas, encontrándose a lo largo del ciclo celular usualmente con un mismo grado de compactación. La heterocromatina tiene una tendencia a encontrarse en la periferia nuclear y en el nucleolo (Krebs et al., 2018). La forma común de heterocromatina que siempre permanece condensada se conoce como heterocromatina constitutiva. En contraste, hay un tipo de heterocromatina conocida como facultativa, que designa regiones genómicas dentro del núcleo de las células eucarióticas, las cuales tienen la oportunidad de adoptar la conformación abierta o compacta en diferentes contextos espaciales, temporales e incluso hereditarios (Geyer et al., 2011; Trojer & Reinberg, 2007).

Una misma fibra cromosómica en diferente contexto espacial y/o temporal se puede observar cómo eucromatina o como heterocromatina, por lo que estos estados simplemente representan diferentes grados de condensación del material genético. De la misma manera, existen las regiones de eucromatina en diferentes estados de condensación durante la interfase y la mitosis. Por lo tanto, el material genético se encuentra organizado de tal manera que permite la interacción constante entre regiones específicas del genoma, lo que llega a generar cambios cíclicos en el empaquetamiento de la eucromatina (Krebs et al., 2018; Lodish et al., 2000a).

Hay una gran variedad de modificaciones bioquímicas que inducen cambios en las propiedades del DNA y de los componentes proteicos de la cromatina. Estos incluyen reducción en la acetilación de las histonas, metilación de algunos sitios en las histonas y la metilación de citosinas en el DNA. Estos cambios bioquímicos inducen la condensación de la cromatina y el reclutamiento a la heterocromatina de proteínas específicas, las cuales son responsables de mantener o expandir su inactivación. Aunque los genes activos se encuentran contenidos en la eucromatina, solo una minoría de sus secuencias se transcriben al mismo tiempo. Por lo tanto, la localización hacia el interior del núcleo de la eucromatina se suele observar en la expresión de la mayoría de los genes. Por otra parte, aunque la heterocromatina constitutiva se ha considerado como las regiones cromosómicas transcripcionalmente inertes, varios estudios han mostrado que las regiones centroméricas y pericentroméricas también se transcriben y están involucradas en múltiples procesos celulares. Contrariamente a las expectativas generales, se han observado genes que codifican proteínas activas en la heterocromatina, aunque los mecanismos reguladores de su expresión son en gran parte aún desconocidos (Geyer et al., 2011; Lodish et al., 2000a; Saha & Mishra, 2019).

Varios estudios han mostrado que existe una organización cromosómica determinada dentro del núcleo en interfase. Los cromosomas ocupan diferentes espacios tridimensionales, los cuales son conocidos como territorios cromosómicos (TC) (figura 18) (Cremer & Cremer, 2010; Parada et al., 2004).

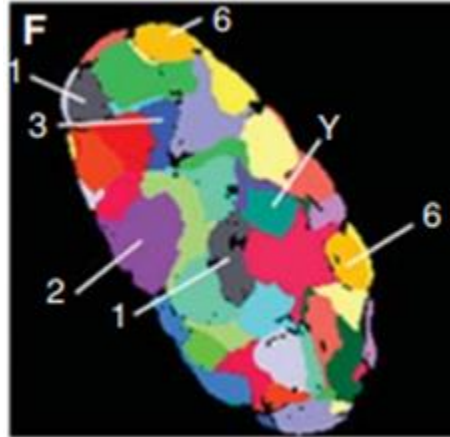


Figura 18. Evidencia directa de los territorios cromosómicos mediante hibridación in situ. Delimitación simultánea de todos los cromosomas del núcleo en interfase de fibroblastos humanos por FISH multicolor. (Cremer & Cremer, 2010)

Los cromosomas que ocupan estos territorios no se encuentran enredados unos con otros, de hecho, comparten áreas de interacción y organización funcional. Por ejemplo, la heterocromatina y otras regiones silenciadas se encuentran principalmente hacia la periferia nuclear, mientras que las regiones ricas en genes se encuentran localizadas hacia el centro del núcleo. Usualmente los genes activos se encuentran en los bordes de los territorios, en algunas ocasiones agrupados juntos en los espacios intercromosómicos, los cuales se encuentran enriquecidos en proteínas de las fábricas de transcripción (Fritz et al., 2019; H. Ma et al., 1999).

El mecanismo por el cual se establecen los territorios cromosómicos todavía es desconocido, también se desconoce la causa de su adaptación a las diferentes fases del ciclo celular y su tendencia a la especificidad por tejido, pero los avances en la microscopía de alta resolución, genómica, modelado matemático está empezando a mostrar la presencia de compartimentos subcromosómicos y

dominios que aparecen entre la fibra de cromatina y el cromosoma completo (Krebs et al., 2018).

Cada cromosoma ocupa una región distinta del núcleo celular, la disposición de cada cromosoma en relación con el centro del núcleo muestra que algunos tienden a localizarse hacia la periferia en contacto directo con la membrana nuclear, mientras que otros tienden a ocupar el centro del núcleo celular. Las relaciones entre cromosomas en un mismo tipo celular tienden a ser las mismas como se observa en los linfocitos de ratón, en los cuales el cromosoma 12 usualmente se encuentra junto al cromosoma 14, el cual a su vez es adyacente al cromosoma 15 (Parada et al., 2002).

Múltiples estudios han mostrado que grandes regiones cromosómicas entre diferentes especies se han conservado a lo largo de la evolución; además, estas regiones han mantenido sus posiciones entre diferentes especies (Tanabe et al., 2002). De hecho, el análisis de los territorios cromosómicos en varios tipos celulares y tejidos distintos ha puesto de manifiesto que los patrones de disposición de los cromosomas son tanto tejido como tipo celular específico (Fritz et al., 2016).

La manipulación en la localización de los cromosomas genera cambios en la expresión génica, lo que sugiere un posible mecanismo entre los territorios cromosómicos y la enfermedad (Finlan et al., 2008).

La perspectiva mecanicista examina la organización no aleatoria de los TC, los cuales se establecen a través de interacciones funcionales con otras estructuras nucleares. Por ejemplo, se ha propuesto que la lámina nuclear que recubre la envoltura nuclear tiene un papel importante en la organización del genoma (Filesi et al., 2005; Goldman et al., 2002). Los dominios asociados a la lámina (LAD) dentro de los cromosomas atan los TC a la periferia nuclear y se encuentran con mayor frecuencia en los TC que están posicionados hacia la periferia (Bridger et al., 2007; Guelen et al., 2008). De acuerdo con las observaciones sobre la actividad génica y el posicionamiento radial de los TC, los LAD se encuentran típicamente en microambientes de heterocromatina. La condensación de DNA en la heterocromatina dificulta sustancialmente el acceso de la maquinaria nuclear para la transcripción, replicación y modificación del DNA y cromosomas. Algunos estudios han sugerido que el reclutamiento a un microambiente heterocromático periférico puede tener implicaciones funcionales para la replicación (Li et al., 2001), transcripción (Finlan et al., 2008; Kumaran et al., 2008; Reddy et al., 2008) y estabilidad del genoma (Oza & Peterson, 2010). Estas ideas están respaldadas por la observación donde la interrupción de la lámina nuclear en pacientes con progeria da como resultado la perturbación de la longitud de los telómeros (Gonzalez-Suarez et al., 2009), el posicionamiento radial de los TC (Mehta et al., 2011), y la condensación y compartimentación de heterocromatina periférica (Goldman et al., 2004; Nikolova et al., 2004; Taimen et al., 2009).

Si bien se cree que la lámina nuclear ejerce su mayor influencia en los TC cerca de la periferia nuclear, otros cuerpos nucleares como el nucleolo y los microambientes median la organización genómica hacia el interior del núcleo [Brown et al., 2008].

Además de las interacciones intercromosómicas específicas entre genes, se han establecido arreglos heterólogos de vecindad en los TC (Bolzer et al., 2005; Nagele et al., 1995). Esto sugiere que la colocalización de genes entre cromosomas puede establecerse no solo por genes que se proyectan fuera de su TC en bucles de cromatina, sino también a través del reposicionamiento de TC completos. Las asociaciones intercromosómicas preferenciales medidas entre los TC heterólogos por parejas sugieren una organización general no aleatoria de los TC entre sí (Bolzer et al., 2005; Brianna Caddle et al., 2007; Khalil et al., 2007; Kuroda et al., 2004; Marella et al., 2009; Mayer et al., 2005; Zeitz et al., 2009). Esta organización no aleatoria de cromosomas en vecindarios es relevante para el establecimiento de la identidad celular. A medida que las células se diferencian, los TC se reposicionan (Kuroda et al., 2004; Marella et al., 2009) y los genes individuales dentro de los TC exhiben interacciones intercromosómicas alteradas. Perfiles de interacción únicos dentro de los RC son encontrados en diferentes linajes de células y tejidos (Marella et al., 2009; Mayer et al., 2005; Parada et al., 2004; Tanabe et al., 2002; Zeitz et al., 2009). Estos perfiles, a su vez, sugieren que la organización genómica podría explicar la alta frecuencia de translocaciones particulares prevalentes en diferentes tipos de cáncer (Fritz et al., 2016).

Matriz nuclear

El núcleo celular es una estructura altamente especializada, la cual se encuentra dividida en dominios funcionales que permiten organizar procesos celulares tan importantes como la replicación y reparación del DNA, transcripción y el procesamiento del RNA. Estudios realizados han mostrado que la replicación y la transcripción se llevan a cabo en espacios discretos y que no colocan dentro del núcleo (figura 19) (Cook, 1999; Wei et al., 1998).

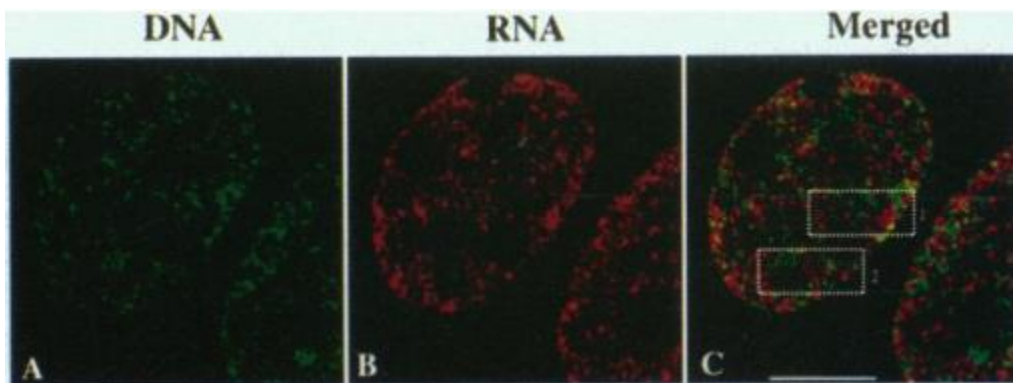


Figura 19. Separación espacial de los sitios de replicación y transcripción en la fase S. El DNA sintetizado de novo se observa en verde, mientras que el RNA se observa en rojo. (Wei et al., 1998)

Los ácidos nucleicos no se encuentran en las células en las formas extendidas correspondientes a su estructura primaria y secundaria, sino molecularmente más compactados. En el caso del DNA, parte de esta compactación o condensación viene representada por el denominado superenrollamiento, o retorcimiento de la cadena sobre sí misma. La condensación se completa mediante la asociación estrecha con proteínas que inducen el plegamiento de la doble hélice del DNA. La

contribución de esta asociación con proteínas posee una relevancia especial en el caso del DNA nuclear eucariótico (Annunziato, 2008; Bednar et al., 1998).

Las principales proteínas que interactúan con el material genético de eucariotas son las histonas, su masa es equivalente a la del DNA. Su función fundamental es estabilizar la estructura del DNA. Las histonas constituyen una familia de proteínas semejantes, de tamaño relativamente pequeño y con un contenido muy elevado de aminoácidos básicos. Gracias a ello, muestran naturaleza policatiónica a pH fisiológico lo que le permite su asociación, mediante interacciones electrostáticas, con los grupos fosfato del esqueleto polianiónico del DNA (Debatisse et al., 2012; Hewish & Burgoyne, 1973).

La asociación estrecha del DNA con las histonas da origen al complejo plurimolecular conocido como nucleosoma; se trata, pues, de un ejemplo de nucleoproteína. En términos estructurales, se considera la unidad elemental constituyente de la cromatina y de los cromosomas (Annunziato, 2008). La propuesta de la existencia del nucleosoma surgió del estudio de la acción de DNAsas sensibles al impedimento estérico: el tamaño de los fragmentos producidos a partir de un DNA nativo es múltiplo de unos 200 pb, mientras que, si previamente se le trata de retirar las histonas, los fragmentos de DNA producidos por la DNAsa son de tamaño aleatorio. Esto sugirió que las histonas protegen regiones de DNA con una extensión próxima a los 200 pb (Bednar et al., 1998).

Una misma molécula de DNA envuelve sucesivamente a distintos octámeros de histonas, de modo que los nucleosomas están conectados entre sí. La porción presente entre dos nucleosomas sucesivos se denomina DNA espaciador; su longitud puede variar entre 10 y 80 pb, dependiendo del organismo o incluso del tejido dentro de un mismo organismo. Esta estructura de nucleosomas espaciados a lo largo de la molécula de DNA se denomina fibra básica de cromatina o fibra de 10 nm, pues su grosor corresponde al diámetro del nucleosoma. El grado de empaquetamiento alcanzado es unas 6 veces superior al de la doble hélice del DNA extendido algo realmente interesante es que los nucleosomas solo se observan cuando se prepara in vitro a baja fuerza iónica (1mM), mientras que dentro de la célula la cromatina se encuentra mayoritariamente en formas más condensadas y su disposición en este estado relativamente extendido se limita, en todo caso, a pequeñas zonas. El enrollamiento sinistrorso (giro en contra de las manecillas del reloj) del DNA sobre el octámero de histonas supone un superenrollamiento toroidal, de signo negativo en la cadena (Bednar et al., 1998).

Para mostrar el problema que enfrenta la cromatina dentro del núcleo podemos comparar las 6 μm de diámetro en un núcleo promedio y los aproximadamente 5 cm de largo de un cromosoma (EMBL-EBI, 2019), el diámetro de la hebra de DNA es de aproximadamente de 2.34 nm, si entre cada par de bases existe una separación de aproximadamente 0.34 nm, la fibra contendría aproximadamente 147.06 Mb. En el caso de que dicha hebra estuviera interactuando en su totalidad con el octámero de histonas de manera uniforme, contaría con un total de 735300 nucleosomas, si cada nucleosoma genera un empaquetamiento de 146 pb por octámero tendríamos

una disminución en la longitud de 107.35 Mb, resultando en una fibra con de 39.7 Mb, que corresponde a una longitud de aproximadamente 13.5 μm superando el diámetro del núcleo y mostrando la problemática que se tendría con cromosomas más grandes como el cromosoma 1 humano de 8 cm de longitud, sin considerar la distribución no homogénea de las histonas.

Con estos datos no podemos dejar de considerar el problema estructural que enfrenta como fibra debido a su gran longitud, aún con la presencia de proteínas de la cromatina, teniendo en cuenta que la compactación al solenoide de 30 nm no se ha observado in vivo (Maeshima et al., 2019; Prieto & Maeshima, 2019).

Una respuesta a esta problemática se encuentra en el superenrollamiento como parte de la condensación del DNA, en general posee un especial significado para comprender la organización estructural del cromosoma. En concreto, contribuye a explicar como un DNA de tan gran magnitud puede alojarse en el interior del núcleo cuyas dimensiones son muy inferiores a la longitud teórica del DNA en doble hélice.

Sin embargo, para llevar a cabo el superenrollamiento es requerida una base estructural que aporte puntos de fijación a la fibra de DNA, esta estructura fue observada a mediados del siglo pasado en hepatocitos de rata, los cuales fueron extraídos con detergentes no iónicos, nucleasas no específicas y altas concentraciones de sal, lo que permitió eliminar las proteínas de la cromatina, a la estructura resultante se le nombró matriz nuclear (figura 20) (Berezney, 1974, 1977).

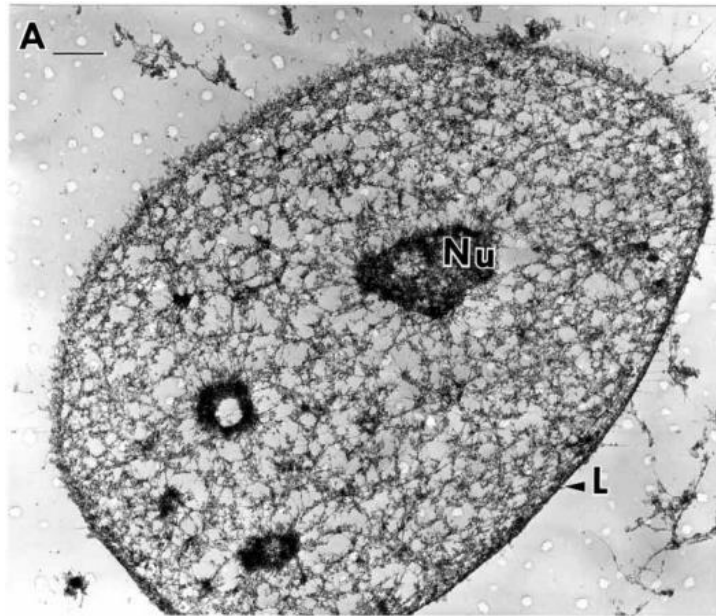


Figura 20. Matriz nuclear preparada con la técnica de crosslinking y observada mediante microscopía electrónica. La matriz nuclear consiste en la lámina nuclear y una red de fibras interconectadas a la lámina y ampliamente distribuidas a través de todo el volumen nuclear. Las matrices de los nucleolos permanecen y se encuentran conectadas a las fibras de la matriz nuclear interna. (Nickerson, 2001)

La matriz nuclear es la estructura residual del núcleo celular, compuesta principalmente por ribonucleoproteínas, RNA, y DNA (Berezney, 1974, 1977). Estructura altamente dinámica tejido específico y con la capacidad de cambiar dependiendo de los estímulos a los cuales se encuentre sometido el núcleo celular e inclusive el organismo (Nozawa & Gilbert, 2019; Silva-Santiago et al., 2017).

Un nucleoide es la estructura residual que se obtiene después de la exposición del núcleo a detergentes no iónicos y altas concentraciones de sal, el cual consiste en los bucles desnudos de DNA anclados a la matriz nuclear, en la figura 21 se puede observar el halo de DNA del nucleoide expandido debido a la exposición de un agente intercalante de DNA (Bromuro de Etidio) en linfocitos B.

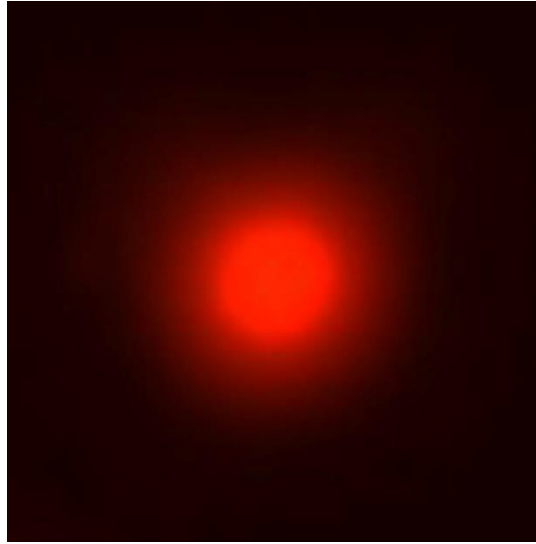


Figura 21. Nucleoide de linfocito en el cual se puede observar el halo de DNA expandido y al centro la matriz nuclear con el DNA anclado. El nucleoide ha sido expuesto a bromuro de etidio y observado mediante microscopia de fluorescencia.

El análisis funcional de las proteínas de la matriz nuclear demostró estar involucrada en múltiples procesos celulares, algunas proteínas juegan un papel estructural, otras son proteínas de choque térmico, enzimas, parte de la maquinaria de replicación y transcripción, remodelación de la cromatina, maduración y transporte del RNA e inclusive algunas forman parte del proceso de transducción de señales (Engelke et al., 2014; Gerace et al., 1978). Su papel estructural fue demostrado al eliminar el 90% de las histonas y proteínas solubles de la fracción nuclear y no observar alteración en la distribución de los territorios cromosómicos (Berezney, 1974; H. Ma et al., 1999).

La digestión para la obtención de la matriz nuclear con ribonucleasas además de disminuir la cantidad de RNA, provoca la liberación de proteínas asociadas a la matriz (Barboro et al., 2002; Fey et al., 1986). Lo que lleva a la desaparición de los filamentos nucleares y los elementos granulares, con pérdida de la organización de

los territorios cromosómicos y el colapso de la estructura, lo que podría estar poniendo de manifiesto que la matriz nuclear es una estructura basada en tensegridad, utilizando el RNA como fibras que mantienen cada uno de los componentes rígidos ensamblados (Aranda-Anzaldo, 2016; Fey et al., 1986; He et al., 1990; loudinkova et al., 2005).

La tensegridad es un principio estructural que se basa la presencia de componentes aislados comprimidos que se encuentran dentro de una red con tensión continua, de tal modo que los miembros comprimidos no se tocan entre sí y se encuentran unidos únicamente por medio de componentes traccionados que son los que delimitan espacialmente el sistema. Dentro del núcleo las interacciones de las hebras de DNA y/o RNA funcionan como tensores y las proteínas de la matriz nuclear funcionan como elementos de compresión generando un complejo estructural basado en tensegridad (figura 22), con un alto grado de estabilidad, pero aun así con un gran dinamismo (Aranda-Anzaldo, 2016; Aranda-Anzaldo & Dent, 2017).

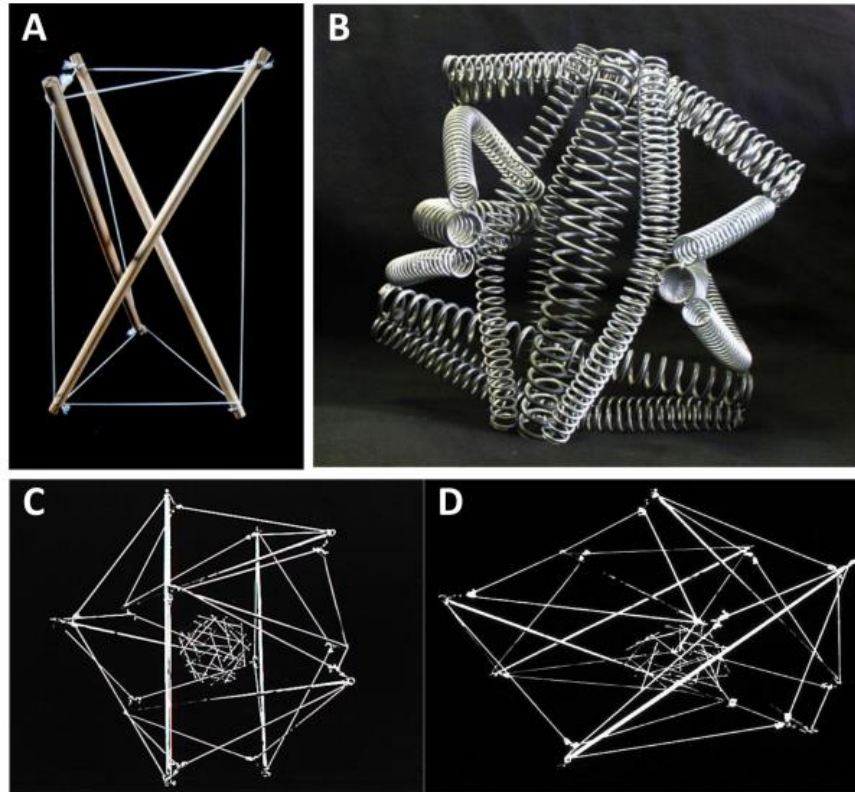


Figura 22. A) Modelo de tensegridad compuesto por puntales de madera y cuerdas de nylon. Las estructuras rígidas no se encuentran en contacto directo, sino suspendidas y estabilizadas a través de su conexión mediante elementos de tensión continua. B) Modelo de tensegridad compuesto únicamente por resortes metálicos interactuantes C) Modelo de tensegridad integrado por puntales y cables elásticos ensamblados de la misma manera que en la imagen B, pero también conectados a pequeños palillos con una estructura de tensegridad esférica basada en resortes en su centro, los resortes no son visibles debido al fondo de la imagen. Este modelo jerárquico de tensegridad ha sido utilizado para modelar alteraciones de forma en células nucleadas, así como cuando un grupo de elementos del modelo son anclados a un sustrato rígido para modelar la adhesión celular, el aplanamiento celular, la expansión celular y nuclear de manera coordinada, como se muestra en D. Las células vivas muestran el mismo comportamiento cuando se anclan a la matriz extracelular o en cultivo (Ingber et al., 2014).

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).

Un estudio reveló un conjunto de 272 proteínas que forman el core de la matriz nuclear en diferentes líneas celulares y alrededor de 2380 son tejido específico (Engelke et al., 2014). Se ha demostrado in vivo e in vitro que proteínas pertenecientes a la MN pueden interactuar tanto con DNA como con RNA (Göhring, 1997; Hibino et al., 2006). Inclusive muchas de las asociaciones proteína-proteína podrían estar mediadas por DNA y/o 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 numerosa y una de esas grandes interacciones las tienen las láminas nucleares (lámina A/C, lámina B1 y B2) que son proteínas pertenecientes a los filamentos intermedios, están codificadas por los genes LMNA, LMNB1 y LMNB2, donde la lámina C es producto de splicing alternativo del transcrito del gen de 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 el metabolismo nuclear (Legartová et al., 2014). 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, el tipo y contenido de lámina define la rigidez nuclear y el estado posmitótico celular (Armando Aranda-Anzaldo & Dent, 2017; Guilly et al., 1990; Ivanovic-Matic, S., 2000; Rober et al., 1990).

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 proteínas LINC (links nucleoesqueleto citoesqueleto) y el complejo del poro nuclear. Las proteínas LINC 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. Si a este cúmulo de interacciones se añaden las uniones celulares, podemos apreciar la existencia de una red (DNA-láminas-proteínas LINC-citoesqueleto-uniones celulares), capaz de transmitir señales mecánicas, que se extiende desde células adyacentes y la matriz extracelular hasta el interior del núcleo (Simon & Wilson, 2011).

Estructura de orden superior en el núcleo

Como ya ha sido mencionado anteriormente durante la interfase el DNA de los metazoarios se encuentra organizado en bucles hiperenrollados anclados por su base a la matriz nuclear. Los bucles se anclan a la MN mediante secuencias conocidas como regiones de asociación o unión a la matriz (MARs) aunque no existen secuencias consenso que definan a priori a los MARs, estos tienden a ser regiones ricas en A-T y de secuencias repetidas. (Ottaviani et al., 2008)

Estudios recientes sugieren que la capacidad de un fragmento de DNA de asociarse a la matriz nuclear in vitro depende principalmente de la longitud del fragmento, lo que muestra que la capacidad de unión a la matriz nuclear se relaciona primordialmente con la topología local del fragmento de DNA en suspensión. (García-Vilchis & Aranda-Anzaldo, 2017)

In situ los MARs han sido clasificados en forma operacional como estructurales si resisten la extracción con altas concentraciones de sal (2 M) y facultativos (quizá funcionales) si no resisten dicha extracción (Maya-Mendoza & Aranda-Anzaldo, 2003). Los MARs estructurales son mejor conocidos como regiones de anclaje del bucle (LARs). Por lo tanto, los bucles resultantes se pueden clasificar en estructurales y facultativos (Elcock & Bridger, 2008; Razin, 2001; Rivera-Mulia & Aranda-Anzaldo, 2010).

Ya ha sido demostrado que las interacciones más estables de tipo estructural que se establecen entre el DNA y la MN no requieren la participación de proteínas de la cromatina ya que al eliminar este tipo de proteínas las interacciones se mantienen (Rivera-Mulia & Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García & Aranda-Anzaldo, 2012); esta distribución espacial del genoma con su interacción con proteínas de la matriz nuclear definen la estructura de orden superior en el núcleo (EOSN), dichas interacciones son tejido-específicas al igual que la organización del genoma en bucles estructurales (Alva-Medina et al., 2010; Aranda-Anzaldo, 2009; Trevilla-García & Aranda-Anzaldo, 2011).

