

ORGANIZACIÓN ESPACIAL Y FUNCIONAL DEL GENOMA EN CÉLULAS ANEUPLOIDES

Tesis doctoral presentada por D^a Nerea Paz Gandiaga para aspirar al grado de
Doctor por la Universidad del País Vasco (UPV-EHU)

Trabajo dirigido por el Dr. Luis Antonio Parada López en CIC bioGUNE y
la Dra. África García-Orad Carles en la UPV-EHU

Leioa, 2011

Este trabajo se ha realizado gracias a subvenciones otorgadas por el Departamento de Sanidad del Gobierno Vasco para el desarrollo de los proyectos de investigación (2006111024 y 2009111045), así como gracias a la concesión de las becas del Gobierno Vasco y CIC bioGUNE.

*A mis padres,
M^a Isabel y Ricardo*

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible mi tesis doctoral. Gracias por haberme ofrecido vuestra ayuda, confianza y apoyo durante estos cuatro años.

Al Dr Luis A. Parada por darme la posibilidad de realizar este proyecto bajo su dirección y por su contribución profesional en mis estudios.

A la Dra África García-Orad, por ofrecerme su ayuda y su conocimiento para desarrollar este proyecto.

Gracias a la gente de CIC bioGUNE, personas que han sido excelentes en todo este tiempo y de las que me llevo muy bonitos recuerdos. En especial a Luis, Luciano, Félix y Amaia, mis compañeros de laboratorio de citogenómica, con los que he compartido el día a día y quienes me han apoyado en todo momento. Me llevo buenos amigos y a mi confidente, sin ella la tesis habría sido completamente distinta. Gracias por la atención y el apoyo de las personas que me ofrecieron su ayuda en los últimos meses y, principalmente, para los que me hicieron un sitio, Ana y Arkaitz.

A mis compañeras en la UPV-EHU, Eli, Maitane y Nerea, por demostrarme una gran calidad personal y profesional en el tiempo que llevo con ellas, y a l@s alumnos internos del laboratorio de genética por ofrecerme su entusiasmo.

A mis amig@s, perdonad por no haberos dedicado todo el tiempo que os merecéis y gracias por tener siempre palabras de ánimo para mí. Hemos compartido buenos y malos momentos durante estos cuatro años y siempre habéis conseguido arrancarme una sonrisa.

Gracias a Josu, por estar a mi lado en todo momento. Gracias por tu confianza de manera incondicional.

A mi familia, por ser un pilar de apoyo fundamental. A mis padres M^ªIsabel y Ricardo, por educarme y enseñarme a dar pasos siempre hacia adelante a base de esfuerzo y trabajo. Gracias a mis hermanos Agurtzane, Jon y Ricardo, por vuestros ánimos que me enseñaron a sacar fuerzas cuando todo pintaba fatal, sin vuestra ayuda no lo habría conseguido.

3D-FISH: hibridación fluorescente <i>in situ</i> tridimensional	especificidad dual regulada en fosforilación en tirosina
4A: albumina bovina 3% en 4XSSC Tween 20. 0,1%	DaM Cy5: anticuerpo de burro anti ratón conjugado con cyan5
4T: 4XSSC- Tween 20 0,1%	DaM Tx Red: anticuerpo de burro anti ratón conjugado con rojo Texas
A: adenina	DaRb FITC: anticuerpo de burro anti conejo conjugado con fluoresceína
A2TBST: albumina 2% TBS1X- tritón 0,05%	F50: formamida al 50% en tampón 2xSSC
ADN: ácido desoxirribonucleico	F70: formamida al 70% en tampón 2xSSC
ARN pol II: ARN polimerasa II	FISH: hibridación <i>in situ</i> fluorescente
ARN: ácido ribonucleico	FITC: Fluoresceína-5-isotiocianato
Asb4: proteína 4 que contiene repetición ankyrin y caja SOCS	G: guanina
Asf1: proteína 1 con función de anti-silenciamiento	GADPH: enzima gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
BAC: cromosoma artificial bacteriano	Gpx: enzima glutatión peroxidasa
BAF: proteínas de barrera al factor de integración	H: humano
BCL2: oncogén 2 asociado con leucemia/linfoma de células B	H1: histona H1
Bio: biotina	H2A: histona H2A
BSA: albumina de suero bovino	H2B: histona H2B
BUB1B: proteína quinasa en serina/treonina de punto de control de la mitosis	H3: histona H3
C: citosina	H3K9: histona H3 trimetilada en la lisina 9
cADN: ADN complementario	H4: histona H4
CAP-D2: subunidad 2 del complejo no SMC de condensina I	H5: histona H5
CAP-G: subunidad G del complejo no SMC de condensina I	HBSS: solución tampón Hanks
CenH3 CENP-A: histona H3 del centrómero	HCl: ácido clorídrico
CENP A, B, C: proteínas centroméricas A, B, C	HCNE: elementos no codificantes altamente conservados
c-Met: proto-oncogén <i>Met</i> (receptor de factor de crecimiento en hepatocitos)	HJURP: proteína centromérica que incorpora CENP-A
Ct: ciclo umbral	HMG: grupo de proteínas de unión al nucleosoma
CTCF: factor de unión a CCCTC	Hox: homeobox
DAPI: 4'-6-diamino-2-fenilindol	HP1: proteína 1 de la heterocromatina
Dig: digoxigenina	HRP: peroxidasa de rábano
DOP-PCR: PCR que utiliza cebadores de oligonucleótidos degenerados	HSA: <i>Homo sapiens</i>
SD: Desviación estándar	IFNγ: Interferon gamma
DSCR: región crítica del Síndrome de Down	IgF2r: receptor tipo insulina de factor 2 de crecimiento
DYRK1A: proteína quinasa 1A, con	IL4-5-13: genes de interleucina 4, 5 y 13
	KCl: Cloruro potásico
	kDa: kiloDalton

ABREVIATURAS

Klf1 : factor de transcripción “Krueppel” de eritrocitos	RbAp48 : proteína asociada a la acetilación de histonas, ensamblaje de la cromatina, unión a retinoblastoma, etc
LCR : región de control del locus	Rgb : canales azul, rojo y verde
LINE : elementos nucleares dispersos largos	ROS : especies reactivas de oxígeno
MAR : región de anclaje a la matriz	Rpm : revoluciones por minuto
mARN : ARN mensajero	SAR : regiones de anclaje a un andamio proteico
Min : minutos	SATB1 : proteína de unión a secuencias ricas en A y T
Mnb : gen minibrain	Scc3 : proteína 3 de cohesión de las cromátidas hermanas
Mpb : Mega pares de bases	s : segundos
Mps1 : proteína esencial para la segregación de cromosomas y la duplicación de los centrosomas	SFB : Suero fetal bovino
Myc : oncogén de mielocitomatosis	SINE : elementos nucleares dispersos cortos
MαRNA pol II : anticuerpo primario de ratón anti ARN polimerasa II	SKY : cariotipado espectral
NaOH : hidróxido de sodio	SMC : complejos de mantenimiento estructural de los cromosomas
NBSFB : Medio neurobasal suplementado con SFB	SOD1 : Superóxido dismutasa 1
ncARN : ácido ribonucleico no codificante	SSC : solución tampón salino
NLR : longitud de repetición nucleosomal	StAvidin-txRed : estreptoavidina conjugada con Texas red
nm : nanómetros	STR : secuencias cortas de repetición en tándem
NOR : región organizadora de nucléolo	SU(VAR)3-9 : histona metil transferasa
NPMN : anticuerpo anti nucleofosmin	T : timina
ORI : origen de la replicación	TBS : solución tampón Tris
P/V : parte por volumen	Topo II : topoisomerasa II
pb : pares de bases	TPP1 : enzima proteasa 1 de tripéptidos
PBS : solución tampón de fosfato	TRF1 y TRF2 : factores 1 y 2 de unión al telómero
PCR : reacción en cadena de polimerasa	VNTR : repeticiones en tándem en número variable
Plk4 : proteína quinasa 4 localizada en los centriolos	WGA : amplificación de genoma completo
PML : leucemia promielocítica	Zac1 : proteína de unión al ADN reguladora de la apoptosis y el ciclo celular
POT1 : proteína terminal de los telómeros	αDig-FITC : anticuerpo anti digoxigenina conjugado con fluoresceína
PSF : antibióticos, penicilina estreptomycin y fungizona	
R : ratón	
Rap1 : proteína de unión al telómero con efecto activador/represor	

I. Introducción	1
I.1 Ácido desoxirribonucleico	3
I.2 Cromatina: ADN y proteínas	5
I.3 Cromosomas	11
I.4 División celular y alteraciones del número de cromosomas	22
I.5 Organización del genoma en el núcleo interfásico	33
I.6 Organización del genoma en células con alteraciones cromosómicas	51
II. Hipótesis y objetivos	55
II.1 Hipótesis	57
II.2 Objetivos	59
III. Materiales y métodos	61
III.1 Cultivos celulares	63
III.2 Preparación de los cromosomas en metafase	66
III.3 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	66
III.4 FISH tridimensional en interfase	75
III.5 FISH sobre preparaciones histológicas	80
III.6 Microdissección de cromosomas en interfase	81
III.7 Análisis molecular de los cromosomas diseccionados	85
III.8 Western-blot	89
III.9 PCR cuantitativa	92
III.10 Adquisición y análisis de imágenes	95
III.11 Análisis estadístico	97

IV. Resultados	99
IV.1 Tamaño del núcleo.....	101
IV.2 Posición radial de cromosomas y genes.....	108
IV.3 Posición relativa de los cromosomas y genes	116
IV.4 Expresión celular de los genes DSCR	143
IV.5 Distribución espacial y expresión génica.....	148
IV.6 Resumen de los resultados.....	156
V. Discusión	161
V.1 Nivel de ploidía y tamaño nuclear	163
V.2 Ploidía y distribución radial de cromosomas	165
V.3 Ploidía y distribución radial de genes	168
V.4 Ploidía y posición relativa de cromosomas y genes.....	172
V.5 Ploidía y expresión génica	180
VI. Conclusiones	183
VII. Bibliografía	187
<i>Apéndice</i>	199

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Ácido desoxirribonucleico

El genoma es el conjunto de información genética de los organismos vivos. El ácido desoxirribonucleico (ADN) es la molécula biológica en la que se encuentra codificada esta información y su estructura es la de una doble cadena polinucleotídica con disposición antiparalela (Watson y Crick, 1953). Los nucleótidos están formados por una base orgánica nitrogenada que puede ser púrica, adenina (A) o citosina (C), o pirimidínica, timina (T) o guanina (G), un azúcar pentosa (2-desoxirribosa) y un grupo fosfato que actúa de enlace fosfodiéster para formar la cadena polinucleotídica (enlace 5'→3'). Las bases nitrogenadas se emparejan mediante puentes de hidrógeno (A = T; C ≡ G) por la existencia de complementariedad entre ellas.

En condiciones fisiológicas se ha demostrado, mediante difracción de rayos X, que la doble hélice de ADN es dextrógira, da una vuelta completa cada 3,4 nm y posee un diámetro de 2 nm. Esta estructura característica del ADN se conoce como B-ADN, tiene 10,5 pares de bases (pb) por vuelta y en ella se pueden diferenciar un surco menor de 1,2 nm y un surco mayor de 2,2 nm aproximadamente (Luger y cols., 1997). Además, el ADN adquiere otro tipo de estructuras a las que se le asignan diferentes letras. La estructura Z-ADN lleva este nombre por la disposición en zig-zag que la molécula adquiere en presencia de una alta concentración de sales y una secuencia de G, C alternadas. La metilación del carbono 5 de la citosina estabiliza significativamente la conformación Z-ADN, inhibiendo la transcripción (Fujii y cols., 1982). La capacidad de adquirir estructuras diferentes a la canónica B-ADN es característica de las secuencias de ADN repetitivas, abundantes en el genoma. Algunas de ellas, como la estructura cruciforme/horquilla, deslizada (S-ADN), tríplex (H-ADN), G-cuadrúplex y Z-ADN, se forman *in vivo*, al menos de manera transitoria, durante los mecanismos moleculares de replicación, transcripción, reparación o recombinación del ADN, en los que comúnmente la torsión de la hebra es muy alta (Fig. 1) (Buske y cols., 2011).

La capacidad de las secuencias repetitivas de adquirir una conformación de ADN alternativa se ha asociado con inestabilidad genética, es decir, sería una causa de

mutaciones, deleciones, expansión y traslocación en eucariotas y procariotas (Mirkin, 2007; Zhao y cols., 2010) En el linfoma folicular se ha observado la formación de una estructura G-cuadrúplex del ADN en la zona de rotura de la traslocación (14;18) que afecta al gen *BCL2* (Nambiar y cols., 2011).

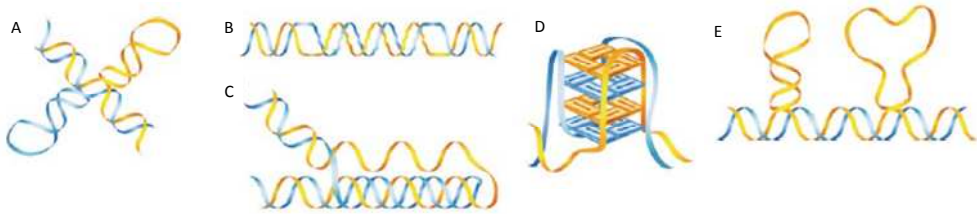


Fig. 1. Imágenes de las figuras alternativas del ADN. Cruciforme (A), Z-ADN (B), tríplex (C), cuadrúplex (D), deslizada o S-ADN (E). (Zhao y cols., 2010).

El genoma humano nuclear contiene $3,2 \times 10^9$ pb (Lander, 2011). Aproximadamente el 5% es una fracción de ADN funcionalmente importante y muy conservada en la evolución, del cual tan solo el 1,1% es codificante de proteína y un 4% contiene elementos funcionales no codificantes (HCNE, *Highly Conserved Non-coding Elements*) (Alexander y cols., 2010). Esto incluye genes de ARN, en los que el producto final son moléculas de ARN que no codifican proteína (ncARN), pero que participan en la regulación génica y el procesamiento de los transcritos (Ghildiyal y Zamore, 2009) y una variedad de secuencias reguladoras capaces de modular la expresión génica a nivel de ADN y ARN (Strachan y Read, 2010). Se ha observado que frecuentemente estas secuencias localizan en regiones de baja densidad génica junto a genes implicados en el desarrollo embrionario. En ratón, el análisis a gran escala de estas secuencias reveló que se encuentran enriquecidas en regiones activadoras de la expresión específica de cada tejido, lo que sugiere una compleja regulación durante este periodo (Pennacchio y cols., 2006).

La fracción mayoritaria del genoma (95%) se compone de secuencias altamente repetitivas no codificantes que en parte son agrupaciones localizadas en tándem (ADN satélite), pero fundamentalmente se trata de repeticiones dispersas en el genoma (retrotransposones) (Ting y cols., 2011).

El ADN satélite α , que se encuentra en el centrómero de todos los cromosomas, es una estructura clave para la correcta interacción de los cromosomas con los microtúbulos del huso mitótico durante la división celular, asegurando una adecuada segregación en la mitosis y la meiosis. Los microsátélites son secuencias cortas de nucleótidos (1-5 pb) que se repiten en tándem en número variable en el genoma, probablemente por deslizamiento de la cadena de ADN durante la replicación (Schlotterer y Tautz, 1992). Son secuencias altamente polimórficas en la población, lo que permite su uso como marcadores, fácilmente identificables mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, si la variación en el número de repeticiones afecta a la región del promotor puede implicar cambios en la expresión génica (Vinces y cols., 2009). Las secuencias Alu y LINE (*Long Interspersed Nuclear Elements*), tienen la capacidad de actuar como retrotransposones que se copian e insertan en otras regiones del genoma, causando reordenamientos cromosómicos y mutaciones. Los eventos de recombinación ilegítima entre repeticiones Alu que se encuentran en localizaciones cromosómicas distintas pueden resultar en deleciones o inserciones (Muotri y cols., 2010). La duplicación de segmentos de ADN ha resultado en variaciones en el número de copias susceptibles a mecanismos genéticos en los que pueden suceder alteraciones estructurales en la secuencia como deleciones, inserciones, inversiones, etc. que se han implicado en síndromes y trastornos en la población (Kidd y cols., 2008; Dierssen y cols., 2009).

I.2 Cromatina: ADN y proteínas

El ADN no está aislado en el núcleo celular, sino que se encuentra asociado a proteínas de distinta naturaleza, histonas y proteínas no histónicas, formando la cromatina. Las histonas son proteínas básicas que intervienen en el empaquetamiento del ADN. Además participan en las funciones de éste mediante interacciones proteína-proteína entre ellas y con otras proteínas cromosómicas distintas. Aunque las histonas, con un alto grado de conservación evolutiva, predominan en la mayoría de las células, hay algunas excepciones; así, por ejemplo

el ADN en los espermatozoides está compactado principalmente por proteínas no histónicas denominadas protaminas (Johnson y cols., 2011).

El nucleosoma es la unidad estructural de la cromatina. En el nucleosoma un segmento de la molécula de ADN de aproximadamente 147 pb y 2 nm de diámetro se enrolla en sentido contrario a las agujas del reloj con un giro de 1,75 vueltas alrededor del octámero de histonas, que está formado por dos moléculas del dímero H3-H4 flanqueadas por dos dímeros H2A-H2B (Luger y cols., 1997) (Kornberg y Lorch, 1999). La unión entre el ADN y las histonas es de naturaleza electrostática entre los grupos cargados positivamente de las histonas y las cargas negativas de los fosfatos del ADN. Las colas N y C terminales de las histonas se extienden fuera del cuerpo del nucleosoma, donde suceden modificaciones epigenéticas reversibles como la acetilación, la metilación, la fosforilación, etc. Cambios moleculares (metilación) en la secuencia de ADN están relacionados con el silenciamiento estable de la expresión (Cedar y Bergman, 2009; Vogler y cols., 2011).

La unión entre dos nucleosomas la establece la misma molécula de ADN (*linker*), pero asociada a la histona H1, formando un puente que le confiere flexibilidad y capacidad de plegarse sobre sí misma. Las histonas de unión no actúan únicamente en la arquitectura de la cromatina, sino que proporcionan capacidad reguladora mediante la interacción con otras proteínas (McBryant y cols., 2010). Además de las histonas que conforman el nucleosoma H2A, H2B, H3 y H4 hay variantes que corresponden con isoformas no alélicas que afectan a la estructura y estabilidad de la cromatina (Park y Luger, 2008).

Algunas variantes de las histonas y su función se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Variantes de las histonas, función e interacción con otras proteínas (Henikoff, 2008).

HISTONA	DESCRIPCIÓN-FUNCIÓN	INTERACCIÓN
CenH3	Histona H3 específica de centrómero	RbAp48, Asf1
H3.3	Variante de la Histona H3	HirA, Asf1
H2A.X	H2A formada con un motivo C-terminal que convierte los sitios con serina fosforilada en sitios de rotura de doble hebra	INO80
H2A.Z	H2A que se sitúa en la zona promotora del gen	SWR1
H2Av	Variante de la H2A.X y H2A.Z presente en <i>D. melanogaster</i>	Tip60
Macro H2A	Variante de la H2A específica de los vertebrados asociada con la cromatina silenciada	Desconocida
H2A ^{Bbd}	Variante de la H2A específica de vertebrados asociada con la cromatina activa	Desconocida

Asf1: proteína 1 con función de anti-silenciamiento; HirA: complejo de ensamblado a nucleosoma; INO80: proteína 80 dependiente de inositol; RbAp48: p48 asociado a retinoblastoma; SWR1: complejo Swi2/Snf2 relacionado con el remodelado de la cromatina; Tip60: p60 interactiva Tat.

