



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Dinámica del interactoma genómico de promotores circadianos

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Roberto Alfredo Sáenz Hernández

TUTORA PRINCIPAL

Dra. Mayra Furlan Magaril
Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Félix Recillas Targa
Instituto de Fisiología Celular
Dra. Mariana Benítez Keinrad
Instituto de Ecología

Ciudad de México, noviembre, 2023



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.

SAENZ HERNANDEZ ROBERTO ALFREDO
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **8 de agosto de 2023**, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestro en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Dinámica del interactoma genómico de promotores circadianos**", dirigida por el/la Dr(a). **FURLAN MAGARIL MAYRA**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

AGUILAR ARNAL LORENA	PMDCBQ	PRESIDENTE
COELLO COUTIÑO MARTHA PATRICIA	PMDCBQ	SECRETARIO
CANIZALES QUINTEROS SAMUEL	PMDCBQ	VOCAL
DIMITROVA DINKOVA TZVETANKA	PMDCBQ	VOCAL
FREYRE GONZÁLEZ JULIO AUGUSTO	PMDCBQ	VOCAL

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 8 de agosto de 2023



Coordinadora
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

Reconocimientos Académicos

Esta tesis fue dirigida por la Dra. Mayra Furlan Magaril del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular en la Universidad Nacional Autónoma de México como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencias del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

El proyecto se desarrolló bajo la guía y asesoramiento del Comité Tutorial conformado por:

Dr. Felix Recillas Targa Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dra. Mariana Benitez Keinrad, Instituto de Ecología, UNAM

Agradezco las revisiones y sugerencias del Jurado para el Examen de Grado integrado por:

Dra Lorena Aguilar Arnal, Presidente	Instituto De Investigaciones Biomédicas
Dra. Martha Patricia Coello Coutiño, Secretario	Facultad De Química
Dr. Samuel Canizales Quinteros, Vocal	Facultad De Química
Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova, Vocal	Facultad De Química
Dr. Julio Augusto Freyre González, Vocal	Instituto De Ciencias Genómicas

Se agradece el apoyo en el manejo de los animales de laboratorio de la M.V.Z. Claudia Rivera Cerecedo, el M. en C. José Luiz Chávez Juárez y el Sr. Mario Zamora Jiménez q.e.p.d.

Se agradece el seguimiento y disposición de Julio Ignacio Palacios Ordoñez, así como de la M. en C. Norma Trejo Medina, y de todos los integrantes de la Coordinación del Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM.

La realización de esta tesis fue posible gracias al respaldo otorgado por la beca CONACYT, así como al apoyo proporcionado por el PAEP del Posgrado.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	iii
Resumen Gráfico.....	iv
Resumen	v
Abstract.....	vi
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 El concepto de ritmo circadiano.....	2
1.1.1 La organización jerárquica del reloj circadiano: el reloj central y los relojes periféricos.....	2
1.1.2 Componentes moleculares del reloj central.....	3
1.1.3 Transcripción circadiana.....	5
1.2 Regulación de la transcripción en mamíferos.....	5
1.2.1 Elementos genómicos de regulación transcripcional.....	6
1.2.2 Enhancers.....	6
1.2.3 Insulators.....	8
1.3 Organización tridimensional del genoma a gran escala.....	8
1.3.1 Territorios cromosómicos.....	8
1.3.2 Formación de asas de cromatina y regulación a distancia.....	9
1.4 Estudio de interacciones a larga distancia de la cromatina.....	10
1.4.1 Captura conformacional del cromosoma (3C) y derivados.....	10
2 ANTECEDENTES.....	13
2.1 Evidencia en favor y en contra de la dinámica de los contactos para establecer activación transcripcional.....	13
2.2 Conformación de la cromatina y regulación de la transcripción de genes circadianos.....	14
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
3.1 El ciclo circadiano como modelo para estudiar el papel de las propiedades dinámicas de la cromatina en la regulación transcripcional.....	16
4 HIPÓTESIS.....	17
5 OBJETIVOS.....	17
5.1 Objetivo General.....	17
5.2 Objetivos particulares.....	17
6 MÉTODOS Y MATERIALES.....	18
6.1 Selección de genes para estudio del interactoma durante un ciclo circadiano.....	18
6.2 Sincronización circadiana de ratones y extracción de tejido.....	18
6.3 RT-qPCR para determinar niveles de transcritos a partir de tejido y Confirmación de Oscilación Circadiana.....	19
6.3.1 Diseño de oligonucleótidos (primers).....	19
6.3.2 Controles de Calidad y Verificación en el Protocolo de Hi-C.....	20

6.3.3	Extracción de ARN.....	21
6.3.4	RT-qPCR	22
6.4	Preparación de bibliotecas de Hi-C a partir de tejido.....	22
6.4.1	Fijación de cromatina	22
6.4.2	Permeabilización de núcleos	22
6.4.3	Digestión.....	22
6.4.4	Rellenado con biotina.....	23
6.4.5	Ligación y reversión de entrecruzamiento.....	23
6.4.6	Extracción y Purificación del ADN	23
6.5	Estrategia alterna para obtención de sondas de captura de ARN marcado con biotina para Capture Hi-C.....	24
6.6	Controles y resolución de problemas experimentales para estandarización de Hi-C en tejido	24
6.7	Análisis de interactoma de promotores circadianos mediante 4C-virtual en Seqmonk y visualización en WashU Browser.....	28
7	RESULTADOS	30
7.1	Parte 1: Análisis comparativo entre cuatro diferentes puntos temporales de las interacciones observadas a partir de Capture Hi-C en hígado	30
7.1.1	Selección de genes para el estudio del interactoma circadiano en hígado de ratón	30
7.1.2	Características de las interacciones de los promotores circadianos.....	31
7.1.3	Confirmación y comparación de actividad oscilatoria de genes circadianos...	33
7.1.4	Dinámica de las interacciones en relación a la transcripción entre puntos temporales.....	35
7.1.5	Exploración de elementos de regulación en el interactoma de genes del reloj central y genes de salida.....	36
7.1.6	Exploración del panorama genómico y visualización de interacciones de genes circadianos	38
7.1.7	Interacciones con elementos de regulación de genes circadianos en mESCs ..	43
7.2	Parte 2: Ensayos para estandarizar un protocolo de Capture hi-C de tejido.....	45
7.2.1	Determinación de la expresión génica circadiana en riñón de ratón.....	45
7.2.2	Estandarización de protocolo de Hi-C en tejido de ratón.....	46
7.2.3	Generación de sondas de captura para el experimento de Capture Hi-C	50
8	DISCUSIÓN	53
9	CONCLUSIONES	56
10	PERSPECTIVAS.....	57
11	Figuras Suplementarias	58
12	REFERENCIAS	70

LISTA DE ABREVIATURAS

3C: Captura Conformacional de Cromosomas

4C: 3C circular

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

CCGs: genes controlados por el reloj; del inglés: Clock Controlled Genes

cDNA: ADN complementario

C Hi-C: Captura Conformacional de Cromosomas del genoma completo dirigido

CTCF: factor de unión CCCTC

dATP: desoxiadenosina trifosfato

dCTP: desoxicitidina trifosfato

dGTP: desoxiguanosina trifosfato

DNAsa: desoxirribonucleasa

dNTPs: desoxirribo nucleótidos trifosfato

eRNA: ARN transcrito de región *enhancer*

Hi-C: Captura Conformacional de Cromosomas del genoma completo

LAD: Dominio Asociado a Lamina

LD 12:12: ciclo de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de oscuridad

mESCs: células troncales embrionarias murinas

NTPs: ribo nucleótidos trifosfato

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

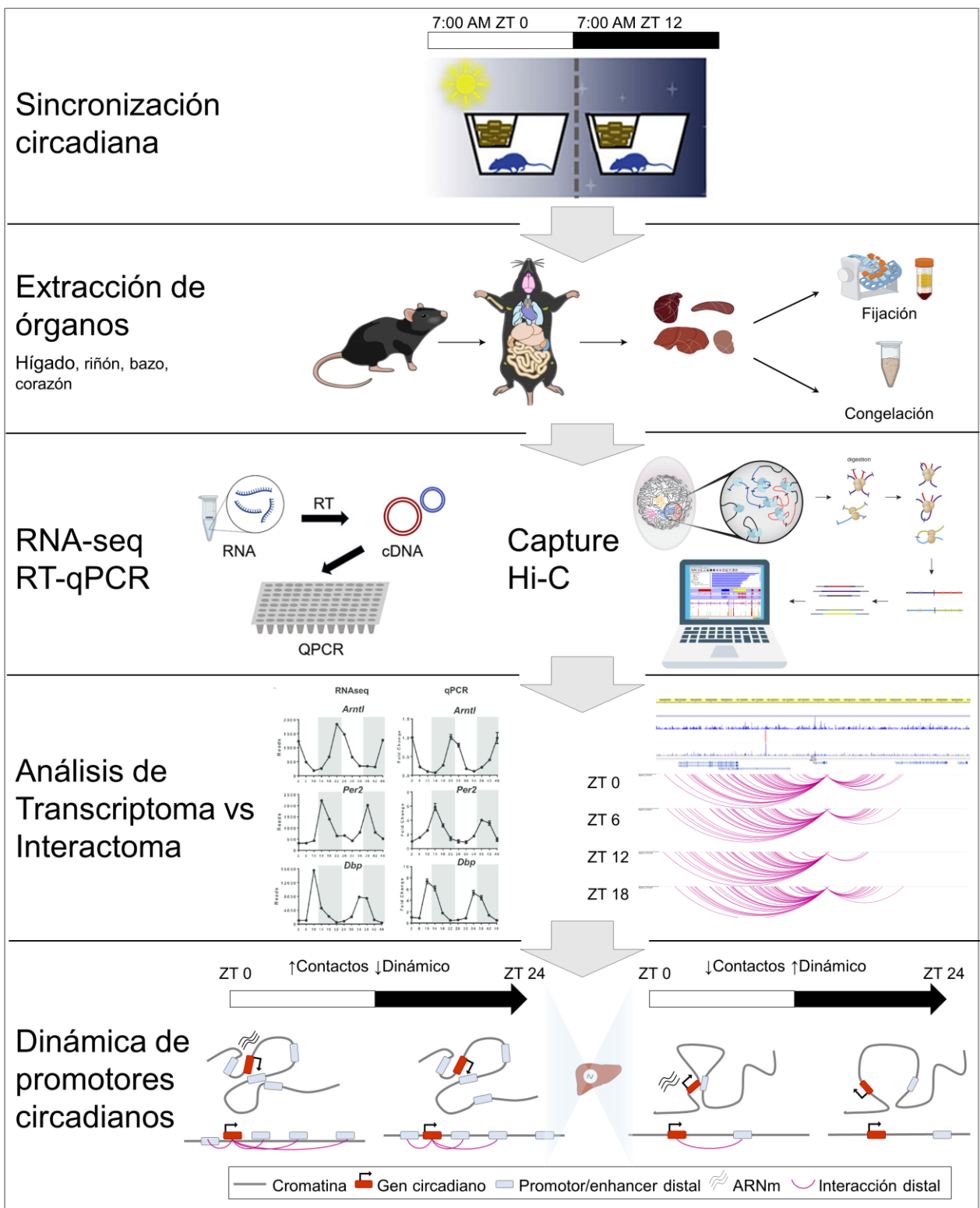
RT-PCR: reverso transcripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa

SCN: núcleo supraquiasmático; del inglés: suprachiasmatic nucleus

TAD: Dominio Topológicamente Asociado

ZT: tiempo *Zeitgeber*, (periodo de tiempo respecto al inicio de la sincronización basado en el ciclo de 24 horas de un organismo, donde ZT0 marca inicio de la luz y ZT12 el inicio de la oscuridad)

RESUMEN GRÁFICO



RESUMEN

El control preciso de la expresión génica es esencial para mantener la homeostasis celular en respuesta a estímulos. La transcripción, que inicia sobre el promotor, depende de elementos reguladores adicionales, como los enhancers, que pueden estar ubicados a distancias considerables en el genoma de sus promotores blanco. Estos elementos ejercen su efecto regulatorio mediante contactos físicos de cromatina. Avances recientes en el estudio de la conformación de la cromatina, como la técnica de Hi-C y su derivado de alta resolución, Capture Hi-C, han subrayado la importancia de la organización tridimensional del genoma dentro del núcleo en el control transcripcional.

Un ejemplo de un sistema que requiere cambios en la expresión génica para responder a estímulos recurrentes es el sistema circadiano. Presente en cada célula en mamíferos, el reloj circadiano orquesta cambios cíclicos en la expresión génica sin alterar la identidad celular, ofreciendo un modelo para explorar el impacto de la organización tridimensional de la cromatina en la regulación transcripcional. Dada la actual falta de certeza completa sobre la influencia de la organización del genoma en la regulación génica circadiana, este trabajo explora la conexión entre la transcripción circadiana y los contactos genómicos.

Aprovechando datos de un experimento de Capture Hi-C realizado en el hígado de ratón, se exploraron los contactos de la cromatina entre los promotores de genes circadianos y los enhancers, con el objetivo de comprender la relación entre estos elementos reguladores distales y su interacción con los promotores circadianos para impulsar la expresión génica rítmica. Centrado en un conjunto de 21 genes, se realizaron ensayos de estandarización para experimentos de Capture Hi-C en tejido murino, se aplicaron análisis bioinformáticos para identificar interacciones significativas y se midieron los niveles de transcripción en cuatro momentos distintos del ciclo circadiano para explorar la relación con los contactos de la cromatina de genes circadianos. También se analizaron contactos en células troncales embrionarias de ratón (mESCs) y se determinaron las interacciones en esta etapa de desarrollo temprano con enhancers anotados en el genoma del hígado de ratón.

Los resultados indicaron que, en hígado de ratón, los genes que no pertenecen al reloj central circadiano tienden a establecer más contactos con una menor variabilidad a lo largo del día en comparación con los genes del reloj central, que muestran menos interacciones, pero con una dinámica mayor. Los genes circadianos, en general, también muestran una preferencia temporal en la que sus contactos coinciden con su máxima transcripción. Además, de manera interesante, algunas interacciones entre los promotores de genes circadianos y elementos enhancer presentes en el hígado de ratón parecen estar preestablecidas en las mESCs.

Estos hallazgos sientan las bases para experimentos de perturbación, en los que se puede estudiar cómo las variaciones genómicas y alteraciones ambientales afectarían las interacciones de la cromatina circadiana. La utilización de modelos de *knockout* o *knockdown* y exponer las células a condiciones diversas ofrecería perspectivas sobre su papel en la modulación de la dinámica de la cromatina en la regulación transcripcional circadiana.

ABSTRACT

Precise control of gene expression is vital for maintaining cellular homeostasis in response to stimuli. Transcription, initiated at the core promoter, relies on additional regulatory elements, such as enhancers. These elements, which may be located at considerable distances away from their target promoters in the genome, transmit their regulatory effect to target promoters by forming physical contacts through chromatin looping. Recent advancements, such as high-throughput Hi-C and its high-resolution derivative, Capture Hi-C, highlight the critical connections between enhancers and promoters throughout the genome, emphasizing the importance of chromosomal organization in transcriptional control.

One example of a system requiring changes in gene expression in response to recurring stimuli is the circadian system in mammals. Present in every cell, the circadian clock orchestrates cyclical changes in gene expression without altering cellular identity, providing a unique model to explore the impact of three-dimensional chromatin organization on transcriptional regulation. Given the current lack of complete certainty regarding the influence of genome organization on circadian gene regulation, this work explores the connection between circadian transcription and genomic contacts.

Leveraging data from a Capture Hi-C experiment conducted in mouse liver, chromatin contacts between circadian gene promoters and enhancer elements were explored, aiming to understand the relationship between distal regulatory elements and their interaction with circadian promoters to drive rhythmic gene expression. Focusing on a set of 21 circadian genes, our approach involves standardizing assays for Capture Hi-C experiments in mouse tissue, using bioinformatic workflows to identify significant interactions, and measuring transcription levels at four distinct time points in relation to the chromatin contacts. Additionally, we analyze contacts in mouse embryonic stem cells (mESCs) and determine interactions in this earlier developmental stage with enhancer regions annotated in the mouse liver genome.

The results indicated that, in mouse liver, non-core clock circadian genes tend to establish more contacts with reduced variability compared to central clock genes, which exhibit fewer interactions but with greater dynamics. Furthermore, circadian genes, in general, preferentially time their contacts with peak transcription. Interestingly, some interactions between circadian gene promoters and enhancer elements in the mouse liver appear pre-established in mESCs.

These findings provide a foundation for perturbation experiments, paving the way to examine how genomic variations and environmental disruptions could impact circadian chromatin interactions. Future implementation of knockout or knockdown models, as well as exposure to diverse conditions, would offer insights into their role in modulating chromatin dynamics.

1 INTRODUCCIÓN

Dentro del núcleo de cada célula eucariota reside el conjunto completo de instrucciones para dirigir el desarrollo, crecimiento y función celular. A pesar de ello, cada célula individual sigue un programa que le confiere sus características distintivas y funciones individuales. Estas instrucciones están codificadas en los genes en las moléculas de ADN. La asociación del ADN con el ARN, y diversas proteínas nucleares conforman la cromatina; que es la plataforma esencial sobre la cual se desencadenan procesos vitales. El primer paso en la conversión del código genético a un producto funcional es la transcripción (D'Oliveira Albanus et al., 2021). Una pregunta de investigación de gran interés es, comprender los mecanismos que regulan la expresión de los genes específicos al tiempo preciso para producir todos los distintos tipos celulares y las funciones biológicas que conforman a un ser vivo.

Un nivel de regulación ampliamente estudiado es el efecto de los elementos regulatorios genómicos, los cuales pueden estar cerca o lejos de los genes. Estos elementos, junto con proteínas como factores de transcripción, desempeñan un papel crucial en la activación de la expresión génica en diferentes condiciones celulares.

Avances recientes en la tecnología de secuenciación genómica, han permitido revelar la conformación espacial de cromatina y su importancia en la activación de la transcripción génica. En las últimas décadas, se ha profundizado en la comprensión del efecto del estado de condensación de la cromatina dictado por marcas epigenéticas y su posicionamiento espacio-temporal dentro del núcleo. Se ha demostrado que la posición del genoma y sus interacciones físicas de la cromatina desempeñan un papel importante en la regulación de genes. Sin embargo, todavía no se comprende completamente el alcance de su impacto ni si los contactos entre regiones de ADN son constantes o transitorios en diferentes contextos celulares. Así mismo, para que se lleven a cabo correctamente los procesos biológicos en la célula, se debe reconocer y responder a estímulos internos y señales ambientales mediante la coordinación de la expresión transcripcional. Los ritmos circadianos son ejemplo de ritmos biológicos orquestados por un reloj molecular que coordinan la expresión de genes en respuesta al ciclo de día y noche.

En esta tesis, se estudia el modelo de la interrelación entre la organización espacial dinámica de la cromatina dentro del núcleo y la expresión cíclica de genes asociados a elementos regulatorios del genoma, como la transcripción de genes circadianos durante un ciclo circadiano. Se investiga la organización espacio-temporal de la cromatina a nivel de contactos de ADN que aproximan a promotores con genes circadianos y su relación con la expresión génica oscilatoria.

1.1 EL CONCEPTO DE RITMO CIRCADIANO

La vida en este planeta está sujeta a la sucesión continua entre luz y oscuridad por la rotación de la tierra alrededor del sol. En anticipación a la repetición del ciclo luz-oscuridad, prácticamente la totalidad de los seres vivos han desarrollado una ritmicidad circadiana (del latín *circa diem*, que quiere decir “aproximadamente un día”) para la mayoría de las funciones fisiológicas y metabólicas vitales. Estos procesos con periodicidad de aproximadamente 24 horas, llamados ciclos circadianos, permiten a un organismo coordinar en sincronía interna y externa actividades endógenas y conductuales a una hora determinada del día. Por ejemplo, en los mamíferos, el proceso conductual con oscilación circadiana más aparente es el ciclo de sueño-vigilia, así como el rendimiento físico y cognitivo, y la ingesta de alimentos. Así mismo, la mayoría de los mamíferos muestran fluctuaciones con niveles máximos cada 24 horas en diversos parámetros fisiológicos como la temperatura corporal, presión arterial, secreción de hormonas y metabolismo (Schibler and Sassone-Corsi, 2002). En las especies nocturnas, como los ratones, se observan las mismas variaciones, pero en fase inversa de luz y oscuridad.

Los sistemas circadianos se distinguen por cumplir tres características: 1. Tienen una entrada o estímulo ambiental 2. Tienen un oscilador endógeno auto regulado y 3. Producen un efecto cíclico auto sostenible. Es decir, los relojes circadianos se pueden sincronizar o “entrenar” por señales externas y una vez iniciados producen un efecto que se mantiene aún en ausencia del estímulo inicial. A una señal capaz de sincronizar el reloj circadiano, se le conoce como un *zeitgeber* que tiene la capacidad de provocar el reinicio del reloj circadiano; lo que se traduce en una sincronización su fase. Aunque la luz es el *zeitgeber* predominante en la mayoría de los organismos, otros estímulos como la ingesta de alimentos, la temperatura y el ejercicio, también pueden influir en el comportamiento de los ritmos circadianos (Tahara et al., 2016).

1.1.1 La organización jerárquica del reloj circadiano: el reloj central y los relojes periféricos

Una vez establecida la presencia de una ritmicidad endógena de 24 h en el organismo, queda por comprender cómo se establece, se mantiene y se organiza temporalmente este proceso. Los relojes circadianos en mamíferos tienen una estructuración jerárquica. Aunque existen relojes específicos en órganos, tejidos, y células; un reloj central, situado en el hipotálamo, desempeña el papel de marcapasos maestro. Este reloj central percibe los estímulos luminosos del entorno a través de vías de señalización y coordina a los demás relojes periféricos (Yoo et al., 2004). La luz se detecta por fotorreceptores en la retina y desencadena señales sinápticas que se transmiten a un grupo de neuronas especializadas en el hipotálamo anterior a través del tracto retino-hipotalámico. A este grupo de neuronas especializadas –unas 20

mil en ratones, y 50 mil en humanos— se les conoce como el núcleo supraquiasmático (Ralph et al. 1990). El núcleo supraquiasmático es el regulador fisiológico maestro de las oscilaciones circadianas en mamíferos; es el punto de partida a partir del cual emanan las señales sistémicas a los demás sistemas de órganos mediante una combinación de señales neuroendocrinas y sinapsis eléctricas (Bollinger y Schibler, 2014). Su precisión y constancia involucran mecanismos moleculares dentro de cada célula.

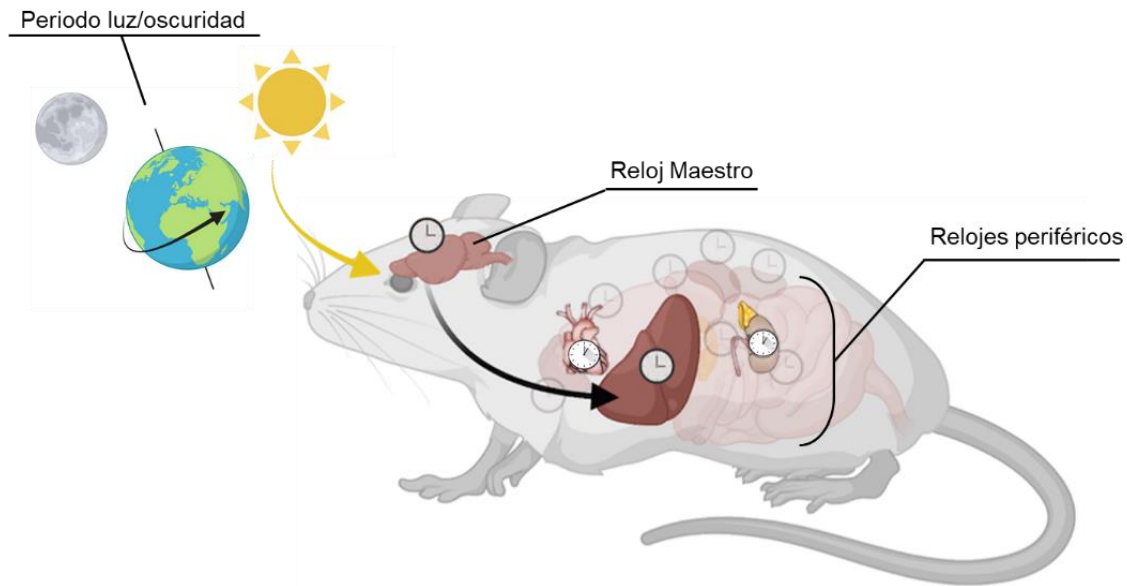


Figura 1. Jerarquía de los relojes circadianos. En mamíferos existe un reloj central que se conoce como el núcleo supraquiasmático. Este grupo de neuronas es responsable de integrar las señales originadas por la luz del ambiente y detectadas por la retina para coordinar a los demás relojes periféricos del organismo.

1.1.2 Componentes moleculares del reloj central

El hallazgo de los mecanismos moleculares que rigen los ritmos circadianos representa un hito fundamental en el campo de la biología molecular. En el 2017, los científicos Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash y Michael W. Young recibieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina por sus investigaciones sobre los ritmos circadianos y la identificación de los genes que controlan el reloj biológico interno. Este reconocimiento demuestra la importancia y complejidad del estudio de los ritmos circadianos y sus implicaciones en la salud y la enfermedad. El circuito de retroalimentación transcripcional-traduccionales autorregulado descubierto por estos científicos en el núcleo supraquiasmático, y en particular la identificación de genes específicos involucrados en la regulación de los ritmos circadianos, ha sido crucial para nuestra comprensión actual del reloj biológico y su función en la salud humana.

A nivel molecular, el reloj circadiano se compone de circuitos interconectados de retroalimentación positiva y negativa transcripcionales y traduccionales (Ueda et al., 2005).

Estos circuitos regulan la expresión rítmica de los componentes del reloj tanto en el núcleo supraquiasmático como en los órganos periféricos. El mecanismo central del reloj circadiano en mamíferos, se establece a través de elementos positivos que activan la expresión de los genes de elementos negativos, cuyos productos proteicos eventualmente inhiben la acción de los mismos elementos positivos, estableciendo un ciclo de retroalimentación auto-reguladora (Figura 2) (Revisado en Takahashi et al., 2008). Los componentes esenciales del reloj circadiano son aquellos genes cuyos productos proteicos son indispensables para la generación y regulación de ritmos circadianos dentro de las células del organismo (Takahashi, 2004). Además, estos elementos representan factores transcripcionales que desempeñan un papel crucial en la regulación de la transcripción rítmica de miles de otros genes en mamíferos (Zhu et al., 2020).

En mamíferos, el circuito positivo principal inicia con los factores de transcripción BMAL1 y CLOCK que forman heterodímeros y se translocan al núcleo para activar la transcripción de los genes *Per* (*Per1*, *Per2*, Y *Per3*) y *Cry* (*Cry1*, *Cry2*, *Cry3*) al unirse a los motivos de E-box en su región promotora (Zhang y Kay, 2010). La regulación negativa de la transcripción ocurre cuando los elementos resultantes, PER y CRY, se unen y provocan la inhibición del heterodímero CLOCK/BMAL1. Así mismo, un circuito de regulación circadiana secundario involucra al complejo CLOCK/BMAL1 cuando activa la transcripción de los receptores nucleares *Rev-erb α* y *Ror α* , cuyos productos proteicos a su vez reprimen y activan, respectivamente, la expresión de *Bmal1*, produciendo el comportamiento oscilatorio de BMAL1 (Figura 2). El ciclo se completa y se vuelve a iniciar aproximadamente cada 24 horas (Zhao et al., 2014).

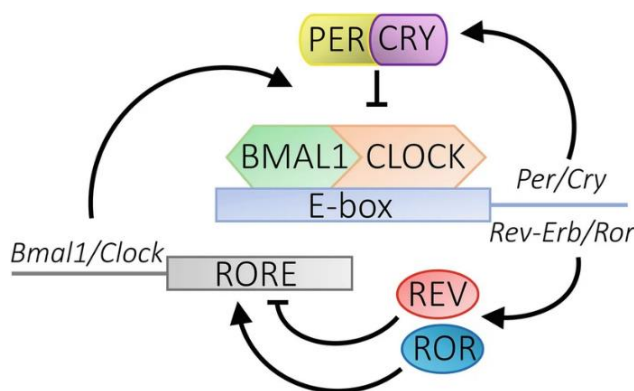


Figura 2: Mecanismo molecular del reloj central. El circuito comienza con la formación de heterodímeros entre los factores de transcripción BMAL1 y CLOCK, que promueven la transcripción de los genes *Per* y *Cry*. La regulación negativa ocurre cuando los elementos PER y CRY inhiben el heterodímero CLOCK/BMAL1. Un asa de regulación secundario involucra a *Rev-erb α* y *Ror α* , que reprimen y activan, respectivamente, la expresión de *Bmal1*, generando oscilaciones en BMAL1 (Mendoza et al., 2023).