Existe importante evidencia de que los bucles estructurales corresponden a los replicones in vivo (Castillo-Mora & Aranda-Anzaldo, 2012; Rivera-Mulia et al., 2011). En metazoarios no existen secuencias consenso definidas que actúen como orígenes de replicación (ORIs), pero varios ORIs caracterizados en metazoarios comparten propiedades asociadas con los MARs y co-mapean o se localizan próximos a LARs (Buongiorno-Nardelli et al., 1982; Cayrou et al., 2010; Razin, 2001).

Por otra parte, existe amplia evidencia de que algunos ORIs se encuentran asociados en forma permanente con la matriz nuclear mientras que otros se asocian en forma dinámica con ella (Anachkova et al., 2005; Djeliova et al., 2001; Ortega & DePamphilis, 1998), pero dicha asociación parece ser indispensable para que ocurra la replicación (Djeliova et al., 2001; Rivera-Mulia et al., 2011).

Los ORIs de metazoarios se dividen en constitutivos y flexibles, estos últimos sólo se activan dependiendo de las condiciones celulares y son tejido-específicos al igual que los SIRs (Letessier et al., 2011), esto sugiere que existe una posible conexión de tipo estructural entre ORIs, SIRs y bucles estructurales de DNA (Cayrou et al., 2010; Méchali, 2010).

Justificación

Los sitios frágiles cromosómicos son loci susceptibles de presentar constricciones, discontinuidades, rupturas y re-arreglos en cromosomas metafásicos de células sujetas a tratamientos que inhiben parcialmente la replicación del DNA (estrés replicativo). Los sitios frágiles se agrupan en dos clases: raros y comunes. Los primeros ocurren en < 5% de la población humana mientras que los SFCs están presentes al parecer en todos los individuos (aunque se expresan con diferente frecuencia o severidad) y son considerados componentes intrínsecos de la estructura de los cromosomas (Palumbo & Russo, 2019). Los SFC son lugares preferentes de intercambio de cromátidas hermanas, de integración de DNA viral, deleción, translocación, amplificación génica en lesiones pre-neoplásicas y tumores malignos de elevada incidencia, lo que sugiere su participación temprana en la oncogénesis (Debatisse et al., 2012; Lukusa & Fryns, 2008).

De diferentes SFC mapeados en linfocitos humanos (Mrasek et al., 2010) y los analizados a nivel molecular se ha observado que corresponden a mega-bases de DNA que se traslapan con genes muy grandes (Smith et al., 2007). FRA3B es el SFC más activo y frágil del genoma humano y se extiende sobre más de 500 kb dentro del gen *FHIT* que mide ~ 1.5 Mb y está ubicado en el brazo corto del cromosoma 3 en la región 3p14.2 (Debatisse et al., 2012; Wali, 2010). FRA3B se localiza en una banda cromosómica con tendencia a la deleción con elevada frecuencia en tumores sólidos, lo que podría estar sugiriendo la presencia de un gen

supresor de tumores en esa región. Deleciones homocigotas dentro de *FHIT* ocurren con frecuencia en una amplia gama de tumores malignos y de líneas celulares derivadas de tumores (Wali, 2010). *FHIT* contiene 10 pequeños exones que dan origen a un cDNA de 1.1 kb. Los cuatro primeros y el último exón no codifican, los exones del 5 al 9 codifican a una proteína de 16.8 Kd que corresponde a una trifosfato-hidrolasa típica cuyas posibles acciones como supresor de tumores son objeto de intenso estudio (Palumbo & Russo, 2019; Wali, 2010). Alrededor del exón 5 se ubica el epicentro o zona crítica de fragilidad cromosómica (Shiraishi et al., 2001).

Estudios recientes establecieron que la manifestación de los SFCs es tejido-específica y que la notable manifestación de FRA3B en linfocitos se correlaciona con la carencia de sitios de iniciación de la replicación a lo largo de 700 kb de *FHIT* que se traslapan con FRA3B, mientras que la manifestación de FRA3B es insignificante en fibroblastos que muestran una densidad normal SIRs en la misma región de 700 kb (Letessier et al., 2011).

La presencia de horquillas de replicación con la necesidad de viajar largas distancias a partir de SIRs muy espaciados se correlaciona con la fragilidad de FRA3B, pero no es suficiente para explicarla pues otras zonas del genoma también presentan escasez de SIRs sin mostrar dicha fragilidad (Letessier et al., 2011). Por otra parte, se ha establecido que la replicación de genes muy grandes (> 750 kb)

inicia en la fase S tardía y termina en la fase G2 del ciclo celular (Helmrich et al., 2011; Letessier et al., 2011).

Todo lo anterior sugiere que existe una base estructural tejido-específica para la presencia de los SFCs. La evidencia indica que los SFCs humanos están conservados y se expresan en primates y roedores, los ortólogos de tales SFCs corresponden a secuencias genómicas muy conservadas entre estos mamíferos (Helmrich et al., 2006; Palumbo & Russo, 2019). El ortólogo de FRA3B/*FHIT* ha sido plenamente caracterizado en el cromosoma 14 del ratón (*Fra14A2/FHIT*) corresponde a un SFC en el ratón y la zona crítica de fragilidad centrada en el exón 5 es muy similar a la descrita en el humano (Glover et al., 1998; Shiraishi et al., 2001), por lo cual se considera que el locus murino es un modelo adecuado para estudiar las causas de la fragilidad de los SFCs humanos.

Durante la interfase el DNA de los metazoarios está organizado en bucles hiperenrollados anclados por su base a una subestructura de naturaleza proteica conocida como matriz nuclear. La MN es un compartimento dinámico cuya composición exacta es materia de debate pero constituye un medio estructural para la organización del genoma y la fisiología nuclear (Mika & Rost, 2005; Nickerson, 2001; Radulescu & Cleveland, 2010; Tsutsui et al., 2005). Los bucles se anclan a la MN mediante secuencias conocidas como regiones de asociación o unión a la matriz (MARs por sus siglas en inglés) pero no existen secuencias consenso que

definan a priori a los MARs que tienden a ser ricos en A-T y secuencias repetidas (Ottaviani et al., 2008). In situ los MARs han sido clasificados en forma operacional como estructurales que resisten la extracción con altas concentraciones de sal y facultativos (quizá funcionales) que no resisten dicha extracción (Maya-Mendoza & Aranda-Anzaldo, 2003; Razin, 2001). Los MARs estructurales se conocen como regiones de anclaje del bucle (Razin, 2001). Por lo tanto, los bucles resultantes se pueden clasificar en estructurales y facultativos (Elcock & Bridger, 2008; Rivera-Mulia & Aranda-Anzaldo, 2010). Las interacciones estables de tipo estructural entre el DNA y la MN no requieren la participación de proteínas de la cromatina y definen una EOSN (Alva-Medina et al., 2010; Aranda-Anzaldo, 2009). Dichas interacciones son tejido-específicas al igual que la organización del genoma en bucles estructurales (Rivera-Mulia & Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García & Aranda-Anzaldo, 2011, 2012).

En metazoarios la replicación y transcripción del DNA ocurren en complejos macromoleculares conocidos como fábricas, que corresponden a focos o sitios discretos dentro del núcleo. Las fábricas están segregadas en forma específica para la replicación o para la transcripción (Cook, 1999; Wei et al., 1998). Dichas fábricas se organizan sobre o con respecto a la MN (Anachkova et al., 2005; Chakalova & Fraser, 2010). Existe importante evidencia mostrando que los bucles estructurales corresponden a los replicones in vivo (Buongiorno-Nardelli et al., 1982; Castillo-Mora & Aranda-Anzaldo, 2012; Razin, 2001; Rivera-Mulia et al., 2011; Tomilin et al., 1995). En metazoarios no existen secuencias consenso que actúen como orígenes

de replicación, pero varios ORIs caracterizados en metazoarios comparten propiedades asociadas con los MARs y co-mapean o se localizan próximos a LARs (Cayrou et al., 2012; Méchali, 2010; Razin, 2001).

Por otra parte, existe evidencia de que algunos ORIs se encuentran asociados en forma permanente con la MN mientras que otros ORIs se asocian en forma dinámica con la MN, pero dicha asociación parece ser indispensable para que ocurra la replicación (Anachkova et al., 2005; Djeliova et al., 2001; Ortega & DePamphilis, 1998; Rivera-Mulia et al., 2011). Los ORIs de metazoarios se dividen en constitutivos y flexibles, estos últimos sólo se activan dependiendo de las condiciones celulares y pueden ser tejido-específicos (Méchali, 2010) al igual que los SIRs (Letessier et al., 2011), esto sugiere que existe una posible conexión de tipo estructural entre ORIs, SIRs y bucles estructurales de DNA.

Hipótesis

La organización en bucles estructurales de la región genómica correspondiente al SFC de *Fra14A2/FHIT* determina cuáles son los replicones y cuáles con los SIRs y ORIs utilizables para la replicación de dicha región. Por lo tanto, diferencias tejido-específicas en dicha organización determinan la dinámica local de la replicación que puede dar como resultado la manifestación tejido-específica del SFC *Fra14A2*.

Objetivo general

Realizar un estudio comparativo de la organización en bucles estructurales de la región genómica correspondiente al epicentro de fragilidad de Fra14A2/*FHIT* en tres tipos de células primarias de ratón que manifiestan (linfocitos B) y no manifiestan (neuronas y hepatocitos) al SFC Fra14A2.

Objetivos particulares

- 1) Determinar la organización en bucles estructurales de la región de 200 kb centrada en el exón 5 de *FHIT* en linfocitos B de ratón. Estas células pueden manifestar el SFC Fra14A2 y transcriben activamente al gen *FHIT* además de que pueden replicar al DNA.
- 2) Determinar la organización en bucles estructurales de la misma región en hepatocitos de ratón. Estas células no manifiestan el SFC Fra14A2 y no transcriben a *FHIT* pero pueden replicar al DNA.
- 3) Determinar la organización en bucles estructurales de la misma región en neuronas de ratón. Estas células son post-mitóticas y por lo tanto no manifiestan el SFC Fra14A2, pero transcriben activamente a *FHIT*.

Material y métodos

Animales experimentales

Los experimentos se realizaron con ratones macho CD1 (por ser una cepa exogámica) con un peso aproximado de 40 g, de aproximadamente 80 días de nacidos, fueron alimentados con agua y comida *ad libitum*. Los animales fueron sacrificados bajo anestesia y exposición a éter etílico, después se procedió a la toma de tejido. Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999), basada a su vez en normas internacionales.

Purificación de células primarias

Hepatocitos

La purificación de hepatocitos primarios de rata se realizó basado en el método publicado por Freshney (1994) modificado por Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo (2003). Mediante una incisión que abarca la cavidad abdominal y torácica del ratón se expone el corazón y se canaliza el ventrículo izquierdo con una aguja calibre 30G, se procede a la perfusión con PBS-A (2.68 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4 , 136.9 mM NaCl, 7.75 mM de Na_2HPO_4 , pH 7.4) a 37°C durante 5 min a 10 ml/min. Se corta la vena cava a nivel renal para que se lleve el proceso de drenado de sangre. Para la disociación de las células, se extrajo el hígado y se perfundió con colagenasa IV, Sigma (0.0025% colagenasa, 0.075% de CaCl_2 en buffer HEPES,

pH 7.6) por 8 minutos. El hígado se fragmentó y se filtró a través de una malla con poros de 400 μm y los hepatocitos se separaron mediante sedimentación por gravedad durante 20 minutos a 4°C. Los hepatocitos aislados se cuantificaron con un hemocitómetro y fueron utilizados inmediatamente para la purificación de nucleoides.

Linfocitos

Para la obtención de linfocitos B quiescentes, se extrajo el bazo de ratones, los cuales fueron fragmentados y filtrados a través de una malla con poros de 400 μm en PBS-A. Los linfocitos B totales se purificaron centrifugando el extracto de bazo a 2100 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente en gradientes continuos de Percoll isotónico al 30%. Posteriormente se obtuvieron los linfocitos B quiescentes por marcaje con microesferas anti CD43 específicas y separación magnética (columnas de separación MACS y mouse CD43 microbeads, Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los linfocitos B quiescentes se cuantificaron con un hemocitómetro e inmediatamente fueron utilizados para la obtención de nucleoides.

Núcleos neuronales

Se aislaron los núcleos neuronales con el método descrito por Thompson (1973) y modificado por Alva-Medina y Aranda-Anzaldo (2010), para lo cual se realizó la decapitación de ratones, se expuso el encéfalo y se extrajeron ambos hemisferios cerebrales. Se disecó la corteza cerebral mediante la separación a simple vista de

la materia blanca de la materia gris y meninges. El tejido fresco se homogeneizó con 1 ml de sacarosa 2 M (2 M Sacarosa, 1 mM MgCl₂, 0.25 mM PMSF) con 10-15 golpes del vástago. El homogeneizado se transfirió a un volumen de 8 ml de sacarosa 2 M y se centrifugó a 49,500 g durante 60 minutos a 4°C. se obtuvo un precipitado, el cual se lavó con 10 ml de sacarosa 0.32 M (0.32M Sacarosa, 1mM MgCl₂, 0.25 mM PMSF) a 1500 g por 5 minutos. El precipitado resultante contiene los núcleos neuronales, este se resuspendió en 600 µl de sacarosa 0.32 M y los núcleos se cuantificaron en un hemocitómetro.

Preparación de nucleoides

La obtención de nucleoides se realizó mediante la extracción con altas concentraciones de sal y detergentes no iónicos (Cook et al., 1976; Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo, 2003). Las células primarias obtenidas se resuspendieron en PBS-A y alícuotas de 50 µl con 3.5×10^5 hepatocitos, 3.5×10^5 núcleos neuronales y con 1×10^6 linfocitos B se mezclaron cuidadosamente con 150 µl de buffer de lisis (2.6 M de NaCl, 1.3 Mm EDTA, 2.6 Mm Tris, 0.6% Triton-X100, pH 8.0). los hepatocitos se lisaron durante 20 minutos, las neuronas y los linfocitos B durante 10 minutos Finalmente, las muestras fueron lavadas con 14 ml de PBS-A y se centrifugaron a 3000 rpm 5 minutos a temperatura ambiente. El botón resultante se recuperó en un volumen de 200 a 300 µl de PBS-A.

Análisis de la integridad de los nucleoides

Se tomaron muestras de nucleoides de hepatocitos, neuronas y linfocitos B de ratón y en un volumen de 10 μ l y se tiñeron con bromuro de etidio a una concentración final de 80 μ g/ml. Las preparaciones fueron visualizadas inmediatamente bajo un microscopio Olympus de epifluorescencia BX60; se capturaron imágenes y secuencia en tiempo real (30 s) con una cámara QiClick/QIMAGING, para observar la expansión del halo fluorescente de DNA, para los linfocitos B se requirió colocarlos en un medio de mayor densidad que consistió en sacarosa al 30%, debido a la rápida expansión y destrucción de los nucleoides en este tipo celular.

Mediante la microscopía de contraste de fases se examinó la morfología de las matrices nucleares, mientras que con la microscopía de fluorescencia se realizó un análisis de la integridad de los nucleoides y del hiperenrollamiento de los bucles de DNA anclados a la MN (A Aranda-Anzaldo & Dent, n.d.).

Se determinó el tamaño promedio del halo de fluorescencia (en micras) de los nucleoides de linfocitos B a partir del contorno de la MN al límite exterior del halo de DNA, mediante una herramienta del software Image J (Auto Local Thresholdv.1.16.1) usando el método Median. Con las medidas se determinó el tamaño promedio del bucle en kilobases correspondientes a los bucles de linfocitos B a partir del tamaño del halo (Alva-Medina et al., 2011; Maya-Mendoza et al., 2005).

Digestión de nucleoides con DNAsa I

Los nucleoides lavados (1.8×10^6 nucleoides de hepatocitos, 6×10^6 nucleoides de linfocitos B y 1.8×10^6 nucleoides de neuronas) se recuperaron en 1.2 ml de PBS-A. La digestión del DNA se llevó a 37°C a cabo con 0.46 U/ml de DNAsa I (Sigma) para hepatocitos y linfocitos B, en neuronas se utilizaron 0.92 U/ml de DNAsa I (Sigma) y se añadieron 5 ml de buffer de digestión (10 mM MgCl_2 , 0.1 mM DTT, 50 mM Tris a pH 7.2).

Las reacciones de digestión de los nucleoides se realizaron por 0, 5, 15, 30 y 60 minutos, cada tiempo de digestión contiene 3×10^5 nucleoides de hepatocitos o neuronas y 1×10^6 nucleoides de linfocitos B quiescentes. A estos tiempos se detuvo la reacción de digestión con 200 μl de buffer de paro (0.2 M de EDTA, 10 mM Tris, pH 7.5, concentración final de 30 mM EDTA). El botón de nucleoides digeridos se resuspendió con 1 ml de PBS-A y se centrifugó a $9,000 \times g$ 10 minutos a 4°C . Se realizaron otros dos lavados similares, pero añadiendo 1 ml de agua bidestilada.

El botón de nucleoides resultante se resuspendió en 200 μl de agua bidestilada y mediante espectrofotometría se cuantificó la cantidad de DNA en cada tiempo de digestión para su utilización como templado para la amplificación de las secuencias de interés por PCR.

Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron pares de oligonucleótidos utilizando el programa Vector NTI para el establecimiento de las posiciones topológicas, con respecto a la MN, de pequeñas secuencias blanco (amplicones) localizadas a lo largo del gen *FHIT* murino que tiene una longitud aproximada de 1.5 Mb. Los oligonucleótidos se diseñaron aproximadamente cada 10 Kb con el fin de establecer intervalos regulares a lo largo de la región estudiada (tabla 1 y figura 23).

También se diseñaron otros pares de oligonucleótidos, para analizar las regiones tanto a telómero como a centrómero a una distancia aproximadamente de 350 Kb, teniendo como referencia al exón 5 (figura 23).

Todos los pares de oligonucleótidos se diseñaron tomando en cuenta parámetros importantes que permiten una amplificación eficiente con las mismas condiciones (concentraciones de reactivos, temperatura, tiempos y número de ciclos). Todos los pares de oligonucleótidos se diseñaron con una longitud de 20 a 25 pb, conteniendo de GC entre 50% y 55% (con una diferencia de <3%), temperatura de melting de 55-60 °C (con una diferencia de <2 °C), y amplicones de 250-500 pb. Se evitó que los pares de oligonucleótidos formaran estructuras secundarias con un $\Delta G < 1$ kcal/mol y dímeros/dúplex con un $\Delta G < -2$ kcal/mol. La especificidad de cada par de oligonucleótidos fue confirmada por el algoritmo de búsqueda de alineamientos del NCBI (Primer-BLAST [Basic Local Alignment Search Tool]).

Amplicón	Primer sentido	Primer antisentido	Longitud del amplicón (bp)
A	GCTTCAGGCATTTGTCATCCTCC	GAGAACAACCTGCTTAAAGCTGGGC	532
B	GGGCCTGACTTCACAAGCAGAA	CTGAGATTAGCAAGTGGCTTTCCGG	502
C	GGACTCAGATGGCTGGTTAGCA	TGAATGGTGTAGTCGGGGAGC	432
D	GAATCCAGAGTCTGTTGACAAGGC	GCTTTATACCATTGGGGCTGCT	448
E	ATGTCTGTGTAGGTGGGCTGTGCT	GGAGCATGGGCAACTTATGGGTA	262
F	ACTTCCCCTCTCTCTGAGATCCAT	AGGTCCCTTTCCTTAGCTGAAGAG	438
G	GATTTTCAAGTGCTGGGGCATG	GTCACAAGAGCAAAGTGGAGCAAC	419
H	ACATTAGGACAGGAGCAGAGCATG	GGTCCATGTTAGCCTCAACTTCCA	419
I	GAAGCCTTGAGTCCCTCCTTTGTA	CACAAACCACCTGAAGCTAATAAGG	465
J	GCATCTGGTGTGGCTTTTATTCC	CCCTTCCCAGCAAACAGAAGTTAG	481
K	TGGAATGATGACCACCTGTAGCTC	TTCTAGGAACCTCGCCAGAACCT	292
L	AGGAATGAGTACCCTTGGGAAGTG	CCCTCAGACTAAGTTGCGATCATG	368
M	GCCACTGGTTTCAATAGCCTTG	CTACCTCTCTTGTGCCATGTGTCA	258
N	AAGGTTGCTTTGTCACCCAAGGAG	CCTGGAATTTTCCCATCTCGCTAG	425
O	TGAGCAGGAGATACTCAGCACCA	CATCCACAATCATAGGCAGAGAGG	393
P	GCTACCAAGGCATGTTGCTAACAG	CCCAAGTATTTACATCCCAGCC	292
Q	TCAGCACCCCTCCTACCAGTATT	CATCCCCCAACAGATGGAGTATAG	271
R	GTGGACTAGACAACAGAGTACTGGG	GGACCAAACATGAGGCTCAG	294
S	CTTCTGGGGGAAAATACCATAGGC	GTTTGGCAGACCTACCTGGACTAAC	360
aT	GAAGCTGGCGATTCCTTTGAGT	GAATAAAGTCAGGCTCTGGGACTG	353
bT	AAGTCAGGAGGTGAGACCACTTAGG	GGTAGCTCTTGTCCATACCCTTGG	290
cT	TGAACTGGACTGTTGGGCATAGT	TGGTGGGGATGATGGCATAA	265
dT	CATGCCTGACCACACCCATGATAT	TGGACCTGGAGAGATGATTTAGCC	468
eT	TTGGTTTGACACGGCAATGG	CCCCACACACTTCCCTCTTATCAA	465
fT	AAGACTCTTCCCTGCTGAATGCTC	GGACTCTACTGTTTGCCTGTTTCC	287
gT	CCCTGACTAAAACACTCCTCACCTG	GGCAGAGCATGTGATTGTGGTACA	434

hT	CAAGCCTGGTTCCTAGTAAGTGA	GGACTGGACTGCCTTTTCTTCAGT	310
iT	GGGTACAAGGCAGTGGTAGAACAC	GGAAAAGAGGAGAGAAGTGGGGTC	306
jT	GCTTAAAGGGAAGTATGGGGA	GGTCACCATAACCCTCCAATGACTT	340
kC	GTAATGAGGTCCTGACCAGCCT	GGTGACACTGATGTGACACTTTGC	298
lC	TCTGTGTGCTGTTTCTCTGAGGAGG	GGATGCTGCCTTGCTTATCTTCTG	450
mC	GGTCACCATAGTCTTCACAGTCCC	TGCCTCCAGTCATGCTACCA	253
nC	GATATGTAGGAGCAGATGGGCGT	GGGTCTAAAGGCTCATGGGAAGAT	345
oC	GTAACACTGGCTTTCTCTGCTGC	GAGGGTGGTCTCTCATCATTCTT	433
pC	TGCTCCTGATGAAAGAAAGCTATTC	GGATTTTACCACGCTCATTATGACA	367
qC	GTTGTGTGTGGGGTAACCAAGTAA	CCACTGCTGGAGACTTTTCTCTCT	499
rC	GTTAATGGATGGCAGAGCACCTC	CCTGATGGTCTCACTTGACAACCT	485
sC	AAAGGAGTTGCTGTACCTGAGTG	GCATGGACAAGGCAGGATATTTTC	458
tC	TCCTCTGTCAGGGGAAAGTGAAC	CAGCGTGAGACCATGTATCAACTG	550
uC	GCCACCACCTTCTGCTGAATA	CCCATATCTCTGATTCCAGCCTTG	450
vC	AATCAAGATCGCAGCCATGAGC	GCCCTCCCTCAAGCATGTATAAGTC	296
wC	CTAGACCTTATGAGAGAGGAGGGGA	GTGGACAGCAAAGAGATCCTTCCT	310
xC	CTGGTTTTGTGATAGAGCAAGGGG	GGTCGCTTTTGAATCACCTGGTC	275
yC	CAAAGGCAGAGGGGTCTAAGAA	AAGCGTAGGGGTCGAAACCACT	274
zC	GACTAGCAACAGACGTTCTCCTTCC	CCACGGAACCCAACAGTGTTAA	253
a'C	TTTGGTCCCCACCAGAGCAGTA	GAAGGCAGGTAATCCTACAGGAGG	285
b'C	AGGTCAAGCACCTTCTTACAGAGC	CCAGAGCTGTCAACAGTCACACAA	495
c'C	TCCCCAGTTCAGATAAGTTCACC	CCACGTAGTCAACCAAATGAGACC	285
d'C	TTCTTTGCCTGGTCCCTGGA	GATAAAGGTGGACGGGGCTTAA	418
e'C	TGATGCTGTTGTCTTCCCCATGTC	CCTCCTGTGAATCACTACCCTTCCA	320
CD	TTCCCACTGATCCTACCTGAAATG	GCACTGACAGCACAGAAATTCTTTG	383
HI	GGAAGCTATGTGCAGACAGTTGTG	GCCTTCACACCACAAGTACTGACA	363
LM	GGACATCTGGGTTTAGGAGGGA	TTCCAGTCGGATGCACACCA	200
RS	ACTGGTAGCCTCAACTTCTGACCC	GGATAACTGGGGGAAGAACAGG	442

Tabla 1. Pares de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de regiones específicas del gen *FHIT*. A-S corresponden a los pares de oligonucleótidos con una distribución aproximada de 10 Kb cubriendo una región de 180 Kb que incluye al exón 5 en donde se encuentra la zona crítica de fragilidad. aT-jT corresponde a los pares de oligonucleótidos que se generaron para la región situada

aproximadamente a 350 Kb en dirección al telómero a partir del exón 5 cubriendo una región aproximada de 90 Kb. aC-e'C corresponde a los pares de oligonucleótidos para la región situada aproximadamente a 350 Kb a partir del exón 5 en dirección al centrómero cubriendo una región aproximada de 210 Kb. CD, HI, LM, RS corresponden a pares de nucleótidos intercalados dentro de la región analizada de 180 Kb centrada en la zona crítica de fragilidad.

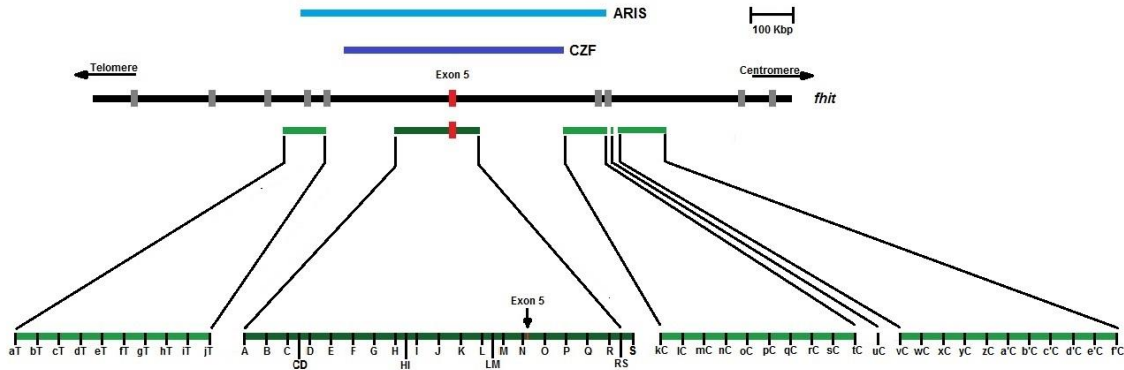


Figura 23. La línea negra representa al gen *FHIT* de aproximadamente 1.5 Mb, en gris se pueden observar los 10 diferentes exones, la línea roja representa al exón 5 donde se centra el grado máximo de fragilidad. En morado se puede observar la zona crítica de fragilidad (CZF) que abarca aproximadamente 500 Kb. La línea azul claro representa la zona con ausencia de sitios de iniciación de la replicación (ARIS) que corresponde aproximadamente a 700 Kb. Las líneas verdes corresponden a las regiones analizadas mediante al mapeo topológico, la verde oscuro se centra en una región aproximada de 180 Kb, mientras que las verde claro corresponden a las regiones hacia centrómero y telómero analizadas a 350 Kb a partir del exón 5.