Recientemente, se ha demostrado que el ADN unido al nucleosoma tiene un mayor grado de metilación que el ADN flanqueante, con una periodicidad de 10 pb. Además, está enriquecido en secuencias de exones, al igual que la enzima ARN polimerasa II (ARN pol II) (Chodavarapu y cols., 2010). El posicionamiento de los nucleosomas podría no ser aleatorio en el genoma y contribuir en la regulación de la transcripción génica y la organización estructural de la cromatina (Arya y cols., 2010).

En condiciones no fisiológicas el conjunto lineal de nucleosomas forman el nucleofilamento de 10 nm, denominado collar de cuentas. Sin embargo, esta configuración no parece existir en el núcleo, que instantáneamente sufre un

enrollamiento originando la estructura de 30 nm de diámetro (Fransz y de Jong, 2011). La fibra de 30 nm tiene una organización helicoidal con un grado de compactación de $70\text{-}160\text{ kb } \mu\text{m}^{-1}$, aunque este nivel de organización también es considerado transitorio *en vivo* (Robinson y cols., 2006; Maeshima y cols., 2010) Se han propuesto distintos modelos para explicar la organización de la fibra de cromatina (Wu y cols., 2007). En el modelo de solenoide interdigitado de un origen, la hélice primaria está formada por un número igual o inferior a seis nucleosomas que se apilarían de forma lineal, formando hélices secundarias (Fig. 2B) (Daban y Bermudez, 1998). Mientras que, recientemente en el modelo helicoidal de doble origen, los nucleosomas generan una estructura en zig-zag y se organizan en dos filas de manera alternada (Schalch y cols., 2005; Grigoryev y cols., 2009) (Fig. 2C). Ésta a su vez puede adquirir una estructura denominada de cinta helicoidal más compacta, con 11,6 nucleosomas por 11 nm, o estructura cruzada (*crossed-linker*). La estructura cruzada supone una variante del modelo en zig-zag de los nucleosomas que se empaquetaría sobre su propio eje formando una doble hélice con un número de nucleosomas por vuelta que depende de la longitud del ADN de unión.

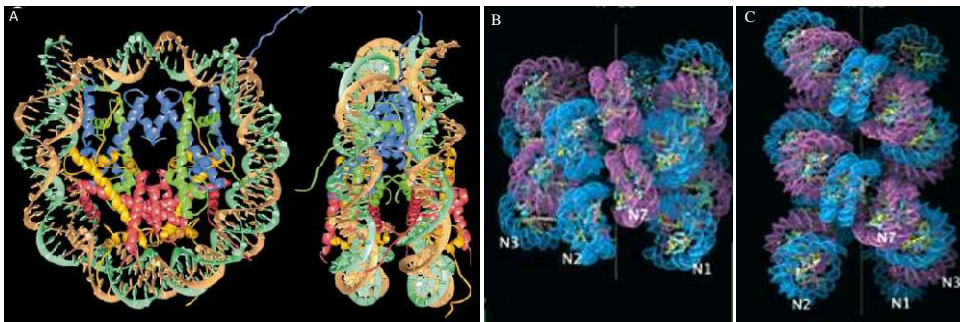


Fig. 2. Imagen estructural del nucleosoma (Luger y cols., 1997) (A). Modelo de solenoide de un origen (B). Modelo helicoidal de doble origen o zig-zag (C) (Robinson y cols., 2006).

La longitud del ADN de unión tiene una influencia directa en la organización estructural de la cromatina. La longitud del ADN de unión se encuentra entre 10 y 90 pb y junto con el ADN nucleosomal (147 pb) generan repeticiones de nucleosomas (NLR, *Nucleosome Repeat Length*) entre 167 y 237 pb (Wong y cols., 2007). Se ha demostrado que las variaciones en la longitud del ADN de unión

suponen una interacción diferencial con las histonas de unión e influyen en la compactación de la cromatina (Routh y cols., 2008). Las secuencias largas de ADN de unión requieren de las histonas para una mayor compactación y organización de los nucleosomas en la fibra de 30 nm. Por lo contrario, si la longitud del ADN de unión es pequeña, el acceso de las histonas es menor y la fibra de cromatina se dispone más laxa y activa, como en las levaduras. La interacción del ADN con H1 y H5 induce compactación, estabilizando la fibra de 30 nm (Li y cols., 2010).

Los conocimientos sobre la organización de la cromatina a niveles superiores a la fibra de 30 nm y los mecanismos que la determinan aún escasos (Patrushev y Minkevich, 2008). Sin embargo, la matriz nuclear parece mediar la formación de lazos cromatínicos *in vivo*. Las secuencias de ADN MAR (*Matrix Attachment Region*) o SAR (*Scaffold Associated Regions*) son regiones de aproximadamente 200 pb, ricas en A-T, que se fijan preferentemente en el andamiaje nuclear (Wang y cols., 2010a). Algunas características incluyen secuencias consenso para la unión de topoisomerasa II (Topo II), regiones libres de nucleosomas, estructura tríplex-ADN, repeticiones invertidas y sugieren su función como origen de la replicación (ORI) y activadores transcripcionales (Girod y cols., 2007). El factor SATB1 organiza el locus del complejo mayor de histocompatibilidad clase II en lazos cromatínicos mediante la unión de MAR a la matriz nuclear. El silenciamiento del gen *SATB1* imita el efecto del interferón gamma ($IFN\gamma$) en la arquitectura de la cromatina, alterando la expresión génica en el locus. Por lo tanto se considera que SATB1 es un factor que juega un papel principal en la organización de la cromatina a niveles superiores y en la regulación génica (Galante y cols., 2007).

En un primer modelo de compactación de la cromatina en los niveles superiores a la fibra de 30 nm, Mirkovitch y cols postularon que las secuencias SAR se ubican próximas unas a otras en el andamio cromosómico, formando lazos de cromatina de 20-150 kpb en una estructura denominada supersolenoide de alrededor de 300 nm de diámetro (Fig. 3). El andamio cromosómico estaría principalmente constituido por proteínas de tipo Topo II y condensinas situadas en las bases de los lazos de ADN (Mirkovitch y cols., 1988). Un modelo alternativo propone que los niveles

superiores de compactación de la cromatina se obtienen simplemente por plegamiento helicoidal de la fibra de 30 nm hasta obtener una fibra de 150-300 nm, sin anclaje a ningún eje proteico (Bak y cols., 1977). Algunas evidencias de este modelo en células de mamífero mostraron una jerarquía en los patrones de plegamiento de la fibra de cromatina de 30 nm, que incluye estructuras intermedias de 50, 100 y 130 nm. Los tubos de 200 nm plegados helicoidalmente sufren nuevos plegamientos que darán lugar a la cromátida metafásica de 700 nm (Belmont y Bruce, 1994).

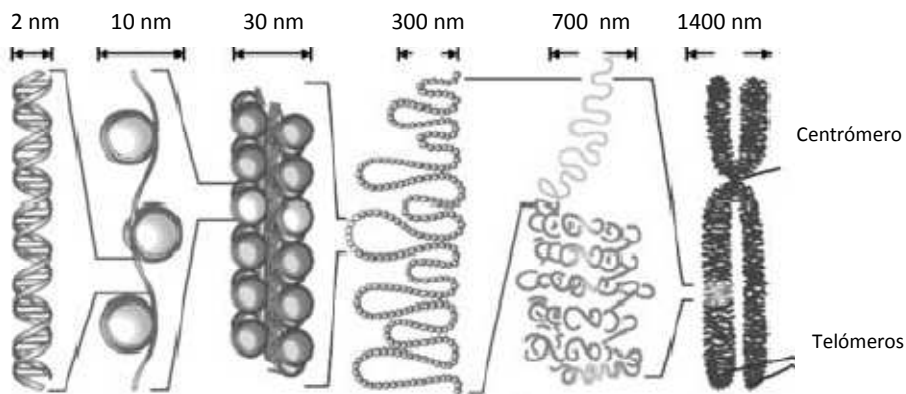


Fig. 3. Niveles de compactación de la fibra de cromatina (Patrushev y Minkevich, 2008).

La cromatina en el núcleo en interfase se dispone más relajada y sufre cambios en la compactación durante los procesos de transcripción y replicación, que son localizados y menos pronunciados que en metafase. Estos eventos de compactación y relajación están asociados frecuentemente con modificaciones epigenéticas a nivel de las colas de las histonas y con metilación de las citosinas del ADN que componen la cromatina.

Las características estructurales y funcionales de la cromatina han permitido diferenciar la eucromatina y la heterocromatina. La eucromatina contiene una densidad génica alta, resulta transcripcionalmente activa y supone alrededor de 2,9 Gpb en el genoma humano. Se caracteriza por la unión leve de moléculas de H1 y la acetilación de las histonas del nucleosoma. La condensación de la eucromatina no es

uniforme y la transcripción génica depende del tipo celular y la función (Strachan y Read, 2010). La heterocromatina es una fracción de 200 Mpb en el genoma que se mantiene altamente condensada durante el ciclo celular, tiene replicación tardía en fase S y es relativamente pobre en genes comparada con la eucromatina. A nivel molecular, en la heterocromatina predomina la metilación del ADN, la unión de H1, la hipoacetilación de las histonas, la metilación de la histona H3 en la lisina 9 y la presencia de la proteína de heterocromatina 1 (HP1). La heterocromatina constitutiva, transcripcionalmente inactiva, corresponde con las secuencias altamente repetitivas de los centrómeros y los telómeros, donde dificulta la acción de los elementos transposones y asegura la estabilidad y la integridad del genoma. Sin embargo, la heterocromatina facultativa se encuentra en regiones eucromáticas, donde las proteínas de la heterocromatina suponen un mecanismo capaz de reprimir la expresión de determinados genes de manera estable (Beisel y Paro, 2011). El contenido de eucromatina y heterocromatina es específico de cada uno de los cromosomas y de las diferentes especies (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004).

I.3 Cromosomas

Los cromosomas son las unidades físicas del genoma que constituyen estructuras fundamentales para la transmisión y la expresión de la información genética. El ADN y las histonas constituyen el 66% de la masa de los cromosomas, mientras que el resto lo constituyen proteínas no histónicas con función estructural. Las proteínas implicadas en la estructura de los cromosomas se han identificado *in vitro*, pero su función *in vivo* aún no está completamente elucidada (Maeshima y Eltsov, 2008). Estas últimas son fundamentalmente de dos tipos: proteínas de alta movilidad (HMG, *High Mobility Group*) y proteínas barrera al factor de integración (BAF, *Barrier to Integration Factor*). Las proteínas HMG-A se unen a regiones del ADN ricas en AT, las HMG-B intervienen en los procesos de torsión del ADN y las HMG-N participan en la reorganización de los nucleosomas (Hock y cols., 2007). La Topo II, las condensinas y las cohesinas son proteínas BAF que se organizan en

dímeros. La Topo II es la proteína estructural más abundante de los cromosomas, cada una de sus cadenas polipéptídicas tiene un tamaño de 175 kDa y está distribuida de manera discontinua a lo largo del eje cromosómico. La Topo II actúa en funciones biológicas esenciales como la replicación, la transcripción y la segregación de los cromosomas, debido a su actividad enzimática endonucleasa, que produce cortes sobre el ADN bicatenario. Esta función permite aumentar o disminuir el nivel de enrollamiento de la molécula de ADN y eliminar la torsión que se genera al condensarse y descondensarse la cromatina (Nitiss, 2009).

Las condensinas y las cohesinas forman parte de los denominados complejos de mantenimiento estructural de los cromosomas (SMC, *Structural Maintenance of Chromosome Complex*). En las células eucariotas se expresan al menos cuatro miembros de este complejo SMC, que son genéricamente ATPasas de alrededor de 150 kDa, plegadas en espiral y que terminan en dominios globulares. El complejo cohesina está formado por SMC1 y SMC3 junto con kleisina y una subunidad adicional Scc3 (*Sister chromatide cohesion*) (Nasmyth y Haering, 2005). Este complejo adquiere una estructura anular que abraza las fibras de la cromatina de las cromátidas hermanas, manteniéndolas cohesionadas hasta el inicio de la anafase (Fig. 4). Recientemente, se ha descrito la interacción de las cohesinas con el factor CTCF (*CCCTC-binding factor*), lo que implica que éstas actúan en la organización del genoma y la regulación génica (Hadjur y cols., 2009; Bose y Gerton, 2010).

El complejo condensina I está formado por una subunidad SMC2, SMC4, kleisina y dos proteínas accesorias, CAP-D2 y CAP-G, mientras que el complejo condensina II es similar, salvo que se compone por dos subunidades SMC2 (Fig. 4). Estos complejos proteicos constituyen uno de los elementos estructurales fundamentales que intervienen en el empaquetamiento de los cromosomas metafásicos (Hagstrom y Meyer, 2003).

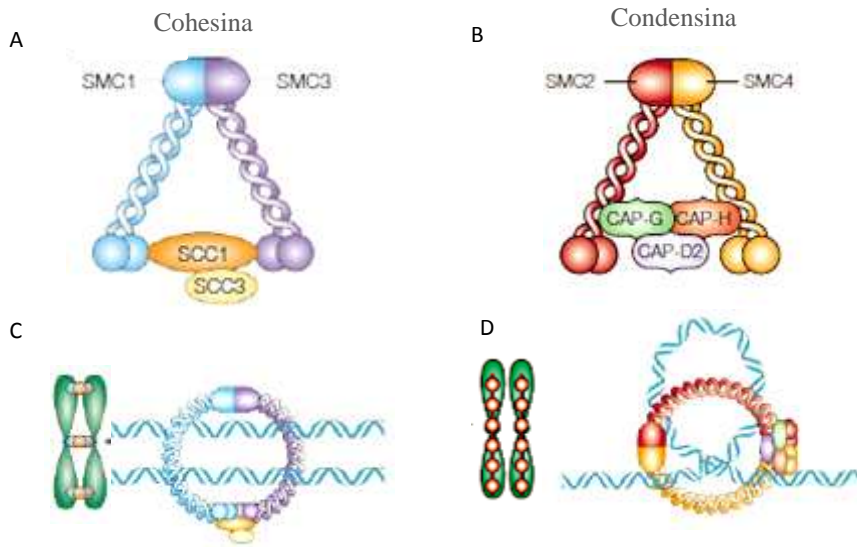


Fig. 4. Estructura de los complejos de cohesina (A) y condensina (B) y su localización en el cromosoma metafásico entre las cromátidas hermanas (C) y longitudinalmente (D). (Hagstrom y Meyer, 2003). CAP, subunidades del complejo no SMC de la condensina I; SMC, complejos de mantenimiento estructural de los cromosomas; SSC, proteínas de cohesión de las cromátidas hermanas.

Los complejos de condensinas, después de la Topo II, son los componentes proteicos más abundantes de los cromosomas. En metafase adquieren un patrón de distribución característico alternado, en el que también interviene la Topo II (Ono y cols., 2003). La supresión de Topo II no compromete la estructura de los cromosomas *in vitro* de *Xenopus*, pero resulta esencial para el correcto ensamblaje de los cromosomas y para la separación de las cromátidas en anafase. Las condensinas se distribuyen de manera axial en los cromosomas y las mutaciones en estas proteínas o su ausencia implican la pérdida de una correcta condensación (Hirano y Mitchison, 1993; Hirano, 2006).

Marko propuso un modelo de organización de los cromosomas metafásicos en el que intervienen cohesinas, condensinas y Topo II (Marko, 2008). Los dominios de cohesina se establecen alrededor de la fibra de cromatina de 30 nm a una distancia de 1000 nm entre ellos y los complejos de condensina II, más abundantes, están distribuidos regularmente de manera longitudinal (Fig. 5A). En profase temprana éstos inducen el acortamiento de la fibra comprendida entre dos dominios de

cohesina mediante la formación de bucles primero y de unas rosetas cromatínicas o cromómeros de 100 nm de diámetro hacia el final de profase (Fig. 5B y C). La Topo II, también distribuida longitudinalmente de forma regular, facilita la resolución de los enredos que surgen durante este proceso. Hacia el final del estadio de profase, la fibra de cromatina de 100 nm de diámetro pierde la mayor parte de las cohesinas y sufre plegamientos que favorecen el apilamiento de los cromómeros e incorpora la condensina I, que a su vez favorece la contracción de la cromatina longitudinalmente (Fig. 5D y E), lo que aumentaría el diámetro del cromosoma metafásico (Fig. 5F y G) (Marko, 2008). Sin embargo, este modelo no determina la reproducibilidad del empaquetamiento de la cromatina a pequeña escala en los cromosomas mitóticos. Belmont y colaboradores describen este fenómeno como la simetría de las señales del operón lac respecto del eje de Topo II en cromosomas individuales. Ellos observaron que la posición de las señales resultaba reproducible longitudinalmente, no de manera axial, con una variación en torno a 300 nm. Por otro lado, determinaron una ausencia de simetría entre las señales de las cromátidas hermanas. La condensación de los cromosomas se produce de manera coordinada en el tiempo y en el espacio y aún así los mecanismos de compactación de las cromátidas hermanas parecen independientes (Strukov y Belmont, 2009). Recientemente se ha observado que la regulación epigenética que mantiene el control de la compactación de la cromatina a un nivel menor podría permanecer en los cromosomas mitóticos y así contribuir en la transmisión de la información genética (Zaidi y cols., 2010).

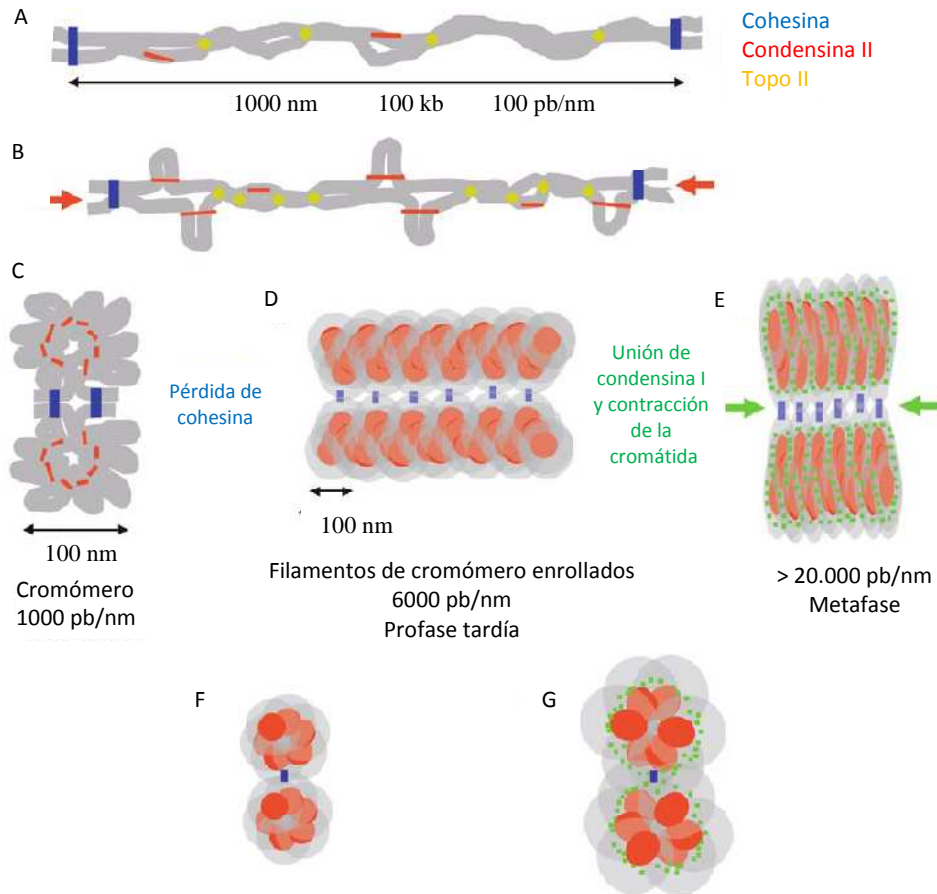


Fig. 5. Modelo de compactación de la cromatina durante la mitosis. En la fibra de cromatina (A), formación de bucles (B) y cromómeros (C) hasta el filamento de cromómeros enrollados (D). Contracción de la cromátida (E), para aumentar el diámetro del cromosoma metafásico (E y F) (Marko, 2008).