1.1.3 Transcripción circadiana

Se ha invertido gran esfuerzo en comprender la naturaleza del ciclo circadiano a nivel de transcriptoma de diversos tejidos en mamíferos. Gracias a los avances en las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento y herramientas bioinformáticas, en los últimos años ha habido un progreso significativo en la comprensión de la regulación transcripcional circadiana del genoma completo (Panda, et al. 2002; Storch et al., 2002, Zhang et al. 2004 Vollmers et al. 2009; Fang et al 2014). Una gran parte del genoma está bajo regulación circadiana. El análisis del transcriptoma en varios tejidos y tipos de células ha revelado que miles de genes muestran patrones de expresión rítmicos, lo que sugiere que hay una influencia generalizada de los relojes circadianos en la expresión génica. Lo que se sabe a partir de estos estudios, es que hasta el 20% de los transcritos son sujetos a una expresión oscilante; sin embargo, el porcentaje exacto del genoma que es circadiano sigue siendo incierto, ya que puede variar dependiendo del tejido u organismo que se estudie (Zhang et al., 2014).

1.2 REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN EN MAMÍFEROS

Un ser vivo está conformado por cientos de tipos celulares específicos que comparten el mismo genoma. Como resultado del empeño que se ha puesto en comprender lo que conlleva a esta variedad, se ha determinado que el fundamento de la diversidad durante la diferenciación celular y el desarrollo radica en los intrincados mecanismos de la expresión génica diferencial. Entre los 15 a 30 mil genes que puede englobar el genoma de un organismo eucarionte, las células diferenciadas expresan un conjunto específico de genes para generar las proteínas que le confieren su identidad celular y en última instancia las propiedades características de los diferentes tejidos (Lis, 2019). La regulación de la expresión de genes a partir de un mismo genoma es vital para asegurar la función celular de un organismo.

El primer paso crítico en la cual se transfiere la información genética desde el ADN a otros productos funcionales es la transcripción. Si bien la secuencia de ADN contiene la información utilizada en la ejecución de un programa transcripcional, la accesibilidad de la maquinaria transcripcional y factores transcripcionales a la cromatina desempeña un papel crucial en la regulación de este proceso (Vaquerizas et al., 2009). Se ha descubierto que la accesibilidad a la cromatina es modulada por modificaciones directas en la secuencia de ADN o por modificaciones postraduccionales sobre las histonas de los nucleosomas (Ong and Corces, 2011). Por ejemplo, se sabe que modificaciones químicas de histonas como la acetilación (ac), metilación (me), fosforilación (P) y ubiquitinación (ub), así como la

modificación de las bases nucleotídicas del ADN como la metilación, influyen en la accesibilidad de la cromatina.

Además, se ha observado que la organización espacial de los cromosomas desempeña un papel importante en la regulación a nivel global. Los cromosomas se organizan en territorios específicos dentro del núcleo celular, y las interacciones intercromosómicas y a larga distancia entre regiones genómicas son comunes. Se ha demostrado que la posición de los territorios cromosómicos se correlaciona con la actividad transcripcional, y las regiones con actividad transcripcional similar tienden a colocarse en el espacio nuclear, formando "fábricas de transcripción" donde es probable que compartan la maquinaria de transcripción (Jackson et al., 1993; Mitchell y Fraser, 2008).

Durante las últimas décadas, se ha avanzado de manera exponencial el conocimiento sobre mecanismos que confieren cambios a la expresión de genes pero que no son debido a cambios directos a la secuencia del ADN. Estos diversos niveles de regulación ocurren en conjunto para coordinar la expresión génica para dar identidad a un tipo celular y asegurar el funcionamiento adecuado de las células.

1.2.1 Elementos genómicos de regulación transcripcional

Por lo general, un gen está regulado por una región con una secuencia específica de ADN, que se encuentra río arriba del sitio de inicio de la transcripción (aproximadamente -500 pb a -1000 pb), conocida como promotor. Es un sitio de acoplamiento para varias proteínas de la maquinaria transcripcional.

Mientras el promotor de un gen define dónde inicia la transcripción, las secuencias reguladoras pueden aumentar o disminuir la eficiencia de la transcripción. Estos elementos del genoma se conocen como reguladores en *cis* y actúan de una manera independiente de posición y orientación con respecto al promotor.

1.2.2 Enhancers

Una clase de elementos de regulación genómicos determinantes en la expresión génica espaciotemporal se conocen como enhancers que tienen la habilidad de alterar positivamente la expresión, independientemente de su orientación o distancia linear con respecto a sus genes blanco. Técnicas desarrolladas más recientemente han permitido caracterizar a dichos elementos en función de la sensibilidad a la DNAsa I (lo que sugiere cromatina accesible), la presencia de secuencias consenso para unión a factores de transcripción, así como modificaciones sobre histonas (Bulger and Groudine, 2011; Levine 2010; Blackwood et al., 1998). En la actualidad, se ha integrado el uso de técnicas genómicas como el acoplamiento

de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) para ciertas modificaciones de histonas, con secuenciación masiva; lo que ha permitido la predicción de enhancers. Por ejemplo, la detección de una relación alta de monometilación sobre la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me1) en comparación con la trimetilación (H2K4me3) al mismo tiempo de la presencia de la acetilación de la lisina 27 sobre la histona H3 (H3K27ac) sobre una región genómica se atribuye a enhancers (revisado en Li et al., 2016). Con base en estas características, modelos computacionales han permitido la predicción desde cientos de miles hasta millones de enhancers en el genoma de mamíferos (Qin et al., 2022).

1.2.2.1 Transcritos de enhancers: eRNAs

Cada vez más investigaciones respaldan que los enhancers funcionales son elementos transcripcionales que dan origen a transcritos no codificantes conocidos como enhancer-RNAs (eRNAs). Estos eRNAs son ARNs generados a partir de enhancers y han sido implicados en la regulación de la expresión génica, lo que sugiere que desempeñan un papel en la red de regulación transcripcional.

Se ha demostrado que la presencia de eRNAs está asociada a la actividad de enhancers, lo que refuerza su potencial importancia como mediadores de la regulación génica en diversos contextos biológicos. (revisado en Li et al., 2016). Varios grupos de investigación han comprobado que enhancers previamente anotados por sus marcas epigenéticas generan transcritos de ARN (De Santa et al., Kim et al., 2010). A partir del establecimiento de este descubrimiento, técnicas de secuenciación para detectar transcritos primarios se han desarrollado para estudiar la transcripción de eRNAs.

Algunos grupos han observado que, en comparación con los enhancers que no generan transcritos de manera robusta, aquellos que lo hacen muestran con mayor frecuencia la unión de co-activadores transcripcionales y una mayor accesibilidad de la cromatina en las regiones genómicas asociadas a estos elementos de regulación distal. Estos mecanismos pueden contribuir a la actividad del enhancer y a la expresión del gen cercano en *cis* (revisado en Li et al., 2016).

En el mismo sentido, un concepto actualmente en debate es la definición de un enhancer activo. Como se mencionó antes, la anotación genómica de los enhancers es principalmente una predicción basada en marcas epigenéticas. Se ha sugerido que la presencia de una mayor cantidad de factores de transcripción en las regiones marcadas como enhancers podría ser una señal de que se trata de enhancers funcionales. De manera intrigante, los enhancers definidos bajo este criterio a menudo muestran niveles significativos de transcripción de eRNA (Hah et al., 2015).

1.2.3 Insulators

Se les conoce como insulators a los elementos de regulación en *cis* que tienen la capacidad de prevenir la activación o represión de expresión transcripcional por factores en *cis* o en *trans* (Wallace and Felsenfeld, 2007). Su caracterización permite dividir a los insulators de acuerdo con su función: los que tienen la habilidad de bloquear la acción de un enhancer sobre un promotor, de manera dependiente de posición y orientación; así como los que tienen la capacidad de silenciar genes mediante la propagación de la heterocromatina por la formación de una “barrera” (Geyer et al., 1986, Recillas-Targa et al., 2002). Un ejemplo clásico de un insulator que bloquea a enhancers es el motivo de CTCF al cual se une el factor CTCF; una proteína con 11 dedos de zinc, expresada ubicuamente, y altamente conservada (Moon, 2005). Se ha demostrado que la capacidad para bloquear interacciones promotor-enhancer por regiones insulator en vertebrados es mediada por CTCF (Burgess-Beusse et al. 2002).

1.3 ORGANIZACIÓN TRIDIMENSIONAL DEL GENOMA A GRAN ESCALA

El arreglo espacial del genoma en el interior del núcleo no se produce de manera aleatoria. Por el contrario, a través de una variedad de estrategias experimentales, se ha evidenciado que la organización espacial de los cromosomas es altamente ordenada y regulada (Cremer y Cremer, 2001). La organización tridimensional del genoma, también conocida como la arquitectura del genoma en el núcleo, acumula cada vez más evidencia de tener un papel fundamental en la regulación de la expresión génica y en la función celular en general. Investigaciones han revelado que los cromosomas no se encuentran dispersos al azar dentro del núcleo, sino que adoptan posiciones específicas y se organizan en compartimentos que pueden influir en la interacción entre regiones genómicas distantes.

1.3.1 Territorios cromosómicos

Dentro del núcleo, el genoma se encuentra organizado en regiones espaciales discretas conocidas como territorios cromosómicos (Figura 3). El arreglo de los territorios cromosómicos dentro del núcleo ha sido estudiado mediante ensayos de hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) con sondas específicas acopladas a fluoróforos diversos para distinguir entre cada uno (Bolzer et al., 2005; Cremer et al., 2010, Lichter et al., 1988, Pinkel et al., 1988). La arquitectura de los territorios cromosómicos también ha sido estudiada a detalle con la ayuda de técnicas de microscopía de alta resolución (Baddeley et al., 2010; Markaki et al., 2010). Además, la implementación de nuevas técnicas (ver sección de Captura Conformacional de Cromosomas) para estudiar la organización tri-dimensional del genoma

corroboran las observaciones basadas en microscopía (Lieberman Aiden et al., 2009, Zhang et al., 2012).

Se ha observado que el arreglo espacial de estos territorios no sigue un patrón aleatorio y parece coincidir con rasgos cromosómicos como el tamaño, la actividad de replicación, el contenido GC, y la densidad génica (Croft 1999, Tanabe 2002). Los cromosomas de menor tamaño y con mayor densidad génica interaccionan preferentemente entre sí y se agrupan hacia el centro del núcleo, mientras que aquellos más grandes y con menor densidad de genes tienden a localizarse hacia la periferia nuclear (Lieberman-Aiden, 2009; Zhang 2012). Además, se observa con frecuencia interacciones entre cromosomas específicos, lo que favorece las interacciones a larga distancia entre regiones genómicas.



Figura 3. Niveles de organización del genoma. A un nivel global existe la compartimentación de los cromosomas que ocupan un lugar discreto dentro del núcleo; a un nivel intermedio, cada cromosoma se organiza en compartimento; a un nivel más local, la cromatina forma asas mediadas por proteína que permiten acercar espacialmente a elementos de regulación transcripcional como enhancers con promotores, (adaptado de Fu et al., 2018)

1.3.2 Formación de asas de cromatina y regulación a distancia

El estudio de las interacciones existentes permite idear modelos que involucren la formación de asas intracromosómicas. Estos modelos no sólo proporcionan información valiosa sobre la estructura tridimensional del genoma, sino que también proveen datos para realizar estudios sobre su relevancia funcional. Como se ha mencionado, los elementos de regulación como promotores, enhancers, e insulators ocupan ubicaciones distantes en la secuencia lineal del genoma, pero influyen sobre sus blancos para regular la expresión mediante proximidad espacial.

El modelo ampliamente aceptado para explicar cómo estos elementos de regulación pueden estar situados a larga distancia en el genoma lineal, pero operar en proximidad espacial, es la formación de asas en la fibra de cromatina dentro del núcleo (Fraser and Bickmore, 2007).

1.4 ESTUDIO DE INTERACCIONES A LARGA DISTANCIA DE LA CROMATINA

En tiempos recientes, el notable aumento en la disponibilidad de recursos de secuenciación y capacidad computacional para analizar datos ha permitido un profundo avance en el conocimiento de procesos biológicos complejos, como la organización cromosómica a nivel genómico. En los últimos años se han presenciado avances impresionantes en el entendimiento de la estructura inter-nuclear. A continuación, se describen algunos de los métodos más relevantes utilizados para desentrañar la organización del genoma.

1.4.1 Captura conformacional del cromosoma (3C) y derivados

El método 3C (Chromatin Conformation Capture) fue desarrollado con el propósito de detectar interacciones entre dos segmentos de cromatina y sentó las bases para el desarrollo de métodos de captura de la conformación para estudiar la organización tridimensional del genoma (Dekker et al., 2002). El fundamento central del 3C y todas sus técnicas derivadas se basa en el proceso de entrecruzamiento químico del contenido nuclear que fija la cromatina en su ubicación espacial dentro del núcleo, seguido por la fragmentación del ADN con enzimas de restricción y la posterior ligación de estos fragmentos (Figura 4). Una vez que se revierte el entrecruzamiento, se obtienen moléculas híbridas que contienen dos regiones del genoma que pueden estar separadas en la secuencia lineal del ADN, pero que físicamente se encuentran cercanas en el espacio tridimensional del núcleo celular. Las interacciones de un 3C se detectan por PCR, lo que requiere el diseño de oligonucleótidos específicos para cada región de interés (uno contra uno). La técnica de captura de conformación cromosómica circular (4C) se desarrolló después para estudiar interacciones de un locus seleccionado con el resto del genoma (uno contra todos), combinando los principios de la técnica 3C con secuenciación de alto rendimiento.

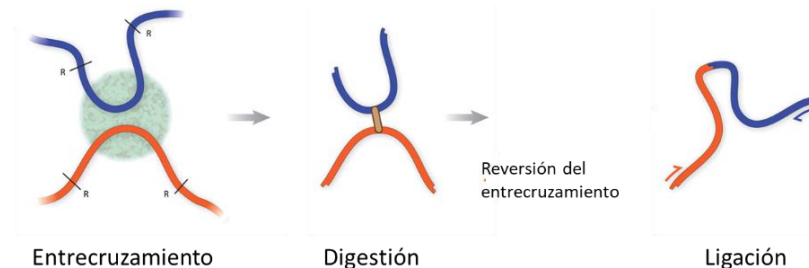


Figura 4. Ilustración del fundamento de 3C. Dos regiones linealmente distales en el genoma, pero espacialmente próximas (representadas por líneas de cromatina azul y roja) quedan entrecruzadas químicamente, tras la digestión y reversión de entrecruzamiento es posible identificar a la interacción de ambas regiones si se cuenta con los oligonucleótidos de PCR.

1.4.1.1 Hi-C

Para obtener un panorama de las interacciones que existen entre las distintas regiones del genoma completo, se desarrolló Hi-C (Lieberman-Aiden et al., 2009). Este método enriquece los eventos de ligación mediante el uso de biotina después de la digestión (Figura 5). Tras la ligación de sitios romo, los complejos se enriquecen con una purificación utilizando estreptavidina para obtener solo a los fragmentos ligados. La secuenciación masiva de los fragmentos recuperados es posible con el uso de adaptadores utilizados tras la creación de una biblioteca. Después de la secuenciación el mapeo de las secuencias permite identificar interacciones entre dos loci distintos.

Para analizar la configuración de la cromatina a nivel del genoma completo, se emplea la técnica Hi-C. No obstante, cuando se busca explorar las interacciones entre elementos específicos a escala global, surge la necesidad de secuenciar el genoma en su totalidad y con gran profundidad. Por ejemplo, la resolución del experimento original fue de 1 Mb (Lieberman-Aiden et al., 2009) y para obtener un incremento a una resolución de 100 Kb se necesitaría un incremento en la profundidad de secuenciación de 100 veces. Dicho de otra manera, el incremento unitario en la resolución requiere de un incremento cuadrático de la profundidad de la secuenciación, volviéndolo poco práctico y costoso.

Sin embargo, se ha desarrollado recientemente una alternativa para explorar las interacciones de regiones específicas distribuidas en todo el genoma: la técnica conocida como Capture Hi-C. Esta metodología se utiliza para obtener los resultados analizados en este trabajo y se describe a continuación.

Capture Hi-C es una versión modificada de la técnica Hi-C que permite investigar de manera dirigida las interacciones entre regiones genómicas específicas. Involucra la selección y enriquecimiento de regiones de interés mediante sondas de captura diseñadas a medida, seguido de la fijación cruzada, digestión, ligación y secuenciación (Figura 5). Al centrarse en regiones específicas, el Capture Hi-C proporciona una visión de mayor resolución de las interacciones que involucran esas regiones, lo que permite una investigación más detallada de sus interacciones regulatorias. Esta técnica ha demostrado ser valiosa para estudiar el panorama regulatorio del genoma y comprender las implicaciones funcionales de interacciones genómicas específicas.

Para enriquecer zonas específicas, se genera un conjunto de sondas biotiniladas que se utilizan como “carnadas” o “baits”, para capturar por ejemplo los promotores del genoma, a partir de la biblioteca de Hi-C. Estos baits enriquecen la selección, permitiendo la identificación de

todas las interacciones con las regiones seleccionadas, permitiendo el estudio detallado de las interacciones genómicas en esas áreas específicas (Figura 5 y Figura 6).

1.4.1.2 Capture Hi-C

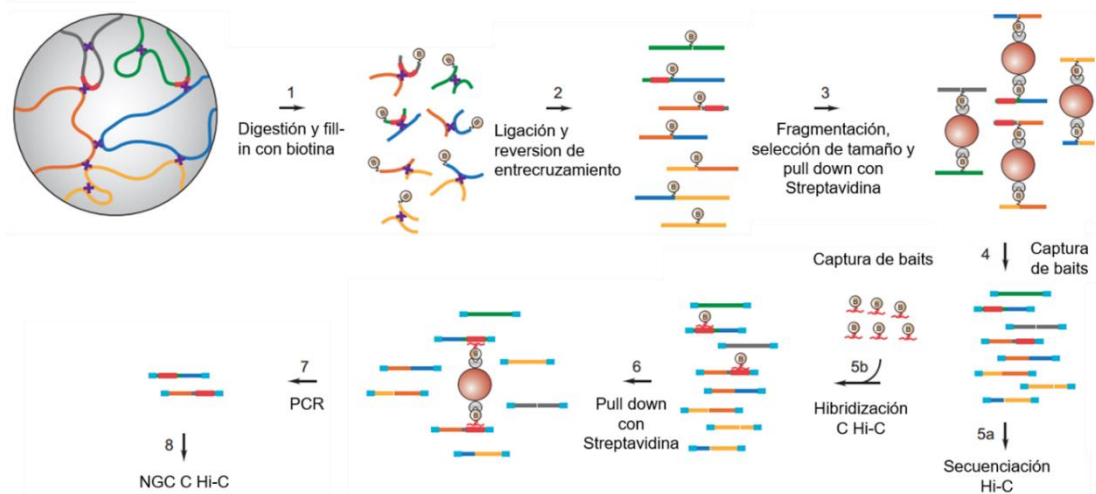


Figura 5. Esquema general del procedimiento de un experimento de Capture Hi-C. Hasta el punto 4 se sigue el mismo procedimiento que para un Hi-C convencional. El diseño y uso de sondas biotiniladas permite enriquecer, en una segunda fase de selección, los fragmentos que contengan el elemento de interés (por ejemplo, los promotores) (modificado de Furlan-Magaril, et al., 2015).

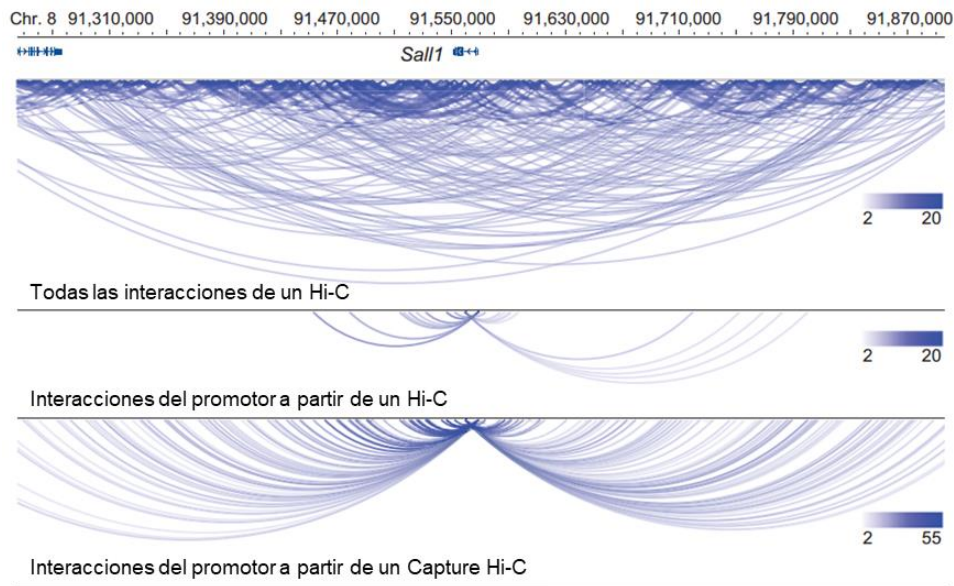


Figura 6. Comparación de perfil de interacciones de un Hi-C con el de un Capture Hi-C para el mismo promotor. Con la misma profundidad de secuenciación, se observan distintos perfiles de interacción a partir de un mismo promotor. En el panel superior se observan todas las interacciones del genoma determinadas por Hi-C, en el medio se observan las interacciones observables únicamente con el promotor de *Sall1* del mismo experimento, y en el panel inferior un experimento de Capture Hi-C en el cual se utiliza una sonda para el promotor *Sall1*. Este resultado demuestra como la adaptación de la técnica permite observar una cantidad considerablemente superior de interacciones con la misma profundidad de secuenciación (Schoenfelder et al 2015).

2 ANTECEDENTES

2.1 EVIDENCIA EN FAVOR Y EN CONTRA DE LA DINÁMICA DE LOS CONTACTOS PARA ESTABLECER ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL

Los estudios que investigan los contactos de la cromatina en relación con la expresión transcripcional han revelado una naturaleza dinámica con distintos grados de estabilidad dependiendo del contexto. Algunos contactos se originan y se vuelven estables en ciertas situaciones, indicando una relación regulatoria persistente. Sin embargo, otros estudios han encontrado que los contactos cromatínicos pueden exhibir características dinámicas, lo que sugiere que la interacción entre elementos reguladores puede variar en su estabilidad y duración en diferentes circunstancias.

En algunos contextos de diferenciación celular y desarrollo, se han observado etapas en las que se forman asas dinámicas de cromatina que acercan elementos reguladores distantes a promotores de genes. Estas asas desempeñan un papel fundamental al aproximar físicamente a los enhancers con sus genes objetivo, y están involucradas en la regulación de la expresión de genes específicos de tejidos. En estos estudios, se ha notado que las interacciones entre enhancers y promotores se producen en tipos celulares donde los enhancers están activos, pero no se encuentran en tipos celulares donde los enhancers están inactivos. Este comportamiento dinámico de las interacciones entre enhancers y promotores está estrechamente relacionado con la actividad específica de los elementos reguladores asociados en cada tipo celular. (Schoenfelder et al 2015; Javierre et al 2016; Hnisz et al 2017; y Downen et al 2014). También existe evidencia que demuestra que la interacción enhancer-promotor es restringida de manera espaciotemporal en células donde el gen estudiado es activo (Williamson et al., 2012; Williamson et al., 2016; Buntig et al., 2016).

Por otro lado, hay cierta evidencia que demuestra cómo las interacciones enhancer-promotor tienden a ser estables sin importar la actividad del enhancer (Montavon et al., 2011; Ghavi-Helm et al., 2014). En estas investigaciones se identificó que una vez que se forman, los contactos entre elementos reguladores distales y promotores génicos, estos tienden a ser altamente estables a lo largo del tiempo, contribuyendo a la regulación precisa de la expresión génica.

Por lo tanto, el conjunto de evidencias respalda una perspectiva dual: mientras que ciertos contactos cromatínicos pueden ser estables y persistir en el tiempo, facilitando una regulación génica sostenida, otros contactos pueden llevar a cabo remodelaciones y reorganizaciones en respuesta a diferentes señales celulares y estímulos ambientales. Estos hallazgos subrayan

colectivamente la importancia de investigar la dinámica de la formación de contactos en diversos contextos biológicos, mejorando así la comprensión de los mecanismos de regulación transcripcional y la participación de los elementos reguladores distales en la activación de los genes objetivo

2.2 CONFORMACIÓN DE LA CROMATINA Y REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DE GENES CIRCADIANOS

Se sabe menos sobre la dinámica del plegamiento de la cromatina y su relación con la transcripción en el contexto de la expresión de genes circadianos. Para empezar a abordar esta pregunta algunos grupos de investigadores han explorado los cambios en las interacciones desde loci circadianos discretos. Por ejemplo, un estudio utilizando la técnica 4C (que permite observar las interacciones desde un solo locus) sobre el promotor del gen circadiano *Dbp* en cultivos de fibroblastos de ratón, describe la red de interacciones rítmicas que ocurren durante un curso temporal. Se determinó que algunos de los contactos en *trans* que fluctúan se atenúan en células mutantes para el impulsor clave de la retroalimentación positiva en el reloj circadiano central *Bmal1* (Aguilar-Arnal et al., 2013). En otro estudio, se exploró un mecanismo de represión de la transcripción de ciertos genes circadianos en el que podría estar vinculada a la asociación de sus loci con dominios asociados a la lámina (LADs). En particular, detallan sobre la expresión circadiana del gen *Pard3* que depende de su asociación rítmica a un LAD en un mecanismo que involucra en conjunto a la proteína estructural de la cromatina CTCF y la enzima PARP1 (poli(ADP-ribosa)polimerasa) (Zhao et al., 2015).

Simultáneamente al desarrollo de esta tesis, dos grupos publicaron estudios muy relevantes para nuestra pregunta de investigación inicial. El primero investigó la dinámica de contactos entre promotores de ciertos genes circadianos en hígado de ratón durante un ciclo completo (Mermet, et al., 2018, Yeung, et al., 2018). El segundo exploró a nivel global sobre el mecanismo y relevancia del plegamiento de la cromatina entorno a la transcripción circadiana (Kim et al., 2018). Al observar los cambios que ocurren en la organización tri-dimensional, reportan que, en concordancia con la literatura, los contactos permanecen estables dentro de sus TADs correspondientes, habiendo una cantidad considerable de cambios en contactos entre enhancers y promotores. El estudio se enfoca en los cambios que ocurren sobre el locus del gen circadiano *Cry1*, determinando que la unión de un elemento del reloj central negativo, *Rev-erb α* , sobre la cromatina ocurre en un momento opuesto del día (en anti-fase) a la expresión del gen *Cry1*. Por lo tanto, determinan que a nivel de cromatina un componente

represivo del reloj molecular opera mediante la modulación rítmica de asas de cromatina para controlar la transcripción génica circadiana

A pesar de los avances realizados, aún persiste la falta de una clasificación contundente sobre cómo los contactos de cromatina y organización espacial de la cromatina se relacionan con la fluctuación en los niveles de la expresión génica de los genes circadianos. Se destacan dos escenarios: uno donde la estabilidad se correlaciona con la actividad del enhancer, y otro donde las interacciones permanecen estables independientemente del contacto entre promotor-enhancer, contribuyendo a la regulación de la expresión génica.

Con el objetivo de abordar esta incógnita, con este trabajo analizamos detalladamente el interactoma de un conjunto de genes circadianos. Nuestro objetivo principal fue identificar una relación entre la dinámica de la organización espacial de estos genes y su estado epigenético en las regiones con las que establecen contacto, así como su estado de transcripción.