Amplificación por PCR

Diez nanogramos de nucleoides digeridos parcialmente de hepatocitos, neuronas o linfocitos B se utilizaron como templado para la amplificación por PCR de pequeñas secuencias blanco. A cada reacción de PCR se le añadió 0.7 U de DNA polimerasa GoTaq (Promega), 3.0 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP (adenina, guanina, citosina, timina) y 0.1 mM de cada oligonucleótido (sentido y antisentido). La amplificación se realizó en un termociclador (Applied Biosystems 2720) y se utilizó el mismo programa de amplificación para todos los pares de oligonucleótidos: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C

por 45 segundos, alineamiento a 56°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. La identidad de todos los productos amplificados fue confirmada por análisis de restricción utilizando enzimas de restricción de corte único. Los productos amplificados por PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% con buffer TBE 0.5X a 120 volts y 450 mA. El gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) para la visualización y análisis de las bandas correspondientes a cada amplicón con luz UV, utilizando el programa Kodak ID Image Analysis Software 3.5 system. La presencia o ausencia de las bandas correspondientes a cada amplicón se determinó como positiva o negativa, de acuerdo con su detección con el programa de análisis de imágenes utilizado con los parámetros predeterminados por el fabricante.

Mapeo topológico

El nucleoide es la estructura compuesta por los bucles de DNA desnudo ancladas a la matriz nuclear, por la restricción a la libre rotación impuesta por las proteínas de la matriz nuclear el DNA tiene tensión estructural, para disiparla se hiperenrolla sobre sí mismo adquiriendo la conformación plectonémica como se observa en la figura 24. Cada bucle de DNA al encontrarse restringido por su base se puede analizar desde el punto de vista topológico como un círculo.

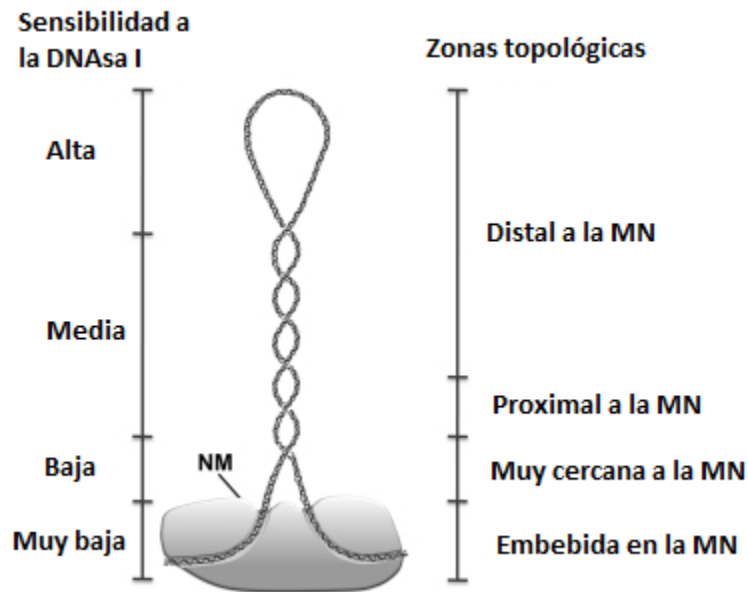


Figura 24. Esquema de un bucle de DNA libre de proteínas de la cromatina asociado a la MN. Se muestran las propiedades topológicas como el hiperenrollamiento, el cual es menor en la zona distal del bucle y la relación de proximidad relativa del DNA con la MN lo que genera un impedimento de tipo estérico para la actividad de la DNAsa I. Debido a estas características topológicas, los bucles de DNA muestran una sensibilidad diferencial al corte por la DNAsa I. en el método desarrollado se establece una correlación entre la distancia relativa del bucle de DNA a la MN y la actividad de la DNAsa I. con base en las cinéticas de digestión en los diferentes tiempos se definen las zonas topológicas que indican la distancia relativa del bucle a la MN. (Rivera-Mulia & Aranda-Anzaldo, 2010)

En el laboratorio se desarrolló un método para determinar las interacciones tridimensionales de los bucles de DNA asociados con la MN de cualquier región genómica con secuencia conocida. El método se basa en principios topológicos elementales como las relaciones de vecindad y/o proximidad y la continuidad del objeto que se estudia. Con base en estos conceptos surge el principio topológico al mapear la posición relativa de puntos consecutivos en una fibra deformable de DNA, con respecto a un referente de posición invariante (la matriz nuclear), se puede deducir la trayectoria y por lo tanto la conformación espacial en tres dimensiones de

la fibra en cuestión como al unir los puntos en la figura 25 (Maya-Mendoza & Aranda-Anzaldo, 2003; Rivera-Mulia & Aranda-Anzaldo, 2010).

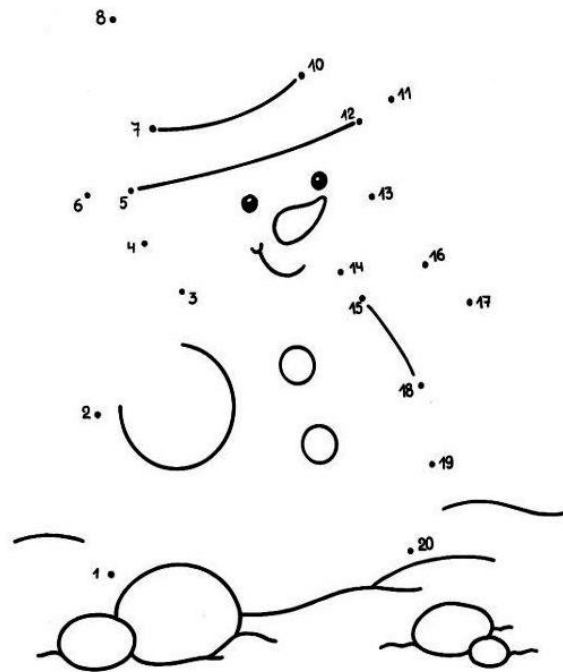


Figura 25. Esquema que ilustra como se puede terminar la trayectoria espacial de una fibra deformable al determinar la posición relativa de puntos ubicados en la fibra con respecto a un invariante posicional (en este caso el suelo).

Al exponer los nucleoides a concentraciones limitadas de DNAsa I los bucles de DNA muestran una resistencia a la actividad de la enzima directamente proporcional al grado de hiperenrollamiento y a su proximidad con la matriz nuclear (Maya-Mendoza & Aranda-Anzaldo, 2003). El comportamiento observado se debe al impedimento estérico que establecen la presencia de las proteínas de la matriz nuclear y el grado de hiperenrollamiento del bucle de DNA que representa una barrera de tipo estructural para la actividad de la DNAsa I ya que su corte es de cadena sencilla (Maya-Mendoza et al., 2004).

En la realización de los experimentos se trabajan con grandes cantidades de nucleoides, los cuales son expuestos a concentraciones limitadas de DNAsa I, esto nos permite determinar tendencias de manera consistente en la cual la sensibilidad del bucle de DNA a la enzima es inversamente proporcional a su distancia relativa a la MN. Por lo tanto, las regiones distales del bucle son digeridas inicialmente, mientras que las regiones más cercanas a la MN son digeridas de manera más tardía como se muestra en la figura 26. El DNA que se encuentra interactuando estrechamente con las proteínas de la matriz nuclear corresponde a la zona embebida, este DNA es extremadamente resistente a la acción enzimática aun exponiendo los nucleoides a altas concentraciones de la enzima permanece aproximadamente un 2% de DNA no digerible, dichas regiones que en promedio tienen alrededor de 1.5 Kb de longitud en hepatocitos podrían corresponder a los anclajes de los bucles a la matriz nuclear (Berezney & Buchholtz, 1981).

El método general para llevar a cabo el mapeo topológico se ilustra en la figura 26.

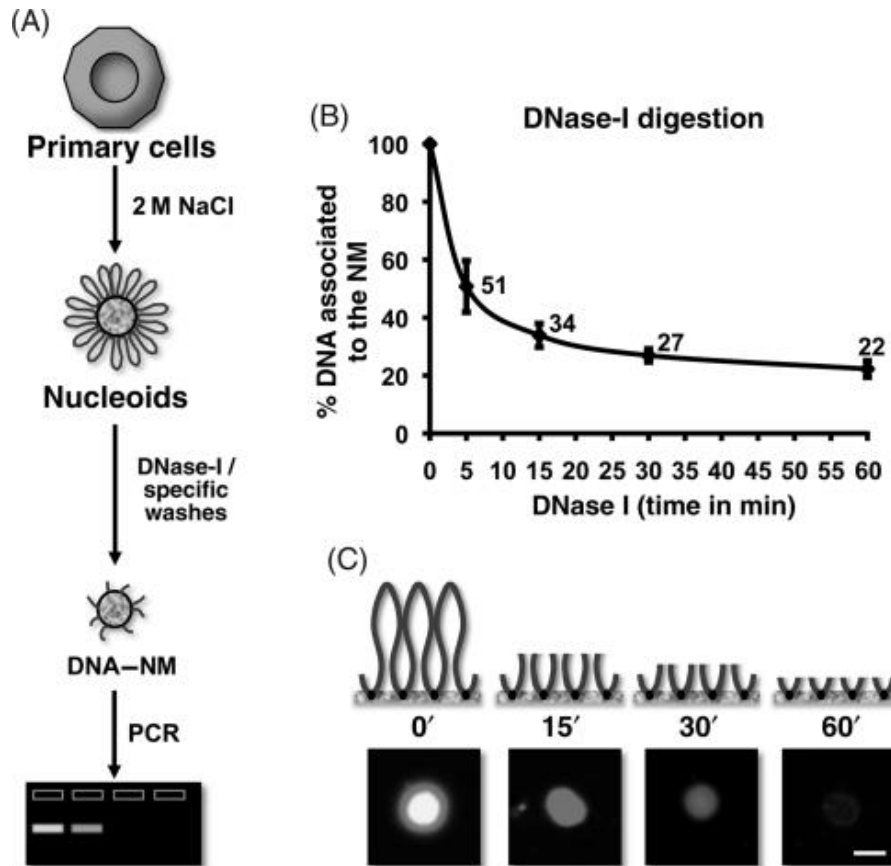


Figura 26. Procedimiento para llevar a cabo el mapeo posicional de secuencias específicas con respecto a la matriz nuclear. (A) Nucleoides preparados a partir de células primarias de ratón los cuales son expuestos a DNasa I para llevar a cabo la digestión progresiva de los bucles de DNA obteniéndose una cinética de digestión de dos fases. (B) Muestras de nucleoides parcialmente digeridos, la pérdida de la fluorescencia se puede observar en (C), lo que representa la pérdida gradual de su contenido de DNA. Las muestras de nucleoides parcialmente digeridos en distintos tiempos son utilizadas como templado para la amplificación por PCR de secuencias específicas que son ubicadas en zonas tipológicas con respecto a la MN (Rivera-Mulia & Aranda-Anzaldo, 2010).

Los resultados presentados en esta tesis fueron publicados (Guadarrama-Ponce R, Aranda-Anzaldo A. The epicenter of chromosomal fragility of Fra14A2, the mouse ortholog of human FRA3B common fragile site, is largely attached to the nuclear matrix in lymphocytes but not in other cell types that do not express such a fragility. *J Cell Biochem.* 2020;121(3):2209-2224.doi:10.1002/jcb.29444 y el artículo correspondiente está en el anexo I de esta tesis.

Resultados

Caracterización biofísica de la EOSN en hepatocitos, linfocitos y neuronas de ratón

Los nucleoides fueron las estructuras obtenidas al someter los núcleos de células primarias (linfocitos B, hepatocitos y neuronas) a altas concentraciones de sal y detergentes no iónicos, los detergentes permitieron la eliminación de los lípidos de membrana y las altas concentraciones de sal eliminaron la mayoría de las proteínas que se encontraban interactuando de manera funcional con el DNA dentro del núcleo, dejando la hebra de DNA libre de proteínas de la cromatina interactuando con las ribonucleoproteínas de la matriz nuclear (Cook et al., 1976; Vogelstein et al., 1980).

Los bucles de DNA se observaron mediante microscopía de fluorescencia cuando los nucleoides se expusieron a un agente intercalante del DNA como el bromuro de etidio, que actuó como palanca molecular intercalándose entre las bases

nitrogenadas. El desenrollamiento del DNA se manifestó mediante la formación de un halo fluorescente de DNA alrededor de la matriz nuclear (figura 27).

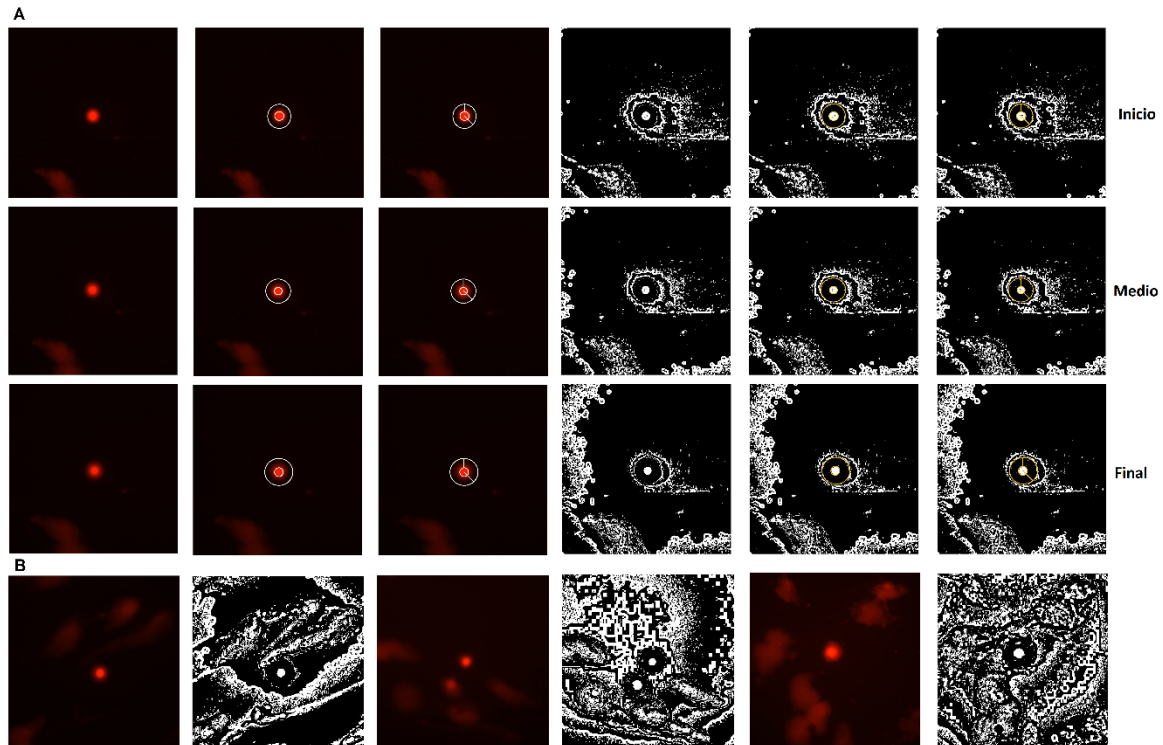


Figura 27. En la imagen A en naranja se puede observar la expansión de un nucleoide de linfocito B expuesto a 80 $\mu\text{l/ml}$ de bromuro de etidio en su etapa inicial, media y final (5 segundos aproximadamente), las imágenes en blanco y negro corresponden a las mismas imágenes analizadas con el software Image J 1.52a, las imágenes han sido convertidas a 8-bit, para poder ser analizadas mediante el software de manera automática, ajustando la imagen convertida mediante el comando Auto Local Threshold lo que convierte la imagen en blanco y negro y permite una mejor detección del halo, después se realiza un traslape de la imagen con una micrografía de una esfera de 15 μm lo que permite determinar el tamaño de la expansión del halo de cada nucleoide en micrómetros. En B se puede observar el proceso anterior de tres nucleoides diferentes.

La resistencia de la MN y la forma del halo una vez alcanzado su grado máximo de expansión aportó información sobre la estabilidad, el tamaño promedio de los bucles y el número de anclajes entre el DNA y la MN. El tamaño promedio de los bucles de

DNA desde su anclaje hasta la zona más distal se determinó midiendo el diámetro del halo ya que es directamente proporcional a ellos como lo reportó Maya-Mendoza en el 2005.

Se encontró que el tamaño del bucle promedio de DNA fue distinto entre hepatocitos y neuronas de ratones del mismo sexo y edad, dichos datos fueron equiparables a los obtenidos a partir de las mismas células primarias en rata reportado por Silva-Santiago en el 2017.

Caracterización comparativa de los bucles estructurales de DNA del gen *FHIT* entre neuronas, hepatocitos y linfocitos B naive de ratón adulto

En el trabajo se realizó un estudio comparativo entre los halos de DNA resultantes de la exposición de nucleoides de linfocitos B a bromuro de etidio en ratones de 80 días de nacidos. Los resultados indicaron que el tamaño del halo promedio en linfocitos B es muy similar al de hepatocitos y significativamente más grande comparado con los de neuronas (tabla 2). Las mediciones del tamaño del diámetro de los halos indicaron que los linfocitos B cuentan con un número similar de bucles de DNA anclados a la MN en relación con los hepatocitos y con un número menor de anclajes respecto a las neuronas como lo observó Trevilla-Garcia en el 2011 en rata.

	Linfocitos B	Hepatocitos	Neuronas
	n = 168	n = 74	n = 134
Radio del halo en micrómetros de la base a la punta del bucle	12.96 ± 0.25	13.04 ± 1.3	8.15 ± 0.86
Radio del halo en kilobases de la base a la punta del bucle	38.11 ± 0.74	38.35 ± 3.82	23.97 ± 2.53
Tamaño promedio del bucle de punta a punta en kilobases	76.22 ± 1.48	76.7 ± 7.64	47.94 ± 5.06

Tabla 2. Radio del halo de fluorescencia de los nucleoides de hepatocitos, linfocitos B y neuronas de ratón. Tamaño promedio del bucle de DNA estimado para hepatocitos, linfocitos B y neuronas de ratón (Silva-Santiago et al., 2017).

Cinéticas de digestión con DNAsa I de neuronas, hepatocitos y linfocitos B naive de ratón adulto

Los bucles de DNA se encuentran topológicamente restringidos al encontrarse anclados a la MN, por lo que cada bucle de DNA tiene un comportamiento parecido a una molécula circular de DNA. El estrés estructural observado en la doble hélice de DNA lo induce a desarrollar un subenrollamiento negativo y así poder disipar el estrés al que está sometido y por lo tanto no presentar rupturas en la hebra o la separación de las cadenas por el rompimiento de los puentes de hidrógeno entre cadenas de DNA. La gran cantidad de nucleoides sometidos a digestión con pequeñas concentraciones de DNAsa I mostraron una cinética de digestión del DNA unido a la MN altamente reproducible.

El comportamiento de las cinéticas generó dos fases perfectamente identificables y basados en los tiempos de digestión establecimos cuatro zonas topológicas como resultado a su relación espacial con la MN (distal, proximal, muy cercana y embebida). Los nucleoides de hepatocitos y linfocitos B mostraron diferentes cinéticas de digestión del DNA unido a la MN cuando se expusieron a 0.46 U/ml de DNAsa I. Las pendientes de la curva de digestión tendieron a cero en las zonas donde el DNA se encuentra embebido dentro de la MN, comportamiento que se mantiene inclusive cuando las muestras se sometieron a tiempos de incubación más prolongados en presencia de la enzima. A los 60 minutos de digestión la cantidad de DNA en la zona embebida fue de aproximadamente 23% para hepatocitos, 22% para neuronas y alrededor del 2% para linfocitos B (figura 28) (Guadarrama-Ponce & Aranda-Anzaldo, 2020).

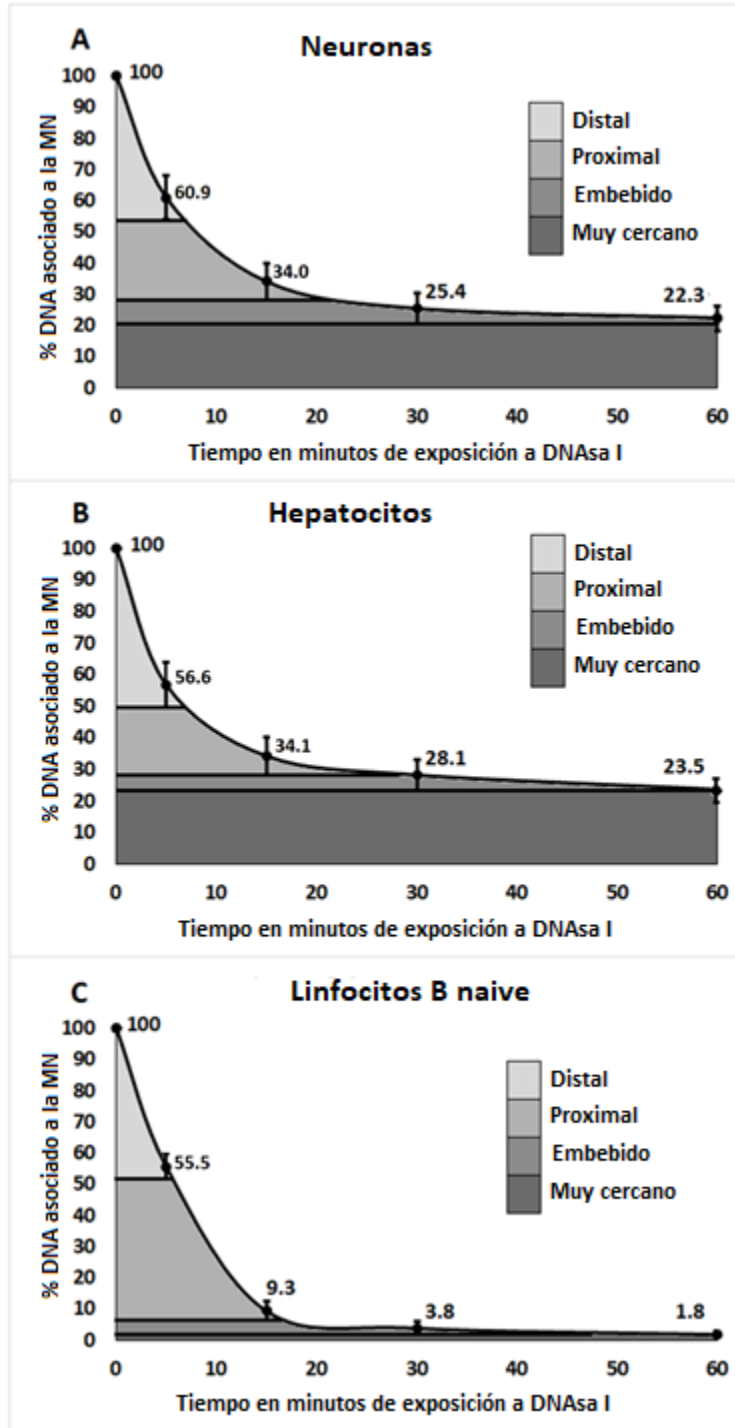


Figura 28. Cinética de digestión de nucleoides. A. Nucleoides de neuronas primarias de ratón DNase I (0.96U/ml) (n=7). B. Nucleoides de hepatocitos de ratón digeridos con DNase I (0.46U/ml) (n=6). C. Nucleoides de linfocitos B naive de ratón digeridos con DNase I (0.46U/ml) (n=4). Cada valor de tiempo es un promedio de experimentos separados con muestras obtenidas de animales diferentes. Las barras indican las desviaciones estándar correspondientes. Las zonas topológicas relacionadas a la MN (distal, proximal, muy cerca y embebida dentro de la MN) corresponden a la disminución en el porcentaje del DNA total unido a la MN y donde se definió de acuerdo con el tiempo correspondiente en cada sección (Guadarrama-Ponce & Aranda-Anzaldo, 2020).

Las curvas de digestión de los linfocitos B fueron consistentes con el hecho de que la MN de éstos es menos densa que la de los hepatocitos y las neuronas, debido a que la MN de linfocitos carece de láminas A/C (Rober et al., 1990), las cuales son el principal componente de la MN madura. Por lo tanto pudimos observar como la exposición al bromuro de etidio induce la ruptura de su MN como se muestra en la figura 29, efecto que no se encontró en nucleoides de neuronas y hepatocitos.

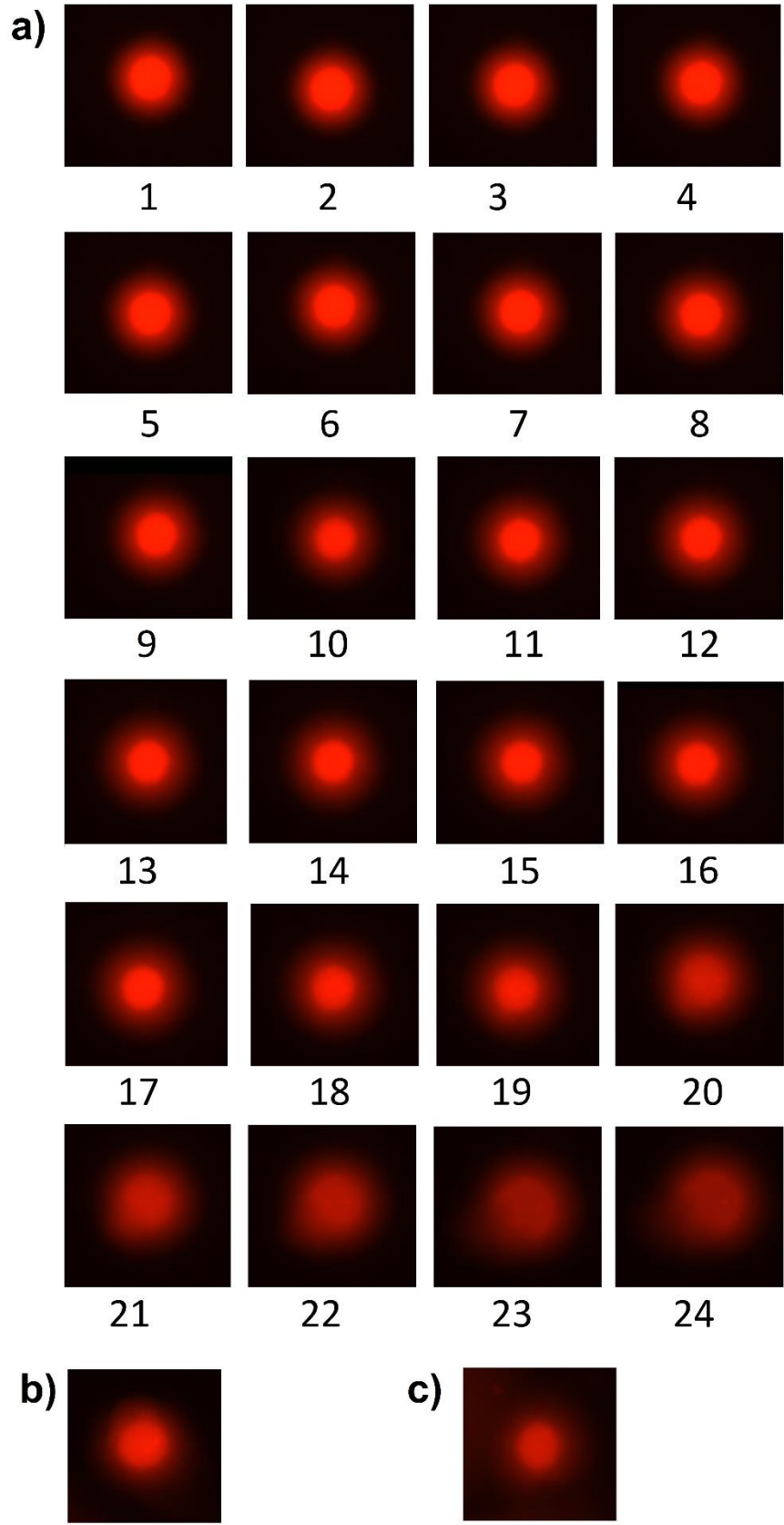


Figura 29. a) Imágenes de linfocitos tomadas a tiempos consecutivos (5 segundos aproximadamente) se puede observar como se genera la expansión del halo de nucleoides expuestos a bromuro de etidio, en las últimas imágenes se observa la destrucción de la MN debido a la baja densidad de la MN debido a la carencia de lámina A/C. b) Imagen de nucleoide de neurona expuesto a bromuro de etidio, la cual se mantiene por 60 segundos. c) Imagen de nucleoide de hepatocito expuesto a bromuro de etidio, la estructura se observa por 60 segundos.