Los cromosomas fueron observados por primera vez en células de plantas por el botánico suizo Karl Wilhelm von Nägeli en 1842 y, al mismo tiempo, por el belga Edouard Van Beneden en células de lombrices del género *Ascaris*. La descripción realizada por estos científicos fue la de los cromosomas en la etapa de mitosis, cuando la cromatina se condensa para formar estructuras aisladas que se tiñen de modo intenso, de allí el nombre de cromosomas (cuerpos coloreados). A principios del siglo XX Theodor Boveri demostró que los cromosomas eran orgánulos permanentes que se condensaban durante la mitosis y permanecían difusos durante la interfase y aportó una descripción moderna del aparato mitótico. Importantes

avances metodológicos realizados en el siglo pasado, tales como el uso de drogas que inducen la despolimerización de las fibras del uso mitótico (colchicina, nocodazol) y, por lo tanto, la detención de la mitosis en la etapa de metafase, y la utilización de soluciones hipotónicas en los protocolos de preparaciones cromosómicas permitieron determinar el número de los cromosomas y estudiar su morfología. Tijo y Levan determinaron en 1956 que el número correcto de cromosomas en la especie humana era de 46, divididos en 22 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales (Tijo y Levan, 1956). Estos últimos se designan X e Y, mientras que los autosomas están ordenados y numerados desde 1 hasta 22 de acuerdo al tamaño, con algunas excepciones (los cromosomas del par 11 y 12 son más grandes que los del par 10 y los cromosomas del par 22 son más grandes que los del par 21 (Tijo y Levan, 1956). En ratones, el número haploide de cromosomas es de 20 y todos son morfológicamente similares, aunque difieren en tamaño. Los cromosomas humanos se distinguen por la posición del centrómero, mientras que los de ratón son todos acrocéntricos. Las preparaciones metafásicas teñidas con colorante de Giemsa permiten poner en evidencia el patrón característico de bandas claras y oscuras que es utilizado para la identificación de los cromosomas. El cariograma es la presentación ordenada de los cromosomas después de su identificación y clasificación de acuerdo al patrón de bandas y posición del centrómero (Fig. 6).

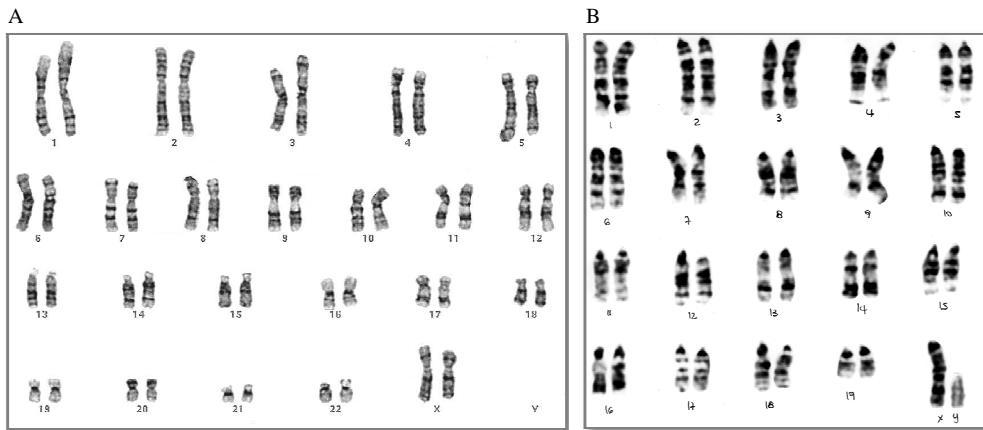


Fig. 6. Cariograma de humano (A) (<http://www.tokyo-med.ac.jp/genet/cki-e.htm>) y de ratón (B).

El conocimiento del número y la morfología de los cromosomas de la especie humana permitieron determinar que algunas patologías estaban asociadas a defectos en el número y la estructura de los cromosomas. Las aneuploidías son alteraciones numéricas que pueden afectar a todo un complemento cromosómico o simplemente a la ganancia o pérdida de uno o más cromosomas. La incidencia de este tipo de alteraciones es del 5% en las gestaciones reconocidas clínicamente. En 1959 Jerome Lejeune demostró que los pacientes con Síndrome de Down tenían un cromosoma 21 adicional (Lejeune y Turpin, 1959). El análisis citogenético ha permitido determinar que las alteraciones cromosómicas ocurren también en las células tumorales, que en el caso de las leucemias y los linfomas constituyen una herramienta muy importante para la evaluación diagnóstica y pronóstica de los pacientes de estas enfermedades (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>). En los cromosomas se pueden distinguir básicamente tres regiones con características y funciones especiales:

- **Brazos cromosómicos.** Constituyen el asiento de los genes. Están formados por eucromatina y heterocromatina que corresponden a las regiones genómicas de replicación temprana y tardía, respectivamente, y se observan como bandas claras y oscuras (Bandas G) cuando éstas se tiñen con Giemsa. Estas regiones poseen características estructurales y funcionales diferentes como la densidad génica, el

tiempo de replicación, el contenido de secuencias repetitivas (no codificantes) y la conformación de la cromatina (Holmquist, 1992).

La heterocromatina constitutiva se localiza generalmente en las regiones centroméricas, pericentroméricas y teloméricas, así como en las regiones adyacentes a los organizadores del nucléolo (NOR) y en algunos organismos también en regiones intersticiales de los brazos cromosómicos. La heterocromatina facultativa se tiñe de la misma manera que la constitutiva, aunque difiere de ésta por su patrón de replicación más tardía. Además, tiene baja concentración de genes, pero es rica en elementos repetitivos largos (LINE), que disminuyen su sensibilidad a la digestión con ADNasa.

- **Centrómero:** También denominado constricción primaria del cromosoma, es una estructura constituida por ADN y proteínas no histónicas, entre ellas las proteínas centroméricas A, B y C (CENP A, CENP B y CENP C), la proteína cinetocórica INCEP y la proteína pasajera Aurora B.

En el centrómero se pueden distinguir una parte interior o heterocromatina céntrica, donde se forma el cinetocoro y una región externa a ésta que se encarga de cohesionar las cromátidas (Fig. 7A y B). La integridad del centrómero es indispensable para la correcta segregación cromosómica durante la mitosis (Diaz-Martinez y Clarke, 2009).

Esta región centromérica de los cromosomas humanos contiene ADN α -satélite, constituido por fragmentos de 171 pb altamente repetidos en tándem y que pueden abarcar secciones del genoma de 0,2 a 7 Mpb. El ADN α -satélite Tipo I está asociado con la función del centrómero y contiene una secuencia de 17 pb conocida como caja CENP-B que corresponde con el sitio de unión de esta proteína (Fig. 7C). El ADN α -satélite de tipo II generalmente flanquea al del tipo I y está a menudo entremezclado con secuencias LINE y cortas SINE (Allshire y Karpen, 2008; Vagnarelli y cols., 2008) (Fig. 7C).

Contiguas a los centrómeros, se encuentran las regiones denominadas pericentroméricas ricas en heterocromatina constitutiva, cuyas secuencias nucleotídicas son ricas en C y G, organizadas como dinucleótidos CpG altamente

repetitivos (constricción secundaria). Los cromosomas humanos 1, 9, 16 e Y son ricos en heterocromatina constitutiva, visible como bloques hipercromáticos en las regiones pericentroméricas.

Los nucleosomas del centrómero contienen CENP-A que es una variante de histona H3 (CenH3 CENP-A) (Fig. 7C). La chaperona HJURP (*Holliday Junction-Recognizing Protein*) resulta indispensable en la disposición de CenH3 CENP-A en G1, ya que aporta estabilidad a la molécula y permite la correcta segregación de los cromosomas (Dunleavy y cols., 2009; Carroll y cols., 2010). CENP-B recluta a CENP-A para la formación del nuevo centrómero e interviene en los procesos de metilación de H3K9 mediante Suv39 (Okada y cols., 2007).

La distribución de proteínas en los centrómeros no es aleatoria, sino que éstas forman dominios que se distinguen básicamente por el tipo proteico y el perfil de modificaciones post-transduccionales de las histonas que los componen.

El dominio más interno es rico en cohesinas y está encargado de la unión de las cromátidas hermanas. A éste le suceden otros dominios ricos en H3K9 di- o trimetilada, histonas H3 fosforilada en la treonina 3 e histona H3 dimetilada en la lisina 4. El dominio más externo del centrómero es particularmente rico en CENP-A (Baumann y cols., 2007) (Fig. 7C). La regulación epigenética que establece y regula el mantenimiento de la cromatina centromérica y la localización del cinetocoro es esencial para la correcta segregación cromosómica durante la mitosis (Allshire y Karpen, 2008).

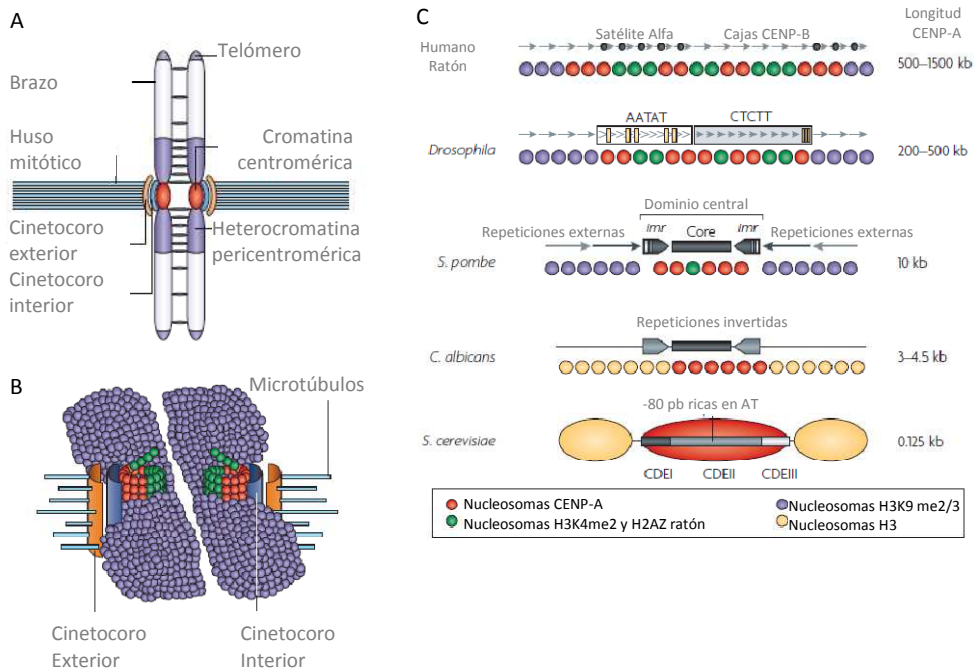


Fig. 7. Regiones del cromosoma, telómero, brazo y centrómero (A). Dominio externo e interno del cinetocoro e inserción con el huso mitótico (B). Composición del centrómero en la escala evolutiva, secuencias de ADN y variantes de las histonas del nucleosoma (C). (Allshire y Karpen, 2008).

La proteína heterocromatina 1 (HP1) es otra proteína muy abundante en la región pericentromérica que reconoce la histona H3 trimetilada en la lisina 9 (H3K9) y la actividad metil transferasa (MT) de la proteína SU(VAR)3-9. La pérdida de HP1 debido a mutaciones del gen correspondiente provoca defectos en la segregación de los cromosomas, resultando letal en algunos organismos. Estos efectos pueden deberse a las múltiples funciones de HP1 que implican la estabilidad de los centrómeros, el control a nivel de los telómeros y la regulación de la expresión génica en la eucromatina y la heterocromatina (Dialynas y cols., 2008). La unión de HP1 a la heterocromatina es transitoria, ya que hay un permanente recambio de la proteína a nivel molecular a pesar de la apariencia rígida y estable que presentan las regiones heterocromáticas (Cheutin y cols., 2003).

Los centrómeros son extremadamente complejos desde el punto de vista estructural y esto está estrechamente relacionado con las funciones que llevan a cabo de mantener la integridad cuantitativa del genoma en las células (Loncarek y cols.,

2007). Recientemente, se ha demostrado que la disociación del ADN de los centrómeros es un requerimiento necesario para la división celular en los mamíferos y se encuentra altamente regulada. Este proceso parece ocurrir únicamente después de la activación de las separasas, la eliminación de las cohesinas que los mantienen protegidos de la acción de la Topo II α y la inhibición del punto de control de la mitosis (Wang y cols., 2010b). De esta forma los centrómeros aportarían la tensión suficiente que mantiene unidos los microtúbulos y el cinetocoro durante la progresión de los cromosomas al comienzo de la anafase. Los centrómeros son estructuras fundamentales para la correcta segregación de los cromosomas en las dos células hijas. La complejidad en la composición de los centrómeros está relacionada con la regulación en los procesos de división celular y la interacción con el huso mitótico, permitiendo la transferencia del material genético.

- **Telómeros:** Son estructuras localizadas en los extremos de los cromosomas, constituidas por múltiples copias de una secuencia hexanucleotídica (TTAGGG) hasta 10-15 kb, combinadas con un complejo de seis proteínas diferentes como son los factores de unión a la repetición TTAGGG 1 y 2 (TRF1 y TRF2), la proteína de unión al telómero (POT1), el factor nuclear 2 de interacción con TRF1 (TIN2), la proteína activadora del represor (Rap1) y la proteína homóloga de la displasia adrenocortical (TPP1).

La estructura molecular de este segmento cromosómico es muy particular, el extremo terminal 3' de la propia repetición de nucleótidos sufre un plegamiento en forma de bucle-T cuya función es la de facilitar la replicación del ADN a nivel de los extremos de los cromosomas. El correcto funcionamiento de los telómeros requiere de la actividad de la enzima telomerasa, que es altamente selectiva y actúa específicamente alargando aquellos telómeros erosionados y cuyas longitudes no superan el umbral funcional (Wyatt y cols., 2010).

La integridad estructural y funcional de los telómeros es una condición *sine qua non* para el mantenimiento de la estructura de los cromosomas, ya que funcionan como capuchones de los extremos cromosómicos protegiéndolos de la erosión y evitando

la formación de extremos pegajosos que podrían dar origen a fusiones de cromosomas (de Lange, 2005).

I.4 División celular y alteraciones del número de cromosomas

La división celular es un proceso altamente regulado que asegura la transferencia de la información genética en dos células hijas. En las células que no se encuentran en división ocurren los eventos de proliferación y crecimiento celular en los que los cromosomas proporcionan al núcleo su apariencia granular con la cromatina relajada. Este período denominado interfase, supone el estadio más largo del ciclo celular e incluye las fases G₀, G₁, S y G₂. Durante G₁ se produce síntesis de proteínas y de ARN, mientras que en S se produce la replicación o síntesis de ADN. Las células pueden a su vez, abandonar el ciclo celular y entrar en un proceso de diferenciación o bien pasar a un estado quiescente o G₀. La transición de una a otra etapa está celosamente controlada por mecanismos moleculares complejos y puntos de control. En la segunda fase del ciclo, G₂, continúa el proceso de crecimiento celular. Hasta que con el inicio de la fase M, ocurren múltiples eventos moleculares que conducen a la división del material genético en dos células hijas durante la mitosis.

La correcta segregación de los cromosomas es un proceso esencial para la transferencia de la información genética, por lo que su regulación se encuentra altamente controlada por mecanismos complejos y muy específicos en las células (Walczak y cols., 2010). La segregación de los cromosomas resulta en un proceso sincronizado, en el que intervienen, entre otros, la interacción con el huso mitótico y la tensión ofrecida por los centrómeros. Los microtúbulos se unen al cinetocoro de cada uno de los cromosomas, que se disponen en la placa ecuatorial metafásica. La dinámica de los microtúbulos permite la progresión de los cromosomas hacia polos opuestos mediante la polimerización y despolimerización de los dímeros de tubulina. La complejidad del proceso conlleva, a veces, a errores en la interacción de algunos cromosomas y los microtúbulos del huso, cuya consecuencia puede ser la generación de alteraciones numéricas de los cromosomas. La no disyunción de

cromosomas, el mecanismo más frecuente de origen de las aneuploidías, en la mayoría de los casos supone un error en la separación de los cromosomas homólogos en la meiosis I, mientras que en un porcentaje menor el error se produce entre las cromátidas hermanas durante la meiosis II ó mitosis. Aunque los conocimientos sobre la causa de la segregación incorrecta de los cromosomas son escasos, las alteraciones en la recombinación parecen contribuir en la no disyunción de los cromosomas en la meiosis (Dierssen y cols., 2009). La edad materna es el único factor vinculado con las anomalías cromosómicas de número (Hassold y cols., 2007). Hasta un 20% de los oocitos humanos son portadores de aneuploidías, mientras que el 1-2% de los espermatozoides tienen alteraciones en el número de cromosomas (Hulten y cols., 2008; Oliver y cols., 2008).

Las aneuploidías más frecuentes de los autosomas son la trisomía 21 (Síndrome de Down), con una incidencia en 1 de cada 600 nacidos vivos, la trisomía 18 (Síndrome de Edwards) y la trisomía 13 (Síndrome de Patau), junto con las aneuploidías de los cromosomas sexuales, Síndrome de Turner (45, X), en mujeres, y síndrome de Klinefelter (47, XXY); (47, XYY); (47, XXX) en varones (Nussbaum y cols., 2008). Las aneuploidías también se originan en las células somáticas durante la división de las células tumorales. Es una característica común de la mayoría de los tumores, que presenten ganancias y pérdidas de cromosomas, un fenómeno denominado inestabilidad cromosómica y que contribuye enormemente a la progresión del cáncer, debido a que incrementa la diversidad genética entre las células tumorales. Este fenómeno genera trastornos numéricos de los cromosomas y reordenamientos estructurales en el cariotipo de las células tumorales, como en los analizados mediante SKY por Grigorova y colaboradores en diez líneas celulares de cáncer de pulmón. Es el caso de la línea celular hiperdiploide NCI-H2122A (Fig. 8), de metástasis pulmonar, en la que podemos encontrar ganancia de los cromosomas 1, 2, 5, 7, 8, 10, 14, 15q, 17 y 20, además de reordenamientos estructurales que involucran seis pares cromosómicos, 1, 8, 14, 10, 12, 19 junto con inversión del 7 e isocromosoma 15q (Grigorova y cols., 2005).



Fig. 8. Cariotipo de células tumorales metastásicas, SKY FISH y bandeo cromosómico (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>).

Entre las causas que conducen a alteraciones de la mitosis que derivan en alteraciones del número de cromosomas se pueden mencionar: **1)** defectos en las cohesinas, **2)** defectos en el punto de control de la mitosis, que controla el correcto ensamblaje del huso mitótico y los cromosomas, **3)** presencia de centrosomas supernumerarios, **4)** defectos en la dinámica de acoplamiento del cinetocoro y los microtúbulos, y **5)** defectos en la regulación del ciclo celular y la citocinesis (Thompson y cols., 2010).

La proteína Mps1 (*Monopolar spindle 1 like*) resulta esencial en el alineamiento de los centrómeros durante la mitosis y en la duplicación de los centrosomas. La liberación de Mps1 en el cinetocoro parece actuar previniendo el avance del ciclo celular de la metafase a la anafase antes del ensamblaje de todos los centrosomas con los microtúbulos del huso mitótico (Jelluma y cols., 2010).