Para lograr dicho análisis, se parte de datos obtenidos por un experimento que utilizó la técnica Capture Hi-C en hígado de ratones adultos los cuales revelan las interacciones que existen con todos los promotores del genoma de ratón (Furlan-Magaril et al., 2021). Datos de particular interés generados a partir de tal estudio, que fueron explorados en esta tesis, son las interacciones entre los promotores con elementos tipo enhancer que se transcriben de manera circadiana.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3.1 EL CICLO CIRCADIANO COMO MODELO PARA ESTUDIAR EL PAPEL DE LAS PROPIEDADES DINÁMICAS DE LA CROMATINA EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL

Ante la incertidumbre actual sobre el papel de la organización del genoma en la regulación de la expresión génica, es crucial abordar la cuestión utilizando un modelo que permita investigar si las variaciones en la expresión oscilante en tejidos específicos se relacionan con las fluctuaciones periódicas en las interacciones entre promotores circadianos y elementos enhancer, como ocurre durante un ciclo circadiano. El sistema circadiano se presenta como un modelo ideal, ya que exhibe cambios transitorios y recurrentes en la expresión génica sin alterar la identidad celular. Esto nos proporciona la oportunidad de estudiar el impacto del arreglo tridimensional de la cromatina en la regulación transcripcional.

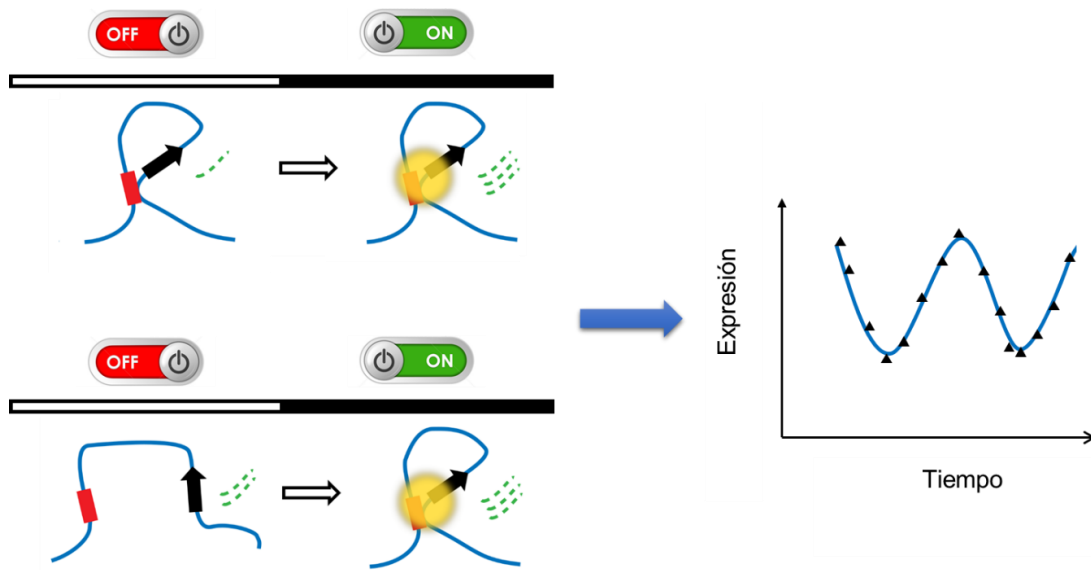


Figura 7 Dos escenarios clave relacionados con la regulación de la expresión génica circadiana. En la parte superior, se muestra cómo la presencia de contacto cromatina se correlaciona con la expresión génica. En la parte inferior, se observa la persistencia de la expresión génica en ausencia de contacto cromatina. Estos hallazgos plantean preguntas sobre la necesidad del contacto cromatina en la regulación precisa de la expresión génica circadiana.

4 HIPÓTESIS

Los promotores de genes circadianos establecerán contactos rítmicos con elementos de regulación durante el ciclo circadiano y estos serán más abundantes en el punto temporal de mayor expresión del gen en cuestión.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar las interacciones dinámicas de promotores para un conjunto de genes circadianos en cuatro puntos temporales durante un ciclo circadiano en células de hígado de ratón

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Generar una lista de genes candidatos para estudiar el interactoma circadiano en ratón
2. Realizar una comparación entre las interacciones determinadas partir de un experimento Capture Hi-C y los niveles transcripción de genes circadianos en hígado de ratón entre 4 puntos del día
3. Determinar las interacciones entre los promotores del conjunto de genes seleccionados en células troncales embrionarias de ratón (mESCs) con regiones de enhancers anotado en tejido hepático
4. Sincronizar ratones con un ciclo LD 12:12 y validar la transcripción rítmica de los genes circadianos a partir de muestras de células de hígado y riñón
5. Estandarizar un protocolo de Capture Hi-C utilizando tejidos de ratones bajo un ciclo LD 12:12
6. Diseñar sondas de captura de promotores de genes circadianos para un experimento de Capture-Hi C

6 MÉTODOS Y MATERIALES

6.1 SELECCIÓN DE GENES PARA ESTUDIO DEL INTERACTOMA DURANTE UN CICLO CIRCADIANO

Se eligieron los genes para el estudio del interactoma en el hígado de ratón adultos en función de las interacciones de los promotores determinadas por el experimento de Capture Hi-C realizado por el equipo de la Dra. Mayra Furlan-Magaril (Furlan-Magaril et al., 2021). Mediante un flujo de trabajo que a continuación se describe, se seleccionaron 21 genes candidato considerando que dichos promotores tuvieran interacciones significativas con enhancers, con expresión en hígado, bazo, corazón, y riñón, y que muestran transcripción circadiana.

Para acotar la lista de genes, se determinaron las interacciones a distancia significativas empleando la herramienta bioinformática CHiCAGO (Cairns et al., 2015). Este paquete estadístico depura a las interacciones significativas y les asigna un valor o “score” a cada interacción. Con CHiCAGO se obtuvo una lista de los promotores de genes con interacciones significativas. A partir de esta lista, se seleccionó un sub-conjunto cruzando la información de las posiciones genómicas de las interacciones de dichos promotores con datos públicamente disponibles de las posiciones genómicas de elementos enhancer que se transcriben de manera circádica (Vollmers et al., 2013, Fang et al., 2014).

Una vez generada una lista precursora, fue necesario realizar un análisis manual del panorama de interacción de cada gen particular para asegurar que el gen prospectivo cumpliera con los requisitos previamente mencionado, utilizando la herramienta SeqMonk. También se buscó a cada gen en la base de datos Circa DB que recopila los perfiles de expresión de genes circadianos para verificar su transcripción circádica. Así mismo, se confirmó en la literatura que la expresión de dichos genes fuera reportada en bazo, corazón, hígado, y riñón.

6.2 SINCRONIZACIÓN CIRCADIANA DE RATONES Y EXTRACCIÓN DE TEJIDO

Se utilizaron 18 ratones macho C57BL/6J de 8 semanas de edad. Los ratones se alojaron en condiciones estándar con temperatura controlada en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (LD 12:12) durante 3 semanas. Se proporcionó alimento y agua ad libitum durante todo el estudio.

Adaptación al ciclo luz-oscuridad:

Para sincronizar los ratones, inicialmente se expusieron a un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas durante tres semanas. Durante este período de adaptación, las luces se encendieron a las 7:00 a. m. y se apagaron a las 7:00 p. m.

Ajuste de fase:

Después del período de adaptación, los ratones se sometieron a un procedimiento de ajuste de fase para garantizar la alineación con los puntos de tiempo experimentales deseados. Para este propósito, se sometió a los ratones a un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, pero con un avance de fase de 6 horas. Esto se logró retrasando el apagado de las luces en 6 horas, lo que resultó en un tiempo de encendido de las 1:00 p. m. y un tiempo de apagado de las 1:00 a.m. El ajuste de fase se realizó durante tres días consecutivos.

Extracción de tejidos:

Inicialmente planeado para realizar experimentos en momentos específicos (a las 0, 6, 12 y 18 horas), las muestras se tomaron en los puntos de tiempo (ZT 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, y 24). Esto generó un excedente de muestras para futuros experimentos o réplicas. Se minimizó el tiempo entre la eutanasia y la recolección de tejidos para garantizar representación precisa de la expresión génica y la conformación de la cromatina en cada punto de tiempo (tiempo de recorrido 5 min).

Con la finalidad de generar material para experimentos de Capture Hi-C, medir niveles de ARN y proteínas, los bazo, corazones, riñones, e hígados de cada ratón se cortaron en pedazos cúbicos con lados de aproximadamente 2 mm. Se separó en partes equivalentes el tejido; una parte se congeló inmediatamente sobre N₂ para extracción de ARN y proteína, y la otra parte se fijó inmediatamente con formaldehído al 2% o 1% para los experimentos posteriores de captura o inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) (detallado en sección 6.4.1 Fijación de cromatina) y posteriormente se congeló sobre N₂ para almacenar a -80 °C hasta la continuación del protocolo de Hi-C.

6.3 RT-qPCR PARA DETERMINAR NIVELES DE TRANSCRITOS A PARTIR DE TEJIDO Y CONFIRMACIÓN DE OSCILACIÓN CIRCADIANA

6.3.1 Diseño de oligonucleótidos (primers)

Se diseñaron oligonucleótidos para medir la expresión génica circadiana con comparadores de expresión constitutiva (Tabla 1). Se identificaron las regiones genómicas relevantes en la

anotación del genoma murino *mm9* y se diseñaron tres por gen, incluyendo uno en sentido y dos en anti-sentido que abarcaran exón-exón y exón-intrón. Esto permitió evaluar tanto los ARN procesados como los nacientes. Los primers se diseñaron utilizando Benchling y Primer3 y se estandarizaron condiciones y validaron experimentalmente mediante reacción de polimerasa en cadena de punto final (PCR) para garantizar su especificidad y eficiencia en la amplificación de las regiones de interés, facilitando la medición precisa de la expresión génica en el estudio.

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos para medir expresión de transcritos maduros y primarios de genes circadianos.

Nombre	Secuencia 5'-3'
mNr1d1_mRNA_Fwd	TGACGACCCTGGACTCCAATAA
mNr1d1_premRNA_Rev	AGCACAGTAACAAACACCAGCC
mNr1d1_mRNA_Rev	TGTGGGACAACCTTGAGTCAGG
mBmal1_mRNA_Fwd	TGGACACAGACAAAGATGACCC
mBmal1_premRNA_Rev	TCAGGGGATAGAGGGACAGTCT
mBmal1_mRNA_Rev	GCATTCTTGATCCTTCCTTGGT
mDbp_mRNA_Fwd	GAGGAGCCTTCTGCAGGGAAA
mDbp_premRNA_Rev	CACCCCAACAGTTGAGTCCCTA
mDbp_mRNA_Rev	GAGTTGCCTTGGCCTCCTTTTC
mIrf2bp2_mRNA_Fwd	GGCTTCCTTTTCCTTGCTGTCC
mIrf2bp2_premRNA_iRev	TGAAGCTGCGTGCAGAACTATG
mIrf2bp2_mRNA_Rev	GAGCAAGTTC AAGAAGGAGCCG
mElovl5_premRNA_Rev	CACCCGCCAAGTTCCTGAAG
mElovl5_mRNA_Fwd	CTGCAGCTTGCTTCTGTTCCC
mElovl5_mRNA_Rev	CCAGGAAGGCCTTGAAATAGGT
mPer2_mRNA_Rev	CTTCAGCTCCTTCAGGGTCCTT
mPer2_premRNA_Rev	CCTTCTAAAAAGAGCGGTGGGG
mPer2_mRNA_Fwd	CCCTGATGATGCCTTCAGACTC
mPpib_Fwd	GGAGATGGCACAGGAGGAA
mPpib_Rev	GCCCGTAGTGCTTCAGCTT
mRps9_Fwd	GACCAGGAGCTAAAGTTGATTGGA
mRps9_Rev	TCTTGCCAGGGTAAACTTGA

6.3.2 Controles de Calidad y Verificación en el Protocolo de Hi-C

Control de Interacción:

Para realizar las reacciones de control positivo de interacción a larga distancia, se seleccionó la región de los genes de Histonas y Albumina, que son genes constitutivos y distales entre sí. Se diseñaron oligonucleótidos cercanos a los sitios de restricción de la enzima MboI para detectar una señal de amplificación mediante PCR cuando se llevara a cabo la digestión, rellenado y ligación de acuerdo con el protocolo de Hi-C.

Control de Digestión:

Para verificar la correcta digestión y religación de la fibra de ADN en el experimento de Hi-C, se diseñaron primers que abarcaran dos sitios de restricción contiguos de la enzima MboI. La teoría detrás de este diseño es que, durante la digestión y religación, existe la posibilidad de que el segundo fragmento gire y se ligue frente al primero, permitiendo la amplificación por PCR de una zona que no sería accesible en el genoma no digerido.

Estos controles de interacción y digestión no solo aseguraron la calidad del procedimiento, sino que también permitieron evaluar la eficiencia de la ligación y detectar posibles errores en el proceso. La estrategia de diseño de primers y su aplicación en estos controles de calidad resultaron fundamentales para garantizar la integridad de los datos obtenidos en el estudio de Hi-C.

Tabla 2. Lista de oligonucleótidos para medir expresión de transcritos maduros y primarios de genes circadianos.

Nombre	Secuencia 5'-3'
Alb_int_Rev_1	GCAGCCGAGAATTAAAGTGC
Alb_int_For_2	AGGAACCAATGAAATGCGAGGT
Alb_int_For_1	ATCAAGACCCACACCAGGAC
Alb_int_Rev_2	ATTAAGCCAAAACCCCATCC
Alb_mid_50kb_For_1	AGGAAGCAGCAGGACTTCTCTG
Alb_mid_50kb_Rev_2	GGCAGCCCAAATGGTGATTGAA
Hist1h4i_bt_Fwd_1	TTTGTGGTGGCCCTAAAAAG
Hist1h4i_bt_Rev_2	ATCATGTCTGGTTCGTGGCAAAG
Hist1h4i_300kb_Fwd_1	CACTGGTAAATTTTTAAAGGGATTTT
Hist1h4i_300kb_Rev_2	GCGGGGTGATTTAACACAGT
Hist1h2be_LR_Fwd_1	TACCCAGCAGTTCAGGAAAGGG
Hist1h2be_LR_Rev_2	TCAGCTCCCTGAAAGCGAAAGT
Alb_noMboI_Fwd_2	TGGGGACACAAGACTTCTGAAAGT
Alb_noMboI_Rev_2	GGGGTGGGTCTCATTATAGGGC

6.3.3 Extracción de ARN

El ARN de las muestras de tejido (bazo e hígado) se extrajo con Trizol siguiendo las especificaciones del fabricante. Se utilizó una muestra de aproximadamente 50 mg que fue homogenizada en una caja Petri de 35mm utilizando el embolo de una jeringa para pasar a través de una maya de disgregación celular. La mezcla de Trizol y el tejido homogenizado fue congelada hasta su posterior procesamiento.

6.3.4 RT-qPCR

A partir del ARN total de las muestras de interés, se sintetizó el ADN complementario (cDNA) utilizando la enzima transcriptasa reversa y oligos específicos para el gen de interés. Luego, se realizó la amplificación del cDNA mediante PCR en tiempo real utilizando el Kit KAP SYBR Fast v9.13. La cuantificación de la expresión génica se llevó a cabo utilizando una curva estándar de referencia y se normalizó mediante la expresión de un gen de referencia interno constitutivo.

6.4 PREPARACIÓN DE BIBLIOTECAS DE HI-C A PARTIR DE TEJIDO

6.4.1 Fijación de cromatina

El bazo, corazón, riñones e hígado de los ratones se extrajo mediante disección y se cortó en trozos pequeños. Se tomaron aproximadamente 10 trozos de tejido de aproximadamente 8mm³ (2x2x2)mm se pasaron a un tubo Falcon de 15mL con 4.4 mL de medio DMEM previamente añadido a los cuales se les agregó 0.6 mL de Formaldehído 16% (concentración final. La fijación se llevó a cabo durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación constante, y luego se detuvo la reacción agregando una cantidad excedente de glicina 1M enfriada sobre hielo.

Se realizó centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4°C. Luego, se eliminó el sobrenadante y los pellets resultantes se congelaron en nitrógeno líquido para su posterior almacenamiento a -80°C, con el propósito de ser utilizados en experimentos futuros.

6.4.2 Permeabilización de núcleos

Para permeabilizar los núcleos, se añadieron SDS al 10% (0.3% final) y se incubaron a 37°C durante 45 minutos a 950 rpm. Luego, se agregaron 75 µl de Tritón X-100 al 10% (1.6% final) y se incubaron bajo las mismas condiciones que en el paso anterior con SDS.

6.4.3 Digestión

Para llevar a cabo la digestión de la cromatina, se empleó la enzima DpnII o MboI. Se añadieron 250 U de esta enzima en dos etapas. Inicialmente, se agregaron 200 U al lisado celular y, tras una suave mezcla con una pipeta, se incubaron durante toda la noche a 37°C. A la mañana siguiente, se añadieron 50 U adicionales de MboI y se volvió a incubar bajo las mismas condiciones durante una hora más.

Transcurrido el tiempo de digestión de dos horas, se inactivaron las enzimas manteniendo los tubos a 65°C durante 20 min.

6.4.4 Rellenado con biotina

Trabajando sobre hielo, se preparó una mezcla de dinucleótidos compuesta por 1.5 µl de dGTP 10 mM, 1.5 µl de dCTP 10 mM, 1.5 µl de dTTP 10 mM y 37.5 µl de dATP-biotina-14 0.4 mM (Invitrogen 19524-016).

Adicionalmente, se añadieron 50 U del fragmento Klenow grande de la ADN polimerasa I (NEB M0210L) a cada tubo, junto con la mezcla previamente preparada. La combinación se homogeneizó mediante pipeteo y se incubó durante 75 minutos a 37°C, con un programa de agitación que consistió en 700 rpm durante 30 segundos, seguidos de 10 segundos de reposo, repitiendo este ciclo.

6.4.5 Ligación y reversión de entrecruzamiento

Se preparó una mezcla de ligación que contenía 100 µl de buffer de ligación 10X, 10 µl de BSA 10 mg/ml, 15 U de ligasa de ADN T4 (1 U/µl) y 425 µl de agua. Esta mezcla se añadió a cada uno de los tubos y se incubaron a 16°C durante toda la noche para asegurar una eficiencia máxima de ligación.

Al día siguiente, se agregaron 50 µl de Proteinasa K (10 mg/ml) a las muestras, y se incubaron a 37°C durante dos horas. Luego, las muestras se mantuvieron en incubación a 65°C durante toda la noche para permitir la degradación completa.

Después de completar la reversión del entrecruzamiento, se procedió a la purificación del ADN. Sin embargo, antes de llevar a cabo esta etapa, las muestras se trataron con 10 µl de RNasa A (10 mg/ml) y se incubaron a 37°C durante una hora.

6.4.6 Extracción y Purificación del ADN

La extracción del ADN se realizó mediante el método fenol-cloroformo. Se añadieron 2 µl de glucógeno a cada muestra, seguido de la adición de 1 volumen de fenol-cloroformo a pH 8. La mezcla se homogeneizó utilizando agitador Vortex y posteriormente se centrifugó a máxima velocidad a 4°C durante 15 minutos. La fase acuosa resultante se transfirió a un nuevo tubo, y se llevó a cabo una segunda extracción utilizando 100 µl de TLE con el objetivo de recuperar la mayor cantidad posible de ADN de cada muestra.

El ADN se precipitó mediante la adición de 2 volúmenes de etanol al 100% y 0.1 volumen de acetato de sodio 3M, y se dejaron las muestras a -20°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron a máxima velocidad (14000 rpm) a 4°C durante 30 minutos. Los pellets resultantes se sometieron a dos lavados con etanol al 70% y finalmente se resuspendieron en TLE.

La cuantificación del ADN se llevó a cabo utilizando el sistema Qubit, utilizando diluciones de 1:50 para garantizar una medición precisa.

6.5 ESTRATEGIA ALTERNA PARA OBTENCIÓN DE SONDAS DE CAPTURA DE ARN MARCADO CON BIOTINA PARA CAPTURE HI-C

Diseño de Oligonucleótidos: Se diseñan oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 120 pares de bases a partir del sitio de corte de MboI en el fragmento genómico de interés.

Amplificación del Fragmento: Se realiza la amplificación del fragmento de 120 pb mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los oligonucleótidos diseñados.

Purificación del Producto: El producto de PCR se purifica para eliminar impurezas y oligonucleótidos sobrantes.

Generación del Sustrato: Se lleva a cabo una reacción de ligación entre el fragmento de ADN amplificado y el adaptador de ARN que codifica para la T7 ARN polimerasa. Esto produce el sustrato necesario para la síntesis in vitro.

Síntesis in vitro de RNA: Se utiliza la T7 ARN polimerasa para sintetizar fragmentos de ARN marcados con biotina a partir del sustrato generado en el paso anterior.

Purificación de Sondas de Captura: Se purifican las sondas de captura de ARN marcado con biotina para eliminar cualquier contaminante.

6.6 CONTROLES Y RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS EXPERIMENTALES PARA ESTANDARIZACIÓN DE HI-C EN TEJIDO

Se realizaron ensayos para optimizar el protocolo Hi-C en tejidos de hígado, riñón, corazón y bazo como se describen a continuación. Sin embargo, se enfrentaron dificultades experimentales, especialmente debido a la naturaleza de los tejidos en comparación con culturas celulares. Se ajustó la cantidad de tejido utilizado para el proceso, aproximadamente 8 millones de células, y se realizaron ajustes para garantizar la eficiencia del protocolo.

Con el objetivo de validar el protocolo Hi-C, se llevaron a cabo controles utilizando oligonucleótidos específicos para evaluar la eficacia de las reacciones enzimáticas. Estos oligonucleótidos fueron diseñados para constatar la reproducibilidad de las interacciones distales previamente conocidas.

Para realizar este control, se eligieron oligonucleótidos diseñados individualmente en direcciones opuestas, que abarcaban regiones genómicas linealmente distantes entre sí. Estas regiones se encontraban a distancias de 50Kb, 300Kb y 1Mb. Estos ensayos se realizaron en una región específica del mismo gen. Puesto que la amplificación exitosa de muestras de material genético con estos oligonucleótidos indicaría una reproducción exitosa de las interacciones, confirmando la validación de las etapas de entrecruzamiento, digestión y

ligación del proceso Hi-C. La Tabla 1 contiene una lista de estos oligonucleótidos diseñados para medir la expresión de transcritos maduros y primarios de genes circadianos.

Además de amplificar dos regiones clave como parte de los controles esenciales en el experimento Capture Hi-C, se confirmó la formación de los nuevos sitios de restricción generados en las reacciones enzimáticas del protocolo. Se llevaron a cabo pruebas en las muestras de tejido utilizando oligonucleótidos de control interno y otro conjunto de oligonucleótidos a 1Mb de distancia para verificar la especificidad de las interacciones.

Los resultados de la amplificación por PCR mostraron inespecificidades para ambos conjuntos de oligonucleótidos. Sin embargo, en el caso del control de la albumina interna, se obtuvo un amplicón con el peso esperado de 124 pb (Figura 8). Notablemente, solo la muestra proveniente del riñón produjo un amplicón cercano al peso esperado de 240 pb para el conjunto de oligonucleótidos de interacción a 1Mb de distancia.

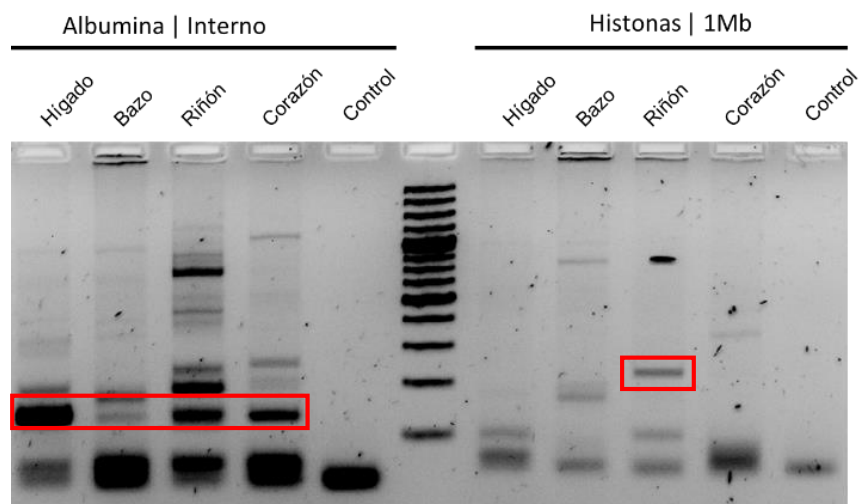


Figura 8. Control de ligación del procedimiento de restricción-ligación de Capture Hi-C. Se utilizaron los oligos para verificar la reacción eficiente de restricción seguida por ligación en los cuatro tejidos. El peso esperado del amplicón del control de albumina es de 124 pb, y para el de histonas es de 1 Mb, de 277 pb.

Se procedió a amplificar nuevamente la banda de aproximadamente 240 pb que se obtuvo de la reacción con el material del riñón utilizando oligonucleótidos de interacción a 1 Mb. Luego de generar la cantidad necesaria de material, se llevaron a cabo ensayos de restricción utilizando enzimas de restricción para confirmar la correcta ejecución del proceso de restricción-ligación del material fijado. Sorprendentemente, no se observaron diferencias en el tamaño de la banda en comparación con el control sin enzimas.

Una posible explicación de este resultado es que la reacción de relleno pudo no haberse llevado a cabo en condiciones óptimas, y la actividad del fragmento Klenow pudo haber eliminado excesivos nucleótidos, suprimiendo los sitios de restricción MboI y ClaI. En ambos

casos, el amplicón del tamaño esperado no fue susceptible a la digestión por MboI ni ClaI. Sin embargo, cuando se utilizó una enzima de restricción con un sitio de corte único dentro del amplicón, se logró la digestión. Se realizó una prueba adicional que respalda la idea de que la actividad hiperactiva del fragmento Klenow pudo causar una escisión excesiva del material, lo que contribuyó al resultado negativo observado (*Figura 9*).

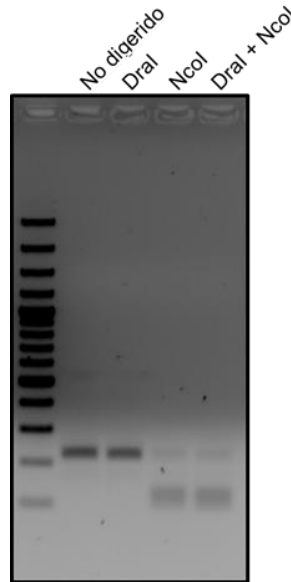


Figura 9 Ensayo de restricción. Se utilizaron enzimas de restricción más cercanas a los extremos para corroborar la hipótesis de un acortamiento excesivo por el fragmento Klenow. El amplicón generado puede ser digerido con DraI que se ubica más cercano al extremo 5' del fragmento.

Se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa para comparar el material del Capture Hi-C con el ADN genómico (*Figura 10*). Se esperaba que el material reconstituido del Capture Hi-C se presentara como una sola banda en el gel de agarosa, con un peso molecular similar al control de ADN genómico. Esto habría indicado una eficiente ligación entre las regiones genómicas y la correcta reconstitución de las interacciones deseadas.

Sin embargo, el resultado fue contrario a lo esperado. En lugar de una sola banda en el peso molecular previsto, se observó un patrón de "barrido" en el gel de agarosa. Este patrón sugiere que la ligación entre las regiones genómicas fue ineficiente o que las interacciones deseadas no se formaron consistentemente.

La presencia del barrido indica la posibilidad de diversos tamaños de fragmentos de ADN o interacciones no específicas que se formaron durante el proceso, lo que sugiere una falta de eficiencia en el proceso de ligación en el experimento Capture Hi-C y la ausencia de formación consistente de las interacciones genómicas deseadas en el material analizado.

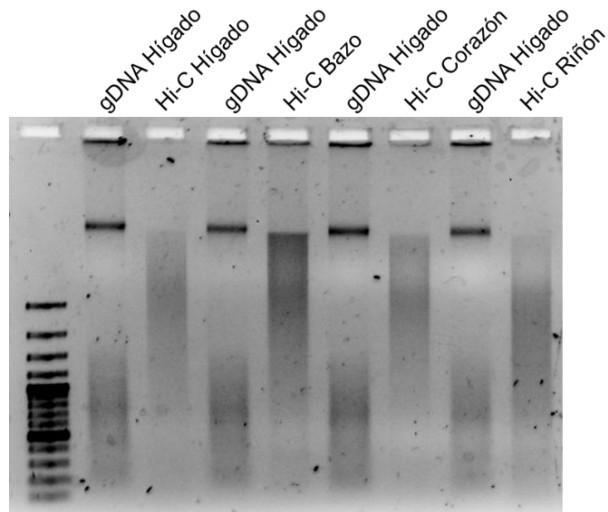


Figura 10 Electroforesis de DNA genómico y material de Capture Hi-C. Se compara el material genómico sin digerir con el material resultante del experimento Capture Hi-C.