Los nucleoides de neuronas requirieron una digestión con 0.92 U/ml de DNAsa I para obtener una curva de digestión con la morfología que permita identificar las cuatro zonas topológicas relativas a la MN, quedando como remanente un 22% de DNA interactuando con la MN después de 60 minutos de digestión, muy similar a lo observado en hepatocitos. La necesidad de incrementar la concentración de enzima para obtener la cinética de digestión buscada implica que los nucleoides neuronales presentan un grado de superenrollamiento mayor en sus bucles y que en promedio un mayor porcentaje de DNA se encuentra más cercano a la MN, lo que es consistente con el menor diámetro observado en el experimento del halo, en relación con los hepatocitos y los linfocitos B. Todo esto muestra que, la organización del genoma dentro del núcleo es tejido específica (Guadarrama-Ponce & Aranda-Anzaldo, 2020).

El DNA se ancla a la MN mediante regiones conocidas como MARs/LARs, en las cuales no se ha determinado una secuencia consenso, sin embargo, se ha observado que su afinidad por la MN se basa en lecturas indirectas, lo que quiere decir que la interacción DNA-MN no depende de la secuencia del DNA sino de características intrínsecas de la hebra como el tamaño o la flexibilidad (García-Vilchis & Aranda-Anzaldo, 2017). El mapeo de la posición relativa a la MN de pequeñas secuencias específicas que se diseñaron espaciadas de manera regular

dentro de una región determinada de DNA permitió determinar las interacciones en tres dimensiones de la fibra de DNA con respecto a la MN, y así infiriendo la organización en bucles estructurales de DNA en la región de interés.

Caracterización de la estructura de orden superior definida por las interacciones DNA-matriz nuclear en la región genómica de *FHIT* en neuronas, hepatocitos y linfocitos B naive de ratón adulto

El enfoque topológico utilizado permitió determinar la organización de bucles estructurales en linfocitos de las tres regiones de interés, la centrada en la zona crítica de fragilidad que consta de 19 pares de oligonucleótidos separados aproximadamente por 10 Kb uno de otro, cubriendo una región de 180 Kb, intercalando cuatro pares de oligonucleótidos dentro de esta región (CD, HI, LM, RS) en la búsqueda de bucles más pequeños (figura 30) que permitieron determinar que la zona crítica de fragilidad se encuentra embebida en la MN como muestra la figura 31 y tabla 3, los bucles se pueden observar en la figura 36.

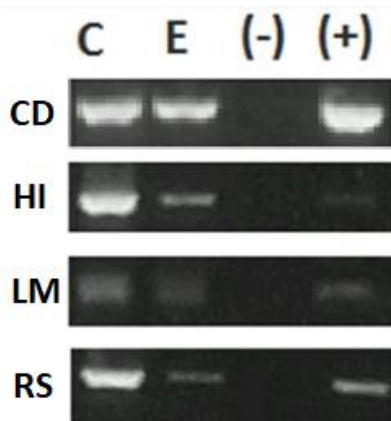


Figura 30. Regiones amplificadas de secuencias blanco-específicas de linfocitos de ratón. C corresponde al tiempo de digestión 0' que sería un control positivo y E a la embebida, (-) es un control negativo y (+) un control positivo donde se utilizó DNA genómico de ratón como templado (n=3) (Guadarrama-Ponce & Aranda-Anzaldo, 2020).

Amplicón	Zonas topológicas relativas a la MN en linfocitos B naïve de ratón				
	Control	Distal a la MN	Proximal a la MN	Muy cercano a la MN	Embebido en la MN
A	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+
C	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+
F	+	+	+	+	+
G	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+
I	+	+	+	+	+
J	+	+	+	+	+
K	+	+	+	+	+
L	+	+	+	+	+
M	+	+	+	+	+
N	-	-	-	-	-
O	+	+	+	+	+
P	+	+	+	+	+
Q	+	+	+	+	+
R	+	+	+	+	+
S	+	+	+	+	+

Tabla 3. Localización de las veinte secuencias blanco de la región genómica de 180 Kb estudiada dentro de las zonas topológicas relativas a la MN en nucleoides de ratón (n=4) (Guadarrama-Ponce & Aranda-Anzaldo, 2020).

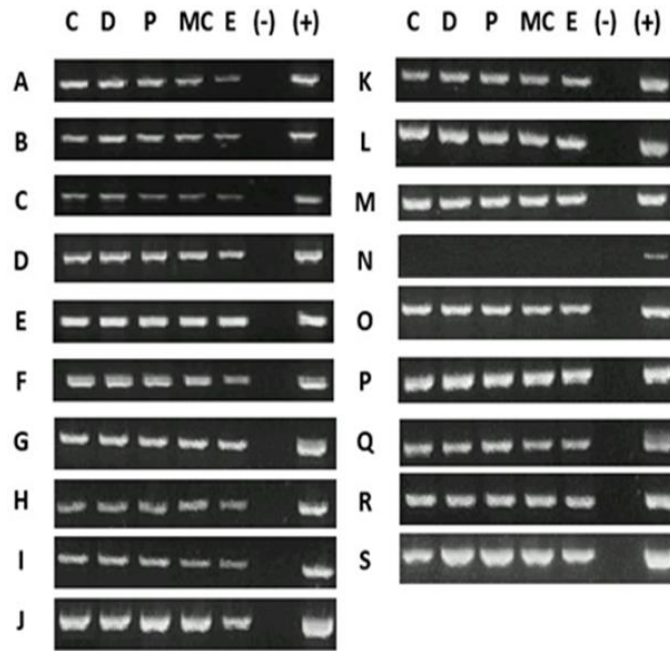


Figura 31. Mapeo posicional relativo a la MN de secuencias blanco-específicas de linfocitos B naive de ratón. C corresponde al tiempo de digestión 0' que sería un control positivo, D corresponde a la zona distal, P a la zona proximal, MC a la muy cercana y E a la embebida, (-) es un control negativo y (+) un control positivo donde se utilizó DNA genómico de ratón como templado (n=4) (Guadarrama-Ponce & Aranda-Anzaldo, 2020).

Debido a la falta de amplificación del punto N que corresponde al punto más cercano al exón 5, se realizó una extracción de las muestras digeridas durante 60 minutos con DNAzol y proteinasa K y después se llevó a cabo la amplificación mediante PCR de las muestras extraídas utilizándolas como templado, el tratamiento de extracción les eliminó las proteínas de la MN asociadas a dicha región obteniendo amplificación detectada por electroforesis, lo que indicaba que la interacción del DNA en esta región se debía a una estrecha interacción DNA-proteína (figura 32) (Guadarrama-Ponce & Aranda-Anzaldo, 2020).

PK Dz (-) (+)



Figura 32. Punto N amplificado en linfocitos de ratón, el cual fue digerido con DNAsa I por 60 minutos y después se expuso a proteinasa K (PK) y DNAzol (Dz), (-) es un control negativo y (+) un control positivo donde se utilizó DNA genómico de ratón como templado (n=3) (Guadarrama-Ponce & Aranda-Anzaldo, 2020).

El análisis de esta región de 180 Kb en hepatocitos (tabla 4 y figura 33) y neuronas (tabla 5 y figura 34) demostró que la organización en bucles estructurales es tejido específica, tanto en neuronas como en hepatocitos el amplicón N cercano al exón 5 se encontró distal a la MN y no tuvo ninguna problemática para ser amplificado, los resultados se pueden observar en la figura 36.

Amplicón	Zonas topológicas relativas a la MN en hepatocitos de ratón				
	Control	Distal a la MN	Proximal a la MN	Muy cercano a la MN	Embebido en la MN
A	+	+	+		
B	+	+	+		
C	+	+	+	+	
D	+	+	+	+	
E	+	+	+	+	+
F	+	+	+		
G	+	+	+	+	
H	+	+	+		
I	+	+	+		
J	+	+	+	+	
K	+	+	+	+	
L	+	+	+	+	+
M	+	+	+	+	
N	+	+			
O	+	+	+		
P	+	+	+	+	+
Q	+	+	+	+	
R	+	+	+	+	+
S	+	+	+	+	

Tabla 4. Localización de las 19 secuencias blanco de la región genómica de 180 Kb estudiada dentro de las zonas topológicas relativas a la MN en hepatocitos de ratón (n=6) (Guadarrama-Ponce & Aranda-Anzaldo, 2020).

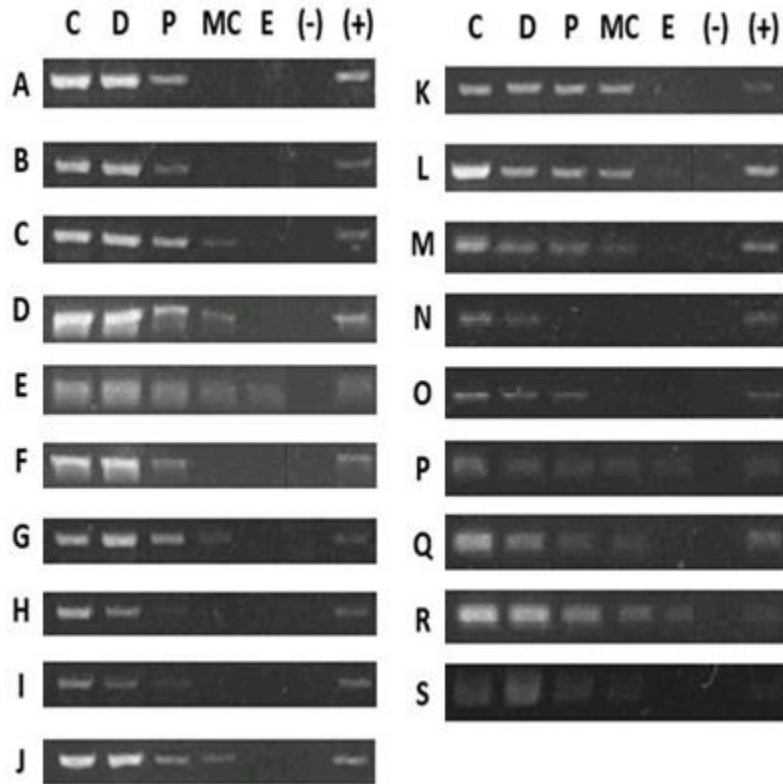


Figura 33. Mapeo posicional relativo a la MN de secuencias blanco-específicas de hepatocitos de ratón. C corresponde al tiempo de digestión 0' que sería un control positivo, D corresponde a la zona distal, P a la zona proximal, MC a la muy cercana y E a la embebida, (-) es un control negativo y (+) un control positivo donde se utilizó DNA genómico de ratón como templado (n=6) (Guadarrama-Ponce & Aranda-Anzaldo, 2020).

Amplicón	Zonas topológicas relativas a la MN en neuronas de ratón				
	Control	Distal a la MN	Proximal a la MN	Muy cercano a la MN	Embebido en la MN
A	+	+	+		
B	+	+	+		
C	+	+	+		
D	+	+	+	+	
E	+	+	+	+	
F	+	+	+		
G	+	+	+	+	
H	+	+			
I	+	+			
J	+	+	+		
K	+	+	+	+	
L	+	+	+	+	
M	+	+	+	+	+
N	+	+	+		
O	+	+	+	+	
P	+	+	+	+	
Q	+	+			
R	+	+	+	+	
S	+	+	+	+	

Tabla 5. Localización de las veinte secuencias blanco de la región genómica de 180 Kb estudiada dentro de las zonas topológicas relativas a la MN en neuronas de ratón (n=7) (Guadarrama-Ponce & Aranda-Anzaldo, 2020).

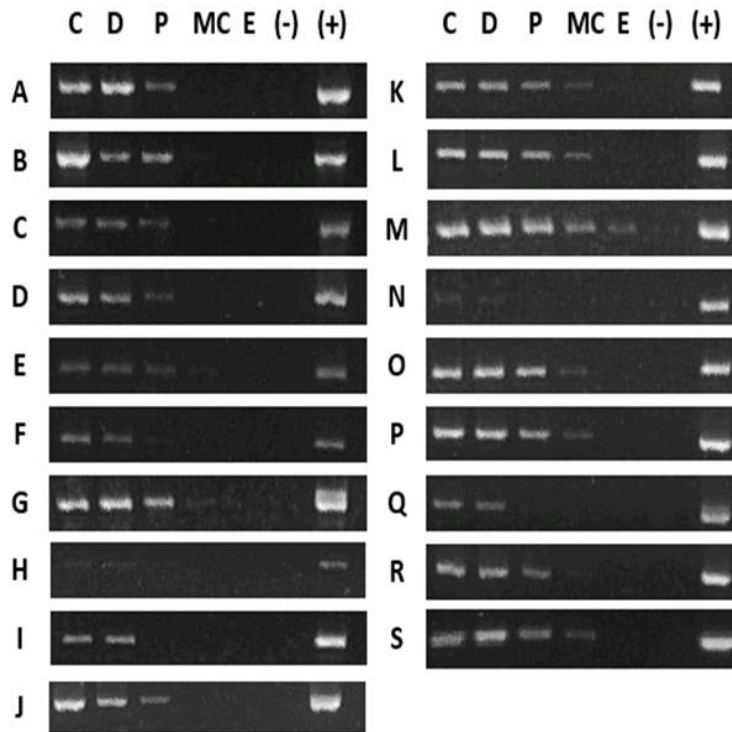


Figura 34. Mapeo posicional relativo a la MN de secuencias blanco-específicas de neuronas de ratón. C corresponde al tiempo de digestión 0' que sería un control positivo, D corresponde a la zona distal, P a la zona proximal, MC a la muy cercana y E a la embebida, (-) es un control negativo y (+) un control positivo donde se utilizó DNA genómico de ratón como templado (n=7) (Guadarrama-Ponce & Aranda-Anzaldo, 2020).

Como ya se ha mencionado, la ZCF de aproximadamente 500 Kb centrada en exón 5 se encuentra dentro de una zona desprovista de sitios de iniciación de la replicación (ARIS), dicha zona se extiende aproximadamente 700 Kb y las horquillas de replicación tienen que viajar largas distancias a partir de las regiones distales para lograr la replicación de esta región (Debatisse et al., 2012; Le Tallec et al., 2014).

En la búsqueda de bucles estructurales que pudieran servir como orígenes de replicación se diseñaron hacia telómero 10 pares de oligonucleótidos, los cuales

cubren una región aproximadamente de 90 Kb centrada a 350 Kb a partir del exón 5, con ellos se determinó la organización en bucles estructurales en linfocitos B (tabla 6, figura 23 y 35), también se diseñaron hacia centrómero 21 pares de oligonucleótidos que cubren una zona de aproximadamente 230 Kb centrada a 350 Kb a partir del exón 5, al determinar la EOSN (figura 23 y 35, tabla 7) se encontraron pequeños bucles tanto hacia telómero como hacia centrómero donde inicia la zona con ARIS, los resultados de la organización estructural se pueden observar en las figuras 37 y 38 (Guadarrama-Ponce & Aranda-Anzaldo, 2020).

Amplicón	Zonas topológicas relativas a la MN en linfocitos B naive de ratón a 350 Kb hacia telómero				
	Control	Distal a la MN	Proximal a la MN	Muy cercano a la MN	Embebido en la MN
aT	+	+	+	+	+
bT	+	+	+	+	
cT	+	+	+	+	+
dT	+	+	+	+	+
eT	+	+	+	+	+
fT	+	+	+	+	+
gT	+	+	+	+	+
hT	+	+	+	+	+
iT	+	+	+	+	+
jT	+	+	+	+	+

Tabla 6. Localización de las diez secuencias blanco de la región genómica de 90 Kb estudiada a 350 Kb del exón 5 hacia telómero dentro de las zonas topológicas relativas a la MN (n=4) (Guadarrama-Ponce & Aranda-Anzaldo, 2020).

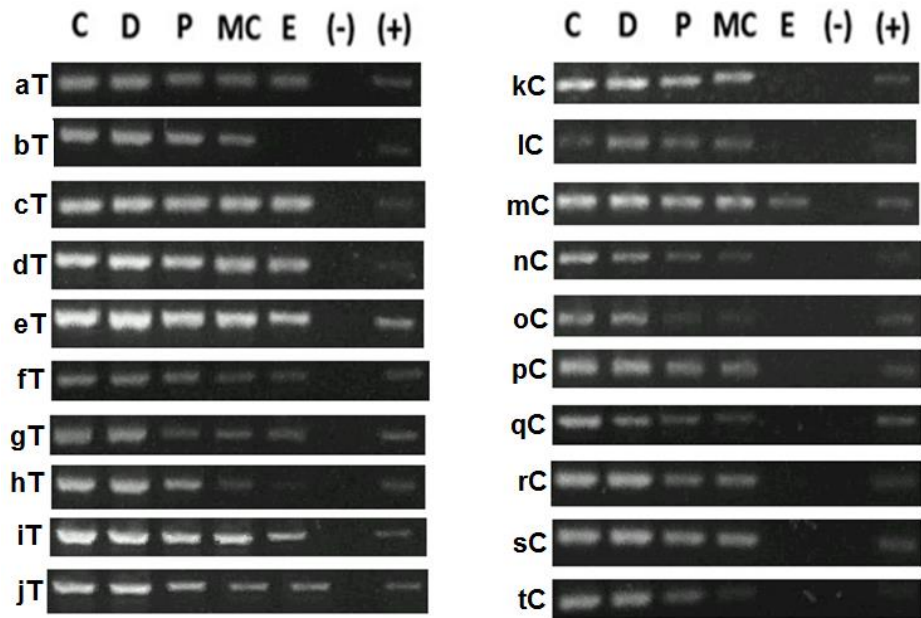


Figura 35. Mapeo posicional relativo a la MN de secuencias blanco-específicas de linfocitos B naive de ratón a 350 Kb tomando como punto de referencia el exón 5. Los amplicones aT-jT se encuentran hacia telómero y los amplicones kC-tC se encuentran hacia centrómero. C corresponde al tiempo de digestión 0' que sería un control positivo, D corresponde a la zona distal, P a la zona proximal, MC a la muy cercana y E a la embebida, (-) es un control negativo y (+) un control positivo donde se utilizó DNA genómico de ratón como templado (Guadarrama-Ponce & Aranda-Anzaldo, 2020).

La organización en bucles estructurales de los tres diferentes tipos celulares se puede observar en la figura 36, obtenida a partir del mapeo posicional de los amplicones. La EOSN en linfocitos de las regiones hacia centrómero y telómero se pueden observar en las figuras 37 y 38 respectivamente.

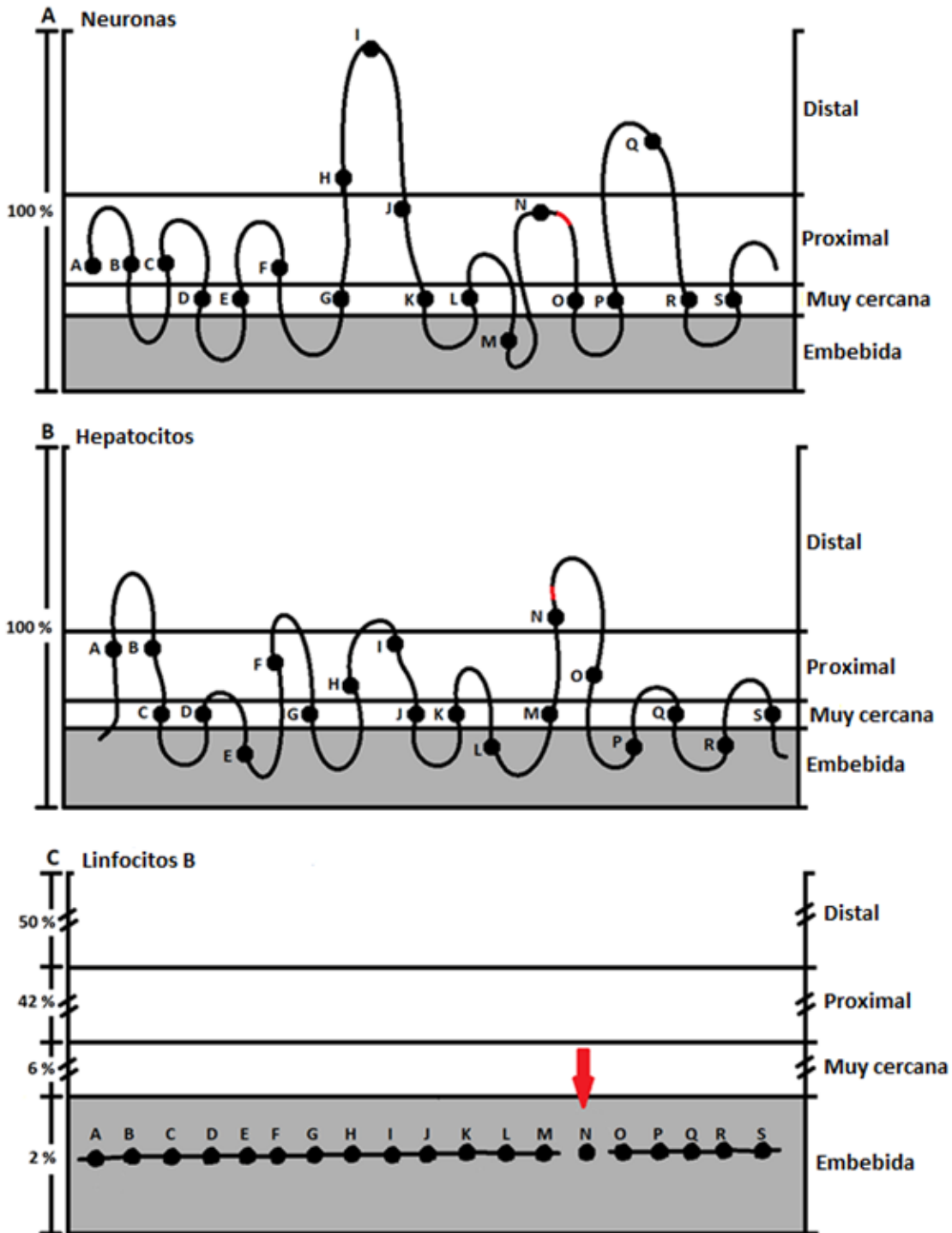


Figura 36. Estructura de orden superior al interior del núcleo de la región de 180 Kb dentro de la ZCF. (A) Bucles estructurales en neuronas de ratón, se puede observar que el exón 5 marcado en rojo localizado en la zona proximal. (B) Bucles estructurales en hepatocitos de ratón, se puede observar el exón 5 marcado en rojo localizado en la zona topológica distal. (C) Bucles estructurales en linfocitos B de ratón, el exón 5 se encuentra marcado por la flecha roja, todos los puntos se encuentran en la zona embebida (Guadarrama-Ponce & Aranda-Anzaldo, 2020).

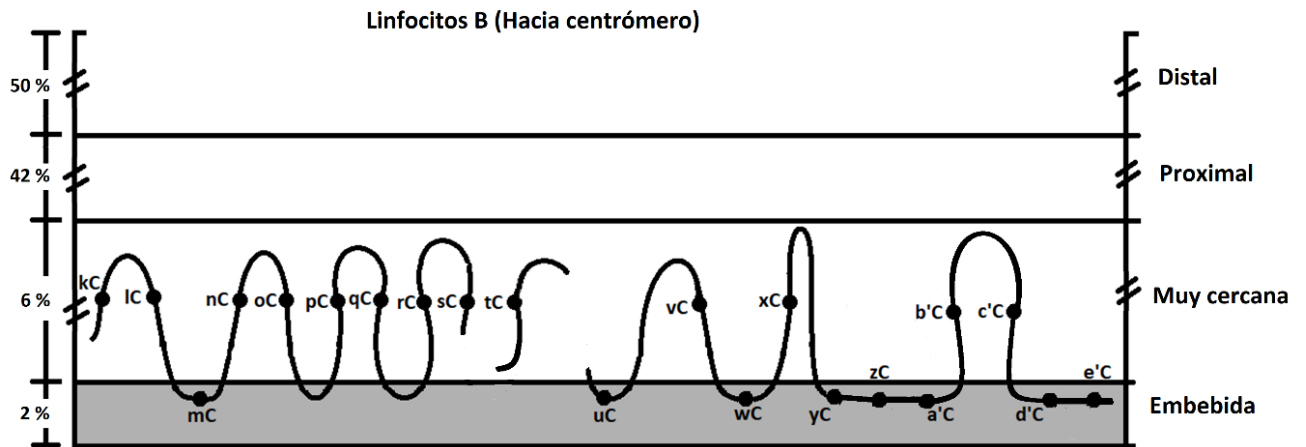


Figura 37. Organización estructural de los bucles de DNA de la región de 230 Kb a 350 kb hacia la región centromérica tomando como referencia el exón 5 del gen *FHIT*, obtenida a partir de linfocitos B naive de ratones de 80 días (Guadarrama-Ponce & Aranda-Anzaldo, 2020).

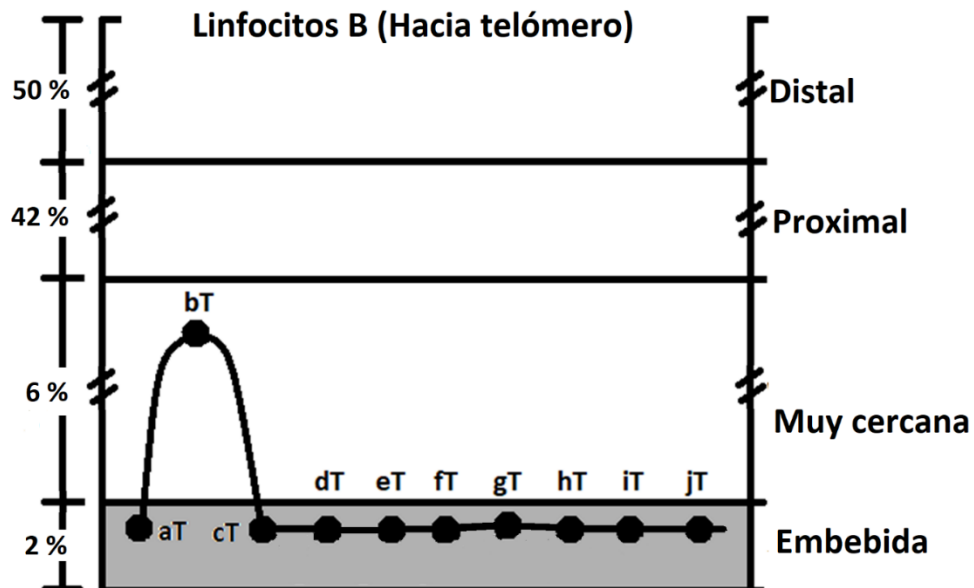


Figura 38. Organización estructural de los bucles de DNA de la región de 90 Kb a 350 kb hacia la región centromérica tomando como referencia el exón 5 del gen *FHIT*, obtenida a partir de linfocitos B naive de ratones de 80 días (Guadarrama-Ponce & Aranda-Anzaldo, 2020).

Discusión

Los genomas eucarióticos poseen una elaborada y dinámica organización al interior del núcleo, dentro de las limitaciones que este les impone. El DNA de las células eucariotas se encuentra muy compactado, lo que implica un alto grado de organización estructural. Sus características nos permiten analizarlo como una fibra deformable que forma bucles al interactuar con una subestructura de naturaleza proteica conocida como MN (Bennink et al., 1999). Dichos bucles pueden ser modelados como círculos topológicos. Esta interacción DNA-MN es de gran estabilidad, ya que se mantiene después de la eliminación de las proteínas de la cromatina, lo que sugiere una función estructural de gran importancia (Bouchiat et al., 1999; Iyer et al., 2011).