El gen *BUB1B* (*mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase*) codifica para una proteína quinasa implicada en la función del huso mitótico, localiza en el cinetocoro y actúa inhibiendo el complejo promotor de la anafase que retrasa este evento. La mutación de *BUB1* interviene en el mecanismo sensor de localización de los cromosomas en la placa metafásica que permite que la mitosis progrese aún cuando todos los cromosomas no estén alineados, provocando aneuploidía (Hanks y cols., 2004).

Los agentes que despolimerizan las fibras de tubulina, tales como la colchicina y el nocodazol, pueden generar aneuploidías porque interfieren con el proceso dinámico de formación de las fibras del huso mitótico, actrices principales en la segregación

física de los cromosomas. Un efecto similar también lo presentarían agentes que estabilizan las fibras, tales como los taxanos (Dalton y Yang, 2009).

Los microtúbulos del huso mitótico se organizan de manera bipolar en los centrosomas. Los centrosomas, compuestos por un par de centriolos, son otras de las estructuras celulares fundamentales para la segregación cromosómica, de modo que la alteración en el número y/o orientación espacial de los mismos resulta crucial en la célula y puede conducir a aneuploidías (Nigg, 2007).

La proteína de centriolo Plk4 (*Polo-like kinase 4*) resulta un componente principal en la generación y el mantenimiento del número exacto de centriolos. Recientemente se ha demostrado que la forma activa de Plk4 promueve su degradación vía proteasoma mediante trans-autofosforilación en el dímero. La duplicación anormal del número de centriolos resulta de la interrupción de este proceso y de la sobreexpresión de la forma *Plk4-kinase dead* que impide la degradación de la proteína (Guderian y cols., 2010).

La supresión de las cohesinas o los factores que regulan los procesos en las que están involucradas conllevan a un incremento de células tetraploides en el cáncer colorrectal, indicando que los defectos en las cohesinas parecen provocar alteraciones globales en la división celular, más que la segregación incorrecta de los cromosomas individuales (Iwaizumi y cols., 2009).

Las poliploidias, es decir las células con ganancias de complementos completos de cromosomas, tan comunes en las células tumorales humanas son infrecuentes en las células somáticas normales. Sin embargo, estudios citogenéticos realizados en material de abortos espontáneos demostraron que ocurren y que todas son incompatibles con la supervivencia del feto (Solomon y cols., 2010). Una causa frecuente de triploidía es la fecundación de un óvulo por dos espermatozoides, aunque un fallo meiótico en la gametogénesis, en el que se origina un óvulo o un espermatozoide diploide, también puede producir un cigoto triploide. Alteraciones en la mitosis en los periodos embrionarios iniciales, en los que todos los cromosomas duplicados migran a una de las dos células hijas, pueden conducir a tetraploidía. Las poliploidias son comunes en las plantas y, de manera contraria a los

mamíferos, se encuentran asociadas con un aumento de su valor agrícola.

La reorganización de la envoltura nuclear durante la mitosis resulta fundamental para la segregación de los cromosomas, así como para restablecer el compartimento nuclear en las células hijas. Los componentes de la membrana del núcleo participan activamente en la progresión de la mitosis y la interacción de estas proteínas con la cromatina y el citoesqueleto constituye un factor relevante en la correcta segregación de los cromosomas y en la organización del genoma en el núcleo interfásico (Kutay y Hetzer, 2008; Capo-Chichi y cols., 2011).

Finalmente, es importante mencionar que los defectos en la correcta segregación de los cromosomas durante la división celular y/o en los mecanismos que la regulan tienen una importancia cada vez mayor en patología humana.

I.4.1 Trisomía 21: Síndrome de Down

El Síndrome de Down es la condición humana asociada a una alteración numérica de los cromosomas. En 1959 Jerome Lejeune demostró que los pacientes con Síndrome de Down tenían un cromosoma 21 adicional (Lejeune y Turpin, 1959).

El fenotipo de las personas con esta alteración cromosómica es característico, con signos y síntomas que son comunes a todas ellas, pero con alto grado de variabilidad interindividual (Roper y Reeves, 2006). Entre los rasgos que caracterizan a estas personas están la protrusión lingual, los pliegues de epicanto en la esquina interna del ojo, el iris con manchas de Brushfield, el pliegue único transversal en las palmas de las manos, las orejas pequeñas y antevertidas, la dismorfia craneal, los dedos cortos y una estatura baja (Fig. 9A). Los trastornos clínicos que sufren son complejos, con aparición y severidad variable. Entre éstos están el retardo mental, las enfermedades congénitas cardíacas en un 50% de los recién nacidos, las infecciones recurrentes por un sistema hematopoyético e inmune alterados y un riesgo significativamente más elevado de padecer leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda o la enfermedad de Hirschprung figuran entre los más destacables. Además, presentan un riesgo mayor de padecer enfermedad de Alzheimer a edades más tempranas que en la población general.

La trisomía 21 total es la causa del 95% de los casos de Síndrome de Down y afecta a 1 de cada 600 nacidos vivos, siendo una de las causas más comunes de retraso mental (Shen y cols., 1995). La mayoría de los casos de Síndrome de Down se deben a defectos en la disyunción de los cromosomas 21 en la fase de meiosis I (Fig. 9B y C). Aunque en una frecuencia inferior, la trisomía puede ser también parcial, es decir que el síndrome se debe a la presencia sólo de parte del material del cromosoma del par 21 (Antonarakis y cols., 2004). Generalmente el segmento responsable de la trisomía parcial abarca una región genómica mayor a 5 Mb. Sin embargo, actualmente se han observado microtrisomías en las que el tamaño del fragmento triplicado oscila entre 3-5 Mb.

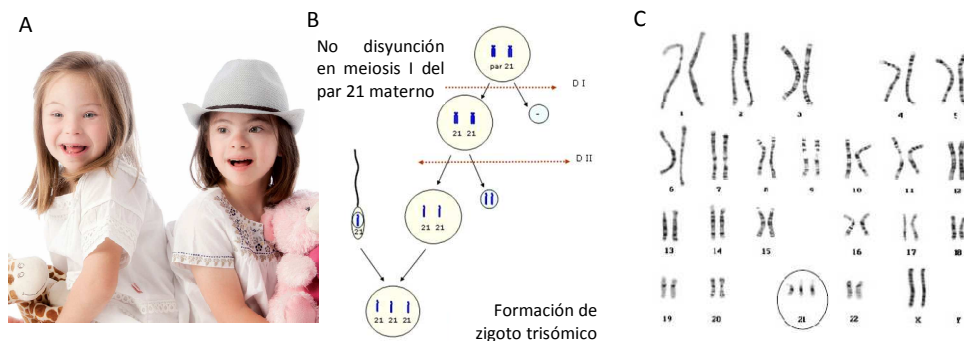


Fig. 9. Imagen fenotipo del Síndrome de Down (www.downmadrid.org) (A). Origen más frecuente de la trisomía 21: no disyunción de los cromosomas en la meiosis I (B). Cariograma de un paciente de trisomía 21 (C). (Antonarakis y cols., 2004).

La presencia de un cromosoma 21 adicional, o de parte del mismo, supone la herencia de tres copias de los genes que mapean en ese cromosoma y es este desequilibrio en la dosis de genes, con el defecto en el nivel de expresión, el responsable de las alteraciones a nivel molecular. En teoría, una copia adicional del cromosoma 21 implicaría un aumento de 1,5 veces en el nivel de expresión de los genes triplicados, pero mediante la tecnología microarray para medir la expresión (mARN) se ha observado que la expresión de los genes comprendidos no siempre sigue el patrón teórico esperado. Debido a esto se estableció la clasificación de los genes involucrados en el Síndrome de Down basada en rangos de expresión génica como se describe a continuación (Ait Yahya-Graison y cols., 2007):

- Genes de tipo I: tienen un nivel de expresión de 1,5 veces en los pacientes con Síndrome de Down con respecto de los individuos cromosómicamente normales.
- Genes de tipo II: aquellos que mantienen un nivel de expresión significativamente mayor a 1,5 veces el normal y reflejan un efecto de amplificación.
- Genes de tipo III: aquellos con niveles de expresión menores a 1,5. La mayoría de los genes del cromosoma 21 aparecen en este grupo (56%).
- Genes de tipo IV: son genes con valores de expresión muy variables entre individuos.

Recientemente se ha demostrado un fenómeno similar en las neuronas de ratón que contienen una copia de un cromosoma 21 humano. En estas neuronas se observaron un grupo de genes con una expresión aumentada probablemente como efecto de la dosis, otro grupo de genes en los que el nivel de expresión no variaba debido a un efecto de compensación y un último grupo con un efecto opuesto, en los que la expresión se veía reducida (Wang y cols., 2011).

El efecto de la dosis de los genes es alelo específico, es decir, que distintas combinaciones alélicas pueden contribuir en a la gravedad o al silenciamiento de un carácter fenotípico. Además, la expresión de los genes del cromosoma 21 puede tener un efecto indirecto sobre los genes y productos de otros cromosomas (Fig. 10) (Antonarakis y cols., 2004).

Los pacientes con Síndrome de Down que portan sólo trisomías 21 parciales, así como también los modelos murinos para este síndrome, han sido fundamentales para identificar los genes candidatos asociados al fenotipo. La región genómica de aproximadamente 5 Mb que se extiende entre los marcadores genéticos D21S17 y D21S55, en la banda 21q22.3, se considera que contiene los genes “críticos” que contribuyen al fenotipo característico del Síndrome de Down (Sinét y cols., 1993). Esta región se denomina Región Crítica para el Síndrome de Down (DSCR, *Down Syndrome Critical Region*). Sin embargo, es importante destacar que ninguno de los genes de esta región es suficiente por sí mismo para producir el fenotipo característico en su totalidad (Olson y cols., 2007). En base al efecto que tiene la

dosis de genes en el fenotipo se han observado dos categorías: aquellos que son sensibles a la dosis y, por tanto, la combinación de tres copias contribuye al fenotipo del Síndrome de Down y aquellos que no son sensibles a la dosis y, por tanto, sin efecto aparente en el fenotipo (Fig. 10), lo que se correspondería con genes que codifican para proteína y los que darían origen a ARN no codificantes (ARNnc, microARN), respectivamente.

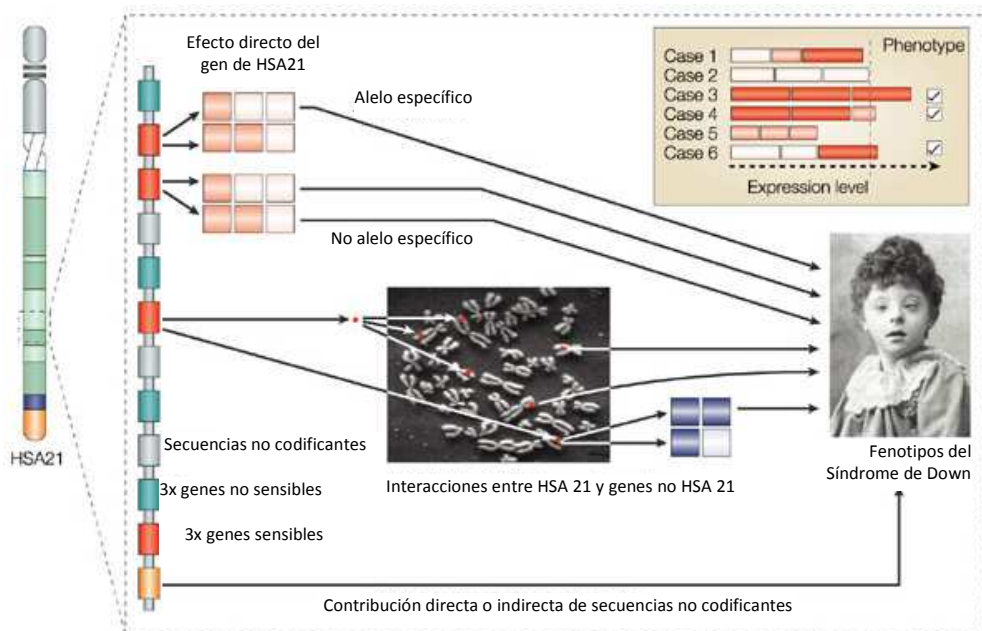


Fig. 10. Hipótesis del efecto de la dosis de genes en el fenotipo del Síndrome de Down. Contribución directa o indirecta y de los genes del HSA21 (Antonarakis y cols., 2004).

El gen *DYRK1A* (*Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation Regulated Kinase 1A*) en humanos mapea sobre la DSCR, en el cromosoma 21, y es considerado un gen candidato asociado a los defectos de aprendizaje en el Síndrome de Down. *DYRK1A* codifica para uno de los miembros de la familia de proteínas DYRK, con actividad quinasa dual de manera específica, regulada por una fosforilación en tirosinas. La proteína DYRK1A contiene una secuencia diana nuclear, un dominio de proteína quinasa, un motivo cremallera de leucina y una repetición de 13-histidinas consecutivas altamente conservadas. La autofosforilación de un residuo

tirosina en el dominio catalítico de DYRK1A ocurre de manera constitutiva, sin embargo, no parece regular la actividad quinasa de DYRK1A. La regulación de DYRK1A puede ocurrir a nivel de la expresión génica, mediante la interacción con elementos reguladores y la traslocación regulada en el núcleo (Becker y Sippl, 2011). La maduración alternativa del transcrito primario del gen genera múltiples variantes que difieren unas de otras en la región 5'UTR o en la región 3'codificante. Estas variantes codifican para al menos cinco isoformas distintas de la proteína.

La función de DYRK1A parece radicar en la regulación de rutas de señalización durante la proliferación y puede resultar relevante en el desarrollo embrionario del cerebro. El gen *DYRK1A* humano es homólogo del gen de *Drosophila mnb* (*minibrain*) y del de ratón *Dyrk1a*. La interrupción del gen *mnb* en *Drosophila* resulta en moscas con una reducida proliferación de los neuroblastos, un descenso en el número de neuronas de la región central del cerebro y en defectos de aprendizaje y memoria. Ratones knockout (KO) con la supresión de ambos alelos de *Dyrk1a* resultan letales en el embrión. Los ratones KO heterocigotos son viables, aunque en una menor proporción y muestran una reducción en el tamaño de las regiones específicas del cerebro. En humanos, el gen *DYRK1A* puede estar implicado en los trastornos neurológicos asociados con el Síndrome de Down, por su papel en el desarrollo del cerebro (Dierssen y de Lagran, 2006). Son cada vez más los trabajos de investigación que sugieren que el producto del gen *DYRK1A* participa en los mecanismos patogénicos que subyacen a los trastornos mentales y en otros síntomas del Síndrome de Down. Hay trabajos que proponen la implicación de DYRK1A, por fosforilación, en la regulación de vías que intervienen en la regulación de la transcripción de genes, maduración de mRNA, sinapsis y procesos neurodegenerativos (Park y cols., 2009) (Fig. 11B).

La sobreexpresión de DYRK1A en el Síndrome de Down puede estar implicada en defectos en la correcta progresión del cerebro, en el desarrollo precoz de procesos neurodegenerativos y en la pérdida neuronal y la demencia.

La identificación de numerosos genes que se encuentran desregulados por la sobreexpresión de DYRK1A y de numerosas proteínas citosólicas y nucleares, como

los factores de transcripción fosforilados por DYRK1A, indican que su sobreexpresión resulta clave en la alteración de vías de señalización del desarrollo embrionario y del envejecimiento del cerebro en el Síndrome de Down, con alteraciones estructurales y funcionales que incluyen el retraso mental.

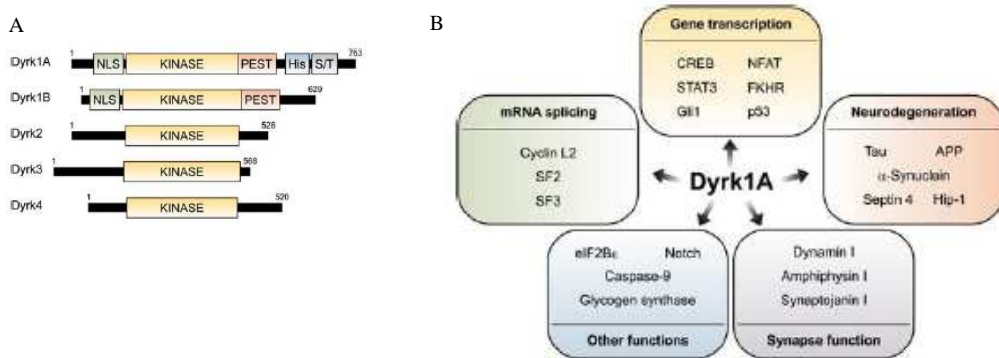


Fig. 11. Dominios que conforman la proteína Dyrk1A y su conservación en otras variantes (A). Funciones en las que intervienen los sustratos de fosforilación de Dyrk1A (B) (Park y cols., 2009).

La inhibición de la actividad de la DYRK1A puede contrarrestar los efectos fenotípicos y se propone como un método de tratamiento de los defectos en el desarrollo y la prevención de la neurodegeneración asociada a la edad, como ocurre en la patología de Alzheimer (Wegiel y cols., 2010). *DYRK1A* surge como un gen relevante en el Síndrome de Down, en el que la dosis parece afectar directamente en el fenotipo.

El gen *SOD1* (*Cu/Zn Superoxide Dismutase 1*) mapea en la región cromosómica 21q22.1 no comprendida en la DSCR y dista 5,7 Mbp por encima del gen *DYRK1A*. *SOD1* actúa como agente anti-oxidante en el mantenimiento del equilibrio redox celular, la inflamación y el estrés oxidativo. El gen *SOD1* codifica para una proteína citoplasmática soluble, que actúa como un homodímero, resultando en una de las isozimas responsables de destruir radicales libres superóxido en el organismo. Los compuestos superóxido son potentes agentes oxidantes dañinos para el organismo (ROS, *Reactive Oxygen Species*) generados de manera natural, que contienen el anión superóxido (O_2^-) unido a otra molécula. La enzima Cu/Zn-SOD1 cataliza la

reacción que libera oxígeno (O_2) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) a partir de los compuestos superóxido. En un proceso en el que intervienen las enzimas glutatión peroxidasa (Gpx) y catalasa, las moléculas de H_2O_2 y otros radicales son detoxificadas.

La sobreexpresión de SOD1 se ha observado en pacientes con Síndrome de Down como resultado de la dosis de genes, lo que implica un aumento del 38-40% de la actividad de esta enzima en linfocitos y granulocitos polimorfonucleares (de Haan y cols., 1997). Las evidencias sobre el aumento de SOD1 en el cerebro de personas con Síndrome de Down no se ven acompañadas por el incremento de Gpx y catalasas en los tejidos en los que el aumento de peróxido puede inducir apoptosis. La presencia de ROS se ha visto implicada en los procesos neurodegenerativos y cada vez son más los trabajos que los implican en el Síndrome de Down. Se ha propuesto que la regulación de los componentes ROS puede resultar en un mecanismo de control de factores de transcripción y la consecuencia del desequilibrio molecular resulta en la muerte neuronal y la neurodegeneración en estos pacientes (Lubec y Engidawork, 2002). Strydom y colaboradores postularon que el nivel de estrés oxidativo en pacientes de Síndrome de Down podría ser indicador de la capacidad cognitiva, en los que un aumento de SOD1 respecto de Gpx estaría relacionado con habilidades más afectadas (Strydom y cols., 2009). Sin embargo, sus resultados indicaron el efecto contrario, de modo que las personas más afectadas se asociaron con una relación SOD1/Gpx reducida. Los autores concluyen que el sistema antioxidante se encuentra implicado en la capacidad cognitiva de las personas con Síndrome de Down. Sin embargo, son necesarios más estudios para comprender el efecto del estrés oxidativo en estos pacientes (Strydom y cols., 2009). En el caso de *SOD1* las variaciones en el fenotipo en el Síndrome de Down pueden resultar de la interacción de múltiples genes y sus productos.