Se realizó un ensayo complementario al experimento en el que se llevaron a cabo digestiones con, DpnII y MboI, ambas con el mismo sitio de corte, para comparar la eficiencia de ambas enzimas en la digestión del material.

El resultado mostró que la digestión con la enzima de restricción DpnII fue más eficiente que la realizada con la enzima MboI. Con la enzima DpnII, se observó un patrón de "barrido" a un menor peso molecular en comparación con la reacción llevada a cabo con la enzima MboI (Figura 11).

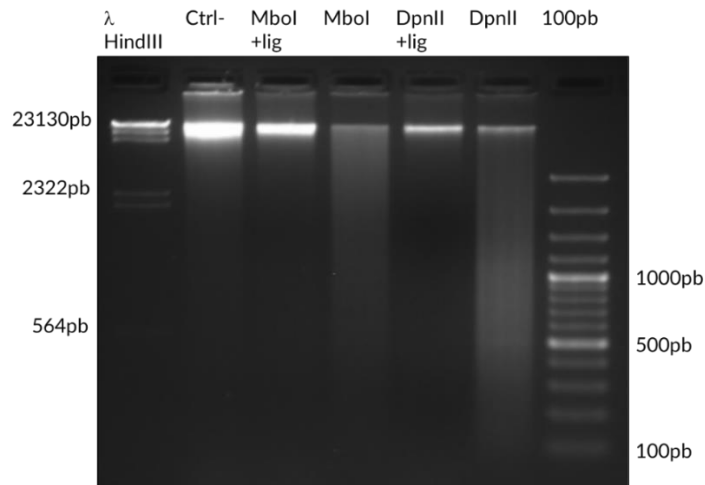


Figura 11. Gel de ensayo 3C utilizando dos enzimas de restricción distintas. En el gel se observa el material genómico no digerido (Ctrl-), el material digerido y ligado con MboI (Mbol + lig), el material digerido con MboI (Mbol); el material digerido y ligado con DpnII (DpnII + lig), el material digerido con DpnII (DpnII).

Estas sondas de captura generadas serán empleadas en el proyecto para la captura específica de los promotores de los genes circadianos de interés.

Para llevar a cabo el protocolo, se requiere una cantidad inicial adecuada de material para las reacciones enzimáticas involucradas en el proceso. Dado que se parte directamente del tejido, lograr un control preciso sobre el número de células resulta difícil en comparación con preparaciones provenientes de cultivos celulares. En los ensayos iniciales, se utilizó una cantidad constante de tejido, según lo estipulado por la estandarización original del protocolo (aproximadamente 8 millones de células). Debido a la persistencia de dificultades experimentales consistentes, se optó por confirmar la cantidad de células de hígado de manera indirecta mediante una estimación del número de células.

Esta estimación indirecta implicó extraer ADN de una alícuota de la muestra a procesar. Al cuantificar esta alícuota y considerar el volumen total de la muestra, junto con la cantidad de ADN típica por célula según la literatura, se extrapoló el valor para determinar el número de células en la muestra. Utilizando esta cuantificación, se llevó a cabo un último experimento de Hi-C, cuyos resultados se presentan a continuación.

Para llevar a cabo el protocolo, se requiere una cantidad inicial adecuada de material para las reacciones enzimáticas involucradas en el proceso. Dado que se parte directamente del tejido, lograr un control preciso sobre el número de células resulta difícil en comparación con preparaciones provenientes de cultivos celulares. En los ensayos iniciales, se utilizó una cantidad constante de tejido, según lo estipulado por la estandarización original del protocolo (aproximadamente 8 millones de células). Debido a la persistencia de dificultades experimentales consistentes, se optó por confirmar la cantidad de células de hígado de manera indirecta mediante una estimación del número de células.

Esta estimación indirecta implicó extraer ADN de una alícuota de la muestra a procesar. Al cuantificar esta alícuota y considerar el volumen total de la muestra, junto con la cantidad de ADN típica por célula según la literatura, se extrapoló el valor para determinar el número de células en la muestra. Utilizando esta cuantificación, se llevó a cabo un último experimento de Hi-C, cuyos resultados se presentan a continuación.

6.7 ANÁLISIS DE INTERACTOMA DE PROMOTORES CIRCADIANOS MEDIANTE 4C-VIRTUAL EN SEQ-MONK Y VISUALIZACIÓN EN WASHU BROWSER

El análisis del interactoma de los promotores circadianos se realizó utilizando la plataforma SeqMonk, que ofrece herramientas poderosas para el análisis de datos de interacción cromosómica. Una característica particularmente útil de SeqMonk es su capacidad para generar el interactoma a partir de un solo fragmento de restricción como sonda de punto de vista. Aquí se describe la metodología utilizada:

Se comenzó por cargar los datos previamente procesados por CHiCAGO en el proyecto de SeqMonk. CHiCAGO es una herramienta que evalúa la confiabilidad de las interacciones cromosómicas y asigna puntajes a las interacciones basados en su calidad.

A continuación, se definieron las regiones de interés en el genoma para el conjunto de datos de interés. En este caso, el enfoque se centró en los promotores circadianos. Estas regiones se utilizaron como puntos de vista para analizar las interacciones cromosómicas.

Una vez definidas las regiones de interés, se cuantificaron las interacciones que ocurren a partir de un solo fragmento de restricción. Para lograr esto, se utilizaron los fragmentos que contenían las sondas de captura previamente generadas. Estas sondas de captura se diseñaron específicamente para capturar las interacciones de los promotores circadianos.

Para visualizar las interacciones cromosómicas de manera más detallada y contextual, se utilizaron los datos generados en SeqMonk para crear arcos de interacción en el WashU Browser. Esta plataforma de visualización permite una representación gráfica de las interacciones en el contexto del genoma completo.

Con los arcos de interacción generados en el WashU Browser, se llevó a cabo un análisis visual de las interacciones cromosómicas. Se exploraron las regiones genómicas que interactuaban con los promotores circadianos y se examinaron las características de estas interacciones.

7 RESULTADOS

7.1 PARTE 1: ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE CUATRO DIFERENTES PUNTOS TEMPORALES DE LAS INTERACCIONES OBSERVADAS A PARTIR DE CAPTURE HI-C EN HÍGADO

Los resultados de esta parte de la tesis presentan un análisis comparativo entre el interactoma y transcripción de genes circadianos en el hígado de ratón utilizando datos de los experimentos de Capture Hi-C y RNA-seq realizados por el grupo de la Dra. Furlan-Magaril (Furlan-Magaril et al., 2021). El análisis se enfoca en 21 genes circadianos para comprender las interacciones cromatínicas a lo largo del día.

7.1.1 Selección de genes para el estudio del interactoma circadiano en hígado de ratón

Con el objetivo de focalizar el análisis del interactoma circadiano a una muestra representativa y manejable, se generó una lista conformada por 21 destacando los siguientes criterios aplicados:

Valor CHiCAGO:

En primer lugar, se consideró el “valor CHiCAGO” de los genes, una métrica estadística que evalúa la significancia de las interacciones detectadas mediante Capture Hi-C (Cairns et al., 2016). Este puntaje, que integra lecturas, ruido de fondo y características genómicas locales, identifica interacciones confiables como en este caso entre promotores y enhancers.

Patrones de Expresión Circadiana:

El hígado y el riñón experimentan una regulación circadiana estricta asociada a las demandas metabólicas del ratón a lo largo del día. Por lo tanto, como segundo criterio, se seleccionaron genes que tuvieran patrones de expresión circadiana previamente reportados en estos dos órganos en ratón.

Interacciones con eRNAs:

Adicionalmente, el tercer criterio contempló la presencia de interacciones con regiones que transcriben eRNAs. Dado que la presencia de eRNAs se ha vinculado con enhancers activos, este criterio resultó relevante para nuestro enfoque en la regulación de la transcripción mediante la formación de asas que aproximan elementos activadores a promotores como mecanismo de activación transcripcional circadiana.

Genes Centrales vs. No Centrales:

Por último, se incluyeron genes del reloj central, incluso si no interactúan con regiones generadoras de eRNA, con el propósito de comparar el perfil de interacciones entre ambos grupos.

La lista resultante comprende los 8 genes circadianos con el valor CHiCAGO más alto, 6 genes con interacciones en regiones de eRNAs, y 7 genes centrales (Tabla 3).

Tabla 3. Lista de genes candidato. Los 21 genes se eligieron mediante los criterios de selección: 1) Los genes con valor CHiCAGO más alto, 2) Patrones de expresión circadiana en hígado y riñón, y 3) Interacción con regiones generadoras de eRNA y la inclusión adicional de genes del mecanismo central del reloj circadiano para comparación.

GEN	CRITERIOS PARTICULARES
<i>Dhrs3</i>	Son genes circadianos que interaccionan con eRNA y con valor CHiCAGO más alto
<i>Ppp1r3c</i>	
<i>Elovl5</i>	
<i>Sos2</i>	
<i>2310044g17rik/cipc</i>	
<i>Irf2bp2</i>	
<i>Nfil3</i>	
<i>Per2</i>	
<i>Dbp</i>	Son genes circadianos que interaccionan con eRNA
<i>Npas2</i>	
<i>Per1</i>	
<i>Cirbp</i>	
<i>Csnk1a1</i>	
<i>Tef</i>	
<i>Bmal1</i>	Son genes con pocas interacciones pero son genes del mecanismo central “core clock”
<i>Cry1</i>	
<i>Nr1d1</i>	
<i>Clock</i>	
<i>Fbxl3</i>	
<i>Usp2</i>	
<i>Csnk1d</i>	

7.1.2 Características de las interacciones de los promotores circadianos

Continuando con el análisis, se planteó evaluar las interacciones cromatínicas a lo largo del ciclo circadiano, por lo que se determinó el número de interacciones asociadas a cada promotor en los cuatro puntos temporales evaluados por el experimento de Capture Hi-C (Tabla 4). Estos valores representan las interacciones individuales que realiza cada promotor circadiano con alguna otra región del genoma en los tiempos ZT0, ZT6, ZT12, y ZT18. Se aprecian oscilaciones a lo largo del ciclo circadiano, como se detalla en la Tabla 4 y Figura 14.

Tabla 4. Interacciones totales a ZT0, ZT6, ZT12, ZT18 a partir del promotor hacia el resto del genoma. Se listan las interacciones detectadas para cada gen durante el ciclo circadiano.

GEN	ZT0	ZT6	ZT12	ZT18
<i>Dhrs3</i>	113.0	113.0	111.0	109.0
<i>Ppp1r3c</i>	60.0	53.0	50.0	58.0
<i>Elov15</i>	86.0	105.0	80.0	86.0
<i>Sos2</i>	53.0	59.0	53.0	47.0
<i>2310044g17rik/cipc</i>	14.0	17.0	15.0	14.0
<i>Usp2</i>	0.0	1.0	1.0	1.0
<i>Irf2bp2</i>	98.0	89.0	103.0	97.0
<i>Csnk1a1</i>	25.0	32.0	28.0	28.0
<i>Cirbp</i>	14.0	16.0	18.0	26.0
<i>Fbxl3</i>	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Csnk1d</i>	1.0	1.0	1.0	2.0
<i>Nfil3</i>	35.0	38.0	42.0	31.0
<i>Per2</i>	9.0	10.0	19.0	13.0
<i>Dbp</i>	11.0	25.0	24.0	18.0
<i>Npas2</i>	14.0	8.0	8.0	12.0
<i>Per1</i>	5.0	7.0	19.0	12.0
<i>Tef</i>	9.0	18.0	17.0	18.0
<i>Bmal1</i>	3.0	0.0	0.0	2.0
<i>Cry1</i>	1.0	2.0	0.0	0.0
<i>Nr1d1</i>	6.0	10.0	9.0	8.0
<i>Clock</i>	0.0	0.0	0.0	1.0

Se destacó una notable diferencia en el número de interacciones realizadas por los promotores de genes circadianos pertenecientes al reloj central y los promotores de genes no pertenecientes al reloj central en el conjunto seleccionado de 11 y 10 genes, respectivamente (Figura 12).

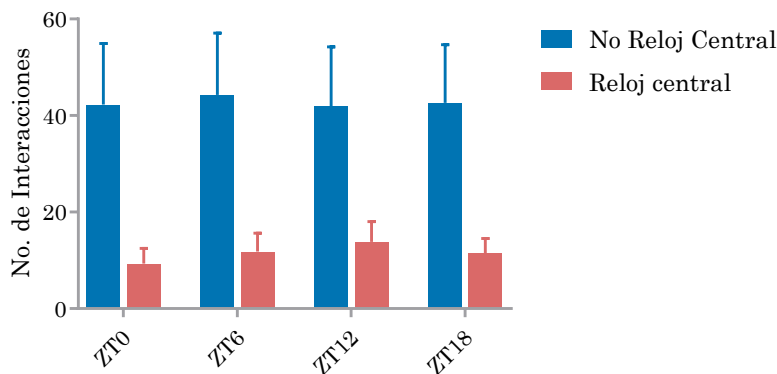


Figura 12. Comparación del número de interacciones entre promotores de genes del reloj central (n=10) y promotores de genes no pertenecientes al reloj central (n=11), barras de error estándar.

Adicionalmente, se calcularon los promedios del valor CHiCAGO de cada gen en los distintos puntos del ciclo. Se destacó que durante el transcurso de ciclo se observa poca variación en el valor de CHiCAGO en general (Tabla Suplementaria 1). Esto es relevante ya que el valor CHiCAGO describe la calidad de los contactos y su constancia a lo largo del ciclo sugiere

que los cambios observados en las interacciones podrían investigarse con confianza estadística para indagar su significado biológico. En otras palabras, los contactos que aparecen o desaparecen son significativos y no producto de variaciones en las condiciones experimentales.

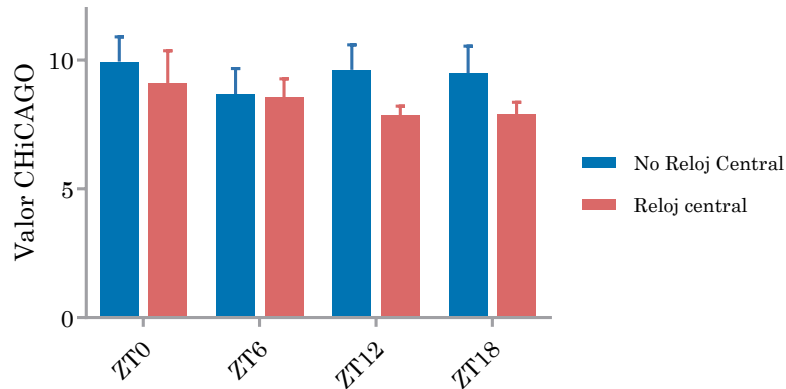


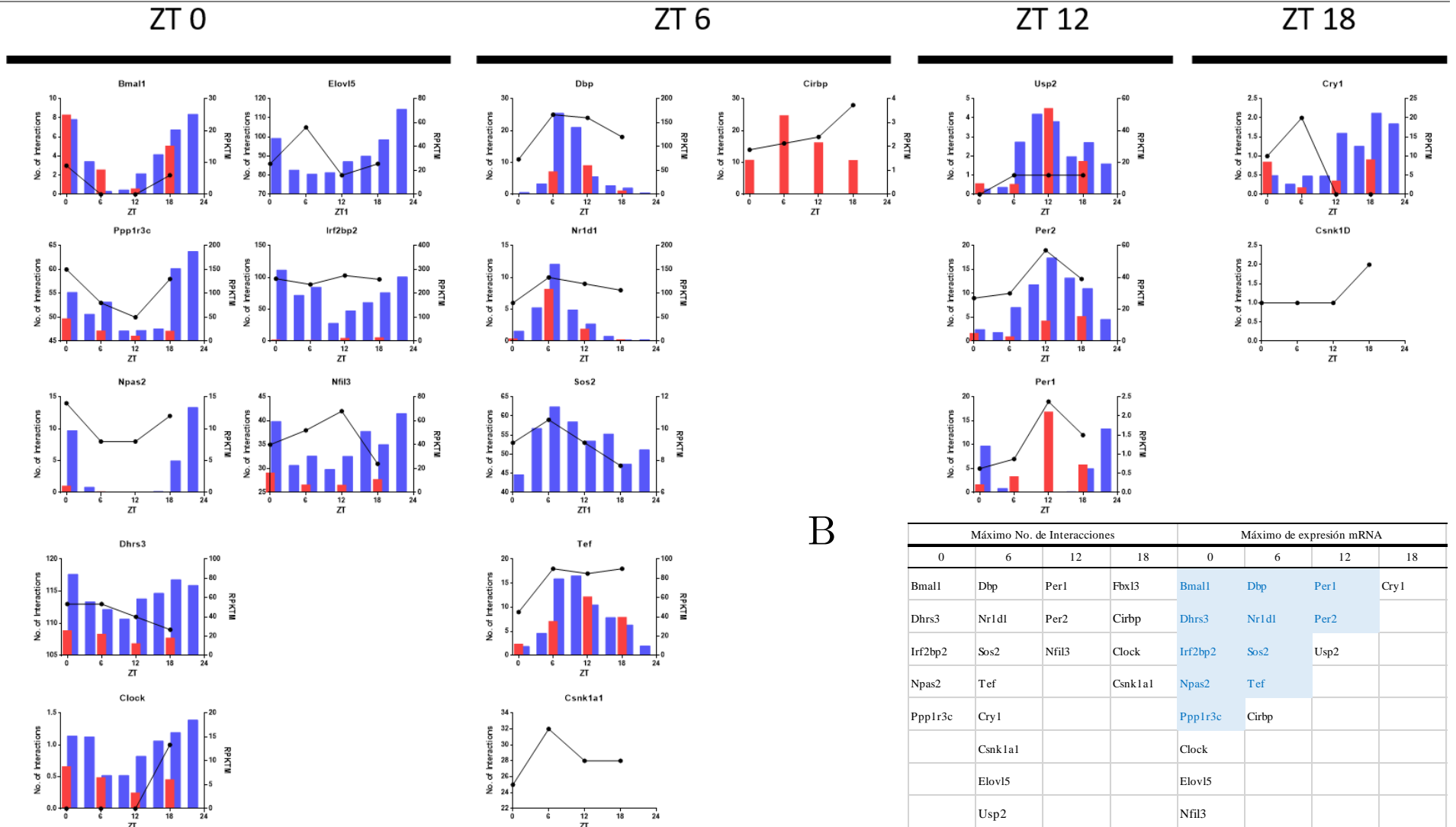
Figura 13 Promedio del valor CHiCAGO para todos los genes a lo largo de cada punto del ciclo: Análisis de promedio con error estándar de los valores CHiCAGO de genes en cuatro puntos temporales, distinguiendo entre componentes del reloj circadiano y no circadiano., barras de error estándar.

7.1.3 Confirmación y comparación de actividad oscilatoria de genes circadianos

La expresión de los genes se midió en los puntos ZT0, ZT6, ZT12 y ZT18, mediante la secuenciación de ARN total (RNA-seq) en hígado de ratones sincronizados, confirmando la presencia de fluctuaciones oscilatorias característicamente circadianas (Figura 14) (Furlan-Magaril et al., 2021). Estos hallazgos fueron respaldados al compararlos con datos de secuenciación de ARN-naciente registrados para el mismo tejido a lo largo de un ciclo completo (Fang et al., 2014).

Los genes se agruparon según sus puntos de máxima transcripción “ZT0, ZT6, ZT12, ZT18” (Panel A Figura 14)). Agrupando de esta manera, se observó una correlación positiva entre los puntos de máxima expresión transcripcional, (barras rojas ARN total; barras azules ARN naciente) y el perfil del interactoma (línea). Esta tendencia se observó en la mayoría de los genes estudiados (90% n=21) lo que sugiere una fuerte conexión entre los niveles de expresión y las interacciones cromatínicas (Figura 14). Por ejemplo, se observó que los genes *Bmall*, *Ppp1r3c*, *Npas2*, *Sos2*, *Nr1d1*, *Tef*, *Per2*, *Per1*, coincidieron en su punto de máxima expresión con el máximo número de interacciones realizadas por sus promotores. De manera interesante, para el gen central *Clock*, en ZT18 se observa su única interacción, la cual se adelanta por 6 horas a su pico de expresión (Figura 14 y Tabla 4). Así mismo, mientras el máximo de la transcripción incrementa hacia el final del día, en concordancia con lo reportado, para *Cry1* las interacciones que realiza se dan hacia el inicio del día, y no como fue demostrado a las ZT22 (Kim et al 2018).

Figura 14. Perfil de interacciones en relación con la distribución de ARN cuantificado en cada punto de máxima expresión. A) Los genes se agruparon según su tendencia de máxima expresión en cuatro puntos temporales. Las líneas representan el número de interacciones observadas en ZT0, ZT6, ZT12 y ZT18. Las barras reflejan los datos de RNA-seq naciente, con datos en azul publicados por Fang et al. 2014 y en rojo el ARNm total determinado por Furlan et al. 2021 No se obtuvieron datos de transcripción para Csnk1a1 o Csnk1d. B) La tabla resalta en azul los genes que muestran la mayor coincidencia en términos de interacciones y expresión máxima según los resultados de A, organizados en intervalos de tiempo de 0, 6, 12 y 18.



7.1.4 Dinámica de las interacciones en relación a la transcripción entre puntos temporales

Con el objetivo de identificar el cambio en las interacciones en el transcurso del ciclo y su relación con la transcripción de los genes circadianos, se calculó el promedio de interacciones en cada punto temporal para determinar si la distribución en porcentaje podría estar relacionada con el pico de transcripción (Figura 15). Se agruparon los genes según su periodo de máxima transcripción, y se observó que los genes con un pico transcripcional en ZT0 tenían más contactos alrededor del amanecer, mientras que aquellos con máxima expresión en ZT6 y ZT12 presentaban una proporción mayor de interacciones durante ese intervalo temporal (entre ZT6 y ZT12). Los genes cuyo máximo perfil transcripcional tenía pico en ZT18 no mostraron una preferencia temporal en el establecimiento de contactos. Estas variabilidades en las proporciones de contactos entre grupos de genes podrían tener implicaciones en los mecanismos de regulación circadiana, incluso podría investigar los genes que coinciden entre pico transcripcional y máximo de contactos comparten algún mecanismo de regulación.

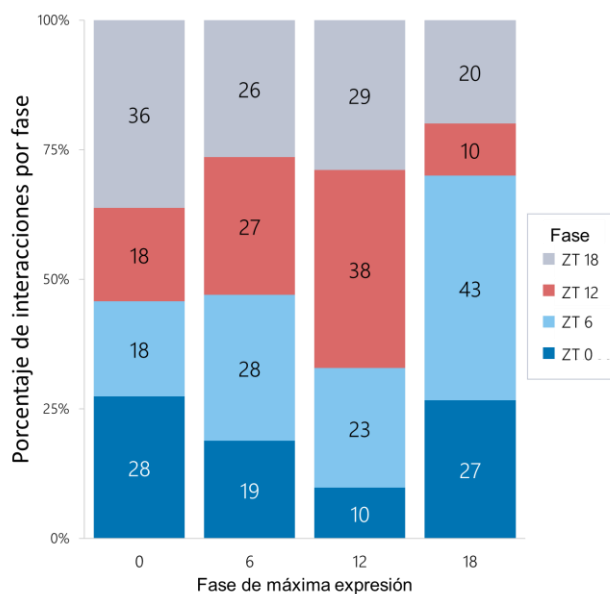


Figura 15. Distribución de interacciones en cuatro puntos de máxima expresión (ZT0, ZT6, ZT12 Y ZT18) como proporción del total de interacciones en cada periodo. Las barras agrupan a los genes en sus fases de máxima expresión (ZT0, ZT6, ZT12 y ZT18) y los segmentos de cada barrar muestran la distribución de interacciones en cada punto temporal.

Razonando que la correlación entre la fase de transcripción máxima y el máximo número de contactos marcada para la mayoría de los genes podría ser influenciada por el ambiente genómico o elementos específicos en los sitios contacto, se decidió enfocar la investigación en la exploración de estas regiones distales.

7.1.5 Exploración de elementos de regulación en el interactoma de genes del reloj central y genes de salida

Después de investigar las características generales de las interacciones, se buscó encontrar posibles patrones en un posible contexto regulatorio en las regiones con las que establecen contactos los promotores de los genes circadianos. Para llevar a cabo un análisis de las interacciones promotor-región reguladora y explorar las características de estas regiones, se aplicaron varios filtros para seleccionar las interacciones de cada gen en los diferentes puntos del ciclo circadiano (ZT0, ZT6, ZT12 y ZT18).

Primero, seleccionaron las interacciones con regiones generadoras de transcritos eRNA (según Fang et al., 2014). Este filtro se aplicó con el propósito de explorar el papel de los elementos de regulación a distancia, ya que se ha observado que la presencia de eRNAs está asociada con la actividad de enhancers (revisado en Li et al., 2016).

Tabla 5 Interacciones realizadas por promotores de genes circadianos con regiones que generan eRNA. Se seleccionaron las interacciones que se realizan con regiones generadoras de eRNA en hígado de ratón durante cada punto temporal. Para cada gen reducen notablemente del total de interacciones.

GEN	ZT0	ZT6	ZT12	ZT18
<i>Dhrs3</i>	10.0	10.0	10.0	10.0
<i>Ppp1r3c</i>	10.0	8.0	7.0	11.0
<i>Elovl5</i>	13.0	0.0	9.0	13.0
<i>Sos2</i>	8.0	9.0	9.0	6.0
<i>Cipc</i>	2.0	2.0	1.0	1.0
<i>Usp2</i>	0.0	1.0	0.0	0.0
<i>Irf2bp2</i>	2.0	2.0	4.0	4.0
<i>Csnk1a1</i>	5.0	6.0	6.0	7.0
<i>Cirbp</i>	4.0	3.0	4.0	6.0
<i>Fbxl3</i>	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Csnk1d</i>	0.0	0.0	0.0	1.0
<i>Nfil3</i>	4.0	6.0	5.0	4.0
<i>Per2</i>	2.0	3.0	4.0	3.0
<i>Dbp</i>	5.0	7.0	8.0	7.0
<i>Npas2</i>	2.0	1.0	1.0	3.0
<i>Per1</i>	1.0	2.0	5.0	6.0
<i>Tef</i>	3.0	4.0	4.0	4.0
<i>Bmal1</i>	1.0	0.0	0.0	0.0
<i>Cry1</i>	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Nr1d1</i>	0.0	1.0	0.0	0.0
<i>Clock</i>	0.0	0.0	0.0	0.0

Aplicando este filtro, se observó una marcada diferencia en la cantidad de interacciones realizadas por los promotores (Tabla 4 vs Tabla 5). Para algunos la diferencia fue mucho mayor, por ejemplo, para *Dhrs3* disminuyeron alrededor de 90% de las interacciones establecidas, en un rango de 113 interacciones a tan solo 10. Mientras que la mayoría de los

genes establece contactos con pocas regiones que transcriben eRNA, algunos genes no realizan interacciones con regiones de dicha anotación, por ejemplo: *Irf2bp2*, *Fbxl3*, *Cry1*, *Clock*. Debido a que en general se realizan pocas interacciones con elementos que transcriben eRNA, se reduce la complejidad para distinguir cuáles interacciones oscilan o cambian durante el ciclo. Por ejemplo, *Usp2*, *Csnk1D*, *Bmal1*, *Nr1d1*, sólo realizan una interacción con regiones generadoras de estos elementos durante un punto del día.

El siguiente filtro aplicado seleccionó las interacciones realizadas con regiones ocupadas por factores transcripcionales de la maquinaria central; específicamente, BMAL1, NPAS2, CLOCK, CRY1, CRY2, PER1, PER2, y REV-ERB α , que tienen un papel activador o represor del ciclo circadiano. Los datos de unión provienen de una serie de experimentos de CHiP-seq realizados durante un ciclo circadiano completo (Koike et al., 2012). A pesar de la restricción a un subconjunto de factores transcripcionales, se enfrenta una complejidad considerable en las posibles combinaciones de factores transcripcionales de la maquinaria central por analizar en cada punto temporal. Por esta razón, se creó un agregado de estos datos de unión que sirvió como el criterio para el filtro. De tal manera, las interacciones de la Tabla 6 representan contactos de promotores con regiones a las que al menos uno de los factores mencionados se une durante el ciclo circadiano.