La matriz nuclear es la estructura residual del núcleo celular, compuesta principalmente por ribonucleoproteínas, RNA y DNA. Se considera una estructura altamente dinámica, tejida específica, especie específica y con la capacidad de cambiar dependiendo de los estímulos a los cuales se encuentre sometido el núcleo celular e inclusive el organismo (R. Berezney & Coffey, 1977; R Berezney & Coffey, 1976; Nozawa & Gilbert, 2019; Silva-Santiago et al., 2017).

Una pista que ha dado algo de luz para explicar la distribución cromosómica dentro del núcleo formando los territorios cromosómicos es que durante la interfase el DNA de los metazoarios se encuentra organizado en bucles hiperenrollados anclados por su base a la matriz nuclear (Ottaviani et al., 2008). Los bucles se anclan a la MN

mediante secuencias conocidas como regiones de asociación o unión a la matriz y aunque no existen secuencias consenso que definan a priori a los MARs, estos tienden a ser regiones ricas en A-T y de secuencias repetidas; sin embargo en las regiones de interés de este proyecto no se han observado estas características de composición o secuencia, como se puede observar en la tabla 7, de hecho es más probable que la asociación del DNA a la MN dependa de lecturas indirectas como la longitud del fragmento, y no por composición o secuencia (García-Vilchis & Aranda-Anzaldo, 2017; Ottaviani et al., 2008).

Ya ha sido demostrado que las interacciones más estables de tipo estructural que se establecen entre el DNA y la MN no requieren la participación de proteínas de la cromatina ya que, al eliminar este tipo de proteínas, las interacciones se mantienen.

Esta distribución espacial del genoma con su interacción con proteínas de la matriz nuclear definen la estructura de orden superior en el núcleo (EOSN), dichas interacciones son tejido-específicas al igual que la organización del genoma en bucles estructurales (Alva-Medina et al., 2010; Aranda-Anzaldo, 2009; Rivera-Mulia & Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García & Aranda-Anzaldo, 2011, 2012).

Existe importante evidencia de que los bucles estructurales corresponden a los replicones in vivo, (Buongiorno-Nardelli et al., 1982; Castillo-Mora & Aranda-Anzaldo, 2012; Razin, 2001; Rivera-Mulia et al., 2011). En metazoarios no existen secuencias consenso definidas que actúen como orígenes de replicación, pero varios ORIs caracterizados en metazoarios comparten propiedades asociadas con

los MARs y co-mapean o se localizan próximos a LARs (Burrow et al., 2010; Cayrou et al., 2010).

Por otra parte, algunos ORIs se encuentran asociados en forma permanente con la matriz nuclear mientras que, otros se asocian en forma dinámica con ella, pero dicha asociación parece ser indispensable para que ocurra la replicación (Anachkova et al., 2005; Djeliova et al., 2001; Ortega & DePamphilis, 1998; Rivera-Mulia et al., 2011).

Los ORIs de metazoarios se dividen en constitutivos y facultativos, estos últimos sólo se activan dependiendo de las condiciones celulares y son tejido-específicos, al igual que los SIRs, esto sugiere que existe una posible conexión de tipo estructural entre ORIs, SIRs y bucles estructurales de DNA (Cayrou et al., 2010; Letessier et al., 2011; Méchali, 2010).

Todo lo anterior ha llevado a pensar que el problema estructural observado en los sitios frágiles puede tener como consecuencia obstaculización de los procesos de replicación o transcripción, disputa de estos procesos sobre la misma región, lo que puede generar la ruptura o alteración de la hebra de DNA, manifestándose como fragilidad dentro de los cromosomas (Guadarrama-Ponce & Aranda-Anzaldo, 2020).

Debido a que los sitios frágiles comunes como el gen *FHIT* es una región propensa a presentar constricciones, discontinuidades, rupturas o rearrreglos en cromosomas metafásicos de células que se encuentran bajo estrés replicativo, su presentación

ubicua en la población general, nos hace considerarlo un componente intrínseco de los cromosomas como ya ha sido antes reportado por Durkin en el 2007 e Irony en el 2018.

El gen *FHIT* no se caracteriza por presentar secuencias repetidas. En varios estudios se ha reportado que los sitios frágiles son regiones ricas en A-T, el contenido de A-T en el genoma humano es de aproximadamente 59%, mientras que en el genoma murino es del 58%. En la tabla 7 se observa un análisis del contenido de A-T dentro del gen *FHIT* en donde se muestra que el contenido de A-T en el gen humano es del 61.09% y en el murino es del 59.94%, entonces aparentemente existe un ligero enriquecimiento de A-T dentro del gen como ya se había mencionado, al analizar la zona crítica de fragilidad no se encuentra una diferencia en relación a la composición del gen, sin embargo, cuando se analiza el exón 5 que corresponde al “core” de fragilidad en ambas especies se detectó una disminución del 5% en el contenido de A-T, lo que podría generar que estas zonas sean menos flexibles de lo que se pensaba ya que, su mayor contenido de G-C induciría una mayor rigidez a la hebra de DNA y por lo tanto, una pérdida de la flexibilidad que podría ser un componente sumativo a su manifestación de fragilidad.

Análisis de <i>FHIT</i> y la CFZ (500 Kb)					
Zona analizada	Nucleótido	Número de nucleótidos	Nucleótidos	Porcentaje	Porcentaje A-T
<i>FHIT</i> Humano	Adenina	444,914	1,504,183	29.58	61.09
	Timina	473,936		31.51	
	Citosina	284,059		18.88	

	Guanina	301,274		20.02	
CFZ Humano	Adenina	149,623	500,000	29.92	61.5
	Timina	157,875		31.58	
	Citosina	92,984		18.6	
	Guanina	99,518		19.9	
Exón 5 Humano	Adenina	31	120	25.83	54.16
	Timina	34		28.33	
	Citosina	30		25	
	Guanina	25		20.83	
FHIT Murino	Adenina	460,355	1,611,970	28.56	59.94
	Timina	505,882		31.38	
	Citosina	317,957		19.72	
	Guanina	327,776		20.33	
CFZ Murino	Adenina	141,497	500,000	28.3	60.1
	Timina	159,046		31.8	
	Citosina	97,980		19.6	
	Guanina	101,477		20.3	
Exón 5 Murino	Adenina	26	120	21.67	55
	Timina	40		33.33	
	Citosina	32		26.66	
	Guanina	22		18.33	

Tabla 7. Análisis en humano y ratón del contenido de A-T en todo el gen *FHIT/FHIT*, la zona crítica de fragilidad (CFZ) y el exón 5.

La formación de R-loops en regiones de difícil replicación podría inducir colisiones entre la maquinaria de replicación y la de transcripción, específicamente en genes

grandes como *FHIT*, sin embargo, el estudio de otros genes grandes dentro del genoma no ha mostrado la manifestación de fragilidad esperada lo que indica que existe otro componente implicado (Helmrich et al., 2011; Madireddy et al., 2016).

La predisposición a la formación de R-loops en linfocitos B se puede relacionar con la organización en bucles estructurales dentro de la zona crítica de fragilidad ya que todos los amplicones buscados en linfocitos B se encontraron embebidos en la MN como se observa en la figura 36C, lo que genera tensión sobre la hebra al tirar de ella cada una de las maquinarias al mismo tiempo, y podría explicar como la replicación de otros grandes genes, en donde la replicación y la transcripción también coinciden, no manifiestan fragilidad, debido a que en estos últimos presentan una EOSN con bucles promedio distribuidos de manera regular.

El estudio de la velocidad de las horquillas de replicación dentro de los sitios frágiles muestra que es exactamente la misma que en el resto del genoma, lo que indica que el problema no es la velocidad de la horquilla de replicación, sino la ausencia de estructuras que definan los sitios de iniciación de la replicación. Aún falta explicar el cómo es posible que en los linfocitos B, donde su EOSN suele encontrarse en la zona embebida en la región más frágil, las horquillas tengan la capacidad de mantener su velocidad, quizá esto se relaciona con el modelo de carrete y explicaría que durante la replicación lo que en verdad se mueve no es la fábrica de replicación, sino la hebra de DNA.

Esto conlleva a hipotetizar que la replicación tardía puede estar relacionada a la posible colisión entre las maquinarias de replicación y de transcripción (Helmrich et al., 2011; Le Tallec et al., 2014). Aunque se ha propuesto que la deficiencia en el sistema de reparación de los sitios frágiles puede ser la causa de fragilidad, la lógica indica que la necesidad de este sistema en estas regiones está relacionada a un problema en el proceso de replicación, regresando al problema inicial, lo que nos debe hacer pensar que debe haber otros factores en los cuales recae la inestabilidad de los sitios frágiles, como pueden ser dificultades en la iniciación, progresión de la replicación o su conflicto con la maquinaria de transcripción (Brisson et al., 2019; Ozeri-Galai et al., 2014).

Conclusiones

- El tamaño promedio de los bucles estructurales de DNA anclados a la MN en hepatocitos y linfocitos B naive de ratón son muy similares.
- La densidad de la matriz nuclear en linfocitos B es mucho menor que la de hepatocitos y neuronas de ratón y esto se hace evidente por la disociación de la MN que induce el desenrollamiento de los bucles de DNA.
- La sensibilidad a la digestión por la DNAsa I observada en linfocitos B es mucho mayor que en hepatocitos y neuronas, probablemente relacionada a la baja densidad de su MN por la deficiencia de lámina A/C
- La organización en bucles estructurales de la zona crítica de fragilidad del gen *FHIT* es tejido específica.
- Las neuronas de ratón presentan una EOSN con bucles típicos de neuronas dentro de la zona crítica de fragilidad de FRA14A2.
- Los hepatocitos de ratón muestran una EOSN con bucles típicos de hepatocitos dentro de la zona crítica de fragilidad de FRA14A2.
- En linfocitos B el DNA de la zona crítica de fragilidad se encuentra completamente embebida dentro de la matriz nuclear y no se detectan bucles estructurales.
- La manifestación de fragilidad de Fra14A2 en linfocitos B se puede deber a la estrecha interacción entre el DNA y las proteínas de la MN, lo que conduce a estrés estructural durante el proceso de replicación.

- En los tres tipos celulares analizados no se encontró una secuencia específica que determinara la interacción entre el DNA y la MN.
- Nuestros datos sugieren que la delección del gen *FHIT* es un efecto colateral de la replicación en una región que por sus propiedades estructurales es intrínsecamente difícil de replicar, independientemente del posible papel del producto de *FHIT* como supresor de tumores.

Perspectivas

Las estructuras nucleares permiten que se lleven a cabo procesos celulares como la replicación y la transcripción, procesos que requieren una gran organización dentro del núcleo.

La MN es la subestructura que permite esta coherencia nuclear sobre la cual se llevan a cabo algunos procesos y otros lo hacen con respecto a ella, el hecho de que esta estructura se base en un sistema de tensegridad permite generar un orden interno, lo cual genera la integración de los territorios cromosómicos.

Sin embargo, dentro de toda esta organización es necesario contar con anclajes que tengan un mayor aporte estructural con respecto a otros, por eso se deben seguir analizando los sitios frágiles comunes que tengan mayor frecuencia tanto en los linfocitos B como en otros tipos celulares.

También sería un gran aporte analizar regiones frágiles dentro de todo un cromosoma, lo que permitiría determinar si existen anclajes con mayor importancia (superanclajes) que otros. La generación de deleciones de regiones que se determinen como superanclajes podrían generar la desorganización del genoma y por lo tanto predisponer a las células a convertirse en células con un comportamiento parecido al cáncer. *FHIT* podría ser un anclaje que genera coherencia estructural para el genoma celular en linfocitos B de ratón.

El descubrimiento de estos superanclajes estarían aportando información estructural que se relaciona con algunos tipos de neoplasia.

Parte de la investigación se puede enfocar en la identificación de la o las proteínas que se encuentran interactuando de manera estrecha con ciertas regiones del genoma y determinar si se encuentran en distintos sitios frágiles.

La determinación de otros sitios frágiles en otros tipos celulares que se manifiesten bajo diferentes circunstancias permitirá determinar la importancia de las interacciones entre el DNA y la MN.

Por último, la determinación de las estructuras de orden superior al interior del núcleo del mismo tipo celular, pero de diferentes especies aportará información importante sobre la composición indirecta y los efectos inducidos debido a las propiedades biofísicas de la MN.

Anexo I

Guadarrama-Ponce et al., 2019



RESEARCH ARTICLE

The epicenter of chromosomal fragility of Fra14A2, the mouse ortholog of human FRA3B common fragile site, is largely attached to the nuclear matrix in lymphocytes but not in other cell types that do not express such a fragility

Rolando Guadarrama-Ponce | Armando Aranda-Anzaldo

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

Correspondence

Prof Armando Aranda-Anzaldo, MD, PhD, Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Tollocan y Jesús Carranza s/n, 50180 Toluca, Edo. Méx, Mexico. Email: aaa@uaemex.mx and armandoa10@gmail.com

Funding information

CONACYT-Mexico, Grant/Award Number: 176794

Abstract

Common fragile sites (CFSs) correspond to chromosomal regions susceptible to present breaks, discontinuities or constrictions in metaphase chromosomes from cells subjected to replication stress. They are considered as genomic regions intrinsically difficult to replicate and they are evolutionary conserved at least in mammals. However, the recent discovery that CFSs are cell-type specific indicates that DNA sequence by itself cannot account for CFS instability. Nevertheless, the large gene *FHIT* that includes FRA3B, the most highly expressed CFS in human lymphocytes, is commonly deleted in a variety of tumors suggesting a tumor suppressor role for its product. Here, we report that the epicenter of fragility of Fra14A2/*Fhit*, the mouse ortholog of human FRA3B/*FHIT* that like its human counterpart is the most highly expressed CFS in mouse lymphocytes, is largely attached to the nuclear matrix compartment in naive B lymphocytes but not in primary hepatocytes or cortical neurons that do not express such a CFS. Our results suggest a structural explanation for the difficult-to-replicate nature of such a region and so for its common fragility in lymphocytes, that is independent of the possible tumor suppressor role of the gene harboring such CFS.

KEYWORDS

cancer, DNA loop, DNA replication, *FHIT*, LAR (loop attachment region), MAR (matrix attachment region)

1 | INTRODUCTION

Common fragile sites (CFSs) are chromosomal regions susceptible to present constrictions, discontinuities, breaks or re-arrangements in metaphase, condensed chromosomes from cells subjected to replication stress.¹ Such CFSs were recognized as recurrent locations for double-stranded DNA breaks in cultured peripheral blood lymphocytes from most sampled healthy humans, and so they were considered as a structural feature of

normal chromosomes even though they may exhibit differential frequency of expression in a population.¹ Moreover, disruption of DNA replication by agents that reduce the progression of the replication fork (such as aphidicolin that inhibits DNA polymerases) induces the expression of fragility; therefore, the CFSs are considered regions that are intrinsically difficult to copy during DNA replication.² It is remarkable that several of the highly expressed CFSs in human lymphocytes are also expressed (at the chromosome containing the corresponding

syntenic DNA sequence) in mouse and nonhuman primate lymphocytes^{1,3,4} suggesting their evolutionary conservation. FRA3B is the most active CFS in human lymphocytes¹ and it has been shown, in nonstressed lymphoblastoid cells, that replication initiation events are remarkably poor in a chromosome region extending over 700 kb that overlaps with the critical zone of FRA3B fragility.⁵ Moreover, in replication-stressed lymphoblastoid cells this region was not only depleted in initiation events but also in termination events, indicating a defect in the completion of DNA replication.⁵ However, the recent mapping of CFSs in different cell types confirmed that contrary to previous assumptions for universality, the expression of CFSs is tissue-specific.⁶⁻⁸ Thus it is very interesting that normal human fibroblasts do not express FRA3B, even when subjected to replication stress, and they show a normal density of replication initiation sites along the 700 kb region that overlaps with the critical zone of fragility in lymphocytes.⁵ This situation necessarily implies that DNA sequence alone cannot account for CFS instability.

FRA3B critical zone of fragility extends for some 500 kb within the ~1.5 Mb *FHIT* gene situated in the short arm of human chromosome 3. *FHIT* includes 10 very short exons that result in a 1.1 kb cDNA. The first four exons and the last one are noncoding while exons 5 to 9 codify for a 16.8 kd protein with typical dinucleoside 5', 5''-P₁P₃-triphosphate (Ap₃A) hydrolase activity.⁹ The core of fragility is centered in the exon 5.¹⁰ *FHIT* is among the most commonly deleted genes in human cancers and the loss of the corresponding protein is apparently an early event in carcinogenesis, suggesting a role for *FHIT* as tumor suppressor.^{9,11} There is a current debate on this given that the gene is located at a potentially fragile chromosome site and so there is scope for considering the deletion of *FHIT* as a passenger event in cancer. Nevertheless, recent evidence supports a DNA caretaker role in preventing mutation and tumorigenesis for *FHIT*.¹¹ Thus a further understanding of FRA3B intrinsic fragility may contribute to elucidate the role of *FHIT* in cancer. On the other hand, Fra14A2/*Fhit*, the mouse ortholog of FRA3B/*Fhit*, is located in the chromosome 14 of the mouse and corresponds to the most active CFS in mouse lymphocytes.¹² Mouse *FHIT* also codes for a triphosphate hydrolase and the critical zone of fragility is also centered in the exon 5 of the gene.⁴ Therefore, Fra14A2/*Fhit* is a valid model for studying the basis of CFS instability in mouse lymphocytes that it is also relevant for the human case.

Several studies, published along the past 40 years, have provided evidence that in the nucleus of metazoan cells the genomic DNA is organized in negatively supercoiled loops anchored to a nuclear compartment

or substructure commonly known as the nuclear matrix (NM) and that such an organization is fundamental for DNA replication (see, Fritz et al¹³ for a comprehensive review). The interactions between nuclear DNA and the NM are operationally classified into stable/constitutive/structural that resist extraction with high salt and transient, possibly just functional, that do not resist high-salt extraction.^{14,15} Usually, DNA interacts with the NM through short-length tracts (~200 bp) known as matrix attachment/associated regions or MARs.¹⁶ The MARs participating in the structural interactions are also known as loop attachment regions or LARs.¹⁵ In silico analysis of both human FRA3B and mouse Fra14A2 sequences indicated that they are enriched in high-flexibility DNA regions and potential MARs,³ features suggesting the possibility for a privileged interaction of such orthologous CFSs with the NM. Nevertheless, the evidence indicates that there is no specific sequence or set of sequences that unambiguously identify or correspond to the MAR/LARs¹⁶ and so MAR-finding software is on the whole not a reliable tool.¹⁷

The structural DNA-NM interactions correspond to a nuclear higher-order structure (NHOS). Therefore, considering the evidence that such NHOS is cell-type specific¹⁸⁻²⁰ in the present work, we did a comparative characterization of the local NHOS within and around Fra14A2/*Fhit* in three primary cell types from the mouse: naive B lymphocytes endowed with a proliferating potential and that express Fra14A2 fragility,^{1,12} liver hepatocytes also endowed with high proliferating potential but which do not express Fra14A2 fragility,²¹ and postmitotic cortical neurons intrinsically unable to proliferate. Our results indicate that in lymphocytes the Fra14A2 epicenter of fragility is largely attached to or embedded within the NM so that no typical DNA loops can be detected within the region. In contrast, the corresponding Fra14A2 region is organized in cell-type specific DNA loops in both hepatocytes and cortical neurons. Thus, considering the current knowledge about the structural organization of DNA replication in vivo, we discuss how our results contribute to explain the intrinsic difficulty for the replication of the Fra14A2 region in lymphocytes and so the local induction of chromosomal fragility when such cells are subjected to replication stress, independently of whether or not the corresponding gene may have a tumor suppressor role. We also discuss how our results contribute to explain the tissue specificity of the CFSs.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Animals

For the present study and with the previous approval from the Ethics Committee of Facultad de Medicina,

Universidad Autónoma del Estado de México, male CD-1 outbred mice (weight ~40 g, age 80 days) were used as the source of primary cells. The mice were kept and handled according to the Official Mexican Norm for production, care and use of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999). The mice were euthanized by general anesthesia before the isolation of primary cells.

2.2 | Primary cells

The detailed procedure for isolating primary hepatocytes has been previously described by us.^{14,19} The procedure for isolating naive-B-lymphocytes has also been described previously.^{19,20}

2.3 | Isolation of neuronal nuclei

Neuronal nuclei from cerebral cortex of mice were isolated as previously described.¹⁹

2.4 | Preparation of nucleoids

The residual structures consisting of the NM with the naked structural DNA loops firmly bound to it are known as nucleoids.²² Nucleoids from freshly isolated hepatocytes, naive B lymphocytes, and neuronal nuclei were obtained as previously described.¹⁹

2.5 | DNase I digestion of nucleoids

About 1.8×10^6 nucleoids from hepatocytes or from neurons, or 6.0×10^6 nucleoids from naive B lymphocytes

were suspended in 1.2 mL phosphate-buffered saline-A and mixed with 5.0 mL of digestion buffer (10 mM MgCl₂, 0.1 mM dithiothreitol, and 50 mM Tris, pH 7.2). Digestion of the corresponding samples with DNase I (pancreatic bovine DNase I Sigma) were performed as previously described.^{18,19} The final concentration of DNase I was 0.46 U/mL for hepatocyte and naive B lymphocyte nucleoids, and 0.92 U/mL for neuronal nucleoids.

2.6 | Genomic DNA primers

Pairs of primers defining short but highly specific amplicons spaced ~10 kb from each other along a ~180 kb genomic region that corresponds to the epicenter of Fra14A2/*Fhit* critical zone of fragility (Figure 1 and Table 1) were designed so as to be able to perform efficiently under a common polymerase chain reaction (PCR) program and reaction conditions previously described.¹⁹ The amplicons are < 550 bp, therefore, shorter than the dominant average size (800 bp) of DNA fragments generated by DNase I digestion of naked genomic DNA, and so unlikely to be partially cut by this enzyme. Further pairs of primers defining several short and highly specific amplicons in a ~90 kb telomere-wise and a ~230 kb centromere-wise genomic regions located outside the critical zone of fragility were also designed (Figure 1 and Table 1).

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

PCR amplification of target sequences was performed on NM-bound templates, except when indicated in the main

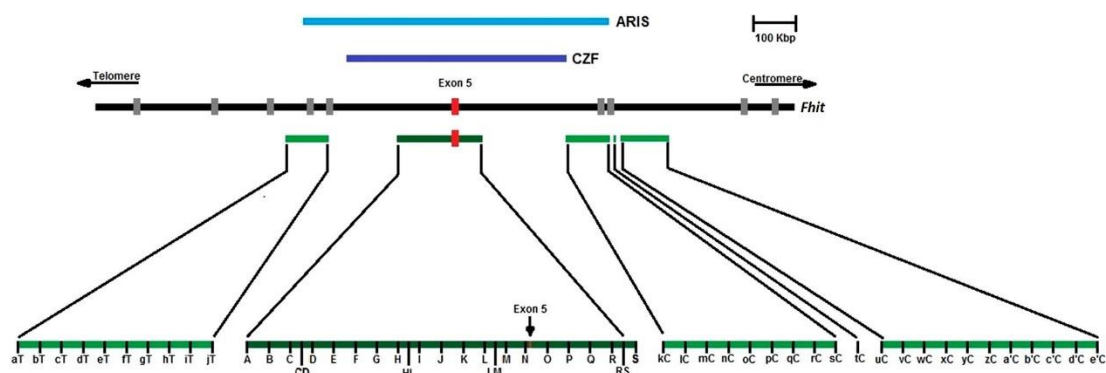


FIGURE 1 Map of the ~1.5 Mb *Fhit* mouse gene (thick black line). Boxes on the main line indicate the position of the ten exons. The position of the ~500 kb critical zone of fragility (CZF) corresponding to Fra14A2 common fragile site (CFS) is indicated. Green bars under the gene indicate the regions where the local nuclear higher-order structure (NHOS) was characterized in the present study. The ~180 kb epicenter of fragility that includes exon 5 (red box) is indicated. ARIS corresponds to a ~700 kb region characterized by its absence of replication initiation sites in the human ortholog *FHIT*, and that overlaps the CZF corresponding to FRA3B in humans and Fra14A2 in the mouse. Letters in the expanded green lines at the bottom indicate the approximate position of the highly specific short targets (Table 1) designed for the characterization of the corresponding local NHOS

TABLE 1 List of highly specific but short targets (amplicons) used in the present study for determining the nuclear higher-order structure within and around the epicenter of fragility of Fra14A2 common fragile site in the murine *Fhit* gene

Amplicon	Forward primer	Reverse primer	Amplicon length (bp)
A	GCTTCAGGCATTTGTCATCCTCC	GAGAACAACCTGCTTAAAGCTGGGC	532
B	GGTCTGACTTCACAAGCAGAA	CTGAGATTAGCAAGTGGCTTTCGG	502
C	GGACTCAGATGGCTGGTTAGCA	TGAATGGTGTAGTCGGGGAGC	432
D	GAATCCAGAGTCTGTTGACAAGGC	GCTTTATACCATTTGGGGCTGCT	448
E	ATGTCGTGTAGGTGGGCTGTGCT	GGAGCATGGGCAACTTATGGGTA	262
F	ACTTCCCCTCTCTGAGATCCAT	AGGTCCCTTTCCTTAGCTGAAGAG	438
G	GATTTTCAAGTGCTGGGGCATG	GTCAACAAGAGCAAAGTGGAGCAAC	419
H	ACATTAGGACAGGAGCAGAGCATG	GGTCCATGTTAGCCTCAACTTCCA	419
I	GAAGCCTTGTAGTCCCTCCTTTGTA	CACAAACCACCTGAAGCTAATAAGG	465
J	GCATCTGGTGTGGCTTTTATTC	CCCTTCCAGCAAACAGAAAGTTAG	481
K	TGGAATGATGACCACCTGTAGCTC	TTCTAGGAACCTCGCCAGAACCT	292
L	AGGAATGAGTACCCTTGGGAAGTG	CCCTCAGACTAAGTTGCGATCATG	368
M	GCCACTGGTTTCAATAGCCTTG	CTACCTCTTGTGCCATGTGTCA	258
N	AAGGTTGCTTTGTACCCAAGGAG	CCTGGAATTTCCCATCTCGCTAG	425
O	TGAGCAGGAGATACTCAGACCA	CATCCACAATCATAGGCAGAGAGG	393
P	GCTACCAAGGCATGTTGCTAACAG	CCCAAGTATTTACATCCCAGCC	292
Q	TCAGCACCCCTCCTACCAGTATT	CATCCCCAACAGATGGAGTATAG	271
R	GTGGACTAGACAACAGAGTACTGGG	GGACCAAACATGAGGGCTCAG	294
S	CTTCTGGGGGAAAATACCATAGGC	GTTTGGCAGACCTACTGGACTAAC	360
aT	GAAGCTGGCGATTCCCTTGTAGT	GAATAAAGTCAGGCTCTGGGACTG	353
bT	AAGTCAGGAGGTGAGACCACTTAGG	GGTAGCTCTGTCCATACCCTTGG	290
cT	TGAACTGGACTGTTGGGCATAGT	TGGTGGGGATGATGGCATAA	265
dT	CATGCCTGACCACCCATGATAT	TGGACCTGGAGAGATGATTTAGCC	468
eT	TTGGTTTGACACGGCAATGG	CCCCACACACTTCCCTCTTATCAA	465
fT	AAGACTTCCCTGCTGAATGCTC	GGACTCTACTGTTTGCCTGTTCC	287
gT	CCCTGACTAAAACACTCCTCACCTG	GGCAGAGCATGTGATTGTGGTACA	434
hT	CAAGCCTGGTCCCTAGTAAGTGA	GGACTGGACTGCCTTTTCTTCAGT	310
iT	GGGTACAAGGCAGTGGTAGAACAC	GGAAAAGAGGAGAGAAGTGGGGTC	306
jT	GCTTAAAGGGAAGTGTGGGGA	GGTCACCATAACCTCCAATGACTT	340
kC	GTAATGAGGTCTGACCAGCCT	GGTGACACTGATGTGACACTTTGC	298
lC	TCTGTGTGCTGTTTCTCTGAGGAGG	GGATGCTGCCTTGCTTATCTTCTG	450
mC	GGTCACCATAGTCTTCACAGTCCC	TGCCTCCAGTCATGCTACCA	253
nC	GATATGTAGGAGCAGATGGGCGT	GGGTCTAAAGGCTCATGGGAAGAT	345
oC	GTAACACTGGCTTTCTCTGCTGC	GAGGGGTGGTCTCTCATATTCTT	433
pC	TGCTCCTGATGAAAGAAAGCTATTC	GGATTTTACCACGCTCATTATGACA	367
qC	GTTGTGTGTGGGGTAACCAAGTAA	CCACTGCTGGAGACTTTTCTCTCT	499
rC	GTTAATGGATGGCAGAGCACCTC	CCTGATGGTCTCACTTGACAACCT	485
sC	AAAGGAGTTGCTGTACCTGAGTG	GCATGGACAAGGCAGGATATTTT	458
tC	TCCTCTGTACGGGAAAAGTGAAC	CAGCGTGAGACCATGTATCAACTG	550
uC	GCCACCCTTCTGCTGAATA	CCCATATCTCTGATTCCAGCCTTG	450
vC	AATCAAGATCGCAGCCATGAGC	GCCCTCCCTCAAGCATGTATAAGTC	296
wC	CTAGACCTTATGAGAGAGGAGGGGA	GTGGACAGCAAAGAGATCCTTCCCT	310
xC	CTGGTTTTGTGATAGAGCAAGGGG	GGTCGCTTTTGAATCACCTGGTC	275
yC	CAAAGGCAGAGGGTCTAAGAA	AAGCGTAGGGTTCGAAACCACT	274