I.5 Organización del genoma en el núcleo interfásico

El genoma humano contiene alrededor de 3 billones de nucleótidos, lo que equivaldría a una longitud aproximada de casi un metro de las moléculas de ADN extendidas que constituyen los cromosomas. Obviamente, de esta manera no pueden acomodarse en el núcleo, por lo que el genoma sufre un alto grado de compactación hasta alcanzar dimensiones de apenas unas μm . Crutchley y colaboradores describen tres niveles jerárquicos de organización del genoma (Crutchley y cols., 2010) (Fig. 12). El primer nivel se caracteriza por el orden lineal de los elementos del ADN, genes y secuencias reguladoras en los cromosomas. La interacción entre el ADN y las proteínas define el segundo nivel de organización del genoma. El ADN junto con dos copias de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 conforma el nucleosoma, la unidad estructural de la cromatina. La sucesión de los nucleosomas origina el nucleofilamento de 10 nm que se empaqueta formando la fibra de 30 nm. Las histonas pueden sufrir modificaciones post-traduccionales como acetilación, metilación, fosforilación, sumoilación, ADP-ribosilación y ubiquitinación. Estas marcas epigenéticas se dan principalmente en la cola amino-terminal de las histonas, y modulan la afinidad del ADN y las histonas y el reclutamiento de proteínas reguladoras. Los conocimientos sobre la organización del genoma a un nivel superior a la fibra de 30 nm son aún escasos (Tremethick, 2007). Ni siquiera a este nivel de organización (fibra de 30 nm) el contenido de ADN de los cromosomas podría ajustarse dentro del núcleo. De modo que, el genoma se organiza y sufre plegamientos adicionales necesarios para el desarrollo de su función en el núcleo.

El tercer nivel supone la organización del genoma en el espacio nuclear. La distribución tridimensional de la cromatina está regulada por proteínas capaces de modular la fibra de 30 nm en ultraestructuras como los lazos cromatínicos (Fig. 12). A este nivel, además de favorecer la compactación del genoma en el núcleo, la distribución espacial podría actuar conjuntamente como un mecanismo de regulación génica (Gondor y Ohlsson, 2009). Los recientes avances en la tecnología han permitido identificar una extensa red de comunicación entre genes y elementos reguladores de un mismo cromosoma e incluso de cromosomas distintos en el

espacio nuclear. Un aspecto crítico supone el estudio de cómo la organización espacial del genoma puede afectar a la función, más que únicamente reflejar este fenómeno (Fraser y Bickmore, 2007).

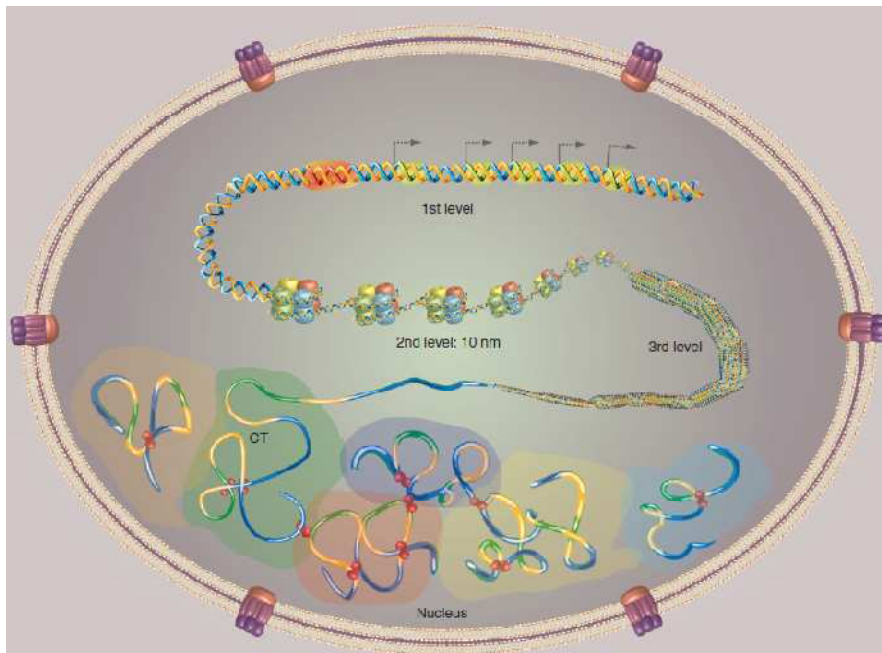


Fig. 12. Niveles de organización del genoma en el núcleo interfásico. El primer nivel supone la doble hélice de ADN. El nucleofilamento de 10 nm y la fibra de 30 nm conformarían el segundo nivel, mientras que el nivel superior de organización son los lazos cromatínicos (Crutchley y cols., 2010). CT, territorio cromosómico

I.5.1 Organización espacial

El núcleo celular es una organela sumamente compleja desde el punto de vista estructural y funcional. Una característica interesante es que, a pesar de no tener membranas en su interior, se encuentra altamente compartimentalizado. La cromatina correspondiente a cada uno de los cromosomas está organizada en el núcleo en interfase de manera similar a como se aprecia en los cromosomas metafásicos. Cremer y colaboradores introdujeron el término territorio cromosómico para describir que los cromosomas existen como entidades individuales no sólo en metafase, sino también en interfase (Fig. 13A) (Cremer y cols., 1974). La confirmación definitiva sobre la territorialidad de los cromosomas vino con la introducción de la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) durante mediados de 1980, que permitió visualizar a través del microscopio los cromosomas y genes en el espacio nuclear (Fig. 13B). La tecnología 3D-FISH junto con la de microscopía confocal y los programas de reconstrucción tridimensional se han convertido en herramientas insustituibles para el análisis de la organización espacial de los territorios cromosómicos (Cremer y cols., 2008). La metodología FISH permitió determinar no sólo que los cromosomas son unidades individuales en interfase, sino también que los cromosomas no están distribuidos de forma aleatoria en el espacio nuclear (Parada y Misteli, 2002) (Fig. 13C).

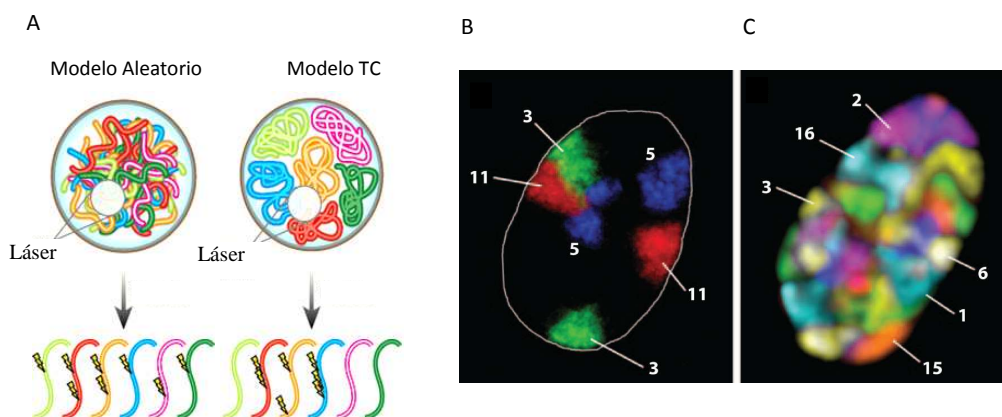


Fig. 13. Modelo de organización de los cromosomas en el núcleo aleatorio y modelo territorial (A) (Meaburn y Misteli, 2007). FISH de los territorios cromosómicos 3, 5 y 11 (B), y del complemento cromosómico humano completo con SKY FISH (C) (Hubner y Spector, 2010).

Estos niveles superiores de organización reflejan las limitaciones geométricas existentes dentro del núcleo que naturalmente afectan la distribución tridimensional de los territorios cromosómicos (Neusser y cols., 2007). Cabe destacar que, aunque los territorios cromosómicos forman dominios discretos en el núcleo, los cromosomas que se encuentran próximos entre sí pueden entremezclarse en las regiones periféricas de los mismos (Branco y Pombo, 2006). Asumiendo que la cantidad de cromatina entremezclada es despreciable frente al total, se puede decir que el tamaño de los territorios cromosómicos está determinado por el contenido de ADN, pero también está influenciado por el estado transcripcional (Visser y cols., 2000). Los conocimientos sobre la estructura interna de los territorios cromosómicos son aún escasos, pero parecen consistir en una red de lazos cromatínicos que permiten el acceso de factores reguladores en el interior de la estructura (Misteli, 2007).

Actualmente, la búsqueda (no aleatoria) de patrones de organización diferencial de la cromatina, los mecanismos responsables de su formación y sus implicaciones funcionales suponen los principales objetivos de estudio en el análisis de la arquitectura nuclear (Cremer y Cremer, 2010). El análisis cuantitativo de la distribución de los elementos genéticos, tales como territorios cromosómicos, dominios subcromosómicos o genes en el espacio nuclear, requiere que se definan referencias en el núcleo en interfase (Ronneberger y cols., 2008). Es por ello que la posición de los elementos genéticos en el núcleo se describe comúnmente según su proximidad al centro de masas o a la envoltura nuclear y a esto se le denomina distribución radial.

Las primeras evidencias sobre la distribución radial diferencial de los territorios cromosómicos se obtuvieron con experimentos 3D-FISH para los cromosomas 18 y 19 en linfocitos humanos. De forma consistente se encontró que el cromosoma 19 localiza preferentemente hacia el centro del núcleo, mientras que la posición de los cromosomas 18 es hacia la periferia nuclear (Fig. 14A). Posteriormente se descubrió que la distribución específica de estos dos cromosomas estaba relacionada con la densidad génica de los cromosomas, el cromosoma 19 es rico en genes, mientras que

el 18 tiene una densidad génica baja (Croft y cols., 1999; Cremer y cols., 2001).

La localización diferencial de acuerdo al contenido en genes es extensiva a todo el complemento cromosómico humano, es decir, los cromosomas con alto contenido de genes se localizan preferentemente hacia el interior del núcleo, mientras que aquellos cromosomas pobres en genes lo hacen hacia la periferia (Boyle y cols., 2001). Por ejemplo, en los linfocitos humanos los cromosomas 1, 7, 19 y 22, ricos en genes, aparecen preferentemente en el centro nuclear (Cornforth y cols., 2002). Cabe destacar que el patrón de distribución radial de acuerdo a la densidad génica de los cromosomas se encuentra muy conservado evolutivamente en primates, a pesar de los eventos de reorganización cromosómicos. En efecto, los segmentos ortólogos del par cromosómico 19 se localizan preferentemente en el interior y los correspondientes al par 18 localizan hacia la periferia nuclear en los núcleos de las células de primates superiores (Tanabe y cols., 2002) (Fig. 14B).

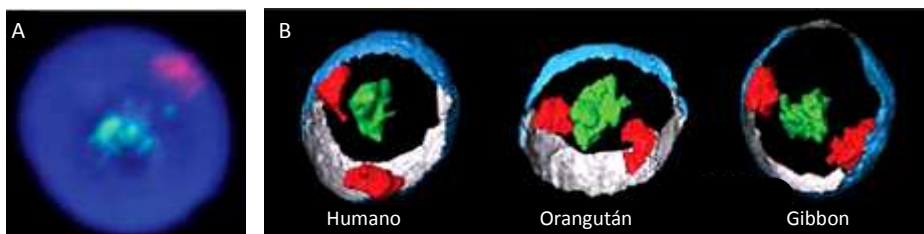


Fig. 14. FISH del territorio cromosómico 19 (verde) en el interior y del territorio cromosómico 18 (rojo) periférico en humanos (A). Conservación del patrón de distribución radial en primates (orangután y gibbon) (B) (Cremer y Cremer, 2010).

Un fenómeno similar de distribución espacial de los cromosomas según el contenido de genes se ha observado también en los roedores. En diferentes tipos celulares de ratón, Mayer y cols observaron que la densidad de genes de los cromosomas son factores que correlacionan de manera no aleatoria con la distribución radial de los territorios cromosómicos en el núcleo, de igual modo a lo observado en humanos (Mayer y cols., 2005). Estudios realizados en embriones preimplantatorios no mostraron que el ordenamiento de los cromosomas en el núcleo interfásico estuviese determinado por la densidad génica de los mismos en bovinos (Koehler y cols., 2009).

Además del contenido en genes, la posición de los cromosomas está determinada por el tamaño de los mismos (Fig. 15). Bolzer y colaboradores estudiaron la posición de los territorios cromosómicos de los 22 pares de autosomas y de los cromosomas sexuales en fibroblastos humanos mediante FISH multicolor. Encontraron que en el núcleo aplanado y elipsoide de estas células la distribución radial se ajustaba en mayor grado al tamaño de los territorios cromosómicos, siendo los cromosomas de mayor envergadura los que se sitúan hacia la periferia y los de menor tamaño preferentemente en el interior del núcleo. Aunque estos autores detectaron que los dominios subcromosómicos con una alta densidad génica y cromatina enriquecida en secuencias Alu en los fibroblastos localizaban en el interior del núcleo (Bolzer y cols., 2005).

En resumen, los resultados sobre la distribución espacial indican que la densidad génica de manera local en una región parece ser un factor importante en la distribución radial de la cromatina en el núcleo (Murmam y cols., 2005; Kupper y cols., 2007). Otras características estructurales y funcionales del genoma, como la actividad transcripcional, el tiempo de replicación y el contenido en GC, también se han propuesto como factores relacionados con la distribución radial de los territorios cromosómicos y los dominios subcromosómicos en el núcleo interfásico.

Federico y colaboradores observaron que las secuencias ricas en GC o en genes localizan en el interior y las secuencias pobres en GC o en genes se disponen hacia la periferia en el núcleo en interfase de anfibios (*Rana esculenta*) y reptiles (*Podarcis sicula*). Estas especies tienen un menor nivel de GC y, sin embargo, presentan una similitud en la estructura de la cromatina, más laxa en las regiones con una densidad génica alta en el interior del núcleo, mientras que típicamente más compacta y en la periferia en las regiones pobres en genes. Proponen que los cambios en la evolución debidos a la termorregulación implicarían un incremento de los niveles de GC que afectan únicamente a la cromatina más laxa, mientras que las regiones pobres en genes se mantienen estables por su estructura compacta (Federico y cols., 2006).

Con relación al nivel de transcripción, Goetze y colaboradores distinguen dominios de cromatina o regiones “*ridges*” con una densidad génica alta y niveles de expresión elevados y dominios “*antiridges*”, pobres en genes y con una menor actividad transcripcional en los cromosomas 1, 3 y 11 humanos. La estructura de la cromatina en el núcleo interfásico de las regiones “*ridges*” resultó más laxa, con una morfología irregular que localiza preferentemente próxima al interior del núcleo, respecto de los dominios “*antiridges*”. La estructura de la cromatina en estos dominios supone un impedimento estérico que no permite entremezclado entre sí (Goetze y cols., 2007).

El análisis de la distribución espacial de loci de replicación temprana fue observado por Grasser y colaboradores en células humanas en una localización preferentemente interior en el núcleo, mientras que la distribución de los genes con un tiempo de replicación tardío se asoció principalmente con la periferia nuclear (Grasser y cols., 2008). De modo que la posición radial de genes de un mismo cromosoma puede diferir de manera significativa entre sí y respecto del territorio cromosómico. El análisis de los genes *Lysozyme*, *Myb*, β -*globin*, *CD11b=Itgam*, *oct3/4=pou5f1*, *Mpo*, β -*actin*, *albumina* en el núcleo de células de ratón embrionarias y en macrófagos diferenciados permitió determinar a Heppeger y colaboradores que el patrón de distribución radial de los genes era específico de cada tipo celular. Es decir, la secuencia de ADN únicamente no determina la posición radial en el núcleo. Además, para este conjunto de genes no encontraron una correlación entre la posición radial y la densidad génica de la región. Aunque, proponen que otros factores como el contenido de GC y de elementos repetitivos largos (LINE), podrían jugar un papel en la distribución de la cromatina en el núcleo interfásico (Heppeger y cols., 2008).

Alternativamente, la posición de los cromosomas o genes también puede ser definida por medio de la posición relativa de uno respecto de otro o también respecto de un compartimento nuclear (Fig. 15). Definido de esta manera, los territorios cromosómicos o genes se pueden encontrar localizados de forma distal o proximal en el núcleo, formando grupos cromosómicos o dominios especializados,

como por ejemplo el nucléolo que es la estructura nuclear donde los genes ribosomales llevan a cabo su actividad.

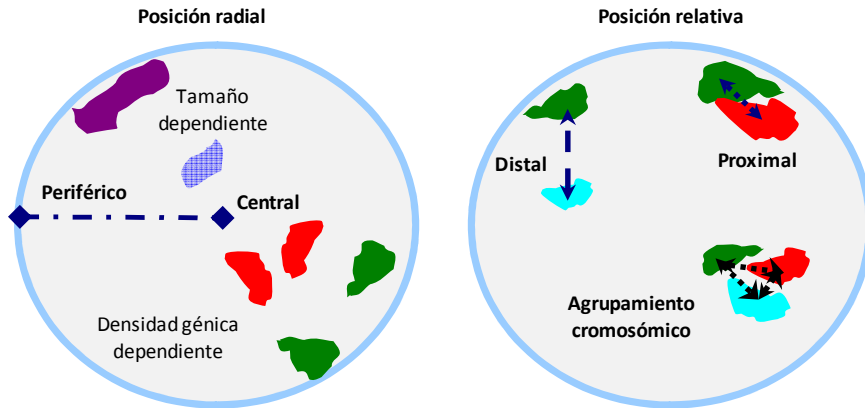


Fig. 15. Distribución de los territorios cromosómicos en el núcleo en interfase, posición radial y posición relativa.

Algunos cromosomas presentan una tendencia a estar separados entre sí de manera no aleatoria en el núcleo, mientras que otros preferentemente se encuentran asociados. En linfocitos de ratón los cromosomas 12, 14 y 15 forman un grupo funcional, probablemente debido a la presencia de NOR en los cromosomas 12 y 15. Únicamente se detecta este tipo de agrupación para uno de los cromosomas homólogos 12, 14 y 15, indicando que quizás en el núcleo individual la distribución de homólogos resulta diferente (Kalmarova y cols., 2008).

La proximidad entre territorios cromosómicos en el núcleo interfásico puede jugar un papel importante en la formación de traslocaciones cromosómicas. Las células de linfomas de células B de ratón frecuentemente presentan traslocaciones de los cromosomas 12, 14 y 15. Estos cromosomas se encuentran formando un grupo compacto en linfocitos B normales (Parada y cols., 2002). Otro ejemplo lo constituye la traslocación (9;22) presente en las células tumorales de la mayoría de los pacientes con leucemia crónica mieloide. El análisis de posición relativa en el núcleo interfásico reveló que estos dos cromosomas se disponen preferentemente en el interior del núcleo en células normales y que los genes BCR-ABL se encuentran yuxtapuestos (Kozubek y cols., 1999). En general, los cromosomas de menor

tamaño y con una mayor densidad génica ocupan una región interior en el núcleo y se disponen próximos entre sí, como los cromosomas 16, 17, 19 y 22 en linfocitos humanos (Boyle y cols., 2001). Mientras que el cromosoma 18, también de pequeño tamaño, pero pobre en genes, no presenta contactos de su cromatina con el resto de los cromosomas mencionados y localiza preferentemente hacia la periferia nuclear (Lieberman-Aiden y cols., 2009). El análisis de distribución relativa de todos los cromosomas en el núcleo de fibroblastos humanos, también demostró que la separación entre los cromosomas homólogos acrocéntricos HSA 13, 14, 15, 21 y 22 resultaba inferior que la de los cromosomas de mayor tamaño (HSA 1-5), lo que parece reflejar la tendencia de asociación de los cromosomas acrocéntricos con el nucléolo, localizado hacia el interior (Bolzer y cols., 2005).