Tabla 6 Interacciones realizadas por promotores circadianos con 1 o más factor transcripcional de la maquinaria central del reloj circadiano (BMAL1, NPAS2, CLOCK, CRY1, CRY2, PER1, PER2, y REV-ERB α). A partir de las interacciones realizadas con regiones generadoras de eRNA, se seleccionaron las que también se efectuaban con al menos 1 factor transcripcional de la maquinaria central del reloj.

GEN	ZT0	ZT6	ZT12	ZT18
<i>Dhrs3</i>	10	7.0	7.0	7.0
<i>Ppp1r3c</i>	9.0	8.0	7.0	10.0
<i>Elovl5</i>	9.0		7.0	9.0
<i>Sos2</i>	4.0	4.0	4.0	3.0
<i>Cipc</i>	1.0	2.0	1.0	1.0
<i>Usp2</i>	0.0	1.0	0.0	0.0
<i>Irf2bp2</i>	2.0	2.0	4.0	4.0
<i>Csnk1a1</i>	4.0	5.0	5.0	6.0
<i>Cirbp</i>	3.0	2.0	3.0	3.0
<i>Fbxl3</i>	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Csnk1d</i>	0.0	0.0	0.0	1.0
<i>Nfil3</i>	3.0	5.0	3.0	2.0
<i>Per2</i>	2.0	2.0	3.0	2.0
<i>Dbp</i>	5.0	7.0	8.0	7.0
<i>Npas2</i>	0.0	0.0	0.0	1.0
<i>Per1</i>	1.0	1.0	2.0	4.0
<i>Tef</i>	2.0	3.0	2.0	2.0
<i>Bmal1</i>	1.0	0.0	0.0	0.0
<i>Cry1</i>	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Nr1d1</i>	0.0	1.0	0.0	0.0
<i>Clock</i>	0.0	0.0	0.0	0.0

Al seleccionar las interacciones con regiones de Sitio de Unión de Factor Transcripcional Circadiano, se observa una reducción en todos los puntos (Tabla 6). Resultaría un análisis interesante explorar con mayor profundidad el tipo de combinaciones que se observan y su relación con respecto a la expresión o la interacción de las regiones de genes circadianos. Identificar algún patrón en la combinación de factores transcripcionales del mecanismo central podría revelar sobre algún mecanismo que ocurre para conferir la transcripción circadiana mediada por contactos.

7.1.6 Exploración del panorama genómico y visualización de interacciones de genes circadianos

Estudios previos han explorado el estado de la cromatina y la actividad transcripcional a través de marcas de histonas, accesibilidad a la DNAsa I y ocupación de ARN polimerasa II, mediante experimentos de Chip-seq, analizados a lo largo del tiempo para evaluar marcadores como H3K27ac, H3K4me1, H3K4me3, and H3K27me y la ARN Polimerasa II fosforilada en serina 5 (Koike et al., 2012).

Para apreciar visualmente las interacciones con los elementos de interés en el genoma, se generaron ventanas en el navegador de visualización *Integrated Genome Viewer*, complementadas con arcos que representan las interacciones, resueltas por el navegador epigenómico *WashU Epigenome Browser* (Figura 16 - Figura 19, Figuras Suplementarias 1-8) (Robinson JT et al., 2011; Daofeng et al., 2022).

Se destaca la disparidad entre los genes circadianos no componentes del reloj central, como *Dhrs3* y *Elovl5*, que presentan un mayor número de interacciones en comparación con los genes componentes del reloj central (Figura 16 y Figura 17). Además, estos genes no muestran una variación notable en el número de interacciones a lo largo del día. Por otro lado, los genes componentes del reloj central, a pesar de tener un interactoma más limitado, experimentan cambios marcados en sus pocas interacciones a lo largo del ciclo circadiano. Por ejemplo, *Nr1d1* gana y pierde un contacto con las mismas regiones cada 6 y 12 horas, y *Cry1* que sólo realiza interacciones de ZT0 a ZT6, las pierde en ZT12 y ZT18 (Figura 18 y Figura 19). En resumen, los genes circadianos que no forman parte del núcleo central del reloj muestran una mayor cantidad de interacciones y una menor variabilidad en contraste con los genes que son componentes del núcleo central del reloj, los cuales experimentan cambios notables en sus interacciones a lo largo del ciclo circadiano.

Dhrs3

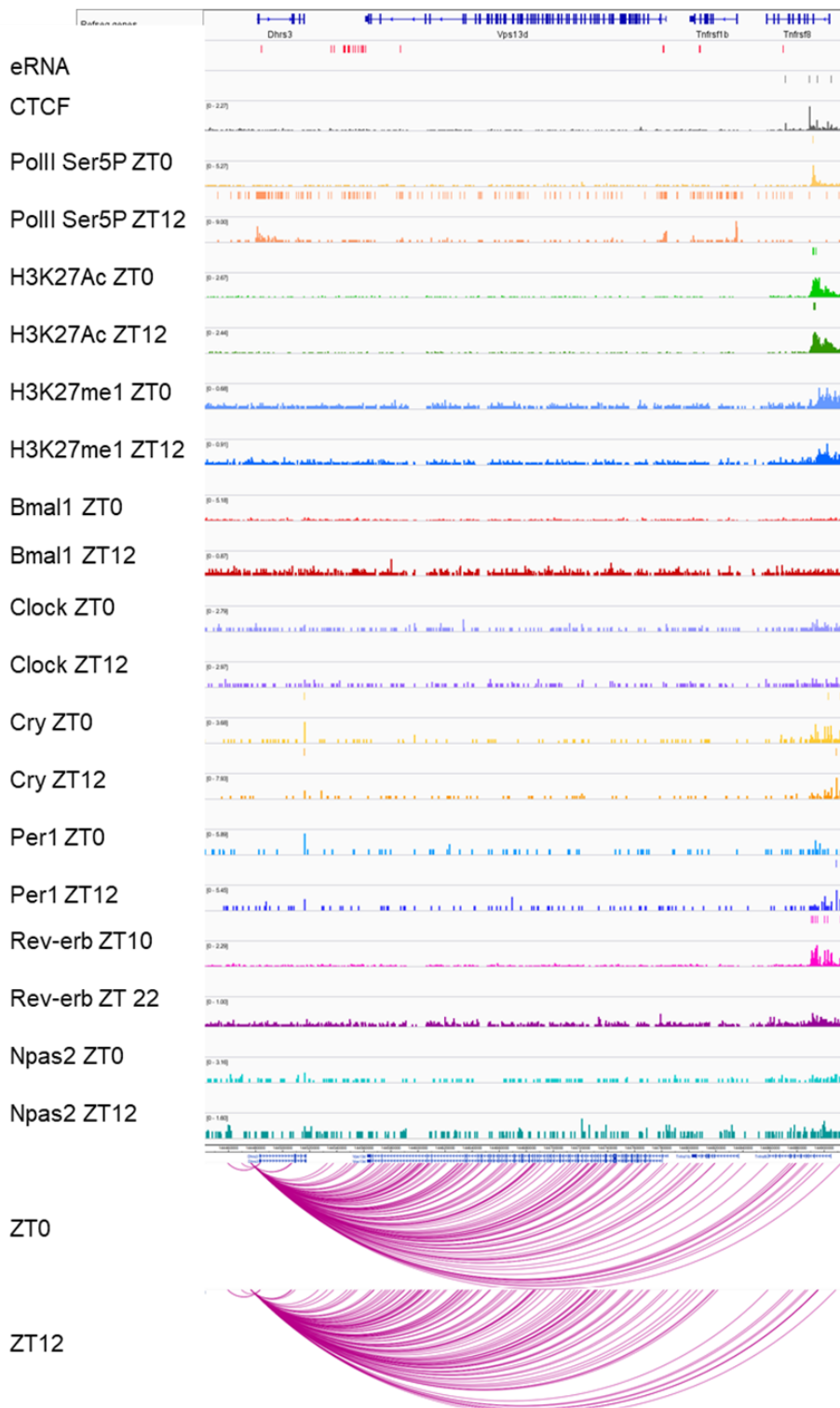


Figura 16 Panorama genómico y de interacciones distales para *Dhrs3*. *Dhrs3* es un ejemplo de un gen no perteneciente al core clock que tiene muchas interacciones y estas no cambian notablemente a través del ciclo.

Elov15

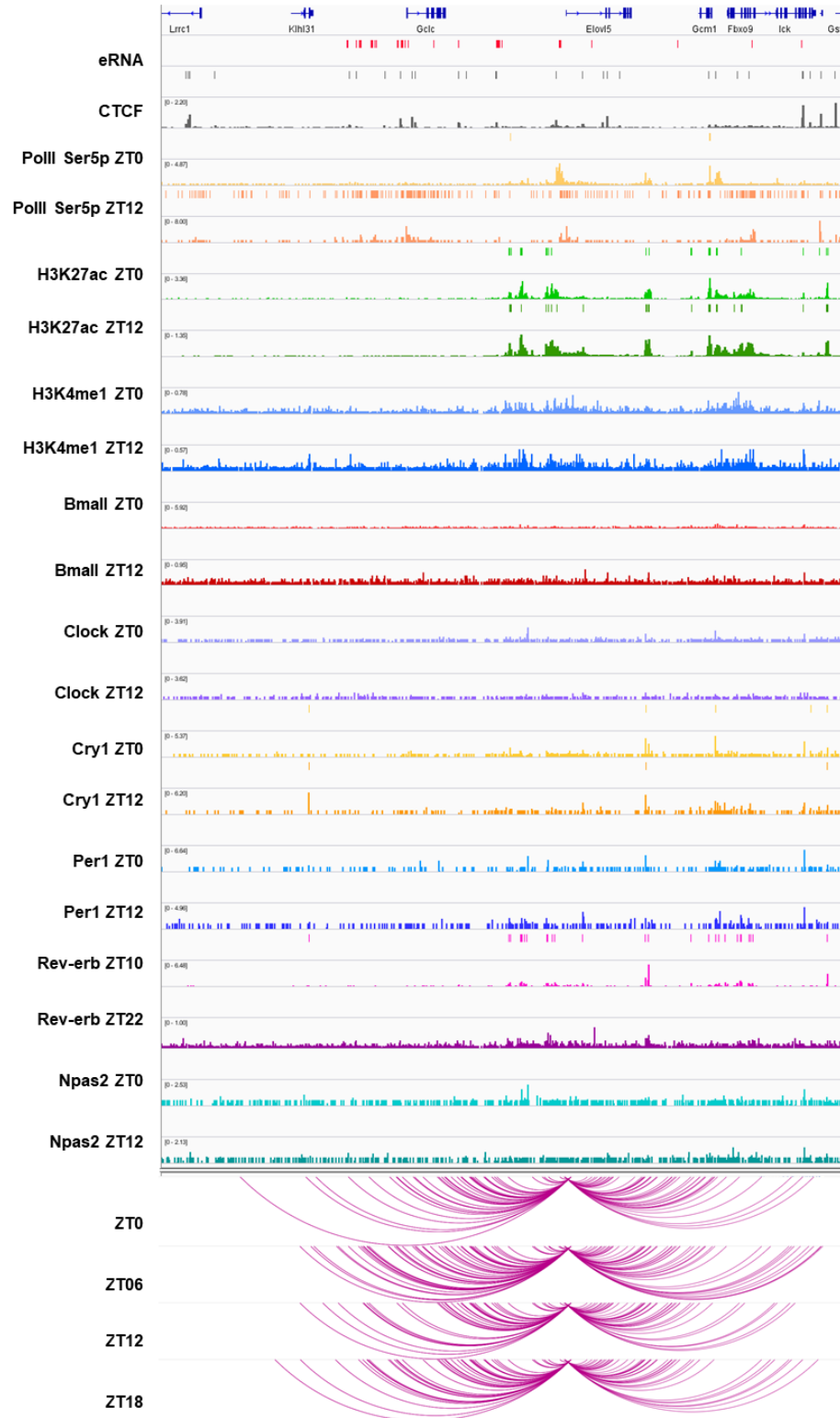


Figura 17 Panorama genómico y de interacciones distales para *Elov15*. *Elov15* no pertenece al core clock tiene numerosas interacciones y estas no cambian notablemente a través del ciclo.

Nr1d1

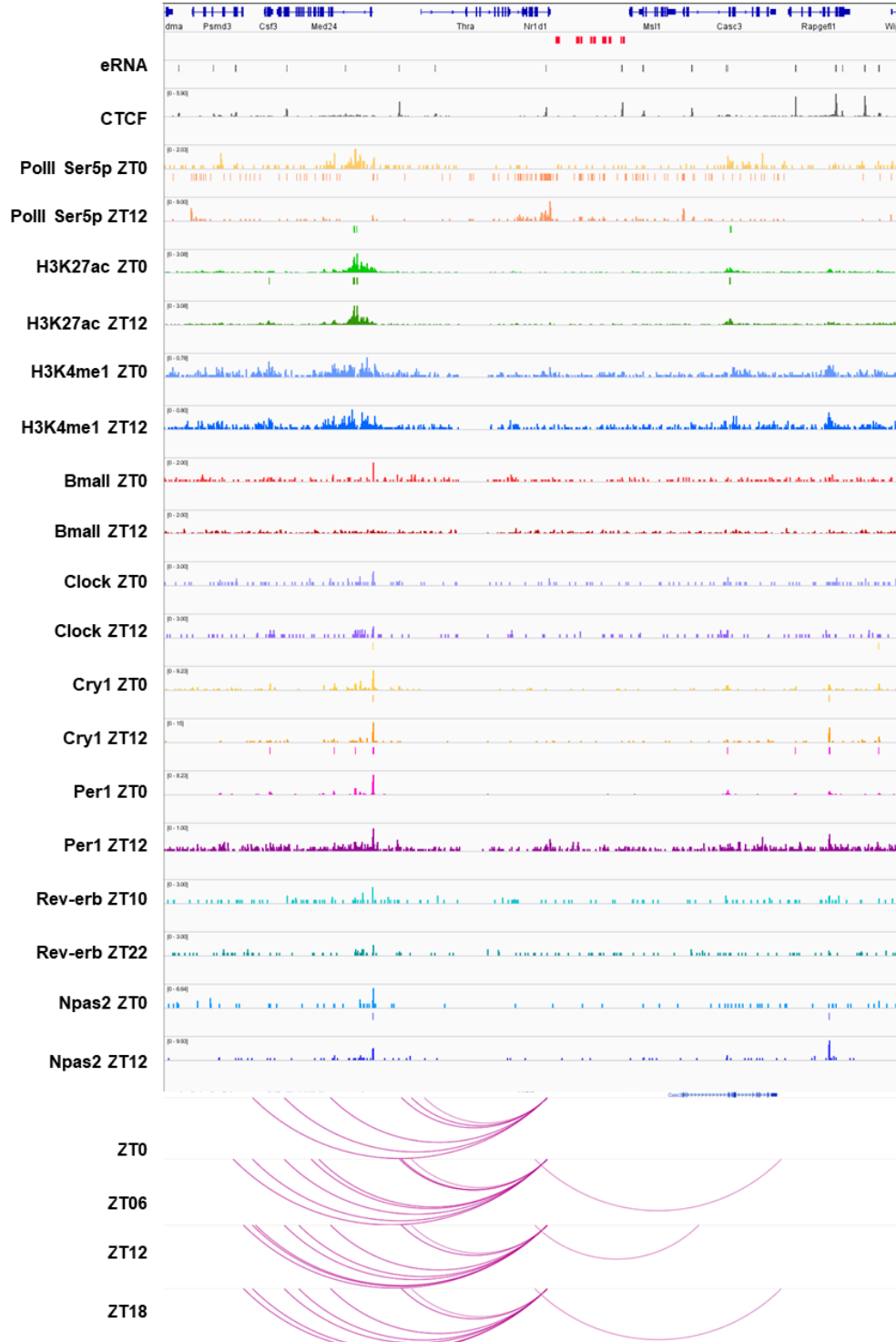


Figura 18 Panorama genómico y de interacciones distales para *Nr1d1*. Ejemplo de gen circadiano de la maquinaria central que realiza pocas interacciones y estas parecen alternar en el transcurso del ciclo.

Cry1

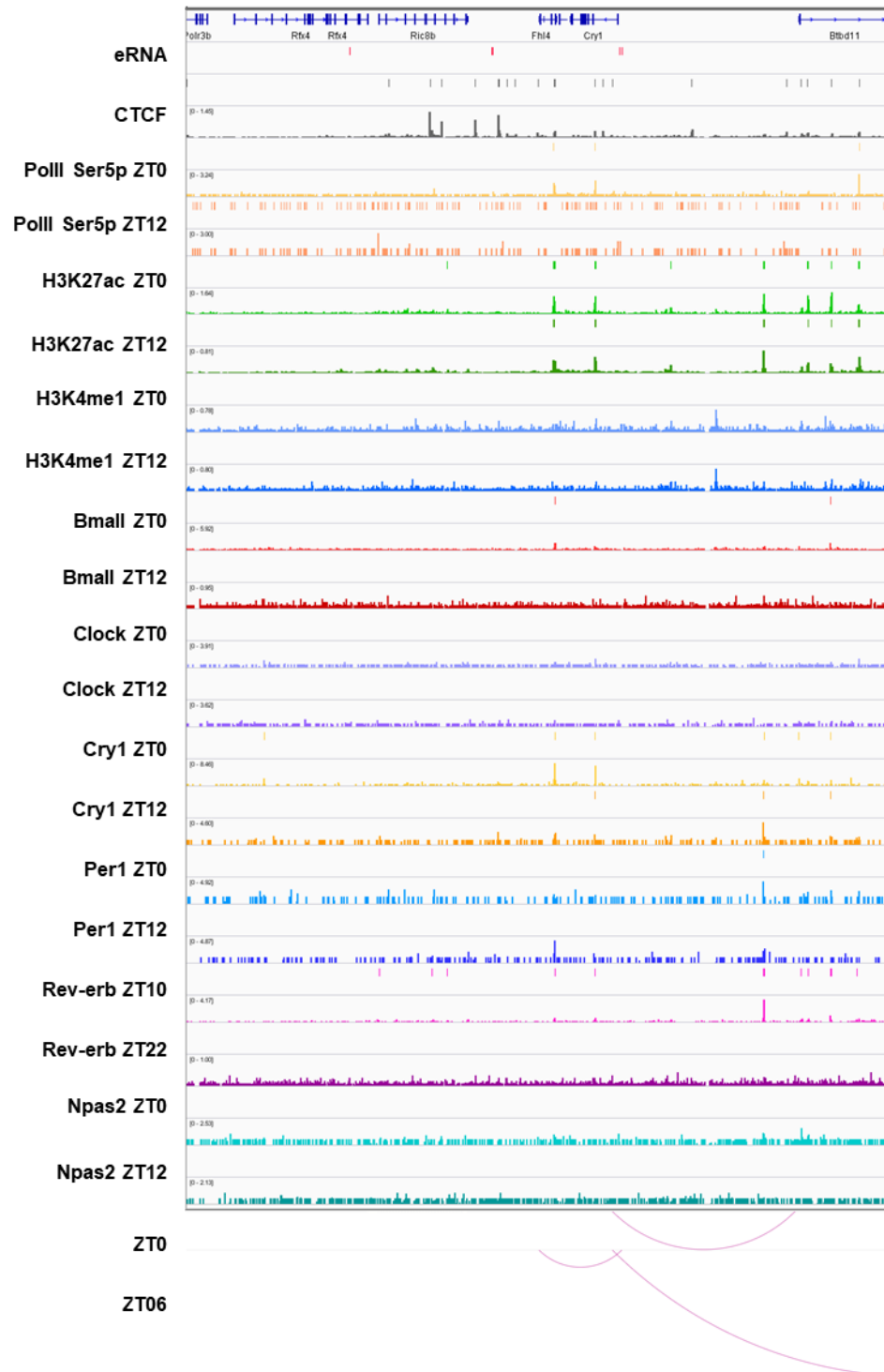


Figura 19. Panorama genómico y de interacciones distales para *Cry1*. *Cry1* realiza 1 interacción a ZT0 y otras dos a ZT 6.

7.1.7 Interacciones con elementos de regulación de genes circadianos en mESCs

El experimento de Capture HiC también se llevó a cabo utilizando células troncales embrionarias de ratón (mESC) (Schoenfelder et al 2015). El origen y la importancia del ritmo circadiano en las células troncales embrionarias (ESCs) sigue siendo en gran parte desconocida, y hay mucho que aún no se comprende de su papel en este estadio; sin embargo, se ha encontrado evidencia que su apareamiento puede estar vinculado a desencadenar ciertos procesos celulares incluso en esta etapa temprana del desarrollo (Weger et al, 2017). El establecimiento del ritmo circadiano en las ESCs podría conducir al inicio de la coordinación temporal de ciertos eventos de desarrollo, la regulación de genes relacionados con la pluripotencia y la diferenciación, y la sincronización de la división celular (Pethe et al., 2020). Para comparar entre un estadio celular temprano con una etapa de diferenciación completa, se determinaron las interacciones de los promotores de los mismos 21 genes en mESC (Tabla 7). Se anticipaba que estas interacciones serían limitadas y los resultados refuerzan esta expectativa al revelar una baja cantidad de interacciones significativas en este estadio celular temprano.

Tabla 7 Cantidad de interacciones totales realizadas por promotores circadianos en mESC. Las interacciones de cada gen detectadas por CHiCAGO detectadas a partir del experimento de Capture HiC que se llevó a cabo utilizando células troncales embrionarias de ratón (mESC)

Gen	Número de interacciones totales en mESC
<i>Dhrs3</i>	1.0
<i>Ppp1r3c</i>	3.0
<i>Elov15</i>	7.0
<i>Sos2</i>	6.0
<i>2310044g17rik/cipc</i>	4.0
<i>Usp2</i>	9.0
<i>Irf2bp2</i>	5.0
<i>Csnk1a1</i>	6.0
<i>Cirbp</i>	11.0
<i>Fbx13</i>	
<i>Csnk1d</i>	2.0
<i>Nfil3</i>	1.0
<i>Per2</i>	1.0
<i>Dbp</i>	17.0
<i>Npas2</i>	2.0
<i>Per1</i>	1.0
<i>Tef</i>	2.0
<i>Bmal1</i>	1.0
<i>Cry1</i>	1.0
<i>Nr1d1</i>	3.0
<i>Clock</i>	1.0

Dado que aún no se ha realizado un experimento de ARN naciente para identificar transcritos de eRNA en mESCs, se utilizó el conjunto de datos del experimento de ARN naciente en hígado de ratón para establecer las determinar las interacciones de los promotores circadianos con las regiones anotadas que producen el transcrito (Tabla 8) (Fang et al. 2014). Esto se hizo con el propósito de obtener una idea de las posibles variaciones en las interacciones en una etapa celular diferenciada en las que ya existe un programa transcripcional definido y regulado por distintos mecanismos incluyendo el de elementos enhancer.

Tabla 8 Interacciones con regiones generadoras eRNA naciente en mESC. Contactos en un estadio temprano (mESC) entre promotores circadianos con regiones que generan eRNA identificadas en un tejido hepático de ratón (hígado, de Fang et al, 2014).

Gen	Interacciones con regiones generadoras de eRNA
<i>Dhrs3</i>	1.0
<i>Ppp1r3c</i>	
<i>Elovl5</i>	1.0
<i>Sos2</i>	1.0
<i>2310044g17rik/cipc</i>	3.0
<i>Usp2</i>	
<i>Irf2bp2</i>	5.0
<i>Csnk1a1</i>	2.0
<i>Cirbp</i>	2.0
<i>Fbxl3</i>	
<i>Csnk1d</i>	
<i>Nfil3</i>	1.0
<i>Per2</i>	1.0
<i>Dbp</i>	
<i>Npas2</i>	
<i>Per1</i>	6.0
<i>Tef</i>	1.0
<i>Bmal1</i>	
<i>Cry1</i>	
<i>Nr1d1</i>	
<i>Clock</i>	

Aunque los datos provienen de tejidos diferentes, es notable que se encontraron interacciones entre ciertos promotores y regiones activadoras de la transcripción preservadas en ambos tipos celulares, lo cual podría sugerir que existen interacciones preensambladas desde las mESCs que posteriormente podrían ser funcionales en el tejido hepático. Es notable que, en este conjunto de genes, algunos asociados a procesos metabólicos, como *Elovl5*, *Irf2bp2*, y *Dhrs3* (elongación de ácidos grasos, regulación de respuestas inmunológicas, y conversión de retinoides, respectivamente), exhiben interacciones desde etapas tempranas de desarrollo celular. Esta observación respalda la noción de que algunos procesos metabólicos preceden al establecimiento de la actividad coordinada de los componentes centrales en el ritmo circadianos (Sato et al., 2023; Alvarez-Dominguez et al., 2020).

7.2 PARTE 2: ENSAYOS PARA ESTANDARIZAR UN PROTOCOLO DE CAPTURE HI-C DE TEJIDO

7.2.1 Determinación de la expresión génica circadiana en riñón de ratón

El estudio del ciclo circadiano requiere una sincronización adecuada de los ratones. Para verificar la sincronización correcta de los ratones a momentos específicos del ciclo circadiano, se midieron niveles de transcripción de *Bmal1*, *Dbp*, *Nr1d1*, y *Per2* del reloj central con expresión oscilatoria mediante RT-qPCR utilizando los genes constitutivos *Rps9* y *Ppib* para normalizar. Se cuantificaron los niveles de expresión en los puntos de tiempo ZT 0, 6, 12, y 18 en hígado y riñón. Se empleó el método de cuantificación por curva estándar para determinar la expresión relativa de los genes circadianos.

A pesar de contar muestras de 9 puntos temporales, sólo 4 puntos temporales (ZT 0, 6, 12 y 18) se seleccionaron para cubrir todo el ciclo circadiano. Las cuantificaciones se realizaron por triplicado para evaluar 2 réplicas biológicas en hígado y riñón.

Los resultados confirmaron la sincronización de los ratones, siguiendo el mismo perfil general de transcripción circadiana reportada en la literatura para hígado y riñón (Figura 20 Figuras Suplementarias 9-14) (según Hughes et al., 2009).

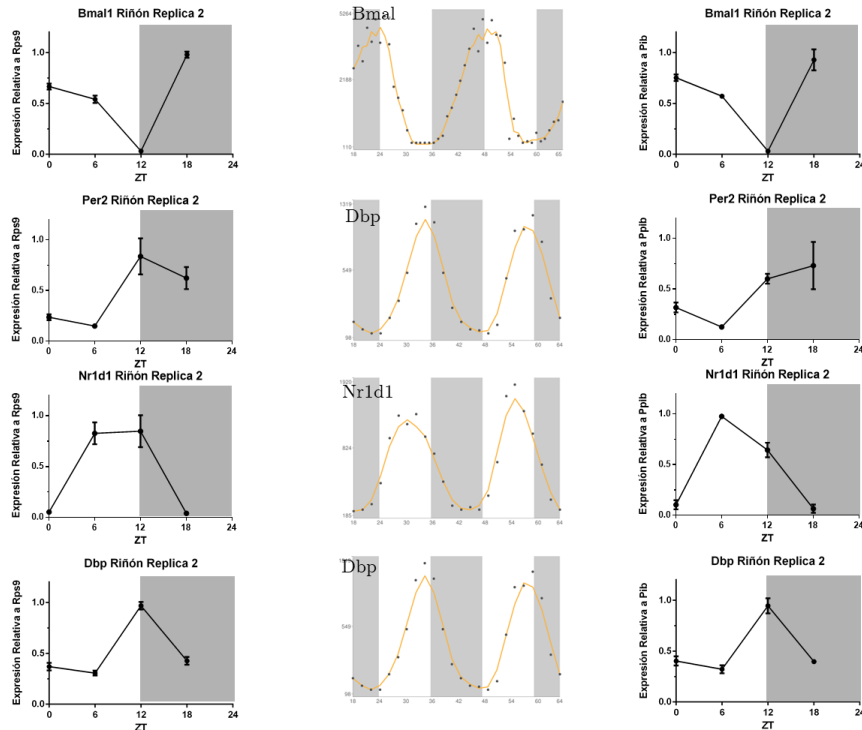


Figura 20. Validación de transcripción oscilatoria mediante RT-qPCR. La cuantificación en riñón de los genes circadianos (*Bmal1*, *Dbp*, *Nr1d1* y *Per2*) se normalizó con *Rps9* y *Ppib*. Se realizaron 3 réplicas técnicas ($n=3$, barras de desviación estándar), en cada ZT (ZT 0, 6, 12 y 18) para abarcar un ciclo circadiano completo

7.2.2 Estandarización de protocolo de Hi-C en tejido de ratón

Con los ajustes derivados de la resolución de problemas en los ensayos de Hi-C en corazón, bazo, hígado, y riñón, descritos en la sección de *Resolución de Problemas en Métodos y Materiales* se repitió el experimento, duplicando la cantidad inicial de material genómico para mejorar las posibilidades de éxito, a partir de hígado y riñón de ratones muestreados en ZT 0.