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Amplicon	Forward primer	Reverse primer	Amplicon length (bp)
zC	GACTAGCAACAGACGTTCTCCTTCC	CCACGGAACCCAACAGTGTTAA	253
a'C	TTTGGTCCCCACCAGAGCAGTA	GAAGGCAGGTAATCCTACAGGAGG	285
b'C	AGGTCAAGCACCTTCTTACAGAGC	CCAGAGCTGTCAACAGTCACACAA	495
c'C	TCCCCAGTTCAGATAAGTTCACC	CCACGTAGTCAACCAAATGAGACC	285
d'C	TTCTTTGCCTGGTCCCTGGA	GATAAAGGTGGACGGGGCTTAA	418
e'C	TGATGCTGTTGTCTTCCCCATGTC	CCTCTGTGAATCACTACCCTTCCA	320
CD	TTCCCACTGATCCTACCTGAAATG	GCACTGACAGCACAGAAATCTTTG	383
HI	GGAAGCTATGTGCAGACAGTTGTG	GCCTTCACACCACAAGTACTGACA	363
LM	GGACATCTGGGTTAGGAGGGA	TTCCAGTCGGATGCACACCA	200
RS	ACTGGTAGCCTCAACTTCTGACCC	GGATAACTGGGGGAAGAACAGG	442

text. Details of the PCR sample preparation, reaction conditions, and analysis of the resulting amplicons have been previously described.¹⁹

2.8 | Positional mapping of target sequences relative to the nuclear matrix

The detailed protocol for inferring the NHOS of a given genomic region from mapping the position of short target

sequences (belonging to such a region) relative to the nuclear matrix, has been previously published and it is freely available for download on the www.¹⁸ Nevertheless, the general strategy (as applied in the present work) is described in Section 3.2. It must be pointed out that physical location is not statistical but a factual spatial property. Therefore, in Tables 2-5 we provide the corresponding number of replica experiments (n) for allocating the target sequences to specific topological

TABLE 2 Location in cortical neurons of the 19 targets within the epicenter of fragility of Fra14A2/*Fhit* to specific topological zones relative to the NM, according to experimental results as depicted in Figure 3 ($n = 4$)

Amplicon	Topological zones relative to the NM (neurons) $n = 4$				
	Control	Distal	Proximal	Very close	Embedded
A	+	+	+
B	+	+	+
C	+	+	+
D	+	+	+	+	...
E	+	+	+	+	...
F	+	+	+
G	+	+	+	+	...
H	+	+
I	+	+
J	+	+	+
K	+	+	+	+	...
L	+	+	+	+	...
M	+	+	+	+	+
N	+	+	+
O	+	+	+	+	...
P	+	+	+	+	...
Q	+	+
R	+	+	+	+	...
S	+	+	+	+	...

Abbreviation: NM, nuclear matrix.

TABLE 3 Location in primary hepatocytes of the 19 targets within the epicenter of fragility of Fra14A2/*Fhit* to specific topological zones relative to the NM, according to experimental results as depicted in Figure 3 ($n = 6$)

Amplicon	Topological zones relative to the NM (hepatocytes) $n = 6$				
	Control	Distal	Proximal	Very close	Embedded
A	+	+	+
B	+	+	+
C	+	+	+	+	...
D	+	+	+	+	...
E	+	+	+	+	+
F	+	+	+
G	+	+	+	+	...
H	+	+	+
I	+	+	+
J	+	+	+	+	...
K	+	+	+	+	...
L	+	+	+	+	+
M	+	+	+	+	...
N	+	+
O	+	+	+
P	+	+	+	+	+
Q	+	+	+	+	...
R	+	+	+	+	+
S	+	+	+	+	...

Abbreviation: NM, nuclear matrix.

zones relative to the NM in different cell types. In each corresponding set of replica experiments (Tables 2-5) the results were the same.

3 | RESULTS

3.1 | Cell-type specific kinetics of digestion by DNase I of nuclear matrix-bound DNA

The nuclear matrix (NM) is operationally defined as the residual nuclear substructure that results from extracting the nucleus with nonionic detergents, high salt, and DNase.^{23,24} The current view is that the NM is a diffuse and dynamic compartment, instead of a stable framework, which somehow is involved in the structural and functional organization of the nucleus.¹³ The NHOS, defined by the structural DNA-NM interactions, can be studied in nucleoids, preparations obtained by extracting the nucleus for NM but without using DNase, thus consisting of the set of structural DNA loops bound to the NM. These loops are supercoiled but wholly devoid of chromatin proteins.²² The naked DNA loops show differential sensitivity to the action of DNase I depending on two parameters that hinder the

enzyme's action: the presence of supercoiling and the proximity of DNA to the NM. Nicking of DNA by a single-stranded nuclease such as DNase I²⁵ induces the loss of supercoiling so that after a given incubation time only the NM proteins become a steric hindrance to the enzyme's action. Nucleoids incubated in presence of a very limited concentration of DNase I show a cell-type specific kinetics of loop DNA digestion that allows the fractionation of bulk genomic DNA in four topological zones^{18,19} relative to their proximity to the NM (Figure 2). It can be appreciated that both neurons and hepatocytes from mice have roughly 20% of the bulk DNA embedded within the NM and this is the DNA fraction that includes the DNA loop regions anchored or attached to the NM. The NM-embedded DNA is not easily accessible to DNase I and so it is resistant to digestion despite very long incubation times with the enzyme.¹⁸ In contrast, in the naive B lymphocytes from mice only ~2% of bulk DNA is embedded within the NM (Figure 2C). However, this is consistent with previous reports in rat lymphocytes^{18,20} and with the fact that the NM is less dense in naive lymphocytes that do not express lamin A/C,²⁶ a major component of the NM in cells at advanced stages of differentiation.^{27,28}

3.2 | Positional mapping of target sequences relative to the nuclear matrix

The previous approach is the basis of a protocol for mapping the position of whichever nonrepetitive DNA sequence relative to the NM by PCR amplification of the target sequence in nucleoid samples containing differential proportions of bulk DNA (depending on the DNase incubation time) still bound to the NM.²⁹ Moreover, considering that there is no universal property at the nucleotide sequence level that may unambiguously identify the MAR/LARs in a given region of genomic DNA, this method coupled to some elementary topological principles allows us to determine the local NHOS (the organization into structural DNA loops) of a given, nonrepetitive, genomic region.¹⁸ Thus we designed a strategy for determining the organization into structural DNA loops of the genomic region corresponding to Fra14A2/*Fhit* epicenter of fragility in the three primary cell types. Nineteen short but highly specific amplicons (labeled A-S), spaced some 10 kb from each other, were designed along ~180 kb that fit within the critical zone of fragility (CZF) including *Fhit* exon 5 (Figure 1). Samples corresponding to the nucleoids from naive B lymphocytes, hepatocytes, and neurons subjected to DNase I digestion

for different times (according to the kinetics shown in Figure 2) were used for amplification by PCR of the target sequences (Table 1) on NM-bound templates. The position of each target sequence relative to the NM may be inferred from the pattern of amplification in nucleoid samples corresponding to the four topological zones relative to the NM (as shown in Figure 3). All target amplicons were previously checked for efficient amplification under the same PCR program using as template bulk genomic DNA from the three different cell types. In this protocol the relevant data is whether or not the target amplicon is detected in the corresponding nucleoid sample by image-analysis software. Thus the spatial position of a given target relative to the NM corresponds to the last topological zone in which the amplification signal is detectable (Figure 3 and Tables 2-4).

3.3 | Nuclear higher-order structure of FRA14A2 epicenter of fragility

With the previous data we can infer the organization in structural DNA loops of the ~180 kb region, corresponding to the epicenter of fragility of *Fhit*, in the three different cell types as shown in Figure 4. In hepatocytes

TABLE 4 Location in naive B lymphocytes of the 19 targets within the epicenter of fragility of Fra14A2/*Fhit* to specific topological zones relative to the NM, according to experimental results as depicted in Figure 3 ($n = 4$)

Amplicon	Topological zones relative to the NM (lymphocytes) $n = 4$				
	Control	Distal	Proximal	Very close	Embedded
A	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+
C	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+
F	+	+	+	+	+
G	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+
I	+	+	+	+	+
J	+	+	+	+	+
K	+	+	+	+	+
L	+	+	+	+	+
M	+	+	+	+	+
N	-	-	-	-	-
O	+	+	+	+	+
P	+	+	+	+	+
Q	+	+	+	+	+
R	+	+	+	+	+
S	+	+	+	+	+

Abbreviation: NM, nuclear matrix.

TABLE 5 Location in naive B lymphocytes of 31 targets spanning specific genomic regions telomere-wise and centromere-wise from *Fhit* exon 5 (Figure 1) to specific topological zones relative to the NM, according to experimental results as depicted in Figure 6 ($n = 5$)

Amplicon	Topological zones relative to NM (lymphocytes) $n = 5$				
	Control	Distal	Proximal	Very close	Embedded
aT	+	+	+	+	+
bT	+	+	+	+	...
cT	+	+	+	+	+
dT	+	+	+	+	+
eT	+	+	+	+	+
fT	+	+	+	+	+
gT	+	+	+	+	+
hT	+	+	+	+	+
iT	+	+	+	+	+
jT	+	+	+	+	+
kC	+	+	+	+	...
lC	+	+	+	+	...
mC	+	+	+	+	+
nC	+	+	+	+	...
oC	+	+	+	+	...
pC	+	+	+	+	...
qC	+	+	+	+	...
rC	+	+	+	+	...
sC	+	+	+	+	...
tC	+	+	+	+	...
uC	+	+	+	+	+
vC	+	+	+	+	...
wC	+	+	+	+	+
xC	+	+	+	+	...
yC	+	+	+	+	+
zC	+	+	+	+	+
a'C	+	+	+	+	+
b'C	+	+	+	+	...
c'C	+	+	+	+	...
d'C	+	+	+	+	+
e'C	+	+	+	+	+

Abbreviation: NM, nuclear matrix.

and neurons the region is organized into cell-type specific structural DNA loops. In both cases the tract corresponding to the exon 5 (N) is located away from the NM. However, in B lymphocytes the ~180 kb region appears to be devoid of DNA loops and wholly embedded within the NM (Figure 4C). Nevertheless, considering that the target amplicons are spaced ~10 kb from each other it might be the case that some intervening regions between the target amplicons are not really embedded within the NM. Thus we designed four amplicons corresponding to short intervening sequences occurring roughly at midpoint

within four 10 kb regions defined by some pairs of the original targets (CD, HI, LM, and RS in Figure 1). The four intervening targets were also readily amplified on NM-bound templates corresponding to the DNA fraction embedded within the NM in B lymphocytes (Figure 5A) thus supporting the notion that the whole region corresponding to *Fhit* epicenter of fragility is largely embedded within the NM in naive B lymphocytes.

It was also remarkable that we could not directly assert the position relative to the NM of exon 5 in B lymphocytes, given that it was not possible to amplify the

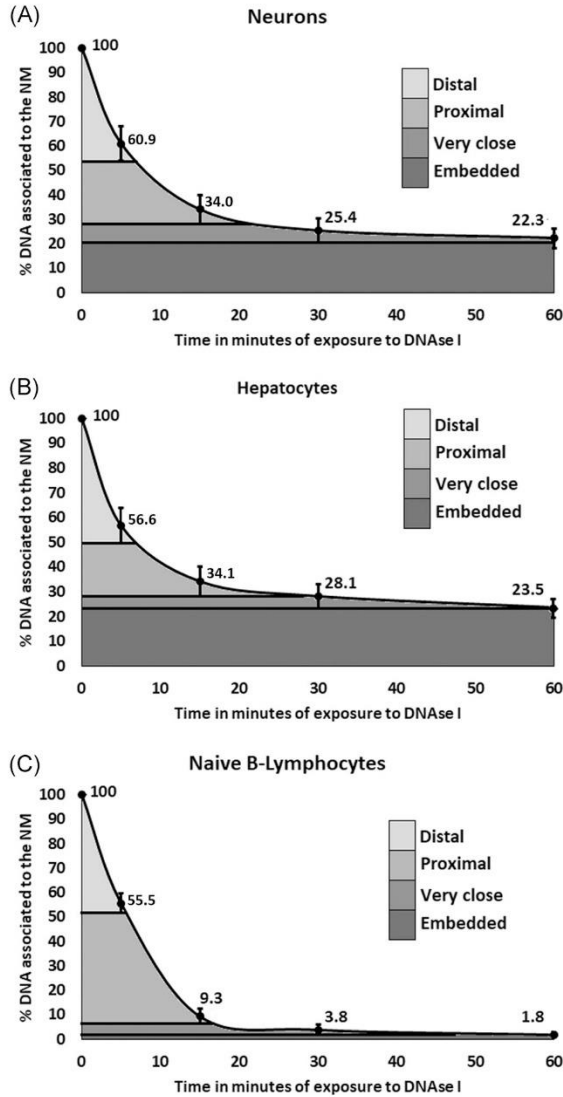


FIGURE 2 Kinetics of digestion with DNase I of nuclear matrix-bound DNA. Nucleoids consisting of the whole set of naked, supercoiled, genomic DNA loops anchored to the nuclear matrix (NM) from cortical neurons (A), primary hepatocytes (B), and naive B lymphocytes (C) from mice, were digested with a very limited concentration of DNase I, for 0, 5, 15, 30, and 60 minutes, and after digestion the residual genomic DNA still bound to the NM was quantified. Each digestion time point indicates the average percentage of bulk DNA still bound to the NM and the corresponding SD defined the lower boundary of each topological zone relative to the NM: distal, proximal, very close, embedded ($n = 7$ for neurons; 6 for hepatocytes, and 4 for naive B lymphocytes). In all cases, under the experimental conditions applied (Materials and Methods), the slope of the digestion curve remains equal or very close to zero after 60 minutes and at least up to 4 hours of incubation with the enzyme

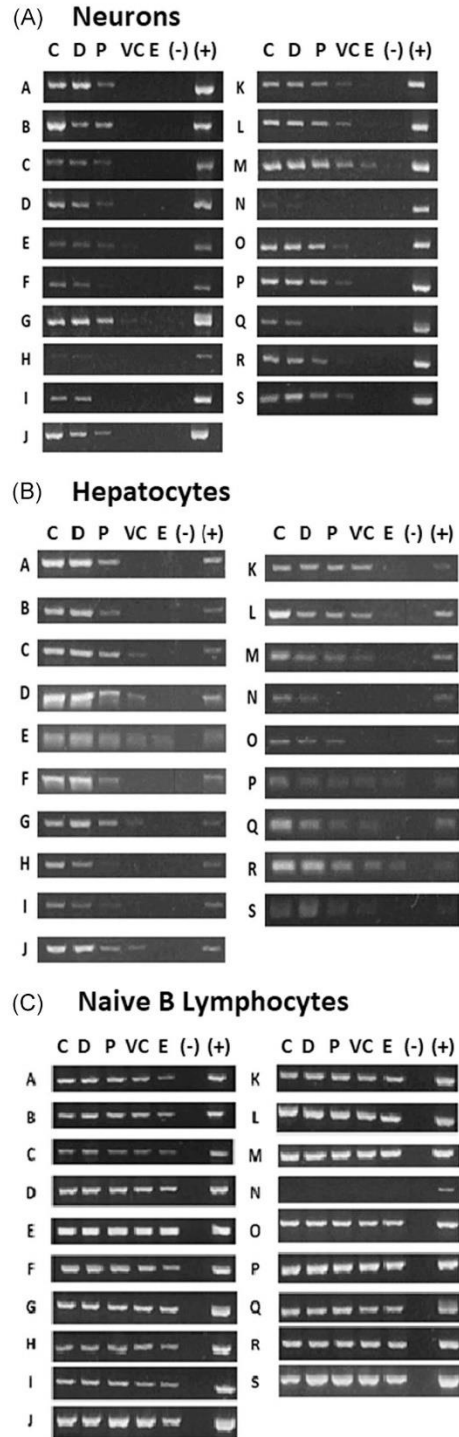


FIGURE 3 Continued.

target N, located next to the 5' end of exon 5, in the NM-bound DNA templates obtained from nucleoids of B lymphocytes (Figure 3C), despite that N is easily amplifiable in bulk genomic DNA from such cells (Figure 3C). Therefore, B lymphocyte nucleoids digested for 60 minutes with DNase I (and so containing ~2% of genomic DNA embedded within the NM) were treated with proteinase K or DNazol so as to destroy the NM and release the NM-bound DNA. The free DNA was recovered and used as template for amplification by PCR of target N. The result was positive (Figure 5B) indicating that the genomic region corresponding to exon 5 (the main core of fragility of Fra14A2) interacts with the NM in a very special fashion that precludes its amplification when it is still bound to the NM.

Previous work with nucleoids from rat primary cells indicates the overall presence of supercoiled DNA loops in naive B lymphocytes.²⁰ Therefore, we designed 10 short target amplicons (aT-jT) spanning a ~90 kb genomic region, located ~ 280 kb telomere-wise from exon 5 (Figure 1) with the purpose of mapping their position relative to the NM and so to determine the NHOS of such ~90 kb region in B lymphocytes, roughly half of such ~ 90 kb fits within the 700 kb region (ARIS) known to be devoid of replication initiation sites in FRA3B/FHIT and the other half is beyond it (see Figure 1). We also designed 21 target amplicons spanning a ~230 kb region located ~ 240 kb centromere-wise from exon 5. About half of such targets still fall within the ARIS region while the other half are located just beyond the 3' end boundary of ARIS (Figure 1). The aim was also to determine the NHOS of such ~230 kb region in B lymphocytes. Thus the mapping results (Figure 6 and Table 5) were used for inferring the corresponding NHOS. The results shown that the ~



FIGURE 3 Positional mapping relative to the NM of 19 highly specific short targets located within Fra14A2/*Fhit* epicenter of fragility. The photos correspond to the results of a typical mapping experiment for each cell type. The amplicons were scored as positive or negative by image-analysis software. Nucleoids from the indicated cell types were digested with DNase I (according to the kinetics in Figure 2) and the targets (A to S) were amplified on the NM-bound templates previously treated with the enzyme for 0 (C), 5 (D), 15 (P), 30 (VC), and 60 (E) minutes, corresponding to four topological zones (distal, proximal, very close, and embedded) relative to the NM. The location of a target to a given topological zone corresponded to the last one in which the target amplicon was detected by the software (Tables 2-4). (–) Negative amplification control without template. (+) Positive amplification control using genomic DNA as template. Notice that in the case of naive B lymphocytes the target N could not be amplified on NM-bound templates (3C). NM, nuclear matrix

90 kb genomic region located ~ 280 kb telomere-wise from *Fhit* exon 5 is largely embedded within the NM save for a single target point (bT in Figure 7). In the case of the ~ 230 kb genomic region located ~ 240 kb centromere-wise from exon 5, the results indicate that it is organized in at least seven very short DNA loops but it also presents 10 to 20 kb patches of DNA embedded within the NM (Figure 8). Hence the ARIS region that overlaps with *Fhit* critical zone of fragility is either largely embedded within the NM or interacts very closely with the NM.

4 | DISCUSSION

The present work shows that in primary hepatocytes and postmitotic neurons from mice the region corresponding to Fra14A2/*Fhit* epicenter of fragility is organized in cell-type specific DNA loops, so that only some tracts of DNA are anchored or embedded within the NM while most DNA is away from the NM (Figure 4A,B). In both cases the local NHOS corresponds to varied sized but nevertheless typical DNA loops. Such NHOS correlates with the fact that Fra14A2 is not a CFS in proliferating hepatocytes,²¹ that although usually quiescent display a most remarkable proliferating capacity after partial hepatectomy in vivo.³⁰ In contrast, the same genomic region is largely attached or at least embedded within the NM in naive B lymphocytes (Figure 4C) that usually express the Fra14A2 CFS when subjected to replication stress.¹ Moreover, the exon 5 that coincides with the main core of fragility seems to be bound to (or at least to interact with) the NM in a very special fashion, since the target N sequence that flags the 5' end of exon 5 cannot be directly amplified on NM-bound templates (Figure 3C) and so it is necessary to eliminate the NM so that the corresponding target DNA becomes amplifiable (Figure 5B). This is remarkable given that all the other targets that are either directly bound to or at least embedded within the NM are easily amplified in the NM-bound templates (Figure 3C). Indeed, we have previously applied the same approach for determining the local NHOS in several genomic regions from different chromosomes in different primary cell types as well as in different cell lines (eg, Maya-Mendoza et al,¹⁴ Rivera-Mulia & Aranda-Anzaldo,¹⁸ Silva-Santiago et al,¹⁹ Trevilla-García & Aranda-Anzaldo,²⁰ and Maya-Mendoza & Aranda-Anzaldo²⁹) and target N is the first case in our experience of a short genomic DNA sequence that cannot be directly amplified on NM-bound templates.

The exact nature of the DNA-NM interactions remains puzzling to this day since, despite intensive search, in

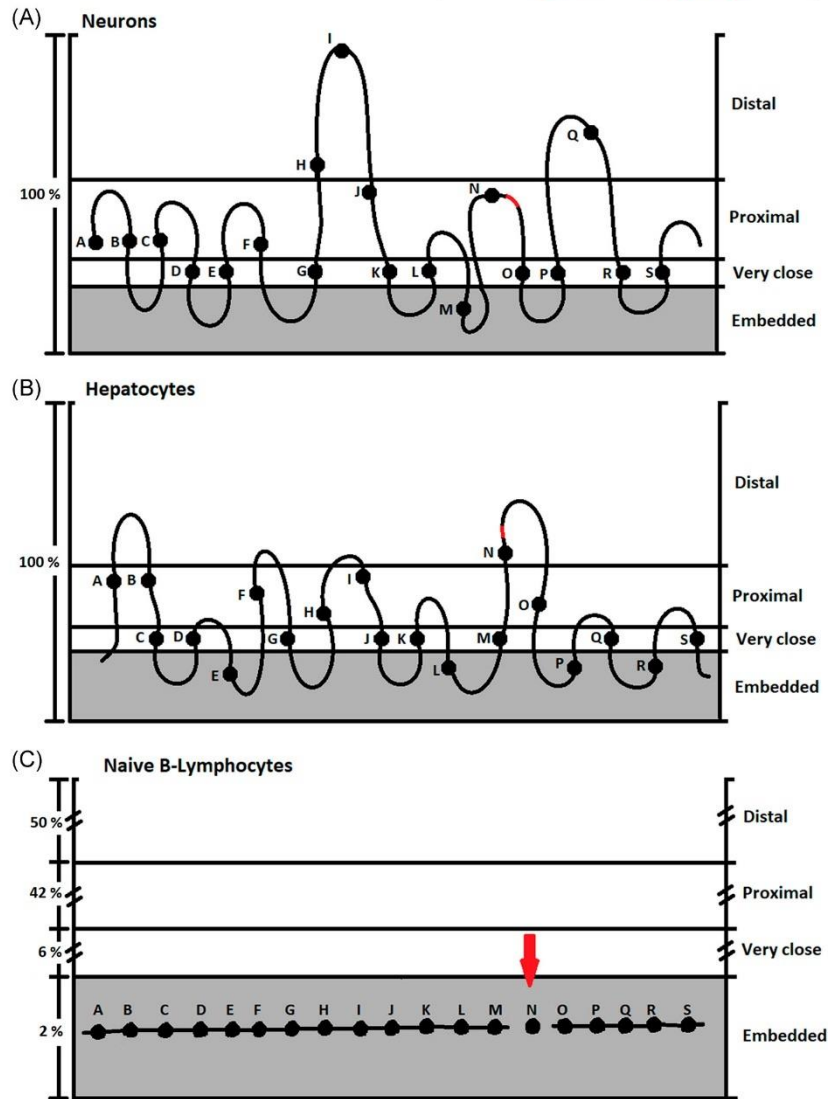


FIGURE 4 Comparative nuclear higher-order structure of Fra14A2/*Fhit* epicenter of fragility in three primary cell types. Data from Tables 2-4 were used for positioning relative to the NM each of the 19 targets spanning the ~ 180 kb epicenter of fragility (Figure 1). This allowed us to infer the configuration of the DNA loops anchored to the NM in cortical neurons and hepatocytes. However, in the case of naive B lymphocytes the whole set of targets was bound/embedded within the NM (see also Figure 5B) indicating the absence of DNA loops. The y axis on the left indicates the percentage of bulk DNA in each topological zone according to cell type (Figure 2). The red arrow highlights the target N corresponding to exon 5, that in B lymphocytes was amplified in the DNA fraction embedded within the NM but only after removal of the NM (Figure 5B) at a difference of the other targets embedded within the NM that were readily amplified on NM-bound templates corresponding to the NM-embedded fraction (Figure 3C and Table 4). NM, nuclear matrix

metazoans nobody has identified a specific sequence or set of sequences that determine the so-called MAR/LARS able to attach to the NM.¹⁶ Moreover, the same DNA sequence may or may not attach to the NM depending on other variables.³¹ The current evidence suggests that DNA-NM interactions correspond to "indirect readouts,"

not determined by specific DNA nucleotide sequences or protein amino-acid sequences, and points towards local DNA topology as a main determinant of the affinity of NM proteins for DNA.³² In any case, the structural DNA-NM interactions are of a higher stability than the interactions between chromatin proteins and DNA, since

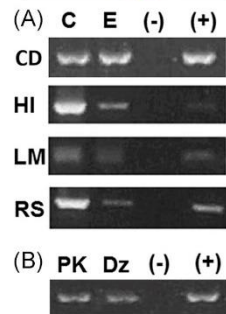


FIGURE 5 (A) positional mapping relative to the NM of four intervening targets also located within the epicenter of Fra14A2/*Fhit* fragility (Figure 1). The four targets were readily amplified on NM-bound templates from naive B lymphocytes corresponding to the NM-embedded fraction (E), further corroborating that the epicenter of fragility is largely bound/embedded within the NM ($n = 3$). (B) The target N corresponding to exon 5, is readily amplified in DNA corresponding to the NM-embedded fraction from naive B lymphocytes but only after the elimination of the NM component either by proteinase K (PK) or DNazol (Dz) treatment. (–) Negative amplification control without template. (+) Positive amplification control using genomic DNA as template. NM, nuclear matrix

the last ones do not survive the NM-extraction procedure.²² However, for the time being we can only speculate about the reason why target N cannot be directly amplified on NM-bound templates and yet, it is readily amplified in the precipitated DNA recovered after elimination of the NM.