Nagele y colaboradores estudiaron la distribución de los cromosomas durante la metafase y encontraron que el ángulo de separación de los cromosomas homólogos en la placa metafásica oscilaba entre 144° y 166° , lo que sugiere que éstos se encuentran en posición opuesta uno respecto del otro. También los cromosomas portadores de regiones organizadoras del nucléolo (NOR) tienen una distribución preferencial en la placa metafásica y tienden a agruparse y localizar próximos unos respecto de otros. Además, esta posición proximal de los cromosomas NOR positivos se mantiene durante la interfase (Nagele y cols., 1998).

Los patrones de proximidad entre los cromosomas muestran una elevada variabilidad en el núcleo interfásico, lo que indica que la organización no aleatoria de los cromosomas representa una distribución de probabilidades en la que los cromosomas y los genes adquieren una posición preferencial en el núcleo (Parada y cols., 2003). Varios autores han demostrado que la posición de los cromosomas se establece en anafase y que, una vez que éstos han adquirido un lugar determinado dentro del espacio nuclear, éste se mantiene durante el ciclo celular (Manders y cols., 1999; Bridger y cols., 2000). El grado de libertad de movimiento de los cromosomas es probablemente mayor cuando las células entran en fase G1 del ciclo y disminuye en fase G1 tardía, S y G2, una vez establecidos los territorios cromosómicos. Este posicionado cromosómico se establece por la propia estructura

de los cromosomas y sus propiedades físicas, aunque también juegan un papel importante las interacciones con otros elementos nucleares. Los filamentos intermedios son el componente mayoritario de la lámina, una estructura subyacente a la membrana nuclear y también del interior del núcleo, y debido a que se unen al ADN y a las histonas se postula que ejercen restricciones a la movilidad de los cromosomas en interfase (Parada y Misteli, 2002).

Durante el ciclo celular, las interacciones de la cromatina con la membrana nuclear se rompen durante el período G2-M y se establecen nuevamente en la fase G1 temprana y concordantemente con esto se observa que los cromosomas individuales adquieren la mayor parte del volumen y la morfología rápidamente dentro de la primera hora en G1 (Muller y cols., 2010). Esto contrasta con el comportamiento de loci específicos en los que la reorganización es progresiva y la formación de lazos cromatínicos fuera de los territorios cromosómicos resulta de manera dinámica (Hubner y Spector, 2010). Algunos genes individuales son objeto de movimientos en el interior del núcleo y de cambios en la posición sujetos a la actividad transcripcional. La cromatina es una estructura dinámica en la que dominios cromosómicos pueden sufrir de manera frecuente movimientos rápidos y relativamente limitados o movimientos ocasionales que implican desplazamientos mayores. Las propiedades dinámicas de la cromatina se han observado *in vivo*, y las recientes evidencias aportan información sobre la importancia de la movilidad de la cromatina en la función. Los resultados sugieren que tanto la relocalización de genes como la inmovilización de la cromatina pueden suponer consecuencias funcionales. Los movimientos locales parecen importantes para la regulación génica, mientras que la cromatina fija interviene en el mantenimiento de la estabilidad en el genoma (Soutoglou y Misteli, 2007).

I.5.2 Organización funcional

El genoma se encuentra altamente organizado en el núcleo de las células eucariotas y esto no implica solamente una distribución no aleatoria de los territorios cromosómicos y genes en el espacio nuclear, sino también la distribución de los procesos biológicos como la replicación, la reparación y la transcripción del ADN. Todas las células de un organismo tienen la misma información genética, sin embargo, la expresión diferencial de los genes durante el desarrollo embrionario y en los tejidos determina el fenotipo. La información epigenética de la cromatina presenta la capacidad de modular la expresión y se transmite en cada ciclo en el genoma con el objeto de mantener la identidad celular (Blomen y Boonstra, 2011).

La maquinaria que regula la expresión a nivel genético y epigenético se distribuye en el núcleo en interfase organizada en microambientes (Stein y cols., 2010). Durante la replicación coexisten los complejos de metilación del ADN, la modificación de histonas y los complejos de lectura de las marcas epigenéticas que permiten el mantenimiento de la información en la cromatina y el control de la expresión (Cheng y Blumenthal, 2010). El control combinado de la transcripción implica la organización de complejos reguladores mediante interacciones proteína-ADN y proteína-proteína en sitios de unión estratégicos del promotor del gen (Weake y Workman, 2010). Efectivamente, estos procesos se llevan a cabo en compartimentos nucleares que son morfológicamente distinguibles por las proteínas que residen en ellos y que forman patrones característicos de una manera dinámica en el núcleo interfásico (Misteli, 2007) (Fig. 16).

El nucléolo es quizás el ejemplo paradigmático de organización funcional del genoma, es la subestructura más prominente del núcleo en la que los genes ribosomales se transcriben simultáneamente por la enzima ARN pol I. En humanos los genes ribosomales mapean en el brazo corto de los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22, que se encuentran en múltiples copias repetidas en tándem y codifican para los ARN de los ribosomas. De la misma manera la transcripción génica llevada a cabo por ARN pol II ocurre de una manera altamente organizada en el espacio nuclear. Experimentos de marcado fluorescente de las moléculas de ARN primario

permitieron determinar que la transcripción ocurre en puntos discretos distribuidos en todo el núcleo, en los que también se encuentra la enzima ARN polimerasa II (ARN pol II) (Wansink y cols., 1993). Sin embargo, se considera que la transcripción ocurre de manera organizada en “factorías” que contienen más de una molécula de polimerasa y donde se pueden transcribir varios genes simultáneamente (Cook, 1999; Chakalova y cols., 2005). Cabe mencionar que la mera presencia de la enzima no implica directamente transcripción génica, ya que también se ha observado en dominios inactivos o formando compartimentos nucleares en los que se almacenan y se reclutan los factores necesarios para la transcripción (Grande y cols., 1997; Mitchell y Fraser, 2008).

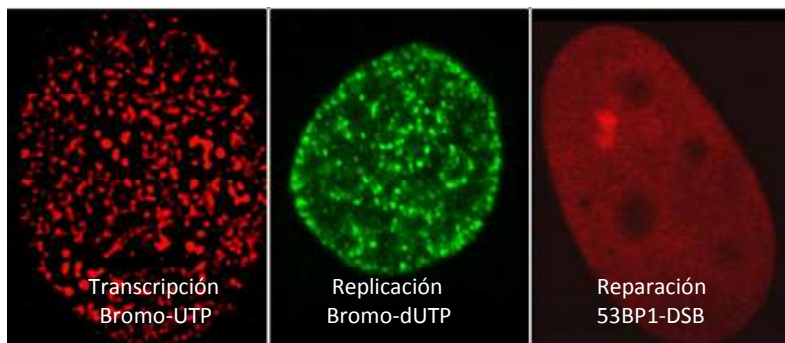


Fig. 16. Distribución de los procesos biológicos de transcripción, replicación y reparación en el núcleo interfásico (Misteli, 2007).

Los procesos de maduración del transcrito primario de ARN no ocurren simultáneamente en los sitios de transcripción, sino que ocurren en los espacios pericromatínicos que están enriquecidos en gránulos intercromatínicos llamados speckles o compartimentos de maduración. La función de estas estructuras es la de almacenaje y ensamblaje de los componentes de maduración del ARN (Markaki y cols., 2010).

Aparte de los compartimentos de maduración, otras estructuras intranucleares morfológicamente distinguibles relacionadas con la organización funcional del genoma son los cuerpos de Cajal, los cuerpos nucleares de la leucemia promielocítica (PML), los dominios de la proteína de la matriz extracelular opticina,

el compartimento perinucleolar, los paraspeckles y los cuerpos del grupo de proteínas polycomb (Kumaran y cols., 2008) (Fig. 17).

Las interacciones de las proteínas contribuyen al mantenimiento de la función del genoma (Hemmerich y cols., 2011). Un diagrama de organización espacial del genoma en el núcleo interfásico se describe en la figura 17, en el que intervienen las principales estructuras que componen el núcleo interfásico, los compartimentos nucleares, la distribución de los procesos biológicos y la organización de los elementos del genoma (Fig. 17).

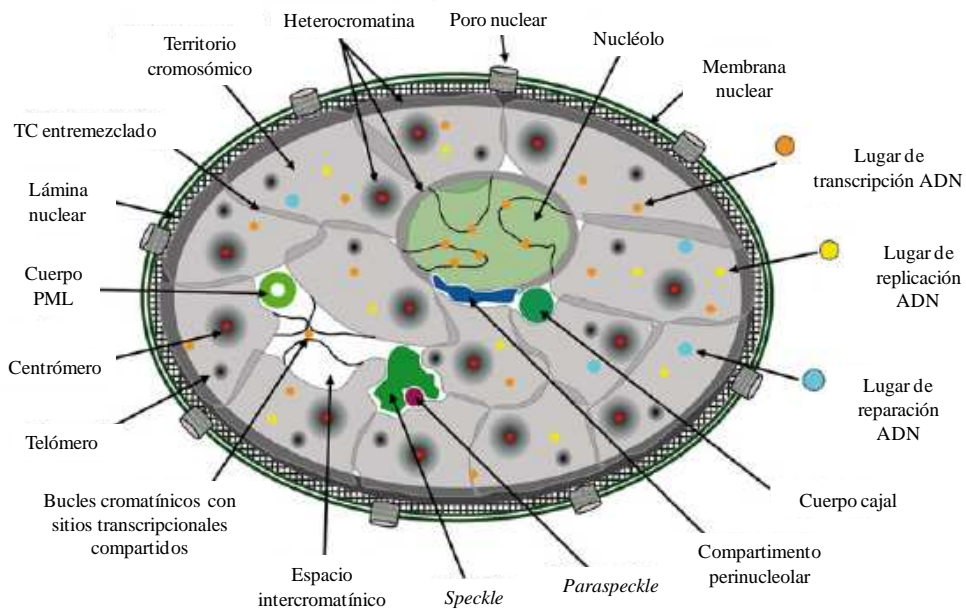


Fig. 17. Principales estructuras que componen el núcleo interfásico. Compartimentos funcionales y niveles superiores de organización de la cromatina (Hemmerich y cols., 2011). PML, leucemia promielocítica; TC, territorio cromosómico

Cremer y cols. propusieron un modelo de organización espacial de la regulación génica en el cual los factores necesarios para los procesos nucleares se localizaban en el espacio entre los territorios cromosómicos o espacio intercromatínico. De esta manera los complejos moleculares involucrados en la transcripción del ADN y maduración del ARN recorren el espacio intercromatínico y podrían formar complejos funcionales en torno al gen (Cremer y cols., 2000; Cremer y Cremer,

2001). La relajación de la cromatina y el reposicionamiento de los genes hacia la periferia de los territorios cromosómicos son dos aspectos críticos implicados en la reorganización nuclear ligada a la actividad génica (Morey y cols., 2007). Genes permanentemente silenciados se localizan en el interior del territorio cromosómico, en dominios de cromatina compacta que resultan inaccesibles para los factores de transcripción (Kurz y cols., 1996). Sin embargo, hay autores que demostraron que la transcripción no ocurre únicamente en la periferia de los territorios cromosómicos, indicando que estos territorios no son estructuras compactas, sino que por el contrario son entidades porosas con una amplia superficie de canales de espacio intercromatínico que penetran hacia el interior y que permiten el acceso de la maquinaria de la transcripción (Cmarko y cols., 1999).

El modelo de organización funcional descrito por Cremer, describe que los territorios cromosómicos presentan superficies con plegamientos complejos en los que los genes activos y las regiones codificantes se encontrarían en contacto con la maquinaria de la transcripción en la periferia de los territorios cromosómicos o formando asas de cromatina extendidas hacia el espacio intercromatínico (Fig. 18A). En el territorio cromosómico se pueden distinguir dominios para el brazo corto, el brazo largo y el centrómero de los cromosomas y la relocalización de los genes hacia la heterocromatina centromérica resulta en el silenciamiento génico, mientras que los genes que se están transcribiendo se disponen en bucles activos (Fig. 18B). Dentro del territorio cromosómico la cromatina puede encontrarse con diferentes niveles de compactación, más densa hacia el interior y próxima a la envoltura nuclear, mientras que la cromatina dispersa se expande hacia el espacio intercromatínico (Fig. 18C). Las características estructurales y funcionales de la cromatina también permiten diferenciar dominios de replicación tardía en la región perinuclear y el compartimento perinucleolar y la cromatina pobre en genes se sitúa preferentemente en la periferia junto a la lámina nuclear. Los dominios de replicación temprana y la cromatina con una densidad génica alta se disponen hacia el interior de los territorios cromosómicos (Fig. 18D), mientras que a nivel de las fibras cromatínicas la organización para la regulación transcripcional resulta más

compleja. Los genes activos pueden quedar en la superficie de la fibra y los genes silenciados hacia el interior. Alternativamente, los dominios de genes silenciados más compactos pueden adquirir una conformación más laxa o abierta para la transcripción (Fig. 18E). En el espacio intercromatínico se encontrarían los componentes necesarios para la transcripción, maduración, replicación y reparación del ADN (Fig. 18F y G).

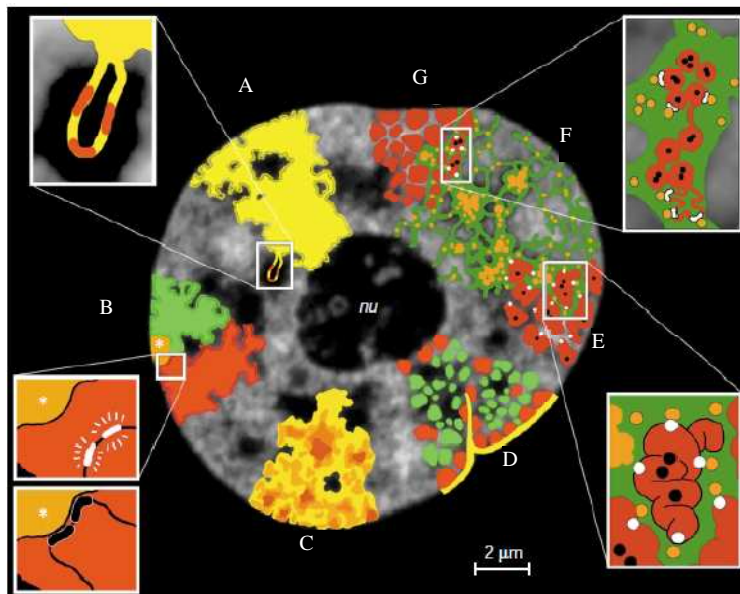


Fig. 18. Modelo de arquitectura funcional del núcleo. Asas de cromatina (A), relocalización de genes (B), composición de territorios cromosómicos (C), dominios de replicación (D), fibra de cromatina (E) y espacio intercromatínico (F y G) (Cremer y Cremer, 2001).

Más importante aún, los datos obtenidos hasta el presente indican que el efecto de la posición sobre la función de los genes parece ser mayor a nivel local, es decir en regiones específicas, más que sobre todo el territorio cromosómico (Francastel y cols., 2000).

En nuestro grupo hemos investigado la relación entre la organización espacial y la función de los genes *Myc*, *c-Met*, *IgF2r*, *Asb4* y *Zac1* en fibroblastos embrionarios de ratón (Royo y cols., 2009). Estos genes tienen una distribución radial similar, se localizan en una porción intermedia entre el centro y la periferia nuclear, pero no se

encuentran próximos entre sí en el núcleo en interfase. Interesante destacar que mediante 3D ARN-FISH descubrimos un patrón específico de localización de los sitios de transcripción respecto del nucléolo. De este modo, *Zac1* mapea en el cromosoma 10 de ratón, carente de genes ribosomales, y aún así este cromosoma se posiciona en estrecha proximidad al nucléolo. Nuestro estudio reveló que la transcripción del gen *Zac1* sucede en yuxtaposición al nucléolo y que la acumulación y retención de mARN en este punto actúa como un mecanismo de regulación de la expresión de la proteína (Royo y cols., 2009). Nuestros resultados agregan evidencia sobre otra función del nucléolo como es la intervención en la expresión proteica, además de las ya conocidas sobre la progresión del ciclo celular, la transcripción y el procesamiento del ARN no ribosomal (Boisvert y cols., 2007).

Recientemente, Papantonis y Cook retomaron la pregunta de si un gen transcribe debido a su posición en el espacio nuclear o si, por el contrario, la posición está determinada por la función de transcripción. Los datos existentes permiten a estos autores postular que las ARN polimerasas y los factores de transcripción juegan un papel central en la organización del genoma. Sin embargo cabe destacar que, como ocurre a menudo en biología, las estructuras pueden determinar la función (Papantonis y Cook, 2010). En concordancia con esta línea de pensamiento, Crutchley y colaboradores han definido un conjunto de características arquitectónicas del genoma que están muy relacionadas con la función; a saber: **1)** La organización local de la cromatina; **2)** las interacciones intracromosomales; **3)** las interacciones intercromosomales; y **4)** el ambiente genómico (Crutchley y cols., 2010).

Localmente, es decir, en regiones específicas del genoma, la cromatina puede encontrarse en un estado de compactación menor a la de los lazos cromatínicos (abierta) y esto se asocia frecuentemente con actividad transcripcional y viceversa (silenciada) cuando ésta es más compacta (de Laat y Grosveld, 2003) (Fig. 19A).

El orden lineal de los genes en un cromosoma no impide que se produzcan interacciones en cis ó intracromosomales, más aún la organización espacial de genes de un mismo cromosoma en interfase está estrictamente relacionada con la

regulación de la expresión (Fig. 19B). Por ejemplo, el gen de la β -globina está controlado por un elemento regulador LCR, distante 40-60 kb de la secuencia del gen, y aún así se ha demostrado que interaccionan físicamente en aquellos tejidos donde está activo mediante la formación de lazos cromatínicos y no así en aquellos tejidos, como el nervioso, donde se encuentra silenciado este gen (Tolhuis y cols., 2002). Inclusive, se ha demostrado que cuando el gen de la β -globina se activa durante la eritropoyesis se relocaliza distante de los bloques heterocromáticos que lo mantenían inactivo, formando lazos que se extienden incluso fuera del territorio cromosómico (Kosak y cols., 2002).

Los genes de los receptores olfativos presentan un comportamiento similar. La elección de los receptores olfativos que se expresan en una determinada neurona está mediada por las interacciones entre los genes y una secuencia potenciadora conocida como elemento H, localizado a 75 kb de los genes sobre el cromosoma 14. La interacción entre estos genes y el elemento H se establece a pesar de estar espacialmente separados en el núcleo (Lomvardas y cols., 2006). Parece que los contactos de la cromatina en cis de la región promotora y los elementos reguladores pueden resultar en un mecanismo de organización tridimensional del genoma para la expresión génica. De igual modo, se propone que las interacciones de los genes con sus elementos reguladores también pueden ser en trans o intercromosomales, es decir, en los que el control de la regulación génica está gobernado por el contacto entre loci de diferentes cromosomas en el espacio nuclear (Fig. 19C). Aunque este fenómeno se ha observado clásicamente en *Drosophila*, las evidencias en mamíferos son aún escasas (Williams y cols., 2010).

Por último, el concepto de ambiente genómico hace referencia al fenómeno de concentración de secuencias de ADN en una región del espacio nuclear como sinónimo de organización funcional del genoma (Fig. 19D). Genes que se encuentran co-regulados a menudo forman un grupo o dominio y comparten factorías de transcripción independientemente de su posición genómica.