7.2.2.1 Controles experimentales de Hi-C para verificación de reacción de entrecruzamiento y reacciones enzimáticas

Se corroboró la digestión, reparación y ligación de fragmentos como a partir de una amplificación de 100 ng del material de reacción con los oligonucleótidos de Albúmina e Histonas (Figura 21).

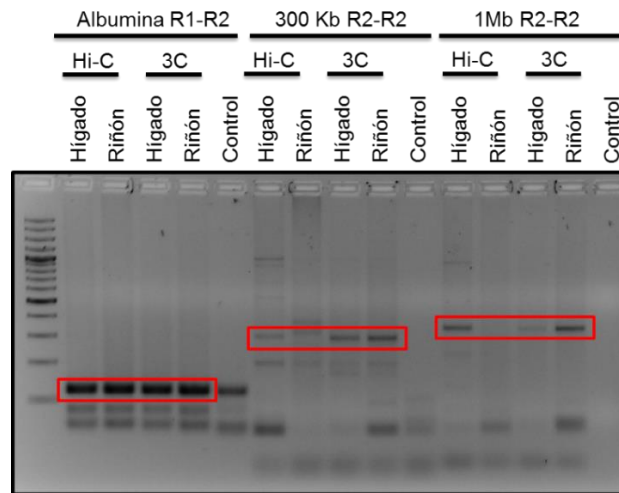


Figura 21. Reacciones de PCR de controles de interacción. Se realizó la reacción para los experimentos de Hi-C y 3C en ambos tejidos con tres regiones con interacción comprobada previamente a 1 Kb, 300Kb, y 1Mb de distancia. El recuadro rojo indica el amplicón esperado que será analizado por ensayos de restricción.

A pesar de enfrentar un problema de aparente contaminación en la reacción del control de Albúmina (detectado en las bandas de menor peso molecular), se logró la purificación del amplicón por separación y purificación en gel de agarosa (Figura 21).

Se continuó el control con la digestión del material recuperado con MboI y ClaI. Esta prueba reveló si la digestión con la enzima MboI generó fragmentos cohesivos capaces de ser rellenados por el fragmento Klenow y si la posterior ligación de los nuevos extremos como generaron un nuevo sitio de corte de ClaI (Figura 22).

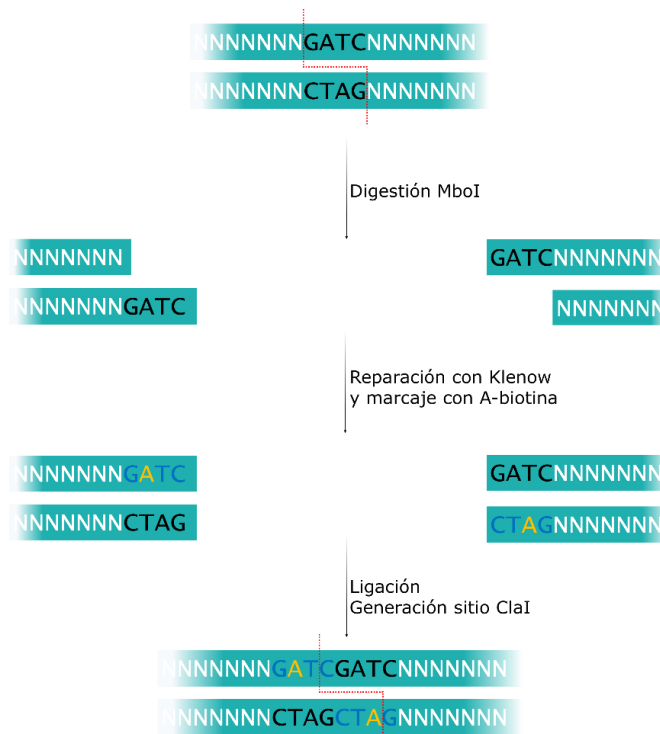


Figura 22 La digestión del ADN con MboI, que reconoce GATC y genera un extremo-GATC. Luego, el relleno del extremo con dNTPs y biotina-14-dATP. La ligación de los extremos como crea un nuevo sitio de restricción (ClaI) para evaluar la eficiencia del relleno.

Al separar las digestiones en agarosa se observaron fragmentos de menor peso, por lo que se confirmó la reacción de relleno con el fragmento Klenow fue exitosa y que los extremos romos del ADN se unieron. Se observó una tenue banda de material no digerido por ClaI, indicando que, aun se podría mejorar la eficiencia de las reacciones (Figura 23). Sin embargo, en el procedimiento de Hi-C se realiza el aislamiento selectivo (pull-down) del material biotinilado; las trazas de material que no se unió de manera óptima se eliminaría.

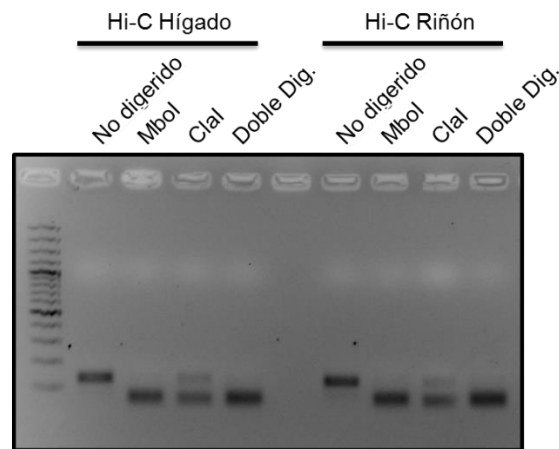


Figura 23. Ensayo de restricción para el control de Albúmina. Se digirió el amplicón purificado con MboI, ClaI, y ambas enzimas juntas. La digestión con ClaI indica la formación del nuevo sitio de restricción por el paso de relleno-ligación del protocolo de Hi-C.

Después de confirmar la eficiencia de los controles de ligación, se avanzó con la etapa de sonicación de las bibliotecas, cuyos resultados mostraron una distribución predominante de fragmentos en el rango de marcador molecular esperado, cerca de 500 pb (Figura 24). Esta uniformidad en el tamaño de los fragmentos es esencial para garantizar la captura precisa de las interacciones genómicas en las etapas posteriores del protocolo del Hi-C.

ZT 0 ZT 12

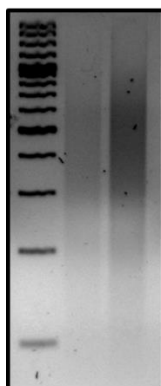


Figura 24. Sonicación de la muestra en COVARIS. Se realizó la sonicación de las muestras de Hi C y se separaron por electroforesis en agarosa para determinar que se generaran fragmentos del tamaño deseado.

Luego de verificar el tamaño deseado de las moléculas sonicadas, se realizó un ensayo para encontrar el número óptimo de ciclos de amplificación necesarios para incorporar adaptadores de secuenciación. Este ensayo involucró múltiples ciclos de PCR, donde los adaptadores se unieron a los fragmentos de ADN para su preparación en la secuenciación (Figura 25). La elección del número adecuado de ciclos fue crucial, ya que demasiados ciclos podrían causar una amplificación excesiva y artefactos no deseados, mientras que muy pocos ciclos podrían resultar en una cantidad insuficiente de material para la secuenciación. Después de probar con 7 y 10 ciclos de amplificación, se decidió elegir la reacción de 10 ciclos utilizando todo el material del proceso de Hi-C para asegurar la cantidad óptima de material adecuadamente preparado para la secuenciación (Figura 25).

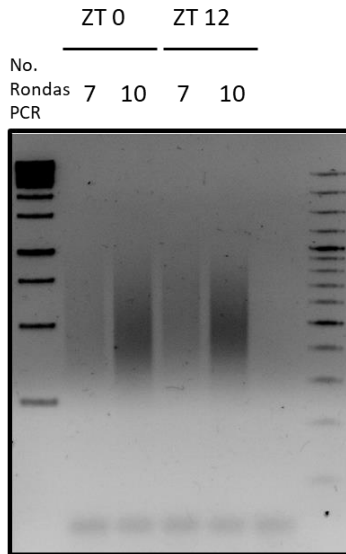


Figura 25. Ensayo de ciclos de PCR para incorporación de adaptadores de secuenciación a biblioteca de Hi C. Se realizaron pruebas para determinar el número de ciclos suficientes para incorporar los adaptadores de secuenciación y minimizar los duplicados de PCR.

Con esta etapa de amplificación, se completó el protocolo experimental de Hi-C, habiendo pasado por un proceso de optimización en todas las fases, desde la digestión y ligación hasta la selección del tamaño de moléculas, los ciclos de amplificación y la incorporación de adaptadores de secuenciación.

Antes de proceder con la secuenciación del Hi-C, se realizó un último ensayo de confirmación. En este ensayo, una parte de la biblioteca de secuenciación se sometió a una digestión MboI y ClaI.

En una separación por agarosa, normalmente se anticiparía observar una dispersión de migración de fragmentos de menor peso molecular en la muestra digerida en comparación con la muestra no digerida. La ausencia de esta característica distribución en la separación por agarosa sugiere que los fragmentos presentes en la biblioteca no pasaron eficientemente por la fase de reacción de rellenado y ligación con biotina, un proceso esencial en el método Hi-C (Figura 26).

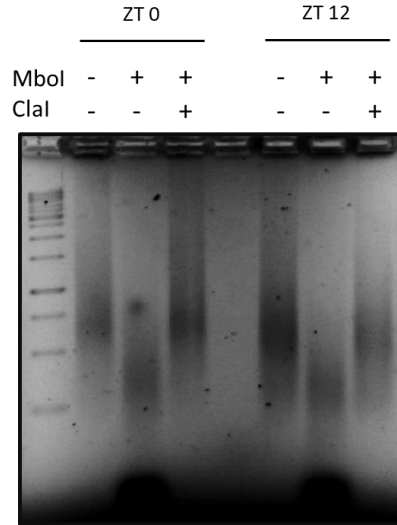


Figura 26. Digestión de las bibliotecas de secuenciación de Hi C de células de riñón, con ClaI y MboI. Se digirieron las bibliotecas con la enzima ClaI para confirmar la existencia del nuevo sitio de restricción formado tras la correcta ejecución del protocolo.

Si bien no se muestra un control positivo en este ensayo, en el laboratorio se desarrollaron ensayos con otros tipos celulares en los que el mismo lote de enzima y condiciones de digestión sí lograron comprobar el buen funcionamiento de ClaI.

El último resultado conlleva la sugerencia de que, al ser susceptible a la digestión por la enzima MboI, la biblioteca en cuestión podría ser usada para analizar mediante un 3C-seq en lugar del proceso Hi-C. En el 3C-seq, se generan fragmentos que reflejan interacciones genómicas, pero a diferencia del Hi-C, no se realizan selecciones específicas utilizando biotina. Debido a limitaciones de tiempo y recursos financieros, se optó por no llevar a cabo la secuenciación. En su lugar, se decidió utilizar datos de un experimento previamente realizado la Dra. Furlan para analizar las interacciones en hígado de ratón, tal como se detalló en la Parte 1 de los Resultados.

7.2.3 Generación de sondas de captura para el experimento de Capture Hi-C

A partir del análisis de diferentes redes de interacciones génicas asociadas al sistema circadiano, se identificaron genes de interés para un estudio más profundo utilizando la técnica de Capture Hi-C. Utilizando datos previamente disponibles en el visualizador IGV (Integrative Genomics Viewer), se realizó una comparación visual detallada entre los perfiles de marcas epigenéticas y los patrones de interacción de los promotores de estos genes. Por ejemplo, como se ilustra en la Figura 27, se seleccionó el gen *Dhrs3* en el programa Seqmonk y se examinó la misma región genómica en IGV. A partir de esta comparación, se eligieron cuatro regiones que presentaban interacciones con el promotor del gen y que también

exhibían un aumento en la señal de ChIP-seq (inmunoprecipitación de cromatina seguida de secuenciación) para marcas epigenéticas asociadas con la activación génica, elementos estructurales importantes, o la unión de factores de transcripción pertenecientes al reloj circadiano central.

En este proceso, se busca una correlación entre las interacciones espaciales de los genes de interés y las marcas epigenéticas relevantes en su entorno genómico. La coincidencia de interacciones y señales epigenéticas sugiere una posible regulación conjunta de los genes circadianos y proporciona pistas sobre los mecanismos moleculares que regulan la coordinación de los ritmos biológicos.

Un aspecto central de varios proyectos de nuestro grupo de investigación es reducir los costos de los experimentos sin sacrificar la robustez de los mismos. Así mismo, como parte importante de este proyecto, se llevará a cabo la implementación de un método para la generación de sondas de captura no reportado previamente.

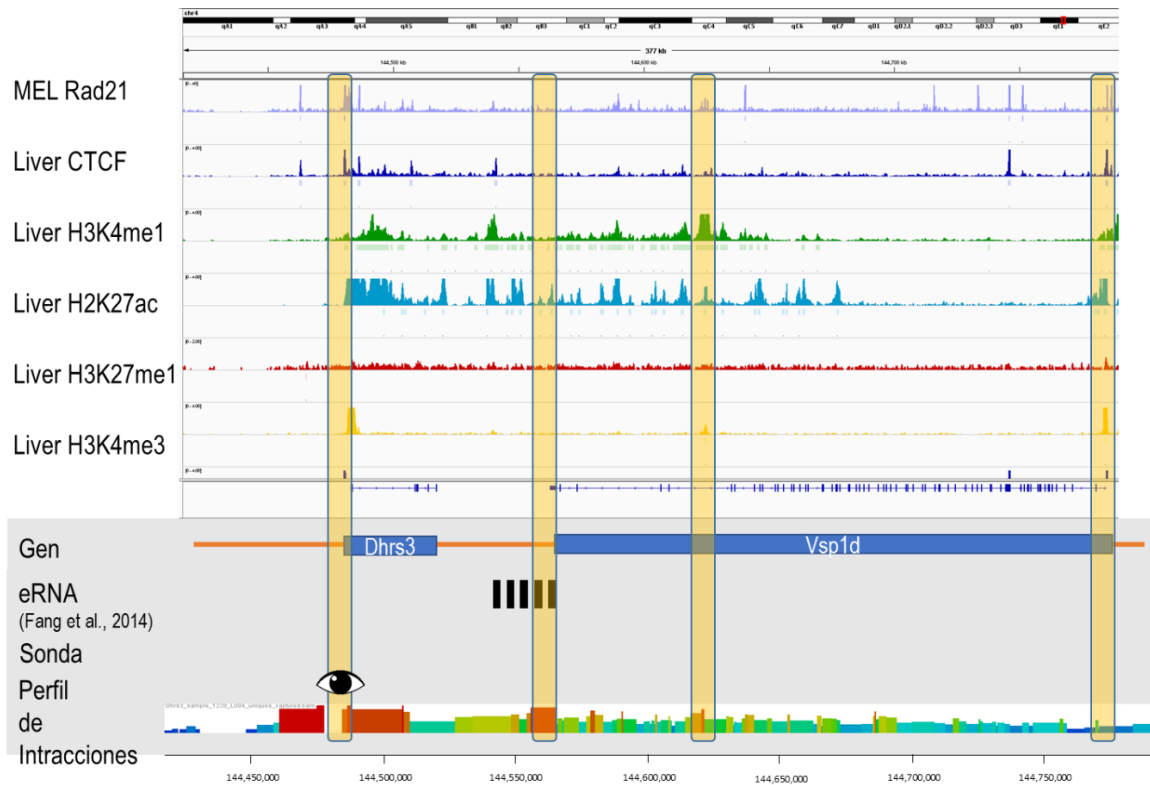


Figura 27. Captura de pantalla de análisis para las regiones de interés. Se utilizó información disponible sobre elementos epigenéticos y estructurales del genoma.

Con el uso de un adaptador de la ARN polimerasa de T7 se pretende sintetizar in vitro fragmentos de ARN marcados con biotina. El adaptador codifica para la T7 ARN polimerasa y por un extremo incluye un sitio de restricción que por medio de una reacción de ligación con un fragmento de ADN de doble cadena con un sitio cohesivo de MboI, produce el sustrato

en la reacción de síntesis in vitro. Se pretende generar las sondas de captura con características específicas por este método. Para esto, se generaron oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 120 pares de bases a partir del sitio de corte de MboI del fragmento genómico. Esto ya se realizó para el conjunto de promotores de todos los genes a estudiar, de tal manera que se generarán dos sondas de captura de ARN biotinilado para los promotores de los genes circadianos.

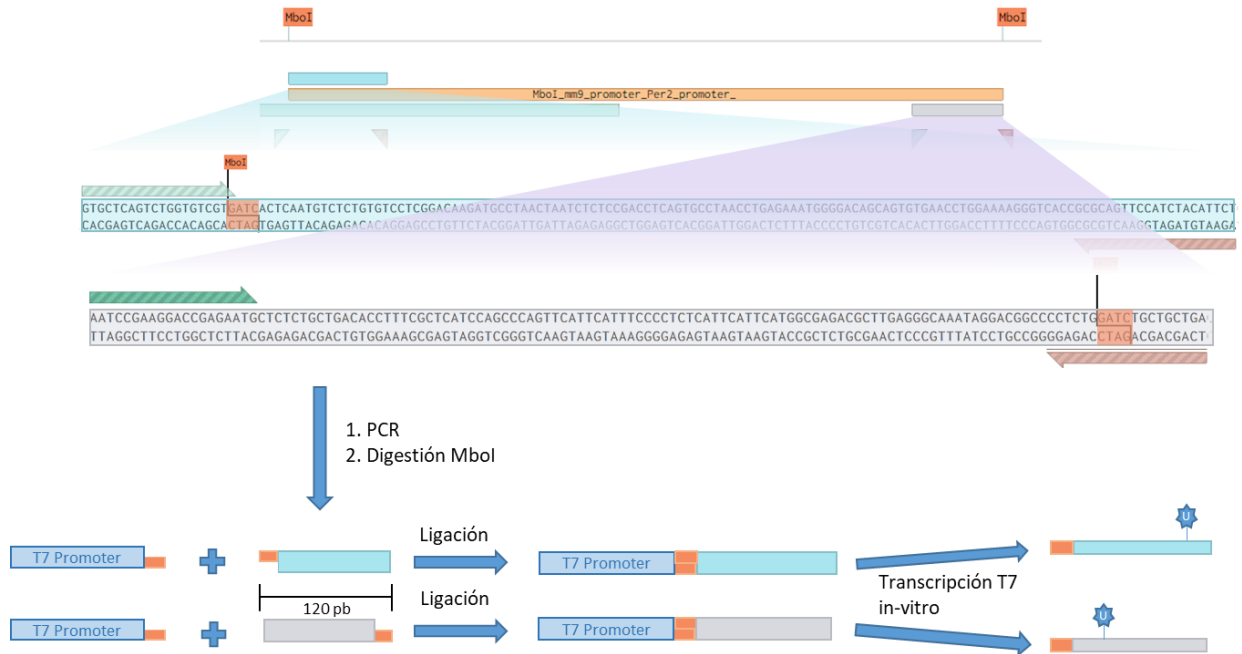


Figura 28. Esquema experimental para el diseño de sondas de captura.

La aplicación de esta metodología innovadora en la generación de sondas de captura podría llevar a una reducción sustancial de los costos, sin comprometer la necesaria especificidad y eficacia requeridas para la captura de las regiones de interés en nuestros experimentos. Esta iniciativa refleja nuestro enfoque en buscar soluciones prácticas y efectivas para impulsar la investigación científica, al tiempo que aseguramos mantener altos estándares en la calidad de los resultados obtenidos.

8 DISCUSIÓN

En esta tesis, se investigó la relación entre la dinámica del interactoma de los promotores circadianos y su actividad transcripcional oscilatoria a lo largo del día en hígado de ratón. Se encontró que los genes del reloj central realizan pocas interacciones con una dinámica muy notable, mientras que los genes de salida realizan más, pero en su mayoría permanecen estáticas durante el día.

Coordinación Temporal de Expresión Génica e Interacciones Distales

La confirmación de la actividad oscilatoria de los genes, mediante la determinación de los niveles de ARNm total y la clasificación de los genes según sus fases transcripcionales, reveló una correlación positiva entre el punto de máxima expresión y el máximo número de interacciones en la mayoría de los genes estudiados. Esta tendencia sugiere una posible coordinación entre la expresión génica y las interacciones distales con elementos regulatorios en el ciclo circadiano. Este hallazgo es consistente con estudios recientes que encuentran caso en los que la expresión génica circadiana está asociada a cambios en la estructura de la cromatina y en las interacciones entre regiones genómicas (Mermet et al., 2018). En estos experimentos puntuales en hígado de ratón se demostró como el promotor de *Bmall* establece contactos rítmicos durante el día, mientras que el promotor del gen de salida *Nampt* mantiene contacto constante con enhancers distales. A pesar de esto, la actividad de ambos elementos sigue un patrón rítmico (Mermet et al., 2018).

Estos casos subrayan la complejidad de la regulación circadiana y la necesidad de seguir estudiando detalladamente las interacciones genómicas globales en diferentes condiciones experimentales y tipos celulares.

Factores de transcripción del núcleo central del reloj en la dinámica de contactos

La marcada disparidad en la cantidad de interacciones llevadas a cabo por los promotores de genes del reloj central en comparación con los promotores de genes no pertenecientes al reloj central en el conjunto seleccionado destaca la cuestión de si existe un mecanismo específico para cada caso.

Aunque se ha avanzado significativamente en la comprensión de los factores de transcripción de la maquinaria central del reloj, aún persiste una exploración incompleta de sus funciones y características. Estos factores, reconocidos principalmente por su papel central en la regulación del ritmo circadiano, han revelado funciones adicionales más allá de su influencia en el reloj biológico.

Se ha observado una relación entre la cantidad de interacciones con enhancers en genes específicos para un programa transcripcional tejido específico y aquellos relacionados con funciones de mantenimiento celular básico (housekeeping). Se ha notado que múltiples enhancers pueden coordinar o ser redundantes, mientras que otros son más específicos en su función dependiendo de esta clasificación funcional (Zabidi et al., 2015, Peng et al, 2020).

Reconociendo que los genes del reloj central se expresan prácticamente en todas las células, se consideran housekeeping (Takahashi, 2016). Por ende, surge la posibilidad de que los mecanismos reguladores de estos genes no dependan tanto de contactos con elementos distales como los genes de salida que frecuentemente son tejido-específicos. Este planteamiento se alinea con la comprensión de que dichos contactos no contribuyen de manera común a la regulación de genes housekeeping, como se evidencia por la baja frecuencia de contactos identificados para genes del reloj central en los datos experimentales del análisis de Capture Hi-C realizado en esta tesis. Sin embargo, es posible que los productos de estos genes, expresados en casi todas las células, desempeñen un papel en la regulación de las interacciones de asas de ADN entre potenciadores y promotores específicos de cada tejido. La investigación detallada sobre la unión de los factores de transcripción del núcleo central del reloj podría aportar valiosas contribuciones para evaluar su impacto en el número de contactos y su relación con la ritmicidad génica. Al examinar posibles correlaciones en el orden o combinaciones de unión, se podrían obtener perspectivas fundamentales sobre los mecanismos regulatorios presentes en el núcleo central del reloj biológico, presente en todos los tejidos.

Hallazgos recientes revelan que las regiones de unión a BMAL1 pueden prescindir de contactos con enhancers distantes, específicamente en ciertos tejidos. Esto sugiere la posibilidad de que otros factores transcripcionales de la maquinaria central del reloj desempeñen un papel en la creación de conexiones entre promotores génicos (Beytebiere et al., 2019). Explorar las proteínas que interactúan de manera específica en un tejido podría ofrecer un mejor entendimiento de la regulación circadiana.

Por ejemplo, se ha iniciado la investigación de ciertos factores transcripcionales clave de la maquinaria central, como BMAL1, que presenta una preferencia específica de tejido en términos de fuerza de unión a enhancers de genes circadianos (Beytebiere et al., 2019). Esta preferencia se correlaciona con las interacciones realizadas con potenciadores distales y la actividad transcripcional. Además, se ha explorado la relación entre la unión de REV-ERB α en una región específica que interactúa con *Cry1*, generando contactos oscilantes que resultan en la represión alternante de la transcripción y, como consecuencia, en la expresión rítmica de *Cry1* (Kim et al., 2018).

La unión de estos factores, ya sea de manera individual o en diversas combinaciones secuenciales, podría facilitar las interacciones con el ADN. Aunque el análisis de esta tesis se limitó al hígado murino, las combinaciones de actividades de factores de transcripción rítmicos y específicos del tejido podrían explicar la expresión génica circadiana diferencial específica de cada órgano.

Persistencia de interacciones génicas desde de la pluripotencia

Las limitadas investigaciones sobre el origen de los ritmos circadianos han sugerido que las células no diferenciadas carecen de oscilaciones rítmicas en los componentes del reloj central (Kowalska et al., 2010; Yagita et al., 2010). La observación de que ciertas interacciones génicas podrían estar preensambladas en las células troncales embrionarias, respaldada por los resultados del análisis en esta tesis, sugiere que estas interacciones aparentemente se conservan hasta los tejidos diferenciados, indicando un papel funcional de los contactos en la anticipación a la eventual sincronización y establecimiento de la ritmicidad.

Además, la observación de interacciones tempranas en genes asociados con procesos metabólicos respalda la idea de que algunos aspectos metabólicos preceden a la actividad coordinada en el ritmo circadiano durante el desarrollo celular. La falta de oscilación rítmica durante la pluripotencia y su impacto en la función celular y el desarrollo son áreas que requieren una exploración más profunda. Comprender cómo se ve afectado el reloj circadiano durante la reprogramación celular podría tener aplicaciones prácticas en la medicina regenerativa y mejorar las técnicas de reprogramación celular para terapias regenerativas.

Papel de eRNAs en la regulación transcripcional y la organización del genoma

En los últimos años, la investigación sobre los eRNAs ha destacado su papel potencial en la regulación transcripcional y la organización genómica. Aunque se ha revelado la presencia de sitios de unión de ARN en factores de transcripción a nivel transcriptómico, aún no se comprende completamente cómo los eRNAs participan en la organización genómica.

Recientemente, se ha revelado la presencia de sitios de unión de ARN en factores de transcripción (TF-ARN) a escala transcriptómica, lo que amplía nuestra comprensión de las posibles implicaciones en la regulación génica (Oksuz et al, 2023). La notable frecuencia de transcritos de eRNA en las regiones de interacciones enhancer-promotor plantea la interrogante de si podrían desempeñar un papel en la organización de la cromatina, contribuyendo así a la regulación transcripcional.

Adicionalmente, se ha observado recientemente que el componente del reloj circadiano, CRY1, desempeña un papel crucial en la pluripotencia celular, especialmente en células troncales pluripotentes. La falta de oscilación en los genes del reloj circadiano en ciertas

etapas y tipos celulares sugiere una conexión entre la oscilación rítmica y la maduración celular (Sato et al., 2023, Alvarez-Dominguez et al., 2020). La pérdida de ritmos circadianos durante la reprogramación celular plantea preguntas sobre cómo se regula y modula el reloj circadiano durante este proceso, y cómo puede afectar la expresión génica y la función celular. Este conocimiento podría ser crucial para la medicina regenerativa y la mejora de las técnicas de reprogramación celular.

Considerando estos hallazgos, investigar el dominio de unión al ARN de CRY1, un componente del reloj circadiano. Explorar su participación en el establecimiento del ritmo circadiano, posiblemente a través de la interacción con ARN, podría arrojar luz sobre su influencia en la organización de la cromatina y la identidad celular. Un experimento para investigar la interacción de CRY1 con moléculas de ARN en células troncales podría proporcionar información valiosa sobre la importancia funcional de este dominio y sus contribuciones a la biología celular y la regulación circadiana.

En resumen, esta tesis presenta un análisis detallado de las interacciones cromatínicas en genes circadianos, resaltando la complejidad y dinámica de estas interacciones a lo largo del ciclo circadiano. Los estudios recientes en la investigación genómica de la biología circadiana han proporcionado ejemplos específicos de cómo la organización estructural de la cromatina regula los programas de transcripción en diversos tejidos. Sin embargo, aún falta descubrir un principio general que explique por qué la transcripción dinámica de algunos genes está vinculada a un plegamiento cromatínico dinámico, mientras que otros genes exhiben un plegamiento estático. Los resultados esfuerzos para comprender este tema ofrecerán una base para potenciales aplicaciones en la comprensión de la sincronización de procesos biológicos y su papel en trastornos circadianos.