Both classical and recent evidence suggests that the high-salt resistant, structural DNA loops bound to the NM correspond to the actual replication units (replicons) in metazoan cells.^{15,33,34} Other classical works indicate that *in vivo* the genomic DNA is replicated at fixed sites organized on the NM (Fritz et al¹³ for a review). Moreover, the spatio-temporal segregation of replication and transcription in nuclear foci known as replication or transcription factories that do not overlap³⁵ implies an underlying structural organization. Varied evidence and theoretical considerations suggest that within the nucleus DNA is replicated by a reeling mechanism in which the template is pulled down towards fixed replication factories.³⁶ Experimental evidence of DNA replication *in vivo* supports the reeling mechanism³⁷ and suggests that replication foci are organized upon or at least with respect to the NM.³⁸ On the other hand, in metazoans no specific DNA sequences that may perform as dedicated origins of replication (ORI) are known. The standing evidence suggests that metazoan ORIs are determined by topological features of DNA, such as negative supercoiling,³⁹ a feature that is particularly intense nearby

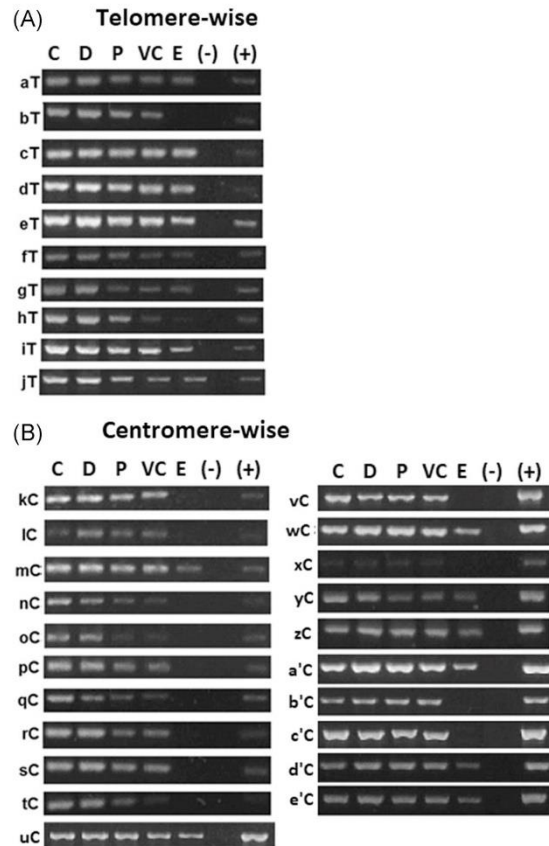


FIGURE 6 Positional mapping relative to the NM in naive B lymphocytes of 10 targets spanning a ~ 90 kb region of *Fhit* (Figure 1) located ~ 280 kb telomere-wise from exon 5 (A) and 21 targets spanning a ~ 230 kb region (Figure 1) located ~ 240 kb centromere-wise from exon 5 (B). B lymphocyte nucleoids were digested with DNase I and the targets were amplified on the NM-bound templates previously treated with the enzyme for 0 (C), 5 (D), 15 (P), 30 (VC), and 60 (E) minutes and corresponding to four topological zones (distal, proximal, very close, and embedded) relative to the NM. The location of a target to a given topological zone corresponded to the last one in which the target amplicon was detected by the software (Table 5). (–) Negative amplification control without template. (+) Positive amplification control using genomic DNA as template. NM, nuclear matrix

the anchors or attachments of DNA loops to the NM but the anchors themselves are not the ORIs.⁴⁰ Indeed, both the stable and dynamic association of ORIs to the NM has been described⁴¹ and this is consistent with the evidence for the existence of constitutive and facultative ORIs in metazoan cells.⁴² In any case, in metazoan cells both the recognition of the potential ORIs and the initiation of DNA replication require a finely tuned degree of negative supercoiling.⁴³

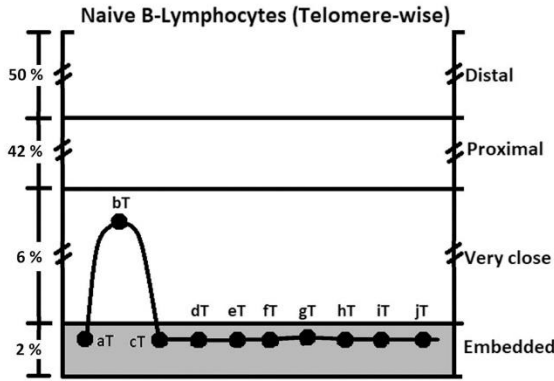


FIGURE 7 Nuclear higher-order structure of the ~90 kb region located ~280 kb telomere-wise from *Fhit* exon 5 (Figure 1) in naive B lymphocytes. Data from Table 5 were used for inferring the configuration of DNA loops in this region. The results indicate the presence of a single but very short DNA loop while most of the region is embedded within the NM. NM, nuclear matrix

In B lymphocytes able to express the CFS Fra14A2, the ~180 kb genomic region centered in exon 5 of *Fhit* (Figure 1) is largely embedded within the NM and so devoid of DNA loops (Figure 4C) that may perform as appropriate replicons. Moreover, our results also indicate the absence of typical replicons along the 700 kb ARIS region that overlaps with in Fra14A2/*Fhit* CZF (Figures 1,7,8) and that was previously characterized by its absence of replication initiation sites in the human ortholog FRA3B,⁵ suggesting that the reason for this scarcity of replication initiation sites is the atypical local NHOS. Altogether, these findings suggest a structural explanation for the absence of replication initiation sites along the CZF of FRA3B, and the "intrinsically difficult

to replicate" nature of both Fra14A2 and FRA3B, since it is difficult to visualize how the reeling mechanism for DNA replication *in vivo*³⁶⁻³⁸ may operate in such regions largely embedded within the NM and so devoid of the DNA topological features necessary for defining potential ORIs. Indeed, it is known that replication causes topological stress and the presence of stable protein-DNA complexes exacerbate such a stress as this facilitates DNA replication fork arrest.⁴⁴ Moreover, the tight interaction between Fra14A2 and the NM would make difficult the replication fork rotation or fork reversal movements necessary for dissipating the topological stress, thus leading to local genomic instability and fragility since under such conditions topoisomerase activity may not be enough for dissipating the topological stress.⁴⁴

As mentioned above, previous work indicates the overall presence of supercoiled DNA loops in naive B lymphocytes, although the lymphocyte loops are more fragile (being easily destabilized and broken by mechanical force) when compared with hepatocyte DNA loops.²⁰ This is consistent with the fact that naive lymphocytes do not express lamin A/C that is a major component of the internal NM²⁶ and so lamin A/C is only expressed in further-differentiated lymphocytes.²⁷ However, the presence throughout the naive B lymphocyte genome of typical, supercoiled DNA loops with average size of ~76 kb is confirmed by the global analysis of the NHOS in the corresponding nucleoids (see Figure S1 and Table S1) and this indicates that in mouse lymphocytes most of the genome is away from the NM instead of tightly attached to it, thus reinforcing the notion that the fragility of Fra14A2 is related to its peculiar tight interaction with the NM, although this

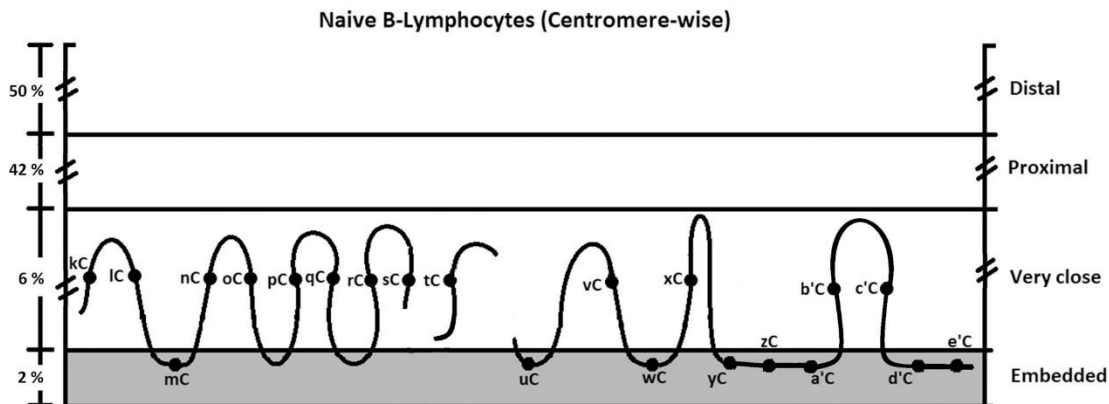


FIGURE 8 Nuclear higher-order structure of the ~230 kb region located ~280 kb centromere-wise from *Fhit* exon 5 (Figure 1) in naive B lymphocytes. Data from Table 5 indicate that the region is organized into at least seven very short DNA loops but that it also includes 10 to 20 kb patches of DNA embedded within the NM. NM, nuclear matrix

awaits confirmation by the characterization of the NHOS at further CFS of the mouse genome.

We have previously reported that both at the local and large-scale levels the NHOS is cell-type specific.¹⁸⁻²⁰ Therefore, considering the fact that the NM composition is cell-type specific^{45,46} but not the genome nucleotide sequence, a reasonable assumption is that the composition of the NM in naive B lymphocytes might be a determining factor for the peculiar interaction between the Fra14A2 region and the NM observed in such cells, given that the same genomic region is organized in nonremarkable but cell-type specific supercoiled loops in both hepatocytes and neurons.

On the other hand, considering that cell-type specific transcription is more a statistical construction than a biological reality at the single-cell level, given the heavily stochastic nature of transcription,⁴⁷ there is scope for the random occurrence of both qualitative and quantitative changes in NM composition at the single-cell level that may support the tight interaction between Fra14A2 and the NM in a given cell from a cell type that usually do not express Fra14A2 fragility. This may lead to the incidental rupture and deletion (after DNA repair) of such a region if that cell happens to undergo active proliferation, even more if it is subjected to replication stress, such as that induced by sustained oncogene expression.⁴⁸ The resulting cellular progeny may then display the deletion of Fra14A2/*Fhit* as a clonal feature independently of whether or not the corresponding gene is a tumor suppressor.

In Chinese hamster CHO cells it has been described a recombination hotspot that implies chromosome fragility in a genomic region of the Chinese hamster chromosome 1 that includes four unrelated genes. It is remarkable that in this case the epicenter of fragility corresponded to a 40 kb LAR tightly bound to the NM.⁴⁹ Thus our results are consistent with the suggestion that DNA regions that interact tightly with the NM are potentially involved in illegitimate recombination and chromosome fragility.⁵⁰

ACKNOWLEDGMENTS

The authors' wish to thank Prof Fernando López-Casillas (IFC-UNAM) and Prof Juan Pablo Pardo-Vázquez (Facultad de Medicina-UNAM) for their critical advice and comments related to this study. Dr Claudia V Rivera-Cerecedo at IFC-UNAM for providing the CD-1 mice stock. While performing this study R G-P was a CONACYT Research Scholar registered within the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas at IFC-UNAM, this study partially fulfills the requirements of R G-P for obtaining the PhD degree.

FUNDING INFORMATION

This study was sponsored by CONACYT-Mexico (grant 176794 to AA-A). The funding organization had no role in the preparation of data for publication or in the writing of the manuscript or in the decision to send it for publication.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflict of interests.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Armando Aranda-Anzaldo  <http://orcid.org/0000-0002-5583-5465>

REFERENCES

- Palumbo E, Russo A. Common fragile site instability in normal cells: lessons and perspectives. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019;58:260-269.
- Bhowmick R, Hickson ID. The "enemies within": regions of the genome that are inherently difficult to replicate. *F1000Res*. 2017;6:666. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11024.1>.
- Matsuyama A, Shiraishi T, Trapasso F, et al. Fragile site orthologs FHIT/FRA3B and Fhit/Fra14A2: evolutionarily conserved but highly recombinogenic. *Proc Natl Acad Sci*. 2003; 100:14988-14993.
- Shiraishi T, Druck T, Mimori K, et al. Sequence conservation at human and mouse orthologous common fragile regions, FRA3B/FHIT and Fra14A2/Fhit. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98: 5722-5727.
- Letessier A, Millot GA, Koundrioukoff S, et al. Cell-type specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site. *Nature*. 2011;470:120-123.
- Hosseini SA, Horton S, Saldivar JC, et al. Common chromosome fragile sites in human and murine epithelial cells and FHIT/FRA3B loss-induced global genome instability. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013;52:1017-1029.
- Le Tallec B, Dutrillaux B, Lachages AM, Millot GA, Brison O, Debatisse M. Molecular profiling of common fragile sites in human fibroblasts. *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18:1421-1423.
- Le Tallec B, Millot GA, Blin ME, Brison O, Dutrillaux B, Debatisse M. Common fragile site profiling in epithelial and erythroid cells reveals that most recurrent cancer deletions lie in fragile sites hosting large genes. *Cell Rep*. 2013;4:420-428.
- Wali A. FHIT, doubts are clear now. *Sci World J*. 2010;10: 1142-1151.
- Zimonjic DB, Druck T, Ohta M, et al. Positions of chromosome 3p14.2 fragile sites (FRA3B) within the FHIT gene. *Cancer Res*. 1997;57:1166-1170.

11. Karras JR, Schrock MS, Batar B, Huebner K. Fragile genes that are frequently altered in cancer: players not passengers. *Cytogenet Genome Res.* 2016;150:208-216.
12. Glover TW, Hoge AW, Miller DE, et al. The murine Fhit gene is highly similar to its human orthologue and maps to a common fragile site region. *Cancer Res.* 1998;58:3409-3414.
13. Fritz AJ, Sehgal N, Pliss A, Xu J, Berezney R. Chromosome territories and the global regulation of the genome. *Genes Chromosomes Cancer.* 2019;58:407-426.
14. Maya-Mendoza A, Hernández-Muñoz R, Gariglio P, Aranda-Anzaldo A. Gene positional changes relative to the nuclear substructure correlate with the proliferating status of hepatocytes during liver regeneration. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:6168-6179.
15. Razin SV. 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.* 2001;6:59-69.
16. Ottaviani D, Lever E, Takousis P, Sheer D. Anchoring the genome. *Genome Biol.* 2008;9:201.
17. Evans K, Ott S, Hansen A, Koentges G, Wernisch L. A comparative study of S/MAR prediction tools. *BMC Bioinformatics.* 2007;8:71.
18. Rivera-Mulia JC, Aranda-Anzaldo A. 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.* 2010;17:23-35.
19. Silva-Santiago E, Rivera-Mulia JC, Aranda-Anzaldo A. The set of structural DNA nuclear matrix interactions in neurons is cell type specific and rather independent of functional constraints. *J Cell Biochem.* 2017;118:2151-2160.
20. Trevilla-García C, Aranda-Anzaldo A. Cell-type-specific organization of nuclear DNA into structural looped domains. *J Cell Biochem.* 2011;112:531-540.
21. Sargent LM, Zhou X, Keck CL, et al. Nonrandom cytogenetic alterations in hepatocellular carcinoma from transgenic mice overexpressing c-Myc and transforming growth factor- α in the liver. *Am J Pathol.* 1999;154:1047-1055.
22. Cook PR, Brazell I, Jost E. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J Cell Sci.* 1976;22:303-324.
23. Wilson RHC, Hesketh EL, Coverley D. The nuclear matrix: fractionation techniques and analysis. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;2016(1):pdb.top074518.
24. Engelke R, Riede J, Hegermann J, et al. The quantitative nuclear matrix proteome as a biochemical snapshot of nuclear organization. *J Proteome Res.* 2014;13:3940-3956.
25. Lewin B. *Gene Expression 2.* 2nd edition. New York: John Wiley and Sons; 1980:360-362.
26. Röber RA, Sauter H, Weber K, Osborn M. Cells of the immune and hematopoietic system of the mouse lack lamins A/C, distinction versus other somatic cells. *J Cell Sci.* 1990;95:587-598.
27. Guilly MN, Kolb JP, Gosti F, Godeau F, Courvalin JC. Lamins A and C are not expressed at early stages of human lymphocyte differentiation. *Exp Cell Res.* 1990;189:145-147.
28. Ivanovic-Matic' S, Dinic' S, Vujos'evic' M, Poznanovic' G. The protein composition of the hepatocyte nuclear matrix is differentiation stage specific. *IUBMB Life.* 2000;49:511-517.
29. Maya-Mendoza A, Aranda-Anzaldo A. Positional mapping of specific DNA sequences relative to the nuclear substructure by direct polymerase chain reaction on nuclear matrix-bound templates. *Anal Biochem.* 2003;313:196-207.
30. Abu Rmilah A, Zhou W, Nelson E, Lin L, Amiot B, Nyberg S, L. Understanding the marvels behind liver regeneration. *WIREs Dev Biol.* 2019;8:e340.
31. Heng HHQ, Goetze S, Ye CJ, et al. Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 7):999-1008.
32. García-Vilchis D, Aranda-Anzaldo A. DNA length modulates the affinity of fragments of genomic DNA for the nuclear matrix in vitro. *J Cell Biochem.* 2017;118:4487-4497.
33. Lemaitre JM, Danis E, Pasero P, Vassetzky Y, Méchali M. Mitotic remodeling of the replicon and chromosome structure. *Cell.* 2005;123:787-801.
34. Courbet S, Gay S, Arnoult N, et al. Replication fork movement sets chromatin loop size and origin choice in mammalian cells. *Nature.* 2008;455:557-560.
35. Wei X, Samarabandu J, Devdhar RS, Siegel AJ, Acharya R, Berezney R. Segregation of transcription and replication sites into higher order domains. *Science.* 1998;281:1502-1505.
36. Cook PR. The organization of replication and transcription. *Science.* 1999;284:1790-1795.
37. Rivera-Mulia J, Hernández-Muñoz R, Martínez F, Aranda-Anzaldo A. DNA moves sequentially towards the nuclear matrix during DNA replication in vivo. *BMC Cell Biol.* 2011;12:3.
38. Wilson RHC, Coverley D. Relationship between DNA replication and the nuclear matrix. *Genes Cells.* 2013; 18:17-31.
39. Remus D, Beall E, L, Botchan M, R. DNA topology, not DNA sequence, is a critical determinant for Drosophila ORC-DNA binding. *EMBO J.* 2004;23:897-907.
40. Cayrou C, Coulombe P, Méchali M. Programming DNA replication origins and chromosome organization. *Chromosome Res.* 2010;18:137-145.
41. Ortega JM, DePamphilis ML. Nucleoskeleton and initiation of DNA replication in metazoan cells. *J Cell Sci.* 1998;111(Pt 24):3663-3673.
42. Méchali M. Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:728-738.
43. Takahashi S, Motooka S, Kawasaki S, et al. Direct single-molecule observations of DNA unwinding by SV40 large tumor antigen under a negative DNA supercoil state. *J Biomol Struct Dyn.* 2018;36:32-44.
44. Keszthelyi A, Minchell N, Baxter J. The causes and consequences of topological stress during DNA replication. *Genes.* 2016;7(12):134. pii.
45. Stuurman N, Meijne AM, van Der Pol AJ, de Jong L, van Driel R, van Renswoude J. The nuclear matrix from cells of different origin. *J Biol Chem.* 1990;265:5460-5465.
46. Dent MAR, Segura-Anaya E, Alva-Medina J, Aranda-Anzaldo A. NeuN/Fox3 is an intrinsic component of the neuronal nuclear matrix. *FEBS Lett.* 2010;584:2767-2771.
47. Coskun AF, Eser U, Islam S. Cellular identity at the single-cell level. *Mol Biosyst.* 2016;12:2965-2979.
48. Ozeri-Galai E, Bester AC, Kerem B. The complex basis underlying common fragile site instability in cancer. *Trends Genet.* 2012;28:295-302.
49. Svetlova EY, Razin SV, Debatisse M. Mammalian recombination hot spot in a DNA loop anchorage region: a model for the

- study of common fragile sites. *J Cell Biochem.* 2001;81(Suppl.): 170-178.
50. Razin SV. Chromosomal DNA loops may constitute basic units of the eukaryotic genome organization and evolution. *Crit Rev Eukar Gene Expr.* 1999;9:279-283.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Guadarrama-Ponce R, Aranda-Anzaldo A. The epicenter of chromosomal fragility of Fra14A2, the mouse ortholog of human FRA3B common fragile site, is largely attached to the nuclear matrix in lymphocytes but not in other cell types that do not express such a fragility. *J Cell Biochem.* 2019;1-16.

<https://doi.org/10.1002/jcb.29444>

Referencias

- Allison, D. F., & Wang, G. G. (2019). R-loops: formation, function, and relevance to cell stress. *Cell Stress*, 3(2), 38–46. <https://doi.org/10.15698/cst2019.02.175>
- Alva-Medina, J., Dent, M. A. R., & Aranda-Anzaldo, A. (2010). Aged and post-mitotic cells share a very stable higher-order structure in the cell nucleus in vivo. *Biogerontology*, 11(6), 703–716. <https://doi.org/10.1007/s10522-010-9285-4>
- Alva-Medina, J., Maya-Mendoza, A., Dent, M. A. R., & Aranda-Anzaldo, A. (2011). Continued stabilization of the nuclear higher-order structure of post-mitotic neurons in vivo. *PLoS ONE*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021360>
- Anachkova, B., Djeliova, V., & Russev, G. (2005). Nuclear matrix support of DNA replication. *Journal of Cellular Biochemistry*, 96(5), 951–961. <https://doi.org/10.1002/jcb.20610>
- Annunziato, A. (2008). DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin | Learn Science at Scitable. In *Nature Education*. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-packaging-nucleosomes-and-chromatin-310/>
- Aranda-Anzaldo, A., & Dent, M. A. (n.d.). Loss of DNA loop supercoiling and organization in cells infected by herpes simplex virus type 1. *Research in Virology*, 148(6), 397–408. [https://doi.org/10.1016/s0923-2516\(97\)83629-1](https://doi.org/10.1016/s0923-2516(97)83629-1)
- Aranda-Anzaldo, Armando. (2009). A structural basis for cellular senescence. *Aging*, 1(7), 598–607. <https://doi.org/10.18632/aging.100074>
- Aranda-Anzaldo, Armando. (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>
- Aranda-Anzaldo, Armando, & Dent, M. A. R. (2017). Why Cortical Neurons Cannot Divide, and Why Do They Usually Die in the Attempt? *Journal of Neuroscience Research*, 95(4), 921–929. <https://doi.org/10.1002/jnr.23765>
- Barboro, P., D'Arrigo, C., Diaspro, A., Mormino, M., Alberti, I., Parodi, S., Patrone, E., & Balbi, C. (2002). Unraveling the organization of the internal nuclear matrix: RNA-dependent anchoring of NuMA to a lamin scaffold. *Experimental Cell Research*, 279(2), 202–218. <https://doi.org/10.1006/excr.2002.5605>
- Becker, N. A., Thorland, E. C., Denison, S. R., Phillips, L. A., & Smith, D. I. (2002). Evidence that instability within the FRA3B region extends four megabases. *Oncogene*, 21(57), 8713–8722. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205950>
- Bednar, J., Horowitz, R. A., Grigoryev, S. A., Carruthers, L. M., Hansen, J. C., Koster, A. J., & Woodcock, C. L. (1998). Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(24), 14173–14178. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.24.14173>
- Bennink, M. L., Schärer, O. D., Kanaar, R., Sakata-Sogawa, K., Schins, J. M., Kanger, J. S., De Grooth, B. G., & Greve, J. (1999). Single-Molecule Manipulation of Double-Stranded DNA Using Optical Tweezers: Interaction Studies of DNA With RecA and YOYO-1. *Cytometry*, 36, 200–208.
- Berezney, R., & Coffey, D. S. (1977). Nuclear matrix. Isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei. *Journal of Cell Biology*, 73(3), 616–637. <https://doi.org/10.1083/jcb.73.3.616>

- Berezney, R., & Coffey, D. S. (1976). The nuclear protein matrix: isolation, structure, and functions. *Advances in Enzyme Regulation*, 14, 63–100. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(76\)90008-x](https://doi.org/10.1016/0065-2571(76)90008-x)
- Berezney, Ronald, & Buchholtz, L. A. (1981). Isolation and Characterization of Rat Liver Nuclear Matrices Containing High Molecular Weight Deoxyribonucleic Acid. *Biochemistry*, 20(17), 4995–5002. <https://doi.org/10.1021/bi00520a028>
- Berezney, Ronald, & Coffey, D. S. (1974). Identification of a nuclear protein matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 60(4), 1410–1417. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(74\)90355-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(74)90355-6)
- Bolzer, A., Kreth, G., Solovei, I., Koehler, D., Saracoglu, K., Fauth, C., Müller, S., Eils, R., Cremer, C., Speicher, M. R., & Cremer, T. (2005). Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biology*, 3(5), 0826–0842. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030157>
- Bouchiat, C., Wang, M. D., Allemand, J. F., Strick, T., Block, S. M., & Croquette, V. (1999). Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements. *Biophysical Journal*, 76(11), 409–413. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77207-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77207-3)
- Brianna Caddle, L., Grant, J. L., Szatkiewicz, J., Van Hase, J., Shirley, B. J., Bewersdorf, J., Cremer, C., Arneodo, A., Khalil, A., & Mills, K. D. (2007). Chromosome neighborhood composition determines translocation outcomes after exposure to high-dose radiation in primary cells. *Chromosome Research*, 15(8), 1061–1073. <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1181-7>
- Bridger, J. M., Foeger, N., Kill, I. R., & Herrmann, H. (2007). The nuclear lamina: Both a structural framework and a platform for genome organization. *FEBS Journal*, 274(6), 1354–1361. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05694.x>
- Brison, O., El-Hilali, S., Azar, D., Koundrioukoff, S., Schmidt, M., Nähse, V., Jaszczyszyn, Y., Lachages, A.-M., Dutrillaux, B., Thermes, C., Debatisse, M., & Chen, C.-L. (2019). Transcription-mediated organization of the replication initiation program across large genes sets common fragile sites genome-wide. *Nature Communications*, 10(1), 5693. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13674-5>
- Buongiorno-Nardelli, M., Micheli, G., Carrì, M. T., & Marilley, M. (1982). A relationship between replicon size and supercoiled loop domains in the eukaryotic genome. *Nature*, 298(5869), 100–102. <https://doi.org/10.1038/298100a0>
- Burrow, A. A., Marullo, A., Holder, L. R., & Wang, Y. H. (2010). Secondary structure formation and DNA instability at fragile site FRA16B. *Nucleic Acids Research*, 38(9), 2865–2877. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1245>
- Castillo-Mora, R. C., & Aranda-Anzaldo, A. (2012). Reorganization of the DNA-nuclear matrix interactions in a 210kb genomic region centered on c-myc after DNA replication in vivo. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(7), 2451–2463. <https://doi.org/10.1002/jcb.24123>
- Cayrou, C., Coulombe, P., & Méchali, M. (2010). Programming DNA replication origins and chromosome organization. *Chromosome Research*, 18(1), 137–145. <https://doi.org/10.1007/s10577-009-9105-3>
- Cayrou, C., Grégoire, D., Coulombe, P., Danis, E., & Méchali, M. (2012). Genome-scale identification of active DNA replication origins. *Methods*, 57(2), 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.06.015>
- Chakalova, L., & Fraser, P. (2010). Organization of transcription. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000729>