Los genes *Igh* y *Myc* mapean en los cromosomas 12 y 15, respectivamente. A pesar de esta característica estructural, se observaron compartiendo el complejo ARN pol

II durante su transcripción coordinada en la misma región nuclear (Osborne y cols., 2007).

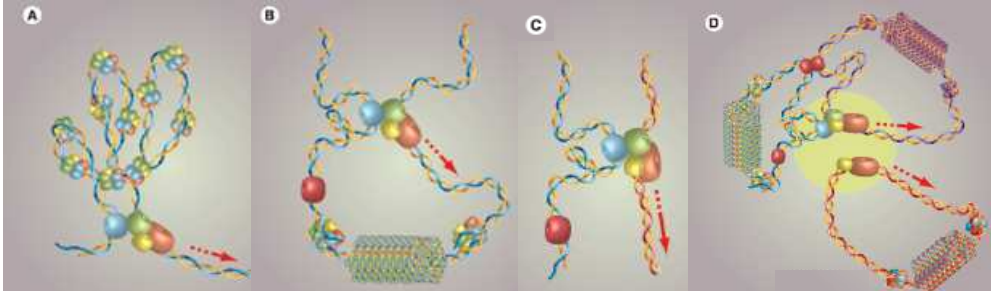


Fig. 19. Conformación de la cromatina. Nivel local (A). Interacciones de elementos de un mismo cromosoma o intracromosomales (B). Interacciones de elementos de distintos cromosomas o intercromosomales (C). Ambiente genómico (D) (Crutchley y cols., 2010).

Las modernas tecnologías de análisis de interacciones del genoma a gran escala, por ejemplo Hi-C que incluye la ligación de elementos físicamente próximos y la posterior secuenciación masiva, han servido para confirmar la existencia de un nivel superior de organización del genoma caracterizado por la segregación de la cromatina activa de la inactiva en dos compartimentos claramente distinguibles desde el punto de vista funcional.

Tal como se mencionara anteriormente, la heterocromatina transcripcionalmente inactiva, los cromosomas pobres en genes y otros elementos con baja expresión se sitúan en la periferia nuclear, mientras que los territorios cromosómicos con una alta densidad génica y transcripcionalmente activos localizan en el interior del núcleo (Lanctot y cols., 2007). Se han descrito varios ejemplos de genes que siguen un comportamiento similar, es decir, que adquieren una localización hacia la periferia del núcleo en estado inactivo. Sin embargo, no se puede tomar como un fenómeno general a todos los genes, ya que se observaron casos en los que los elementos inactivos se trasladan desde la periferia hacia el interior del núcleo (Takizawa y cols., 2008a). También hay evidencias de genes activos en la periferia del núcleo o incluso en la cromatina densa (Dimitri y cols., 2005).

El proceso de reorganización del genoma en respuesta a cambios funcionales es claramente visible durante el proceso de diferenciación. Por ejemplo, en células T de

ratón ocurre una reorganización general del núcleo a nivel del centrómero, los cromosomas y los genes conforme los linfocitos T maduran desde el estado CD4/CD8 doble negativo a CD4 o CD8 positivos simples, donde se observan cambios en la posición radial de los genes y del cromosoma 6 (Kim y cols., 2004). El ejemplo paradigmático lo constituye el cromosoma X inactivo en las células femeninas, que se localiza en la periferia del núcleo altamente compacto (Lyon, 1961).

En resumen, la regulación de la expresión génica ocurre a múltiples niveles y los diferentes niveles de organización estructural de la cromatina tienen como objeto maximizar la eficiencia génica y regular el estado funcional del genoma (Zhou y cols., 2007; van Steensel, 2011).

I.6 Organización del genoma en células con alteraciones cromosómicas

Además de la implicación en los procesos de transcripción, también se ha demostrado que la organización del genoma (efecto de proximidad) es un factor que tiene un papel importante en la generación de las traslocaciones cromosómicas específicas de tumores (Parada y Misteli, 2002). La traslocación entre los cromosomas 9 y 22 humanos está presente en el 85% de los pacientes con leucemia mieloide crónica (Rowley, 2001). Las investigaciones sobre la distribución de estos dos cromosomas en leucocitos normales, es decir, previo al desarrollo del tumor, demostraron que éstos ocupan una posición central en núcleo y, además, localizan estrechamente uno al lado del otro. Se observaron resultados similares para los cromosomas 15 y 17 que sufren traslocaciones en pacientes de leucemia promielocítica aguda (Druker y cols., 2001).

Los genes *Myc*, *Bcl* y el locus de la inmunoglobulina (IGH), involucrados en las traslocaciones específicas de los linfomas de Burkitt y las leucemias linfocíticas humanas, guardan proximidad espacial en el núcleo interfásico de células normales y la distancia entre los genes que participan en una determinada traslocación se correlaciona de forma directa con la frecuencia en la que esas traslocaciones se presentan en los pacientes (Roix y cols., 2003).

En los tumores sólidos, se ha encontrado una correlación similar entre la posición relativa de los cromosomas o genes involucrados en rearrreglos genómicos. Las traslocaciones recíprocas entre los cromosomas 5 y 6 son características de los tumores hepáticos originados en ratones transgénicos *c-myc/TGF* (Sargent y cols., 1999). Los estudios sobre la organización espacial de estos dos cromosomas en los hepatocitos de ratones salvajes, de la misma línea de los transgénicos, revelaron que se ubican próximos uno respecto del otro en el espacio nuclear, formando un par yuxtapuesto en el 68% de las células (Parada y cols., 2004).

Sengupta y colaboradores estudiaron la distribución espacial del cromosoma 7, junto con los territorios cromosómicos 18 y 19, en células en las que introdujeron artificialmente un cromosoma extra y la compararon con la posición del mismo cromosoma en las células parentales diploides. Estos autores detectaron que los cromosomas introducidos artificialmente, es decir, que generaban una situación de aneuploidía, localizaban en una posición radial similar a la del homólogo endógeno (Fig. 20) (Sengupta y cols., 2007).

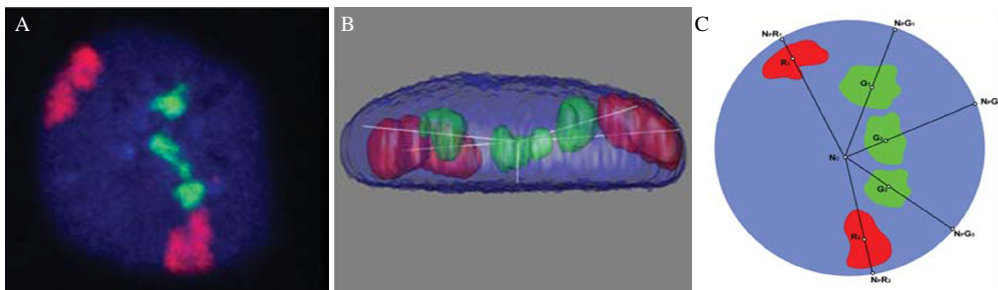


Fig. 20. FISH del territorio cromosómico 7 (rojo) y 19 (verde) en una célula aneuploide (A). Reconstrucción tridimensional (B) y análisis de posición radial (C). (Sengupta y cols., 2007).

La localización de los cromosomas 18 y 19 en los linfocitos humanos constituyó un descubrimiento relevante en el campo de la arquitectura nuclear. El cromosoma 19, con una alta densidad génica, ocupa una posición preferentemente central, mientras que el 18, pobre en genes, se localiza hacia la periferia del núcleo celular. El análisis de la distribución radial de los cromosomas 18 y 19 humanos en ocho líneas celulares tumorales con reordenamientos cromosómicos complejos reveló

diferencias entre las células normales y las líneas tumorales. En siete de las ocho líneas celulares tumorales analizadas, los autores observaron una posición radial de los territorios cromosómicos invertida, es decir, el cromosoma 18 pobre en genes localizaba en el interior y el par cromosómico 19, con una densidad génica mayor, próximo a la periferia. Estos resultados indican que durante la tumorigénesis se produce una pérdida de la organización radial de los cromosomas en el núcleo interfásico (Cremer y cols., 2003).

Está ampliamente aceptado que en plantas las aneuploidías no tienen el mismo efecto deletéreo que en animales. Inclusive es una práctica común la generación de especies con incremento en el complemento genómico con fines de investigación o mejora vegetal. Huettel y colaboradores generaron especies de *Arabidopsis thaliana* con trisomía del cromosoma 5 y determinaron la distribución espacial de algunas secuencias específicas de los cromosomas supernumerarios y la expresión de genes presentes en este cromosoma. Sus resultados en este sistema vegetal indicaron que la trisomía no distorsionaba la distribución espacial de las secuencias utilizadas en el estudio, pero sí observaron una disminución del estado transcripcional del genoma en su totalidad (Huettel y cols., 2008).

Petrova y colaboradores realizaron un estudio de la posición radial de la región centromérica de los cromosomas 1 y X en un caso excepcional de polisomía en un humano (49,XXXXY) y lo compararon con la distribución de esos cromosomas en los fibroblastos de un varón normal (46,XY). Estos autores observaron que la región centromérica y quizás el territorio completo de los cromosomas X activos tenían una localización similar en ambos tipos celulares, mientras que los cromosomas X inactivos (corpúsculos de Barr) se encontraron más próximos a la periferia. De forma interesante, la posición radial del cromosoma 1, con una alta densidad génica y que supuestamente debería localizar hacia el centro del núcleo, se vio afectada por la presencia de los cromosomas sexuales adicionales en las células del paciente con un cariotipo 49,XXXXY (Petrova y cols., 2007).

A pesar de estos avances, el volumen de información acerca de la organización espacial del genoma y la relación que guarda con las funciones del núcleo en las

células aneuploides no tumorales son aún muy escasos.

De ahí que el objetivo principal durante el presente proyecto de tesis doctoral ha sido obtener información sobre la posición de los cromosomas/genes en el núcleo de células con variaciones en el número de cromosomas individuales, así como también de conjuntos completos de cromosomas; y a su vez entender cómo la localización de los cromosomas adicionales podía influir en la expresión de los genes.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.1 Hipótesis

El genoma se encuentra altamente organizado en el espacio nuclear de las células eucariotas. Los cromosomas y los genes ocupan posiciones preferentes en el núcleo interfásico, respecto del centro, de la periferia y de otros genes. En la actualidad se cuenta con un volumen importante de evidencias que apoyan la noción de que la organización espacial del genoma tiene influencia sobre la función del mismo y viceversa.

Por otro lado, el genoma de todas las células de un individuo presenta un número y estructura de cromosomas característico. En la naturaleza ocurren variaciones en el número y estructura de estos cromosomas que tienen consecuencias deletéreas e inclusive pueden llegar a ser incompatibles con la vida. Cuando las aneuploidías o variaciones en el número de cromosomas ocurren en las células germinales son una causa común de enfermedades congénitas en humanos. De este modo, la trisomía 21 es la causa del Síndrome de Down, que ocurre en 1 de cada 600 nacidos vivos, y el desequilibrio en la dosis génica en el Síndrome de Down se considera responsable de los signos y síntomas de esta patología.

Los conocimientos sobre la organización espacial del genoma en células aneuploides, así como sobre cómo influye el aumento de la ploidía en la función del genoma en relación con la arquitectura nuclear son aún escasos. En particular, se desconoce cómo se distribuyen los cromosomas del par 21 humano, así como los genes de la DSCR en el núcleo interfásico de las células de pacientes con Síndrome de Down y la relación que esto guarda con su expresión génica.

En el presente trabajo postulamos que la organización espacial del genoma en el núcleo interfásico de células aneuploides influye en la expresión de sus genes. Por ello, pensamos que la posición de los genes de la DSCR en el núcleo interfásico podría estar relacionada con su función en el Síndrome de Down.

II.2 Objetivos

De acuerdo a la hipótesis propuesta, los **objetivos generales** del presente trabajo se centran en:

1. Estudiar la organización espacial del genoma de las células normales y las aneuploides
2. Determinar la expresión relativa de genes en las células normales y las aneuploides
3. Investigar la relación entre la distribución espacial de los genes en el núcleo interfásico y su expresión génica, en células normales y aneuploides.

Y los **objetivos específicos** que se llevarán a cabo son:

1. Organización espacial genómica en células normales y aneuploides
 - 1.1. Determinar la posición radial y la posición relativa de los cromosomas 5, 6, 15 y 16 en células de ratón con diferentes ploidías.
 - 1.2. Determinar las posiciones radial y relativa de los genes *Socs1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a* que localizan sobre el cromosoma 16 en células de ratón con diferentes ploidías.
 - 1.3. Determinar la posición radial y la posición relativa del cromosoma 21 en células humanas diploides normales y en células aneuploides con trisomía 21.
 - 1.4. Determinar las posiciones radial y relativa de los genes de la DSCR *SODI* y *DYRKIA* en células humanas diploides normales y en células aneuploides con trisomía 21.
2. Expresión génica en células normales y aneuploides
 - 2.1. Determinar la expresión génica, a nivel ARN y proteínas, en células de ratón triploides.
 - 2.2. Determinar la expresión génica, a nivel ARN y proteínas, en células humanas con trisomía 21.
3. Relación entre la distribución espacial de los genes y su expresión
 - 3.1. Cuantificar la intensidad de fluorescencia de la enzima ARN pol II en la región donde se localizan *SODI* y *DYRKIA* en el núcleo en interfase, tanto en células humanas normales como con trisomía 21

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Cultivos celulares

III.1.1 Líneas celulares

Se emplearon cuatro líneas celulares de ratón con diferente nivel de ploidía y dos líneas celulares humanas en cultivo.

Las células murinas utilizadas, G7 (diploide), NIH3T3 (triploide), P16 y LB4 (tetraploide), presentan un contenido genómico estable, al contrario que las líneas celulares tumorales, que en la mayoría de los casos presentan alta inestabilidad cromosómica, es decir, pérdidas y ganancias constantes de cromosomas. Las células G7 son fibroblastos embrionarios de ratón con una carga genética normal de 20 pares de cromosomas, mientras que la línea celular de fibroblastos triploide NIH3T3 tiene 66 cromosomas, la línea de fibroblastos tetraploide LB4, 78 cromosomas y la línea de fibroblastos P16, 82 cromosomas. La morfología de estas células es aplanada y crecen adheridas a la superficie de la placa. Las células se sembraron a razón de 1×10^6 células por placa de 100 mm o 1×10^5 células por pocillo en las placas de 6 pocillos y el medio de cultivo consistió en DMEM F:12 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina, 1% L-glutamina para las líneas G7, P16 y LB4, mientras que para la línea celular NIH3T3 consistió en medio RPMI suplementado igualmente con 10% suero fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina y 1% L-glutamina.

Las líneas celulares GM03714 y 4710-176 derivadas de linfocitos humanos diploides y portadores de la trisomía para el cromosoma 21, respectivamente, fueron gentilmente donadas por el Dr. Antonarakis (Universidad de Ginebra, Suiza) y se cultivaron en suspensión en medio RPMI-Glutamax (GIBCO) suplementado al 10% con suero fetal bovino y 1% de la mezcla de antibióticos penicilina-estreptomicina. Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37°C en atmósfera húmeda que contiene un 5% de CO₂.

III.1.2 Cultivos primarios de neuronas de ratón

Se utilizaron un total de 10 ratones hembra C57BL/6J de genotipo salvaje (WT) preñadas que fueron sacrificadas el día 16,5 de gestación (E16.5) mediante dislocación cervical. La totalidad de los embriones se transfirieron a una placa de

Petri de 100 mm con 10 ml de solución salina de Hanks (HBSS, *Hanks Balance Salt Solution*). El cerebro de cada uno de los embriones fue extraído quirúrgicamente y transferidos a una nueva placa de Petri conteniendo 3 ml de HBSS en la que se procedió a quitar las meninges y eliminar el bulbo olfatorio e hipocampo en condiciones de esterilidad y manteniendo el material sobre un baño de hielo.

Para el aislamiento de las células neuronales, la corteza cerebral de todos los embriones se transfirió a un tubo cónico de 15 ml y se incubó con 400 µl de una solución de Tripsina (2,5%) y 80 µl de ADNasa I (0,4%) durante 5 min a 37°C. Una vez completada la digestión con estas enzimas se agregaron 4,5 ml de medio Neurobasal/Suplemento B27 (1:1), suplementado con 1% L-glutamina, 1% PSF (penicilina-estreptomicina-fungizona) y 10% suero fetal bovino (NBSFB). Posteriormente, el tejido digerido se centrifugó 5 min a 1000 rpm, se resuspendió en 1 ml de medio NBSFB fresco y se disgregó mecánicamente mediante el pasaje del material a través de agujas de calibre 25G, 23G y 21G (10 pases por cada una).

La suspensión celular resultante se filtró a través de filtros de nylon y se determinó la viabilidad celular mediante el recuento de células en cámara de Neubauer con trypan blue. Las neuronas primarias se sembraron a razón de $4-6 \times 10^5$ células por pocillo de una placa de 6 pocillos, provisto cada uno de ellos de un cubreobjetos de 22x22 mm tratados con poli-L-ornitina 0,01% y 2 ml de NBSFB. El medio original se reemplazó por medio NB sin suero fetal bovino 1 día después de la-siembra. Las células adheridas a los soportes de vidrio se fijaron mediante diferentes procedimientos 3 días después de la-siembra, conforme a necesidades experimentales específicas (ver más adelante).

III.1.3 Pretratamiento de los soportes celulares

Cubreobjetos de 22x22 mm se trataron con poli-L-ornitina al 0,01%. Sobre la superficie del portaobjetos se aplicaron 500 µl de la solución durante 1 hora en campana de cultivo celular y se realizaron tres lavados sucesivos con agua durante 10 minutos. La matriz de poli-L-ornitina se dejó secar en campana durante 1 hora y las placas se conservaron a 4°C.

III.1.4 Fijación de las células para microscopía de fluorescencia

La detección y caracterización de estructuras celulares se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta. Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 10 minutos y se permeabilizaron con tampón Tris suplementado al 0,5% con Tritón X-100. Posteriormente se realiza la incubación con los anticuerpos primarios correspondientes y los secundarios conjugados con moléculas fluorescentes. Alternativamente, para la técnica inmunocitoquímica las células se fijaron en paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron las membranas con PBS 1x/Tritón X-100 0,5% durante 20 minutos. Seguidamente las preparaciones se lavaron 3 veces con TBS 1x durante 5 minutos cada vez y se repitió la permeabilización con TBS/Tritón X-100 0,1%.

II.1.5 Inmunofenotipado celular

Las preparaciones neuronales fijadas se incubaron con una solución de albúmina 2% en TBS 1x 0,05% y Tween 20 (A2TBST) durante 45 minutos para bloquear los lugares de unión inespecíficos y, posteriormente, con los anticuerpos primarios y en las condiciones que se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Anticuerpos primarios y condiciones de incubación.

ANTICUERPO	HUÉSPED	DILUCIÓN	DISOLVENTE	TIEMPO DE INCUBACIÓN
Neun	Ratón	1/200	A2TBST	45 min
INCEP	Conejo	1/100	A2TBST	45 min
NPMN	Ratón	1/100	A2TBST	30 min

INCEP: proteína centromérica interior; Neun: proteína neuronal nuclear; NPMN: nucleofosmin o fosfoproteína nucleolar B23.

Para el revelado de la reacción antígeno-anticuerpo las preparaciones se lavaron con 4xSSC/Tween 20 0,1% (4T) durante 5 minutos y 2 veces con TBS 1x durante 5 minutos. Posteriormente, se incubaron con la solución de anticuerpo secundario apropiado y conjugado con Texas Red.