9 CONCLUSIONES

- Los genes circadianos de salida del reloj central tienden a establecer más contactos, pero con una variación más reducida en comparación con los genes del reloj central, que presentan un menor número de interacciones, pero con una dinámica muy marcada.
- Los genes para los que su transcripción alcanza su punto máximo en ZT0 muestran más contactos al inicio del ciclo, los genes con mayor expresión en ZT6 y ZT12 tienen más interacciones entre ZT6 y ZT12, y los de pico en ZT18 no muestran una preferencia clara en cuanto a la temporalidad de los contactos.

- Algunas de las interacciones entre promotores circadianos y elementos enhancer en el hígado murino aparecen también en mESCs.

10 PERSPECTIVAS

Establecer loci para realizar estudios funcionales con base en el análisis de las interacciones

A partir del análisis realizado, se tiene idea de algunos loci candidatos para realizar estudios funcionales. Son de particular interés aquellos genes cuyos interactomas revelaron contactos preferenciales con elementos regulatorios, sitios de unión de factores transcripcionales, de los distintos perfiles de interacción.

Por lo tanto, mediante técnicas de perturbación se podría examinar cómo las variaciones genéticas en los genes circadianos y las perturbaciones ambientales afectan las interacciones cromatínicas circadianas. Emplear modelos de knockout o knockdown de expresión de genes del reloj específicos y exponer células a diferentes condiciones ambientales para analizar su papel en la modulación de la dinámica de la cromatina.

Estudios Comparativos entre Tejidos

Realizar estudios comparativos entre diferentes tejidos para revelar diferencias en las redes de interacciones cromatínicas circadianas y específicas de cada tejido. Explorar las regiones de contacto con el fin de identificar los factores transcripcionales presentes en estas áreas es crucial para determinar posibles diferencias entre tejidos. Estas divergencias podrían ser responsables de distintos programas de interacción y transcripción, ofreciendo así una comprensión más detallada de la regulación génica en contextos tisulares específicos.

Estudios mecanísticos de interacciones de ARN

Realizar análisis del interactoma de ARN-factores transcripcionales para identificar y validar moléculas de ARN específicas, como los eARNs, involucradas en la mediación de las interacciones cromatínicas circadianas. Perturbar o abatir la expresión de estas moléculas de ARN para evaluar su impacto en la organización de la cromatina y la expresión génica.