- Choi, J., & Majima, T. (2011). Conformational changes of non-B DNA. *Chemical Society Reviews*, *40*(12), 5893–5909. <https://doi.org/10.1039/c1cs15153c>
- Cook, P. R., Brazell, I. A., & Jost, E. (1976). Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *Journal of Cell Science*, *22*(2), 303–324.
- Cook, Peter R. (1999). The organization of replication and transcription. *Science*, *284*(5421), 1790–1795. <https://doi.org/10.1126/science.284.5421.1790>
- Cremer, T., & Cremer, M. (2010). Chromosome territories. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(3), 360–361. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003889>
- Debatisse, M., Le Tallec, B., Letessier, A., Dutrillaux, B., & Brison, O. (2012). Common fragile sites: Mechanisms of instability revisited. *Trends in Genetics*, *28*(1), 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.10.003>
- Deweese, J. E., Osheroff, M. A., & Osheroff, N. (2009). DNA topology and topoisomerases: Teaching A “knotty” subject. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, *37*(1), 2–10. <https://doi.org/10.1002/bmb.20244>
- Djeliova, V., Russev, G., & Anachkova, B. (2001). Dynamics of association of origins of DNA replication with the nuclear matrix during the cell cycle. *Nucleic Acids Research*, *29*(15), 3181–3187. <https://doi.org/10.1093/nar/29.15.3181>
- Durkin, S. G., & Glover, T. W. (2007). Chromosome Fragile Sites. *Annual Review of Genetics*, *41*(1), 169–192. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.042007.165900>
- El Achkar, E., Gerbault-Seureau, M., Muleris, M., Dutrillaux, B., & Debatisse, M. (2005). Premature condensation induces breaks at the interface of early and late replicating chromosome bands bearing common fragile sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(50), 18069–18074. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506497102>
- Elcock, L. S., & Bridger, J. M. (2008). Exploring the effects of a dysfunctional nuclear matrix. *Biochemical Society Transactions*, *36*(Pt 6), 1378–1383. <https://doi.org/10.1042/BST0361378>
- 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>
- Fey, E. G., Krochmalnic, G., & Penman, S. (1986). The nonchromatin substructures of the nucleus: the ribonucleoprotein (RNP)-containing and RNP-depleted matrices analyzed by sequential fractionation and resinless section electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, *102*(5), 1654–1665. <https://doi.org/10.1083/jcb.102.5.1654>
- 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>
- Filesi, I., Gullotta, F., Lattanzi, G., D’Apice, M. R., Capanni, C., Nardone, A. M., Columbaro, M., Scarano, G., Mattioli, E., Sabatelli, P., Maraldi, N. M., Biocca, S., & Novelli, G. (2005). Alterations of nuclear envelope and chromatin organization in mandibuloacral dysplasia, a rare form of laminopathy. *Physiological Genomics*, *23*(2), 150–158. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00060.2005>
- Finlan, L. E., Sproul, D., Thomson, I., Boyle, S., Kerr, E., Perry, P., Ylstra, B., Chubb, J. R., & Bickmore, W. A. (2008). Recruitment to the Nuclear Periphery Can Alter Expression of Genes in Human Cells. *PLoS*

Genetics, 4(3), e1000039. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000039>

- Freudenreich, C. H. (2007). Chromosome fragility: Molecular mechanisms and cellular consequences. *Frontiers in Bioscience*, 12(13), 4911–4924. <https://doi.org/10.2741/2437>
- Fritz, A. J., Barutcu, A. R., Martin-Buley, L., Van Wijnen, A. J., Zaidi, S. K., Imbalzano, A. N., Lian, J. B., Stein, J. L., & Stein, G. S. (2016). Chromosomes at Work: Organization of Chromosome Territories in the Interphase Nucleus. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117(1), 9–19. <https://doi.org/10.1002/jcb.25280>
- Fritz, A. J., Sehgal, N., Pliss, A., Xu, J., & Berezney, R. (2019). Chromosome territories and the global regulation of the genome. *Genes Chromosomes and Cancer*, 58(7), 407–426. <https://doi.org/10.1002/gcc.22732>
- Fry, M., & Loeb, L. A. (1994). The fragile X syndrome d(CGG)(n) nucleotide repeats form a stable tetrahelical structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(11), 4950–4954. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.11.4950>
- Fu, J.-F., Hsu, J.-J., Tang, T.-C., & Shih, L.-Y. (2003). Identification of CBL, a proto-oncogene at 11q23.3, as a novel MLL fusion partner in a patient with de novo acute myeloid leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 37(2), 214–219. <https://doi.org/10.1002/gcc.10204>
- Galloway, J. N., & Nelson, D. L. (2009). Evidence for RNA-mediated toxicity in the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Future Neurology*, 4(6), 785–798. <https://doi.org/10.2217/fnl.09.44>
- García-Vilchis, D., & Aranda-Anzaldo, A. (2017). DNA Length Modulates the Affinity of Fragments of Genomic DNA for the Nuclear Matrix In Vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(12), 4487–4497. <https://doi.org/10.1002/jcb.26106>
- Gerace, L., Blum, A., & Blobel, G. (1978). Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution. *The Journal of Cell Biology*, 79(2 Pt 1), 546–566. <https://doi.org/10.1083/jcb.79.2.546>
- Geyer, P. K., Vitalini, M. W., & Wallrath, L. L. (2011). Nuclear organization: Taking a position on gene expression. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(3), 354–359. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.03.002>
- Glover, T. W., Hoge, A. W., Miller, D. E., Ascara-Wilke, J. E., Adam, A. N., Dagenais, S. L., Wilke, C. M., Dierick, H. A., Beer, D. G., & Glover, T. W., Hoge, A. W., Miller, D. E., Ascara-Wilke, J. E., Adam, A. N., Dagenais, S. L., Beer, D. G. (1998). The murine *FHIT* gene is highly similar to its human orthologue and maps to a common fragile site region. - PubMed - NCBI. *Cancer Research*, 58(15), 3409–3414.
- Göhring, F. et al. (1997). The novel SAR-binding domain of scaffold attachment factor A (SAF-A) is a target in apoptotic nuclear breakdown. *The EMBO Journal*, 16(24), 7361–7171.
- Goldman, R. D., Gruenbaum, Y., Moir, R. D., Shumaker, D. K., & Spann, T. P. (2002). Nuclear lamins: Building blocks of nuclear architecture. *Genes and Development*, 16(5), 533–547. <https://doi.org/10.1101/gad.960502>
- Goldman, R. D., Shumaker, D. K., Erdos, M. R., Eriksson, M., Goldman, A. E., Gordon, L. B., Gruenbaum, Y., Khuon, S., Mendez, M., Varga, R., & Collins, F. S. (2004). Accumulation of mutant lamin A progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(24), 8963–8968. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402943101>
- Gonzalez-Suarez, I., Redwood, A. B., Perkins, S. M., Vermolen, B., Lichtensztejn, D., Grotzky, D. A., Morgado-Palacin, L., Gapud, E. J., Sleckman, B. P., Sullivan, T., Sage, J., Stewart, C. L., Mai, S., & Gonzalo, S.

- (2009). Novel roles for A-type lamins in telomere biology and the DNA damage response pathway. *EMBO Journal*, 28(16), 2414–2427. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.196>
- Guadarrama-Ponce, R., & Aranda-Anzaldo, A. (2020). The epicenter of chromosomal fragility of Fra14A2, the mouse ortholog of human FRA3B common fragile site, is largely attached to the nuclear matrix in lymphocytes but not in other cell types that do not express such a fragility. *Journal of Cellular Biochemistry*, 121(3), 2209–2224. <https://doi.org/10.1002/jcb.29444>
- Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M. B., Talhout, W., Eussen, B. H., De Klein, A., Wessels, L., De Laat, W., & Van Steensel, B. (2008). Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature*, 453(7197), 948–951. <https://doi.org/10.1038/nature06947>
- Guilly, M. N., Kolb, J. P., Gosti, F., Godeau, F., & Courvalin, J. C. (1990). Lamins A and C are not expressed at early stages of human lymphocyte differentiation. *Experimental Cell Research*, 189(1), 145–147. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(90\)90267-E](https://doi.org/10.1016/0014-4827(90)90267-E)
- Handt, O., Sutherland, G. R., & Richards, R. I. (2000). Fragile sites and minisatellite repeat instability. *Molecular Genetics and Metabolism*, 70(2), 99–105. <https://doi.org/10.1006/mgme.2000.2996>
- Hansen, R. S., Canfield, T. K., Lamb, M. M., Gartler, S. M., & Laird, C. D. (1993). Association of fragile X syndrome with delayed replication of the FMR1 gene. *Cell*, 73(7), 1403–1409. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90365-W](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90365-W)
- He, D., Nickerson, J. A., & Penman, S. (1990). Core filaments of the nuclear matrix. *Journal of Cell Biology*, 110(3), 569–580. <https://doi.org/10.1083/jcb.110.3.569>
- Hellman, A., Rahat, A., Scherer, S. W., Darvasi, A., Tsui, L. C., & Kerem, B. (2000). Replication delay along FRA7H, a common fragile site on human chromosome 7, leads to chromosomal instability. *Molecular and Cellular Biology*, 20(12), 4420–4427. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.12.4420-4427.2000>
- Helmrich, A., Ballarino, M., & Tora, L. (2011). Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes. *Molecular Cell*, 44(6), 966–977. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.013>
- Helmrich, A., Stout-Weider, K., Hermann, K., Schrock, E., & Heiden, T. (2006). Common fragile sites are conserved features of human and mouse chromosomes and relate to large active genes. *Genome Research*, 16(10), 1222–1230. <https://doi.org/10.1101/gr.5335506>
- Hewish, D. R., & Burgoyne, L. A. (1973). Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 52(2), 504–510. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(73\)90740-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(73)90740-7)
- 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 - Gene Structure and Expression*, 1759(5), 195–207. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2006.04.010>
- 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>
- Ingber, D. E., Wang, N., & Stamenovic, D. (2014). Tensegrity, cellular biophysics, and the mechanics of living systems. *Reports on Progress in Physics. Physical Society (Great Britain)*, 77(4), 046603. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/77/4/046603>
- loudinkova, E., Razin, S. V., Borunova, V., De Conto, F., Rynditch, A., & Scherrer, K. (2005). RNA-dependent

- nuclear matrix contains a 33 kb globin full domain transcript as well as prosomes but no 26S proteasomes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 94(3), 529–539. <https://doi.org/10.1002/jcb.20306>
- Irony-Tur Sinai, M., & Kerem, B. (2018). DNA replication stress drives fragile site instability. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 808, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2017.10.002>
- Ivanovic-Matic, S., Dinic, S., Vujos evic, M., Poznanovic, G. (2000). The Protein Composition of the Hepatocyte Nuclear Matrix Is Differentiation-Stage Specific. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, 49(6), 511–517. <https://doi.org/10.1080/15216540050167052>
- Iyer, B. V. S., Kenward, M., & Arya, G. (2011). Hierarchies in eukaryotic genome organization: Insights from polymer theory and simulations. *BMC Biophysics*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/2046-1682-4-8>
- Kähkönen, M., Tengström, C., Alitalo, T., Matilainen, R., Kaski, M., & Airaksinen, E. (1989). Population cytogenetics of folate-sensitive fragile sites - II. Autosomal rare fragile sites. *Human Genetics*, 82(1), 3–8. <https://doi.org/10.1007/BF00288261>
- Khalil, A., Grant, J. L., Caddle, L. B., Atzema, E., Mills, K. D., & Arneodo, A. (2007). Chromosome territories have a highly nonspherical morphology and nonrandom positioning. *Chromosome Research*, 15(7), 899–916. <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1172-8>
- Koch, C. M., Andrews, R. M., Flicek, P., Dillon, S. C., Karaöz, U., Clelland, G. K., Wilcox, S., Beare, D. M., Fowler, J. C., Couttet, P., James, K. D., Lefebvre, G. C., Bruce, A. W., Dovey, O. M., Ellis, P. D., Dhami, P., Langford, C. F., Weng, Z., Birney, E., ... Dunham, I. (2007). The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines. *Genome Research*, 17(6), 691–707. <https://doi.org/10.1101/gr.5704207>
- Krebs, J. E., Goldstein, E. S., & Kilpatrick, S. T. (2018). *Lewin's Genes XII (XII)*. Jones and Bartlett Learning.
- Kremer, E. J., Pritchard, M., Lynch, M., Yu, S., Holman, K., Baker, E., Warren, S. T., Schlessinger, D., Sutherland, G. R., & Richards, R. I. (1991). Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. *Science*, 252(5013), 1711–1714. <https://doi.org/10.1126/science.1675488>
- Kumaran, R. I., Thakar, R., & Spector, D. L. (2008). Chromatin Dynamics and Gene Positioning. *Cell*, 132(6), 929–934. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.004>
- Kuroda, M., Tanabe, H., Yoshida, K., Oikawa, K., Saito, A., Kiyuna, T., Mizusawa, H., & Mukai, K. (2004). Alteration of chromosome positioning during adipocyte differentiation. *Journal of Cell Science*, 117(24), 5897–5903. <https://doi.org/10.1242/jcs.01508>
- Le Beau, M. M., Rassool, F. V., Neilly, M. E., Espinosa, R., Glover, T. W., Smith, D. I., & McKeithan, T. W. (1998). Replication of a common fragile site, FRA3B, occurs late in S phase and is delayed further upon induction: implications for the mechanism of fragile site induction. *Human Molecular Genetics*, 7(4), 755–761. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.4.755>
- Le Tallec, B., Koundrioukoff, S., Wilhelm, T., Letessier, A., Brison, O., & Debatisse, M. (2014). Updating the mechanisms of common fragile site instability: How to reconcile the different views? *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 71(23), 4489–4494. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1720-2>
- Legartová, S., Stixová, L., Laur, O., Kozubek, S., Sehnalová, P., & Bártová, E. (2014). Nuclear structures surrounding internal lamin invaginations. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(3), 476–487. <https://doi.org/10.1002/jcb.24681>

- LeTallec, B., Millot, G. A., Blin, M. E., Brison, O., Dutrillaux, B., Debatisse, M., Le Tallec, B., Millot, G. A., Blin, M. E., Brison, O., Dutrillaux, B., & Debatisse, M. (2013). Common fragile site profiling in epithelial and erythroid cells reveals that most recurrent cancer deletions lie in fragile sites hosting large genes. *Cell Reports*, 4(3), 420–428. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.003>
- Letessier, A., Millot, G. A., Koundrioukoff, S., Lachagès, A. M., Vogt, N., Hansen, R. S., Malfoy, B., Brison, O., & Debatisse, M. (2011). Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site. *Nature*, 470(7332), 120–124. <https://doi.org/10.1038/nature09745>
- Li, F., Chen, J., Izumi, M., Butler, M. C., Keezer, S. M., & Gilbert, D. M. (2001). The replication timing program of the Chinese hamster β -globin locus is established coincident with its repositioning near peripheral heterochromatin in early G1 phase. *Journal of Cell Biology*, 154(2), 283–292. <https://doi.org/10.1083/jcb.200104043>
- Lilley, D. M. J. (2001). DNA Supercoiling. *Encyclopedia of Genetics*, 575–577. <https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.1255>
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000a). Organizing Cellular DNA into Chromosomes. In *Molecular Cell Biology* (4th ed.). W. H. Freeman.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000b). The Role of Topoisomerases in DNA Replication. In *Molecular Cell Biology* (4th editio). W. H. Freeman.
- Lukusa, T., & Fryns, J. P. (2008). Human chromosome fragility. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1779(1), 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2007.10.005>
- 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. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.3.531>
- Ma, K., Qiu, L., Mrasek, K., Zhang, J., Liehr, T., Quintana, L. G., & Li, Z. (2012). Common fragile sites: Genomic hotspots of DNA damage and carcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(9), 11974–11999. <https://doi.org/10.3390/ijms130911974>
- Madireddy, A., Kosiyatrakul, S. T., Boisvert, R. A., Herrera-Moyano, E., García-Rubio, M. L., Gerhardt, J., Vuono, E. A., Owen, N., Yan, Z., Olson, S., Aguilera, A., Howlett, N. G., & Schildkraut, C. L. (2016). FANCD2 Facilitates Replication through Common Fragile Sites. *Molecular Cell*, 64(2), 388–404. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.017>
- Maeshima, K., Ide, S., & Babokhov, M. (2019). Dynamic chromatin organization without the 30-nm fiber. *Current Opinion in Cell Biology*, 58, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.02.003>
- Marella, N. V., Bhattacharya, S., Mukherjee, L., Xu, J., & Berezney, R. (2009). Cell type specific chromosome territory organization in the interphase nucleus of normal and cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 221(1), 130–138. <https://doi.org/10.1002/jcp.21836>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00611-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00611-5)
- Maya-Mendoza, A., Hernández-Muñoz, R., Gariglio, P., & Aranda-Anzaldo, A. (2004). Gene positional changes relative to the nuclear substructure during carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *Journal of Cellular Biochemistry*, 93(6), 1084–1098. <https://doi.org/10.1002/jcb.20264>
- Maya-Mendoza, A., Hernández-Muñoz, 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>
- Mayer, R., Brero, A., von Hase, J., Schroeder, T., Cremer, T., & Dietzel, S. (2005). Common themes and cell type specific variations of higher order chromatin arrangements in the mouse. *BMC Cell Biology*, 6, 44. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-6-44>
- Méchalí, M. (2010). Eukaryotic DNA replication origins: Many choices for appropriate answers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(10), 728–738. <https://doi.org/10.1038/nrm2976>
- Mehta, I. S., Eskiw, C. H., Arican, H. D., Kill, I. R., & Bridger, J. M. (2011). Farnesyltransferase inhibitor treatment restores chromosome territory positions and active chromosome dynamics in Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells. *Genome Biology*, 12(8), R74. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-8-r74>
- Mika, S., & Rost, B. (2005). NMPdb: Database of Nuclear Matrix Proteins. *Nucleic Acids Research*, 33(Database issue), D160-3. <https://doi.org/10.1093/nar/gki132>
- Miles, J. H. (2011). Autism spectrum disorders-A genetics review. *Genetics in Medicine*, 13(4), 278–294. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181ff67ba>
- Mirkin, S. M. (2001). DNA Topology: Fundamentals. In *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0001038>
- Mrasek, K., Schoder, C., Teichmann, A. C., Behr, K., Franze, B., Wilhelm, K., Blaurock, N., Claussen, U., Liehr, T., Weise, A., & Weise. (2010). Global screening and extended nomenclature for 230 aphidicolin-inducible fragile sites, including 61 yet unreported ones. *International Journal of Oncology*, 36(4), 929–940. https://doi.org/10.3892/ijo_00000572
- Nagele, R., Freeman, T., McMorrow, L., & Lee, H. Y. (1995). Precise spatial positioning of chromosomes during prometaphase: Evidence for chromosomal order. *Science*, 270(5243), 1831. <https://doi.org/10.1126/science.270.5243.1831>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Principles of Biochemistry* (7th ed.). Freeman, W. H. & Company.
- Nickerson, J. A. (2001). Experimental observations of a nuclear matrix. *Journal of Cell Science*, 114(3), 463–474.
- Nikolova, V., Leimena, C., McMahon, A. C., Tan, J. C., Chandar, S., Jogia, D., Kesteven, S. H., Michalícek, J., Otway, R., Verheyen, F., Rainer, S., Stewart, C. L., Martin, D., Feneley, M. P., & Fatkin, D. (2004). Defects in nuclear structure and function promote dilated cardiomyopathy in lamin A/C-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*, 113(3), 357–369. <https://doi.org/10.1172/jci19448>
- Nozawa, R.-S., & Gilbert, N. (2019). RNA: Nuclear Glue for Folding the Genome. *Trends in Cell Biology*, 29(3), 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.003>
- Ortega, J. M., & DePamphilis, M. L. (1998). Nucleoskeleton and initiation of DNA replication in metazoan cells. *Journal of Cell Science*, 111 (Pt 2), 3663–3673.
- Ottaviani, D., Lever, E., Takousis, P., & Sheer, D. (2008). Anchoring the genome. *Genome Biology*, 9(1), 201. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-1-201>
- 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>

- Oza, P., & Peterson, C. L. (2010). Opening the DNA repair toolbox: Localization of DNA double strand breaks to the nuclear periphery. *Cell Cycle*, *9*(1), 43–49. <https://doi.org/10.4161/cc.9.1.10317>
- Ozeri-Galai, E., Tur-Sinai, M., Bester, A. C., & Kerem, B. (2014). Interplay between genetic and epigenetic factors governs common fragile site instability in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *71*(23), 4495–4506. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1719-8>
- Palakodeti, A., Han, Y., Jiang, Y., & Le Beau, M. M. (2004). The role of late/slow replication of the FRA16D in common fragile site induction. *Genes, Chromosomes & Cancer*, *39*(1), 71–76. <https://doi.org/10.1002/gcc.10290>
- Palumbo, E., Matricardi, L., Tosoni, E., Bensimon, A., & Russo, A. (2010). Replication dynamics at common fragile site FRA6E. *Chromosoma*, *119*(6), 575–587. <https://doi.org/10.1007/s00412-010-0279-4>
- Palumbo, E., & Russo, A. (2019). Common fragile site instability in normal cells: Lessons and perspectives. *Genes Chromosomes and Cancer*, *58*(5), 260–269. <https://doi.org/10.1002/gcc.22705>
- Parada, L. A., McQueen, P. G., & Misteli, T. (2004). Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome Biology*, *5*(7). <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-7-r44>
- Parada, L. A., McQueen, P. G., Munson, P. J., & Misteli, T. (2002). Conservation of relative chromosome positioning in normal and cancer cells. *Current Biology*, *12*(19), 1692–1697. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01166-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01166-1)
- Pederson, T., & Marko, J. F. (2014). Nuclear physics (of the cell, not the atom). *Molecular Biology of the Cell*, *25*(22), 3466–3469. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-03-0790>
- Prieto, E. I., & Maeshima, K. (2019). Dynamic chromatin organization in the cell. In *Essays in Biochemistry* (Vol. 63, Issue 1, pp. 133–145). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/EBC20180054>
- 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>
- Razin, S. V. (2001). The nuclear matrix and chromosomal DNA loops: is there any correlation between partitioning of the genome into loops and functional domains? *Cellular and Molecular Biology Letters*, *6*(1), 59–69.
- Reddy, K. L., Zullo, J. M., Bertolino, E., & Singh, H. (2008). Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature*, *452*(7184), 243–247. <https://doi.org/10.1038/nature06727>
- 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>
- Rivera-Mulia, J. C., Hernández-Muñoz, R., Martínez, F., & Aranda-Anzaldo, A. (2011). DNA moves sequentially towards the nuclear matrix during DNA replication in vivo. *BMC Cell Biology*, *12*, 3. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-12-3>
- Rober, R. A., Sauter, H., Weber, K., & Osborn, M. (1990). Cells of the cellular immune and hemopoietic system of the mouse lack lamins A/C: Distinction versus other somatic cells. *Journal of Cell Science*, *95*(4), 587–598.
- Saha, P., & Mishra, R. K. (2019). Heterochromatic hues of transcription—the diverse roles of noncoding

- transcripts from constitutive heterochromatin. *FEBS Journal*, 286(23), 4626–4641. <https://doi.org/10.1111/febs.15104>
- Savelyeva, L., & Brueckner, L. M. (2014). Molecular characterization of common fragile sites as a strategy to discover cancer susceptibility genes. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 71(23), 4561–4575. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1723-z>
- Schwartz, M., Zlotorynski, E., & Kerem, B. (2006). The molecular basis of common and rare fragile sites. *Cancer Letters*, 232(1), 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.07.039>
- Shiraishi, T., Druck, T., Mimori, K., Flomenberg, J., Berk, L., Alder, H., Miller, W., Huebner, K., & Croce, C. M. (2001). Sequence conservation at human and mouse orthologous common fragile regions, FRA3B/FHIT and Fra14A2/FHIT. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10), 5722–5727. <https://doi.org/10.1073/pnas.091095898>
- Silva-Santiago, E., Pardo, J. P., Hernández-Muñoz, R., & Aranda-Anzaldo, A. (2017). The nuclear higher-order structure defined by the set of topological relationships between DNA and the nuclear matrix is species-specific in hepatocytes. *Gene*, 597, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.10.023>
- 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>
- Smith, C., Bolton, A., & Nguyen, G. (2010). Genomic and Epigenomic Instability, Fragile Sites, Schizophrenia and Autism. *Current Genomics*, 11(6), 447–469. <https://doi.org/10.2174/138920210793176001>
- Smith, D. I., McAvoy, S., Zhu, Y., & Perez, D. S. (2007). Large common fragile site genes and cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 17(1), 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2006.10.003>
- Stuurman, N., Meijne, A. M. L., Van der Pol, A. J., De Jong, L., Van Driel, R., & Van Renswoude, J. (1990). The nuclear matrix from cells of different origin. Evidence for a common set of matrix proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 265(10), 5460–5465.
- Sutherland, G. R. (1977). Fragile sites on human chromosomes: Demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science*, 197(4300), 265–266. <https://doi.org/10.1126/science.877551>
- Sutherland, G. R., Baker, E., & Richards, R. I. (1998). Fragile sites still breaking. *Trends in Genetics : TIG*, 14(12), 501–506. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(98\)01628-x](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(98)01628-x)
- Taimen, P., Pflughaar, K., Shimi, T., Möller, D., Ben-Harush, K., Erdos, M. R., Adam, S. A., Herrmann, H., Medalia, O., Collins, F. S., Goldman, A. E., & Goldman, R. D. (2009). A progeria mutation reveals functions for lamin A in nuclear assembly, architecture, and chromosome organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(49), 20788–20793. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911895106>
- Tanabe, H., Müller, S., Neusser, M., Von Hase, J., Calcagno, E., Cremer, M., Solovei, I., Cremer, C., & Cremer, T. (2002). Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(7), 4424–4429. <https://doi.org/10.1073/pnas.072618599>
- Tomilin, N., Solovjeva, L., Krutilina, R., Chamberland, C., Hancock, R., & Vig, B. (1995). Visualization of elementary DNA replication units in human nuclei corresponding in size to DNA loop domains. *Chromosome Research : An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, 3(1), 32–40. <https://doi.org/10.1007/bf00711159>
- Trevilla-García, 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>
- 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), 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.11.050>
- Trojer, P., & Reinberg, D. (2007). Facultative Heterochromatin: Is There a Distinctive Molecular Signature? *Molecular Cell*, 28(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.09.011>
- 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>
- Uhlen, M., Oksvold, P., Fagerberg, L., Lundberg, E., Jonasson, K., Forsberg, M., Zwahlen, M., Kampf, C., Wester, K., Hober, S., Wernerus, H., Björling, L., & Ponten, F. (2010). Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nature Biotechnology*, 28(12), 1248–1250. <https://doi.org/10.1038/nbt1210-1248>
- Vogelstein, B., Pardoll, D. M., & Coffey, D. S. (1980). Supercoiled loops and eucaryotic DNA replication. *Cell*, 22(1), 79–85. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90156-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90156-7)
- Voutsinos, V., Munk, S. H. N., & Oestergaard, V. H. (2018). Common chromosomal fragile sites—conserved failure stories. *Genes*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/genes9120580>
- Wali, A. (2010). FHIT: Doubts are clear now. *TheScientificWorldJournal*, 10, 1142–1151.
<https://doi.org/10.1100/tsw.2010.110>
- Wei, X., Samarabandu, J., Devdhar, R. S., Siegel, A. J., Acharya, R., & Berezney, R. (1998). Segregation of transcription and replication sites into higher order domains. *Science*, 281(5382), 1502–1505.
<https://doi.org/10.1126/science.281.5382.1502>
- Willyard, C. (2018). Expanded human gene tally reignites debate. *Nature*, 558(7710), 354–355.
<https://doi.org/10.1038/d41586-018-05462-w>
- Yu, S., Mangelsdorf, M., Hewett, D., Hobson, L., Baker, E., Eyre, H. J., Lapsys, N., Le Paslier, D., Doggett, N. A., Sutherland, G. R., & Richards, R. I. (1997). Human chromosomal fragile site FRA16B is an amplified AT-rich minisatellite repeat. *Cell*, 88(3), 367–374. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81875-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81875-9)
- Zeitz, M. J., Mukherjee, L., Bhattacharya, S., Xu, J., & Berezney, R. (2009). A probabilistic model for the arrangement of a subset of human chromosome territories in WI38 human fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology*, 221(1), 120–129. <https://doi.org/10.1002/jcp.21842>
- Zhang, H., & Freudenreich, C. H. (2007). An AT-Rich Sequence in Human Common Fragile Site FRA16D Causes Fork Stalling and Chromosome Breakage in *S. cerevisiae*. *Molecular Cell*, 27(3), 367–379.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.012>