11 FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Fbxl3

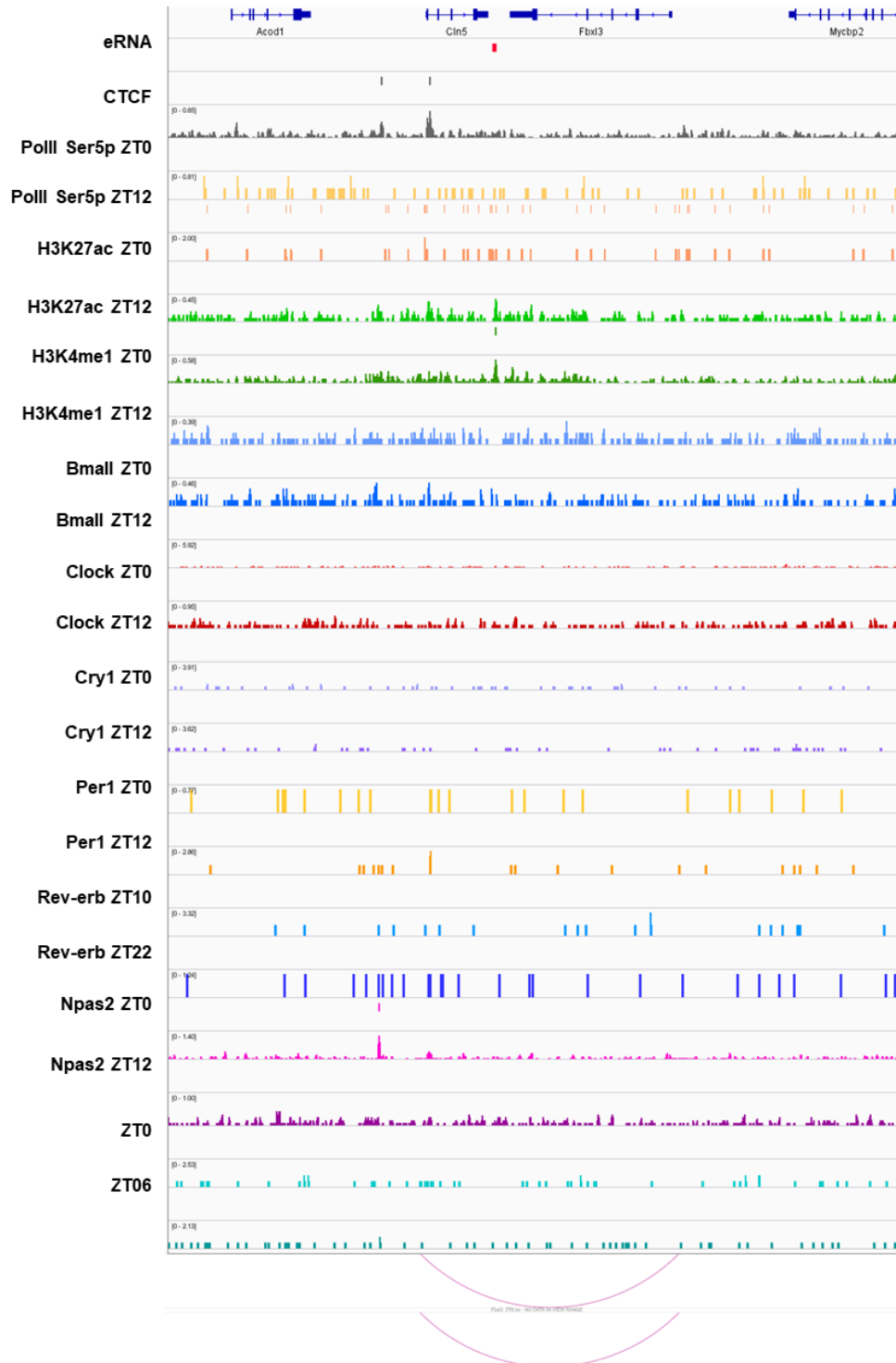


Figura Suplementaria 1 Panorama genómico y de interacciones distales

Irf2bp2

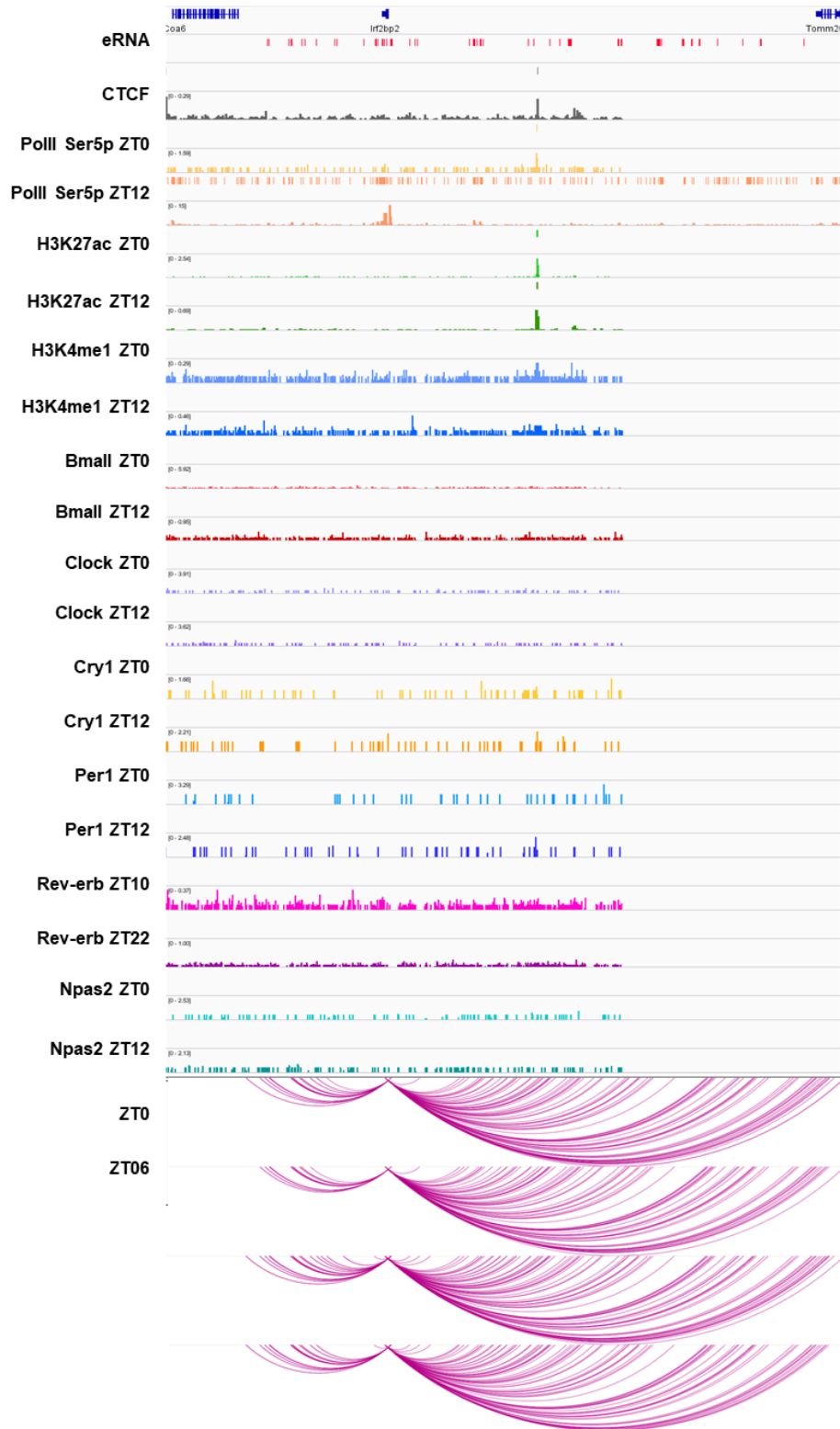


Figura Suplementaria 2 Panorama genómico y de interacciones distales

Nfil3

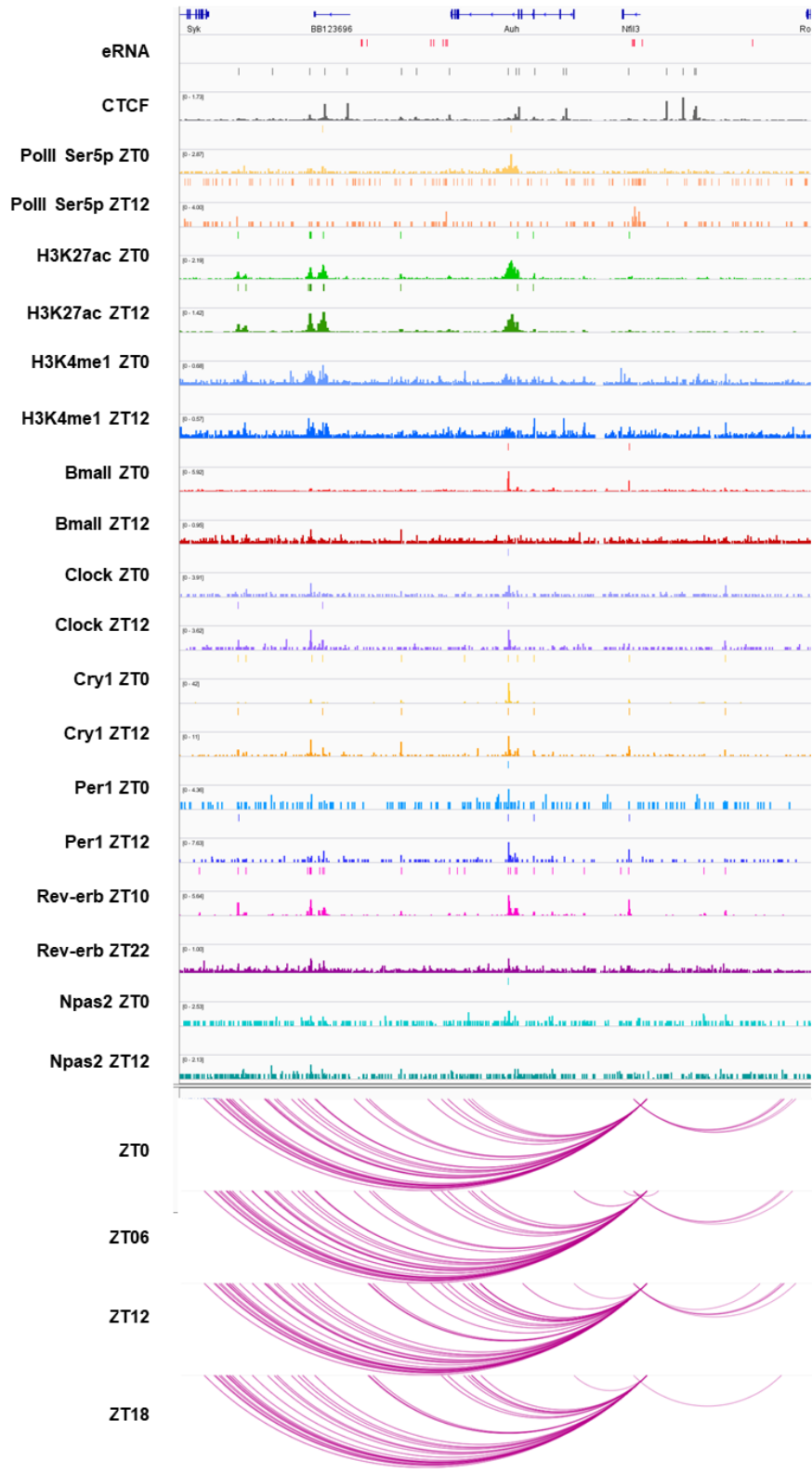


Figura Suplementaria 3 Panorama genómico y de interacciones distales

Npas2

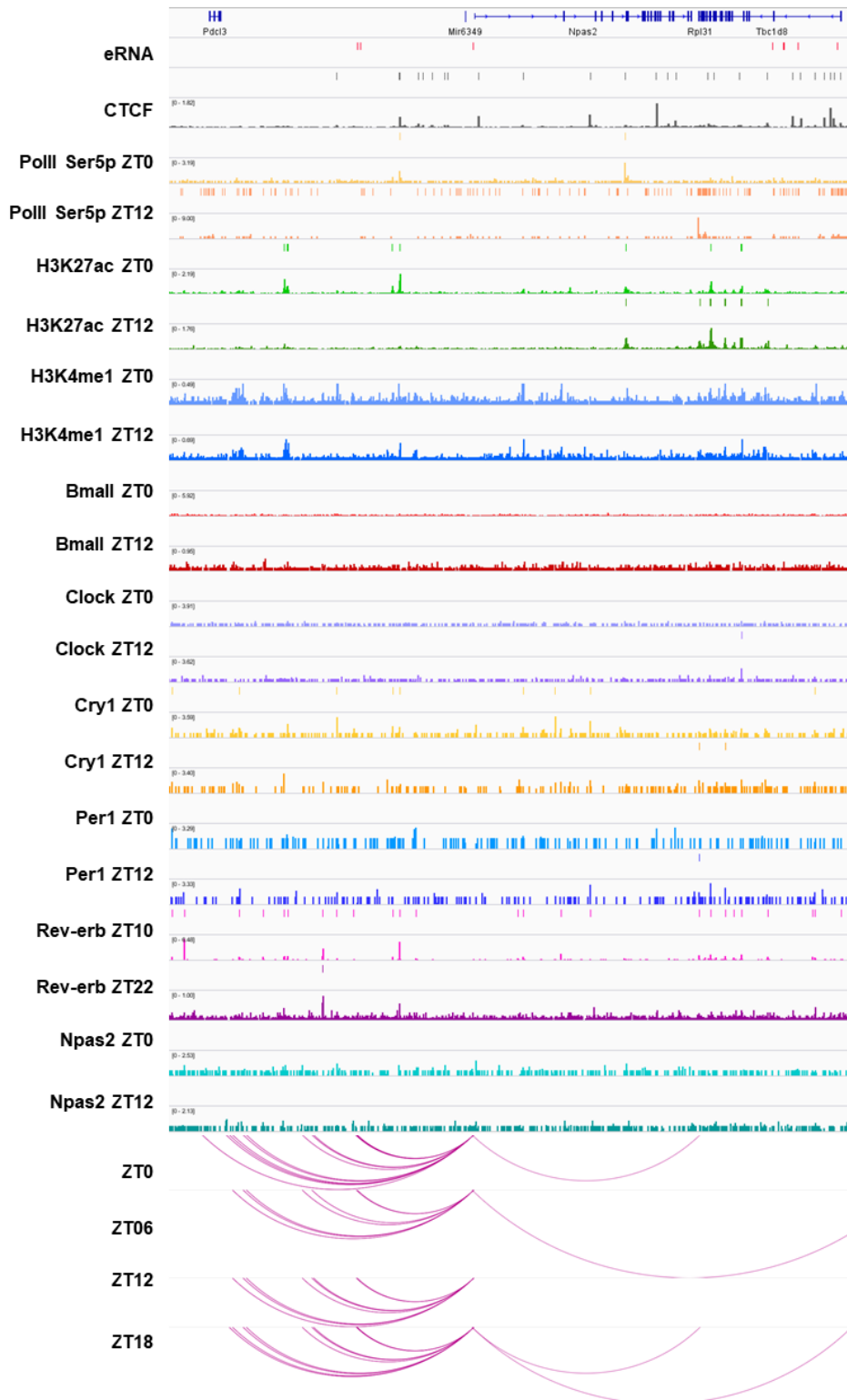


Figura Suplementaria 4 Panorama genómico y de interacciones distales

Per2

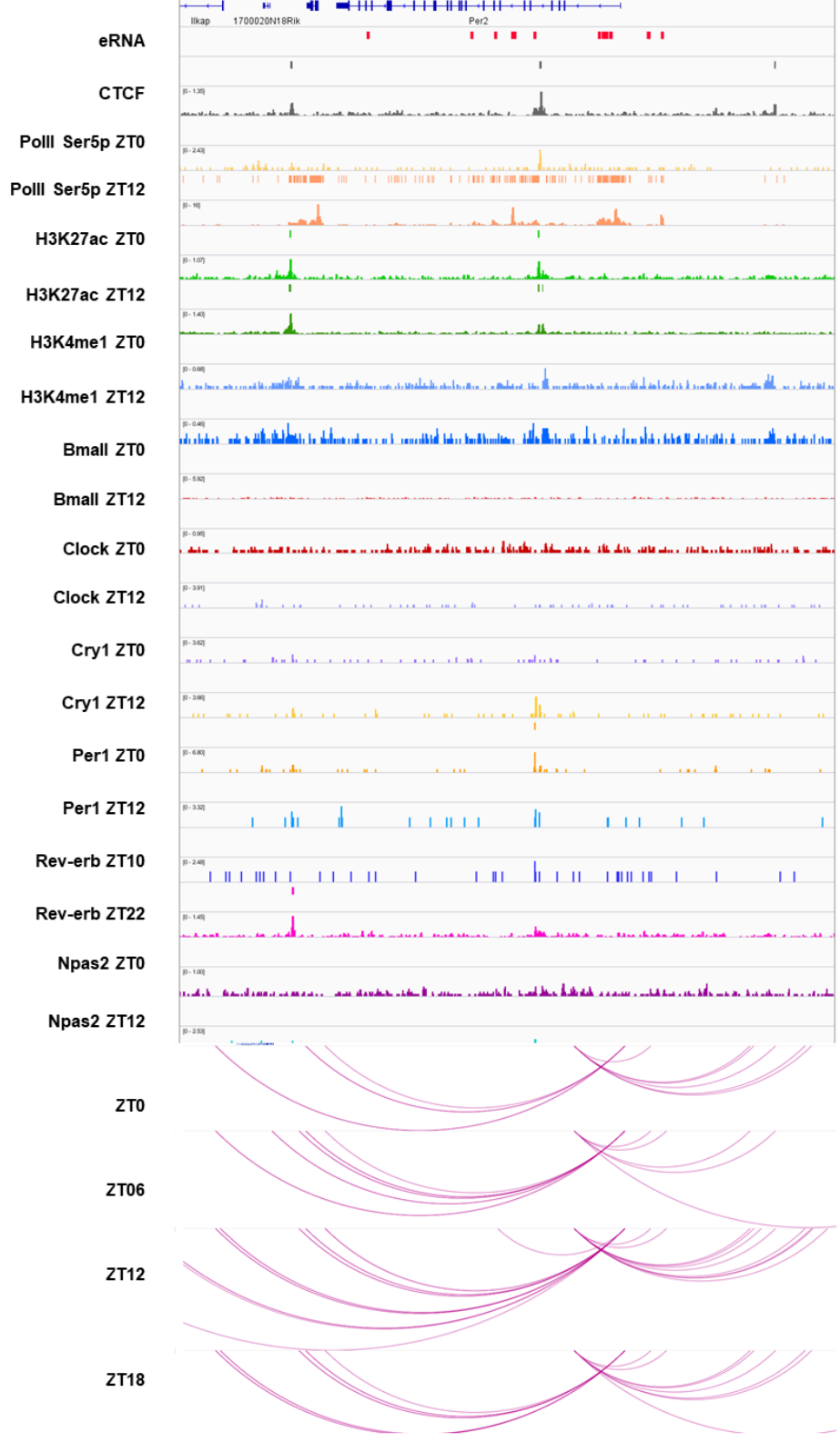


Figura Suplementaria 5 Panorama genómico y de interacciones distales

Cipc

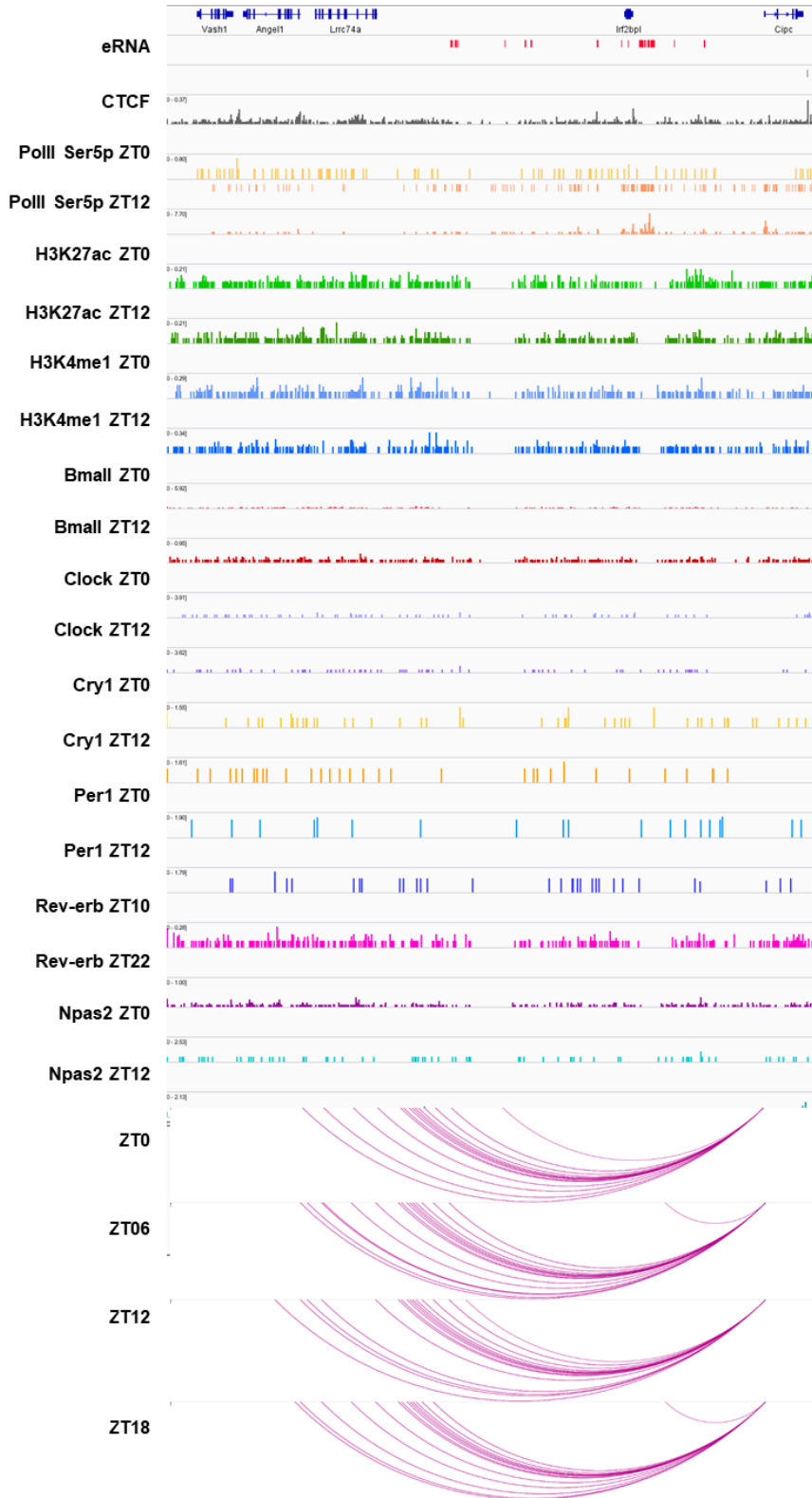


Figura Suplementaria 6 Panorama genómico y de interacciones distales

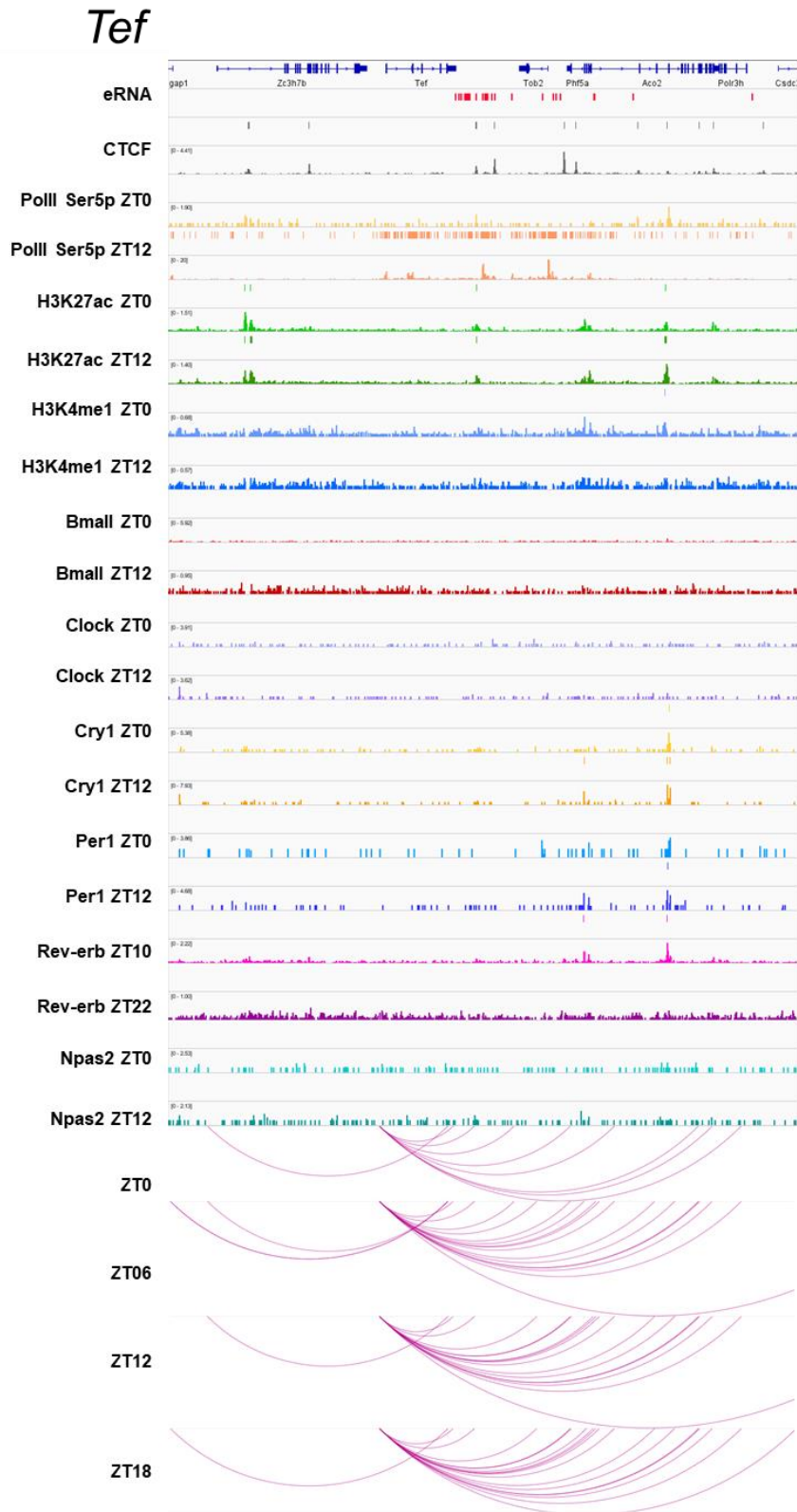


Figura Suplementaria 7 Panorama genómico y de interacciones distales

Usp2

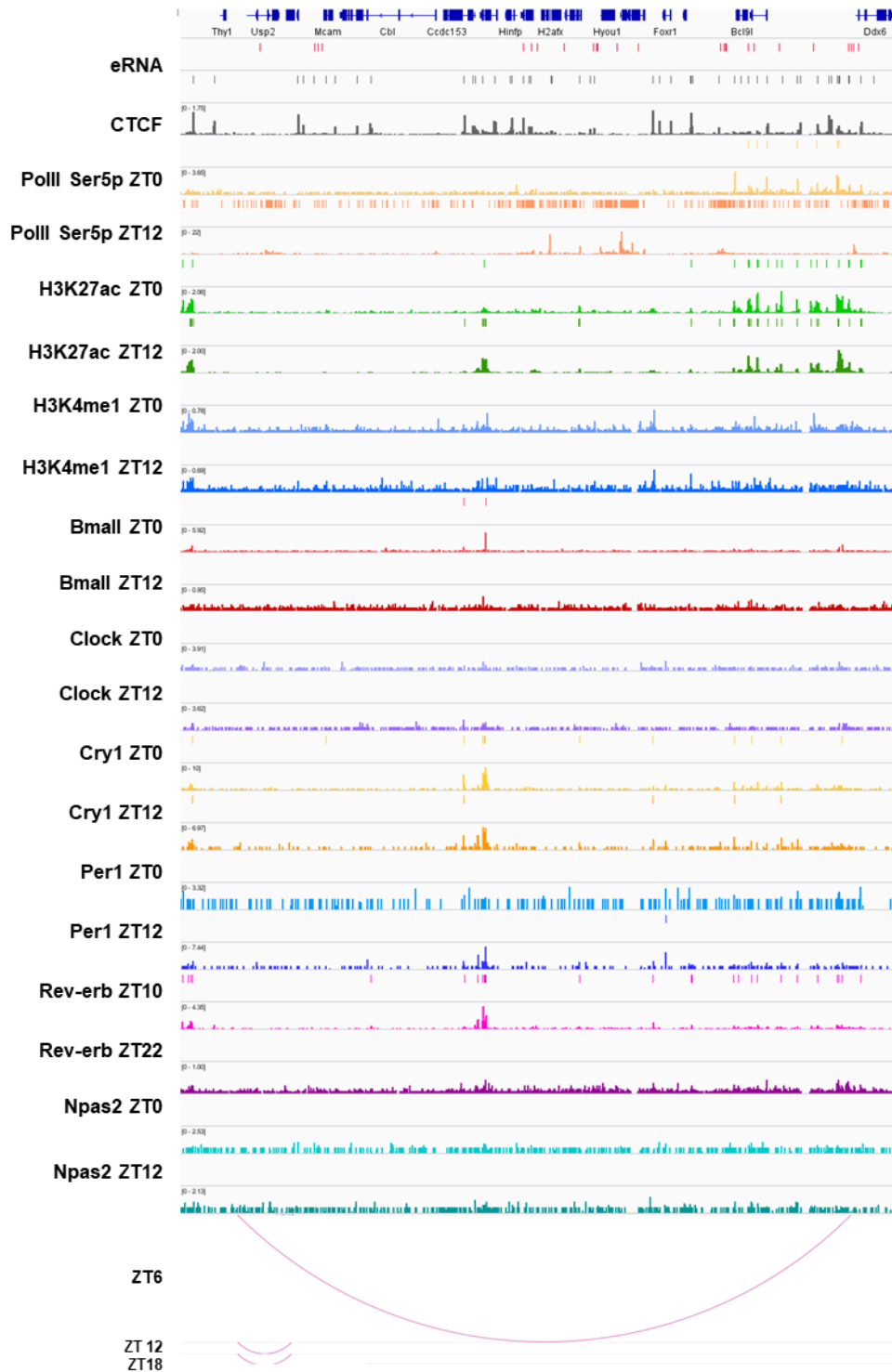


Figura Suplementaria 8 Panorama genómico y de interacciones distales

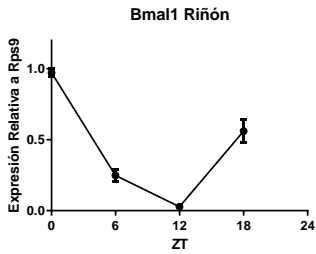


Figura Suplementaria 9 Expresión relativa de gen circadiano normalizado con expresión de gen constitutivo

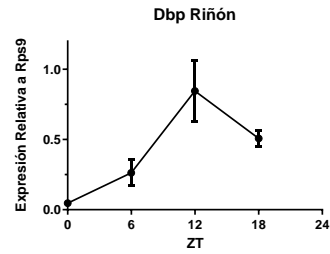


Figura Suplementaria 13 Expresión relativa de gen circadiano normalizado con expresión de gen constitutivo

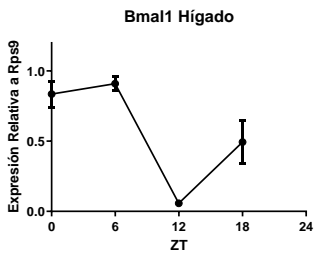


Figura Suplementaria 10 Expresión relativa de gen circadiano normalizado con expresión de gen constitutivo

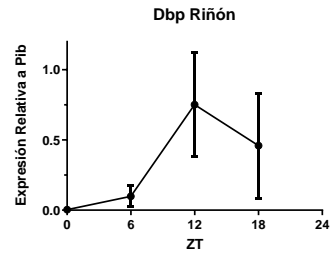


Figura Suplementaria 14 Expresión relativa de gen circadiano normalizado con expresión de gen constitutivo

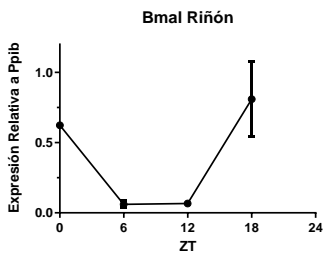


Figura Suplementaria 11 Expresión relativa de gen circadiano normalizado con expresión de gen constitutivo

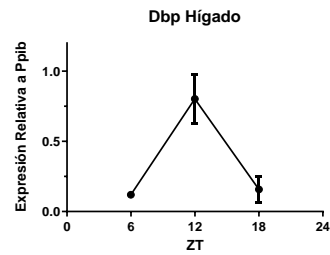


Figura Suplementaria 15 Expresión relativa de gen circadiano normalizado con expresión de gen constitutivo

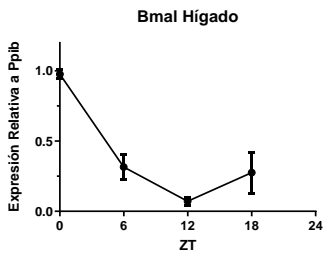


Figura Suplementaria 12 Expresión relativa de gen circadiano normalizado con expresión de gen constitutivo

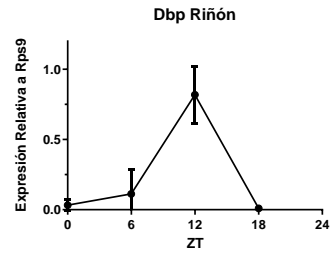


Figura Suplementaria 16 Expresión relativa de gen circadiano normalizado con expresión de gen constitutivo

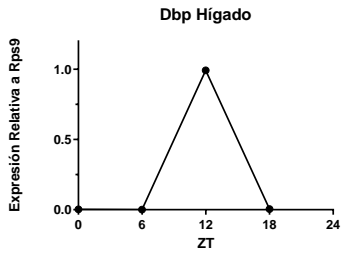


Figura Suplementaria 17 Expresión relativa de gen circadiano normalizado con expresión de gen constitutivo

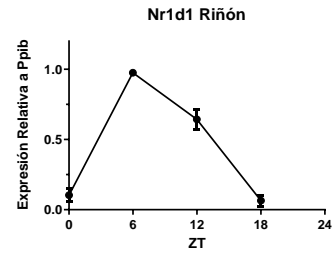


Figura Suplementaria 21 Expresión relativa de gen circadiano normalizado con expresión de gen constitutivo

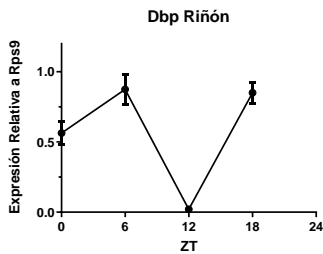


Figura Suplementaria 18 Expresión relativa de gen circadiano normalizado con expresión de gen constitutivo

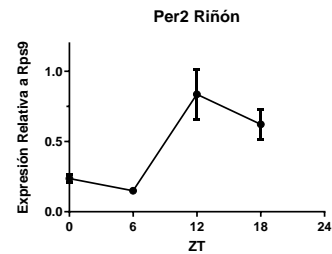


Figura Suplementaria 22 Expresión relativa de gen circadiano normalizado con expresión de gen constitutivo

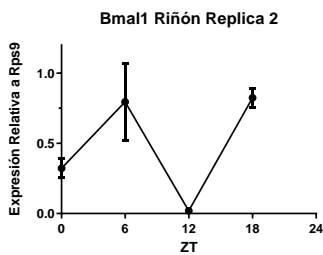


Figura Suplementaria 19 Expresión relativa de gen circadiano normalizado con expresión de gen constitutivo

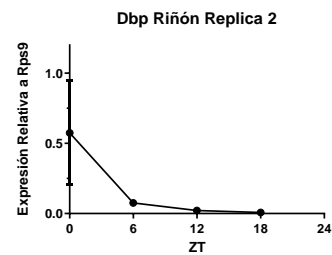


Figura Suplementaria 23 Expresión relativa de gen circadiano normalizado con expresión de gen constitutivo

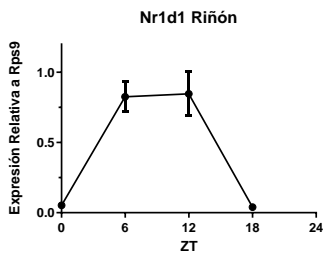


Figura Suplementaria 20 Expresión relativa de gen circadiano normalizado con expresión de gen constitutivo

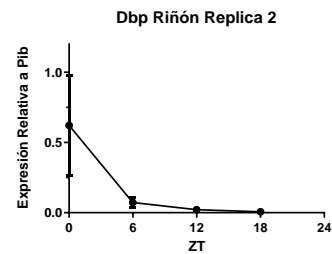


Figura Suplementaria 24 Expresión relativa de gen circadiano normalizado con expresión de gen constitutivo

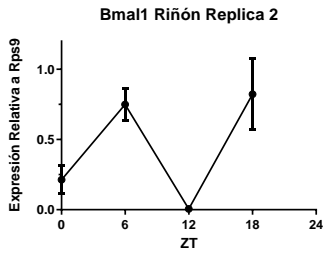


Figura Suplementaria 25 Expresión relativa de gen circadiano normalizado con expresión de gen constitutivo

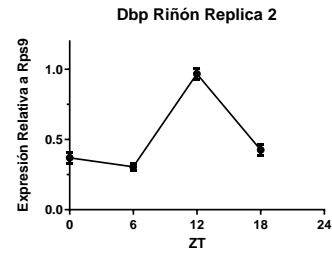


Figura Suplementaria 29 Expresión relativa de gen circadiano normalizado con expresión de gen constitutivo

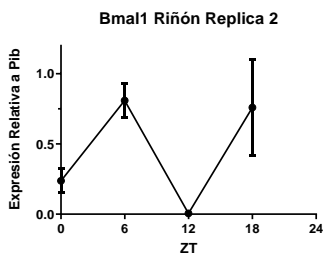


Figura Suplementaria 26 Expresión relativa de gen circadiano normalizado con expresión de gen constitutivo

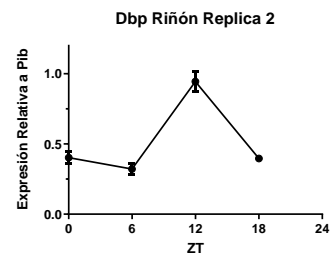


Figura Suplementaria 30 Expresión relativa de gen circadiano normalizado con expresión de gen constitutivo

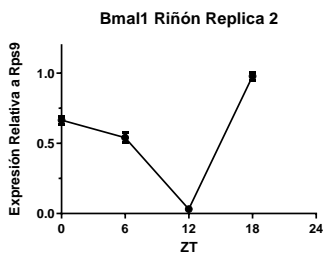


Figura Suplementaria 27 Expresión relativa de gen circadiano normalizado con expresión de gen constitutivo

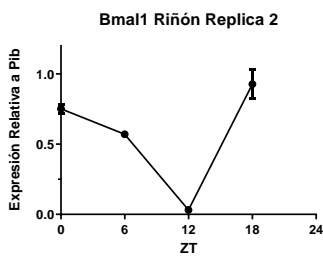


Figura Suplementaria 28 Expresión relativa de gen circadiano normalizado con expresión de gen constitutivo

Tabla Suplementaria 1. Promedios de valor CHiCAGO para cada gen en los puntos ZT0 ZT6 ZT12 y ZT18

PROMEDIO DE VALOR CHICAGO				
Gen	ZT0	ZT6	ZT12	ZT18
<i>Dhrs3</i>	15.5	14.6	14.5	14.1
<i>Ppp1r3c</i>	11.6	11.5	10.7	11.9
<i>Elovl5</i>	12.3	11.4	12.3	12.8
<i>Sos2</i>	8.6	7.9	8.4	8.8
<i>2310044g17rik/ci</i>	10.8	10.1	10.4	9.7
<i>pc</i>				
<i>Nfil3</i>	8.7	9.5	8.4	8.0
<i>Irf2bp2</i>	-	-	13.2	14.8
<i>Csnk1a1</i>	8.4	8.4	8.3	9.3
<i>Cirbp</i>	6.9	6.4	6.1	6.4
<i>Fbxl3</i>	5.9	5.5	-	5.5
<i>Csnk1d</i>	7.0	5.4	6.9	5.6
<i>Usp2</i>	-	5.6	5.4	5.5
<i>Per2</i>	17.8	12.5	8.4	8.7
<i>Dbp</i>	7.4	7.7	6.5	6.7
<i>Npas2</i>	9.4	6.6	8.2	8.6
<i>Per1</i>	7.1	8.0	7.2	7.5
<i>Tef</i>	11.6	9.5	9.2	7.7
<i>Bmall</i>	6.5	-	-	9.9
<i>Cry1</i>	5.0	6.1	-	-
<i>Nr1d1</i>	8.5	8.6	7.1	8.9
<i>Clock</i>	-	-	6.4	5.1

12 REFERENCIAS

- Alvarez-Dominguez J.R., Donaghey J., Rasouli N., Kenty J.H.R., Helman A., Charlton J., Straubhaar J.R., Meissner A., Melton D.A. (2020). Circadian entrainment triggers maturation of human in vitro islets. *Cell Stem Cell*. 26: 108-122
- Baddeley, D., Chagin, V.O., Schermelleh, L., Martin, S., Pombo, A., Carlton, P.M., Gahl, A., Domaing, P., Birk, U., Leonhardt, H., et al. (2010). Measurement of replication structures at the nanometer scale using super-resolution light microscopy. *Nucleic Acids Res* 38, e8.
- Beytebiere JR, Trott AJ, Greenwell B, Osborne CA, Vitet H, Spence J, Yoo SH, Chen Z, Takahashi JS, Ghaffari N, Menet JS. (2019) Tissue-specific BMAL1 cisromes reveal that rhythmic transcription is associated with rhythmic enhancer-enhancer interactions. *Genes Dev* 33:294-309.
- Blackwood, E. M. & Kadonaga, J. T. (1998). Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* 281, 60–63
- Bollinger, T., and Schibler, U. (2014). Circadian rhythms - from genes to physiology and disease. *Swiss Med. Wkly*. 144(2930): w13984
- Bolzer, A., Kreth, G., Solovei, I., Koehler, D., Saracoglu, K., Fauth, C., Muller, S., Eils, R., Cremer, C., Speicher, M.R., et al. (2005). Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol* 3, e157
- Bulger, M. & Groudine, M. (2011). Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell* 144, 327–339
- Burgess-Beusse, B., Farrell, C., Gaszner, M., Litt, M., Mutskov, V., RecillasTarga, F., Simpson, M., West, A. and Felsenfeld, G. (2002) The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 Suppl 4, 16433-16437.
- Cairns, J., Freire-Pritchett, P., Wingett, S.W. et al. (2016). CHiCAGO: robust detection of DNA looping interactions in Capture Hi-C data. *Genome Biol* 17, 127. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0992-2>
- Cremer, T., and Cremer, M. (2010). Chromosome territories. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a003889
- Cremer, T., Cremer, C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* 2, 292–301 (2001). <https://doi.org/10.1038/35066075>
- Croft, J.A., Bridger, J.M., Boyle, S., Perry, P., Teague, P., and Bickmore, W.A. (1999). Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *The Journal of cell biology* 145, 1119-1131
- D'Oliveira Albanus, R., Kyono, Y., Hensley, J., Varshney, A., Orchard, P., Kitzman, J. O., & Parker, S. C. J. (2021). Chromatin information content landscapes inform transcription factor and DNA interactions. *Nature Communications*, 12(1), 1307. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21534-4>
- Daofeng Li, Deepak Purushotham, Jessica K Harrison, Silas Hsu, Xiaoyu Zhuo, Changxu Fan, Shane Liu, Vincent Xu, Samuel Chen, Jason Xu, Shinyi Ouyang, Angela S Wu, Ting Wang, WashU Epigenome Browser update 2022, *Nucleic Acids Research*, Volume 50, Issue W1, 5 July 2022, Pages W774–W781, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac238>
- De Santa, F. et al. (2010). A large fraction of extragenic RNA pol II transcription sites overlap enhancers. *PLoS Biol*. 8, e1000384
- Dekker J., K. Rippe, M. Dekker, and N. Kleckner. Capturing chromosome conformation. (2002) *Science*, 295:1306–1311, Feb 2002.
- Downen, J. M., Fan, Z. P., Hnisz, D., y colaboradores (2014). Control of cell identity genes occurs in insulated neighborhoods in mammalian chromosomes. *Cell*, 159(2), 374-387. doi:10.1016/j.cell.2014.09.030
- Fang, B., Everett, L.J., Jager, J., Briggs, E., Armour, S.M., Feng, D., Roy, A., Gerhart-Hines, Z., Sun, Z. and Lazar, M.A. (2014) Circadian enhancers coordinate multiple phases of rhythmic gene transcription in vivo. *Cell*, 159, 1140–1152.
- Fu, Y., Tessneer, K.L., Li, C. et al. (2018). From association to mechanism in complex disease genetics: the role of the 3D genome. *Arthritis Res Ther* 20, 216 <https://doi.org/10.1186/s13075-018-1721-x>
- Furlan-Magaril, M., Ando-Kuri, M., Arzate-Mejía, R.G. et al. (2021). The global and promoter-centric 3D genome organization temporally resolved during a circadian cycle. *Genome Biol* 22, 162 <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02374-3>

- Hnisz, D., Shrinivas, K., Young, R. A., Chakraborty, A. K., y Sharp, P. A. (2017). A phase separation model for transcriptional control. *Cell*, 169(1), 13-23. doi:10.1016/j.cell.2017.02.007
- Hughes ME, DiTacchio L, Hayes KR, Vollmers C, Pulivarthy S, Baggs JE, Panda S, Hogenesch JB. (2009) Harmonics of circadian gene transcription in mammals. *PLoS Genet*. doi: 10.1371/journal.pgen.1000442.
- Jackson, D.A., Hassan, A.B., Errington, R.J., Cook, P.R.(1993) Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *EMBO J*. 12:1059–1065.
- Javierre, B. M., Burren, O. S., Wilder, S. P. (2016). Lineage-specific genome architecture links enhancers and non-coding disease variants to target gene promoters. *Cell*, 167(5), 1369-1384.e19. doi:10.1016/j.cell.2016.09.037
- Kim, T.-K. et al. (2010). Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* 465, 182–187
- Kowalska E, Moriggi E, Bauer C, Dibner C, Brown SA. (2010) The Circadian Clock Starts Ticking at a Developmentally Early Stage. *Journal of Biological Rhythms*.;25(6):442-449. doi:10.1177/0748730410385281
- Lam, M. et al. Rev-Erbs repress macrophage gene expression by inhibiting enhancer-directed transcription. *Nature* 498, 511–515 (2013).
- Levine, M. (2010). Transcriptional enhancers in animal development and evolution. *Curr. Biol.* 20, R754–R763
- Li, W., Notani, D. & Rosenfeld, M. (2016). Enhancers as non-coding RNA transcription units: recent insights and future perspectives. *Nat Rev Genet* 17, 207–223 <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.4>
- Lichter, P., Cremer, T., Borden, J., Manuelidis, L., and Ward, D.C. (1988). Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Human genetics* 80, 224-234.
- Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., et al. (2009). Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326, 289-293.
- Lis, J.T. (2019). A 50 year history of technologies that drove discovery in eukaryotic transcription regulation. *Nat Struct Mol Biol* 26, 777–782 <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0288-9>
- Markaki, Y., Gunkel, M., Schermelleh, L., Beichmanis, S., Neumann, J., Heidemann, M., Leonhardt, H., Eick, D., Cremer, C., and Cremer, T. (2010). Functional nuclear organization of transcription and DNA replication: a topographical marriage between 190 chromatin domains and the interchromatin compartment. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 75, 475-492.
- Mendoza, J., Billon, N., Vanotti, G., Pallage, V. (2023). Chronobiology of Mood States: Introducing Circadian Animal Models. In: Harro, J. (eds) *Psychiatric Vulnerability, Mood, and Anxiety Disorders*. *Neuromethods*, vol 190. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2748-8_10
- Mermet J., J. Yeung J., C. Hurni C., D. Mauvoisin D., K. Gustafson, C. Jouffe, D. Nicolas, Y. Emmenegger, C. Gobet, P. Franken, F. Gachon, F. Naef, (2018). Clock-dependent chromatin topology modulates circadian transcription and behavior. *Genes Dev*. 32, 347–358 (2018). 10.1101/gad.312397.118
- Mitchell JA, Fraser P. (2008). Transcription factories are nuclear subcompartments that remain in the absence of transcription. *Genes Dev* 22: 20–25.
- Moon, H., Filippova, G., Loukinov, D., Pugacheva, E., Chen, Q., Smith, S.T., Munhall, A., Grewe, B., Bartkuhn, M., Arnold, R. et al. (2005) CTCF is conserved from *Drosophila* to humans and confers enhancer blocking of the Fab-8 insulator. *Embo Rep*, 6, 165-170.
- Oksuz et al (2023) Transcription factors interact with RNA to regulate genes *Molecular cell* Volume 83, Issue 14, 20 July 2023, Pages 2449-2463.e13
- Ong, C.T., and Corces, V.G. (2011). Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. *Nat Rev Genet* 12, 283-293.
- Panda S, et al. (2002) Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 109(3):307–320
- Peng, T., Zhai, Y., Atlasi, Y. et al. (2020). STARR-seq identifies active, chromatin-masked, and dormant enhancers in pluripotent mouse embryonic stem cells. *Genome Biol* 21, 243 <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02156-3>
- Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., Fuscoe, J., Segreaves, R., Lucas, J., and Gray, J. (1988). Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 9138-9142.

- Qin, T., Lee, C., Li, S., Cavalcante, R. G., Orchard, P., Yao, H., Zhang, H., Wang, S., Patil, S., Boyle, A. P., & Sartor, M. A. (2022). Comprehensive enhancer-target gene assignments improve gene set level interpretation of genome-wide regulatory data. *Genome Biology*, 23(1), 105. <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02668-0>
- Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C. and Menaker, M. (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period.
- Recillas-Targa, F., Pikaart, M.J., Burgess-Beusse, B., Bell, A.C., Litt, M.D., West, A.G., Gaszner, M. and Felsenfeld, G. (2002) Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities. *PNAS USA*, 99, 6883-6888.
- Robinson James T., Helga Thorvaldsdóttir, Wendy Winckler, Mitchell Guttman, Eric S. Lander, Gad Getz, Jill P. Mesirov. (2011). Integrative Genomics Viewer. *Nature Biotechnology* 29, 24–26.
- Sato et al., (2023). The circadian clock CRY1 regulates pluripotent stem cell identity and somatic cell reprogramming. *Cell Reports* 42, 112590
- Schibler, U. and Sassone-Corsi, P. (2002). A web of circadian pacesetters. *Cell* 111, 919-922.
- Schoenfelder, S., Furlan-Magaril, M., Mifsud, B., y colaboradores (2015). The pluripotent regulatory circuitry connecting promoters to their long-range interacting elements. *Genome Research*, 25(4), 582-597. doi:10.1101/gr.185272.114
- Takahashi J.S. (2004). Finding new clock components: past and future, *J. Biol. Rhythms*, vol. 19 (pg. 339-347)
- Takahashi JS, Hong HK, Ko CH, McDearmon EL (2008). The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet* 9:764-775
- Takahashi, J.S. (2015), Molecular components of the circadian clock in mammals. *Diabetes Obes Metab*, 17: 6-11. <https://doi.org/10.1111/dom.12514>
- Ueda, H., Hayashi, S., Chen, W. et al. (2005). System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat Genet* 37, 187–192 <https://doi.org/10.1038/ng1504>
- Vaquerizas, J., Kummerfeld, S., Teichmann, S. et al. (2009). A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat Rev Genet* 10, 252–263 <https://doi.org/10.1038/nrg2538>
- Vollmers C, et al. (2012) Circadian oscillations of protein-coding and regulatory RNAs in a highly dynamic mammalian liver epigenome. *Cell Metab* 16(6):833–845.
- Yagita K, Horie K, Koinuma S, Nakamura W, Yamanaka I, Urasaki A, Shigeyoshi Y, Kawakami K, Shimada S, Takeda J, Uchiyama Y (2010) Development of the circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:3846-3851.
- Yeung J, Mermet J, Jouffe C, Marquis J, Charpagne A, Gachon F, et al. (2018). Transcription factor activity rhythms and tissue-specific chromatin interactions explain circadian gene expression across organs. *Genome Res*. 2018;28(2):182–91.
- Yong Hoon Kim et al., (2018). Rev-erb α dynamically modulates chromatin looping to control circadian gene transcription. *Science* 359,1274-1277 DOI:10.1126/science.aaa6891
- Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepack, S. M., Hong, H. K., Oh, W. J., Yoo, O. J. et al. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *PNAS USA* 101. 5339-5346.
- Zabidi, M., Arnold, C., Schernhuber, K. et al. E (2015). Enhancer-core-promoter specificity separates developmental and housekeeping gene regulation. *Nature* 518, 556–559 <https://doi.org/10.1038/nature13994>
- Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, Hughes ME, Hogenesch JB. (2014) A circadian gene expression atlas in mammals: Implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci USA*;45:16219–16224.
- Zhang, E., Kay, S. (2010). Clocks not winding down: unravelling circadian networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 764–776 <https://doi.org/10.1038/nrm2995>
- Zhang, Y., McCord, R.P., Ho, Y.J., Lajoie, B.R., Hildebrand, D.G., Simon, A.C., Becker, M.S., Alt, F.W., and Dekker, J. (2012). Spatial organization of the mouse genome and its role in recurrent chromosomal translocations. *Cell* 148, 908-921.
- Zhao, X., Cho, H., Yu, R.T., Atkins, A.R., Downes, M., and Evans, R.M. (2014). Nuclear receptors rock around the clock. *EMBO Rep*. 15, 518–528.
- Zhu, Q. & Belden, W. J. (2020). Molecular Regulation of Circadian Chromatin. *Journal of Molecular Biology* 432, 3466-3482 <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.01.009>