Para el revelado de las reacciones inmunocitoquímicas el método fue completamente

enzimático (no fluorescente) e incluyó el uso de anticuerpos secundarios conjugados a fosfatasa alcalina o peroxidasa. La reacción de éstos se pone de manifiesto por medio de la incubación con los sustratos adecuados de estas enzimas: el rojo rápido para la fosfatasa alcalina y la diaminobencidina para la peroxidasa.

Finalmente las preparaciones se montaron con Vectashield® (Vector) y se analizaron bajo un microscopio confocal Leica DMire2, con un objetivo 63X de inmersión o un microscopio Olympus CellR de fluorescencia con un objetivo 100X.

III.2 Preparación de los cromosomas en metafase

Se cambió el medio de cultivo a las células aproximadamente 12 horas antes del procedimiento. La división celular se detuvo en estadio de metafase agregando colcemida (0,03-0,04 µg/ml) al cultivo e incubando a 37°C durante 3 horas.

Las células se despegaron del soporte de cultivo con tripsina-EDTA 0,05% y la suspensión celular se transfirió a un tubo cónico y se centrifugó a 250xg durante 10 min. El precipitado celular se resuspendió en 5 ml de solución hipotónica, KCl 0,056 M previamente calentado a 37°C, y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Las células se fijaron con una mezcla de metanol/ácido acético 3:1 en hielo, tres veces consecutivas en un volumen final de 5 ml respectivamente. Las células fijadas se conservaron a -20°C. Las preparaciones se realizaron al menos 1 día después de la fijación depositando gotas de la suspensión celular sobre portaobjetos de vidrio limpios.

III.3 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) es una tecnología que utiliza sondas de ADN marcadas con nucleótidos modificados con digoxigenina o biotina, que a su vez se pueden detectar mediante anticuerpos o haptenos marcados con fluorescencia. Este procedimiento conlleva la desnaturalización del ADN de la muestra (cromosomas metafásicos o en interfase) y del ADN de la sonda marcada e induce la separación de las hebras complementarias de la doble hélice. La incubación de la muestra desnaturalizada con la sonda de interés, también desnaturalizada, conduce a la formación de un híbrido de doble hélice en el sitio diana marcado con

fluorescencia que se puede detectar por medio de microscopía de fluorescencia. El ensayo FISH puede usarse sobre células en metafase para detectar deleciones, para identificar material extra de origen desconocido o para detectar reordenamientos estructurales como los que se observan en ciertos cánceres. También se aplica a células en interfase, como por ejemplo en la detección de aneuploidías en células del fluido amniótico o en los estudios de organización espacial del genoma en el núcleo interfásico (Fig. 21).

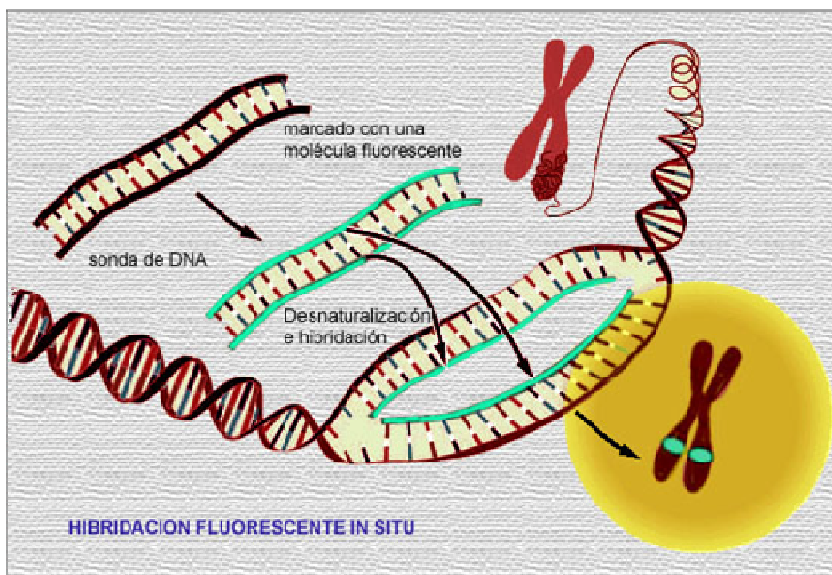


Fig. 21. Esquema del fundamento de la técnica FISH. Hibridación locus específico.

El procedimiento para el método de FISH es sumamente extenso y complejo, por lo tanto la descripción del protocolo se dividirá en partes.

III.3.1 FISH de cromosomas enteros (pintado cromosómico)

Mediante este método es posible visualizar la totalidad del cromosoma. Para la generación de sondas dirigidas a cromosomas específicos es necesario obtener el ADN molde mediante aislamiento mecánico (*sorting*) o manual por microdissección de los cromosomas metafásicos. El marcaje del ADN se realiza mediante PCR.

-DOP-PCR (*Degenerate Oligonucleotide Primer* PCR)

Esta reacción utiliza cebadores inespecíficos y nucleótidos (dNTPs) unidos a biotina o digoxigenina que permiten amplificar fragmentos de ADN de diferentes tamaños y, simultáneamente, incorporar los nucleótidos modificados.

El producto es una mezcla de fragmentos de PCR marcados que hibridan sobre toda la secuencia del cromosoma. Los reactivos necesarios se describen en la Tabla 3, mientras que las condiciones de la reacción incluyen: desnaturalización del ADN a 94°C durante un minuto, unión de los cebadores a 56°C durante un minuto y elongación a 72°C durante tres minutos con 1 segundo adicional en cada uno de los 29 ciclos que conforman la reacción total y una etapa final de incubación a 72°C durante diez minutos. El producto de la reacción se guarda a -20°C.

-Pretratamiento de los cromosomas

Con el objeto de facilitar la hibridación, los restos de citoplasma se digirieron con una solución de pepsina 0,001%-0,005% (P/V) en HCl 0,01M a 37°C. Se incubaron los portaobjetos en esta solución durante 2-10 minutos, controlando periódicamente el procedimiento bajo el microscopio de contraste de fase. Las preparaciones se lavaron sucesivamente en PBS 1x (sin CaCl²/MgCl²) y PBS 1x (con MgCl²) a temperatura ambiente durante 5 min cada vez. Posteriormente se fijaron en formaldehído 1% en PBS 1x durante 10 min y se lavaron nuevamente con PBS 1x (con MgCl²). Se deshidrataron en una serie de alcohol etílico 70%, 90% y 100% por espacio de 2 min en cada una de ellos y los portaobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente. En el caso de FISH 3D se omitió la deshidratación en alcoholes para evitar la distorsión de la arquitectura nuclear.

Tabla 3. Reactivos utilizados para el marcado de los cromosomas mediante DOP-PCR.

VOLUMEN	REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
10 µl	Tampón 10x PCR	
8 µl	50 mM MgCl ₂	
5 µl	Mezcla de dNTP	d-ATP, d-CTP y dGTP 0,2 mM d-TTP 0,15 mM
5 µl	dUTP modificados	Biotina-16 dUTP 0,05 mM Digoxigenina-11dUTP 0,05 mM
65 µl	Agua	
2 µl	Primer Telenius	0,2 µM Humano [5'CCGACTCGAGNNNNNNATGTG-3'] Ratón [5'-CGTACTCGAGNNNNNTACAGC-3']
1 µl	Taq ADN Polimerasa	5 U/µl
4 µl	ADN cromosómico	100-150 ng

-Desnaturalización de la sonda

Las sondas de pintado cromosómico se prepararon disolviendo el producto de DOP-PCR en una mezcla de formamida 50% en 2xSSC/sulfato de dextrano 10%. La alícuota de 12 µl de sonda se calentó a 80°C durante 7 minutos para su desnaturalización y posteriormente se incubó a 37°C durante 30 minutos para favorecer el bloqueo de las secuencias repetitivas.

-Desnaturalización de los cromosomas

La muestra se incubó en una solución de formamida 70%/2xSSC (F70) a 75°C durante 2-3 minutos para desnaturalizar el ADN diana y después se lavaron los preparados en una serie de alcohol etílico 70%, 90% y 100% conservados a -20°C.

-Hibridación

Se depositaron 8 µl de sonda sobre el área celular, se cubrió con un cubreobjetos de vidrio, se selló con cemento de pegar y se hibridó a 37°C durante 48 horas protegida de la luz en una cámara de hibridación húmeda herméticamente cerrada.

-Detección

Las preparaciones se lavaron sucesivamente en formamida 50%/2xSSC (F50), 1xSSC y 4xSSC/Tween 20 0,1% (4T) a 45°C durante 10 minutos cada vez. Después de estos lavados, se incubó con la solución de bloqueo de 3% albumina en 4T (4A) a 37°C durante 30 min y posteriormente con la solución de anticuerpos primarios a una dilución 1:100 en 4A durante 45 minutos, a 37°C y protegida de la luz. Posteriormente las preparaciones se lavaron con 4T a 45°C durante 10 min y se incubaron con la solución de anticuerpos secundarios diluidos 1:100 en 4A durante 45 min a 37°C protegidas de la luz. Finalmente se lavaron 3 veces en 4T a temperatura ambiente y una vez en agua destilada (3 min cada vez). Se tiñó el ADN con DAPI (1 μ g/ml en PBS) y se montaron las preparaciones con Vectashield® (Vector).

III.3.2 FISH locus específico

Para generar sondas específicas de locus (gen) el ADN molde se obtiene de cromosomas bacterianos artificiales (*Bacterial Artificial Chromosome*, BAC). Los BAC contienen el fragmento (aproximadamente de 200 kb) de ADN genómico humano o de ratón del gen de interés. El estudio de la organización del genoma en ratón se realizó para los genes *Socs1* (*Suppressor of cytokine signaling 1*), *Sod1* (*Superoxide dismutase 1*), *Dscr3* (*Down syndrome critical region gene 3*) y *Dyrk1a* (*Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase*). Son genes que mapean sobre el cromosoma 16, el primero en una región centromérica (Chr16 B1, bp: 10.695.821-10.699.114) y el resto en una región telomérica (Chr16 C3.3, bp: 90.220.987-90.226.569; chr16 C4, bp: 94.719.390-94.748.437; y chr16 C4, bp: 94.833.067-94.914.006). El gen homólogo de *Socs1* en humanos también mapea sobre el par cromosómico 16, sin embargo, los genes homólogos de *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a* mapean en el cromosoma 21 en torno a la DSCR (Fig. 22).

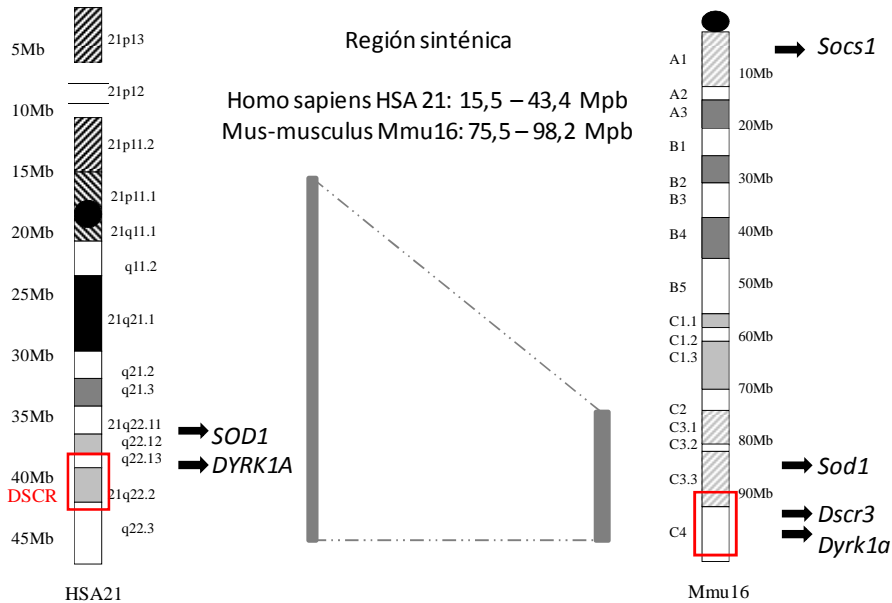


Fig. 22. Diagrama de la región sinténica de cromosoma 21 humano (HSA21) y del cromosoma 16 murino (Mmu16) que incluye la región crítica de Síndrome de Down (DSCR).

La búsqueda de clones se realizó en las bases de datos <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> o <http://www.ensembl.org/index.html>. Para la preparación de las sondas locus específicas se seleccionaron los clones RP23-203B24 (Mbp: 10.62-10.86) que incluían la secuencia genómica de *Socs1*; RP23-118L24 (Mbp: 90.02- 90.25) para *Sod1*; RP23-115D20 (Mbp: 94.57-94.80) para *Dscr3* y RP23-62H3 (Mbp: 94.80-94.95) para *Dyrk1a* (Tabla 4). Los clones fueron adquiridos del *Children's Hospital Oakland Research Institute* (CHORI). En ratón se diseñaron experimentos de hibridación por parejas de genes según la distancia genómica que los separaba. *Socs1* y *Dyrk1a* distan 84.5 Mbp, se consideran genes distantes. *Sod1* y *Dscr3* distan 4,5 Mbp y se consideran genes proximales. El estudio de la organización del genoma en humanos se realizó para los genes *SOD1* y *DYRK1A*, genes implicados en la patología del Síndrome de Down. Éstos mapean sobre el brazo largo del cromosoma 21, Chr21q22.11 (bp: 33.031.935 – 33.041.244) y Chr21 q22.13 (bp: 38.738.636 – 38.888.280), respectivamente. Los clones utilizados para preparar las sondas locus específicas RP11-30D17 (Mbp: 32.98- 33.15) para el gen *SOD1* y RP11-777J19 (Mbp: 38.72-38.89) para el gen *DYRK1A* fueron gentilmente donadas

por el Dr. Mariano Rocci (Universidad de Bari, Italia). La distancia entre estos genes es de 5,7 Mbp en la secuencia genética, por lo tanto, se consideran genes proximales.

Tabla 4. Genes, localización en el cromosoma humano y de ratón y sus correspondientes BAC para la preparación de las sondas FISH.

GEN	RATÓN	BAC	GEN	HUMANO	BAC
<i>Socs1</i>	16qA1	RP23-203B24			
<i>Sod1</i>	16qC3.3	RP23-118L24	<i>SOD1</i>	21q22.11	RP11-30D17
<i>Dscr3</i>	16qC4	RP23-115D20			
<i>Dyrk1A</i>	16qc4	RP23-62H3	<i>DYRK1A</i>	21q22.13	RP11-777J19

-Extracción del ADN

Previamente, las bacterias conteniendo los fragmentos clonados se cultivaron de acuerdo a métodos convencionales en medio LB líquido durante 16 horas, a 37°C en agitación continua (220 rpm). El antibiótico utilizado para la selección de los BAC fue el cloranfenicol a la concentración de 12,5 µg/ml. La extracción de ADN se realizó mediante protocolos rutinarios (*MiniPrep Kit; Quiagen*). Se centrifugaron 6 ml de cultivo bacteriano a 4.400 rpm a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se descartó completamente el sobrenadante y el precipitado se disolvió en 300 µl de tampón Tris-HCl pH 7,0 que contenía ARNasa. Las paredes bacterianas se rompieron con 300 µl de solución de lisis NaOH/SDS y el ADN se retiene en la fase acuosa con 300 µl de solución de acetato de potasio (KOAc) en hielo. Se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Finalmente el ADN del sobrenadante se precipitó con isopropanol y se recuperó con 100 µl de agua destilada. Previo al marcado se midió la concentración y se analizó la calidad del material en gel de agarosa 1,5%.

-Nick translation

El marcado de ADN extraído de BAC se realiza mediante *Nick Translation*, basado en la utilización de una mezcla de ADN exonucleasa (0,01 mg/ml) y ADN polimerasa (fragmento Klenow) que producen muescas en la cadena polinucleotídica e introducen nucleótidos marcados simultáneamente y sin amplificación de material. La concentración y el volumen de los reactivos se indican en la Tabla 5. La reacción de marcado se realizó en un termociclador de BioRAD a 15°C durante 2 horas en un volumen final de 100 µl. Posteriormente se detuvo agregando 1 µl de EDTA 0,5 M e incubando 10 minutos a 65°C. La calidad de la sonda preparada (longitud de los fragmentos) se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5%. El ADN marcado forma un chorreado característico que debe oscilar entre 300-500 pares de bases. Los productos de la reacción se almacenaron a -20°C.

Tabla 5. Volumen de los reactivos para el marcado de ADN mediante Nick translation y concentración final en un volumen de 100 µl.

VOLUMEN	REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
x µl	ADN	≈ 2 µg
10 µl	Solución Tampón 10x	TrisHCl 0,5 M pH 8, MgCl ₂ 0,05 M Albúmina bovina 0,5 mg/ml
10 µl	β-mercaptoetanol	0,1 M
10 µl	Mezcla de dNTP	d-ATP, d-CTP, dGTP 0,05 M d-TTP 0,01 mM
4 µl	dUTP modificados	Biotina-16 dUTP 0,04 mM Digoxigenina-11 dUTP 0,04 mM SpRed, Fluoresceína 0,025 mM
1 µl	ADNasa	0,0001 mg/ml
2 µl	ADN polimerasa	10 U
x µl	Agua	

III.3.3 FISH sobre células metafásicas

Los cromosomas metafásicos humanos y de ratón tienen una morfología lineal en la que el orden de las señales fluorescentes de la sonda coincide con el orden de las secuencias de interés en el genoma, por lo que la interpretación es directa. El diseño de la sonda se realizó atendiendo a las condiciones de la hibridación, para cromosomas enteros (pintado cromosómico), para elementos génicos concretos (FISH locus específico) y para el cromosoma completo combinado con un gen. La hibridación sobre células en metafase de humanos y de ratón permitió validar la sonda, lo que determina que el ADN marcado mapea en la región genómica correcta en células normales.

-Precipitación de la sonda FISH

En ratón se diseñaron experimentos de hibridación por parejas de genes según la distancia genómica que los separaba. *Socs1* y *Dyrk1a* distan 84.5 Mbp y se consideraron genes distantes. *Sod1* y *Dscr3* distan 4,5 Mbp y se consideraron genes proximales. En los experimentos con humanos se empleó la pareja *SOD1- DYRK1A*. Para preparar la sonda de hibridación se mezclaron en un tubo de microcentrífuga 50-100 ng de ADN de cada uno de los miembros de la pareja marcados individualmente con biotina o digoxigenina, 4 µg de COT ADN y 40 µg de ADN de esperma de salmón. Se añadió acetato de sodio 3M pH 5,2 0,1 parte/volumen y etanol 100% 3 partes/volumen, se incubó a -80°C 1 hora y se centrifugó a 12.000 rpm durante 30 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 6 µl de formamida 50%, 6 µl de sulfato de dextrano 10% en 2xSSC en baño de temperatura a 37°C.

-Hibridación sobre cromosomas en metafase

La sonda se desnaturalizó por calentamiento a 80°C durante 10 minutos y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Así preparada, la sonda se conservó en baño de hielo hasta el momento de su utilización. Los cromosomas metafásicos se estabilizaron en 2xSSC durante 10 minutos y se deshidrataron mediante lavados en una serie de etanol 70/85/100% durante 2 minutos en cada uno de las concentraciones de alcohol. La secuencia diana se desnaturalizó por calentamiento a 72°C durante 4 minutos en

formamida 70%. Inmediatamente se aplicó la sonda sobre los cromosomas. Se cubrió con un cubreobjetos de vidrio y se selló con cemento de pegar y se incubó durante 24-48h a 37°C en cámara húmeda.

-Lavados post-hibridatorios y revelado fluorescente

Las preparaciones se lavaron sucesivamente con F50, 1xSSC y 4T a 47°C durante 5 minutos en cada uno de estas soluciones y un último lavado en 4T a temperatura ambiente. Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con 4A durante 30 minutos a 37°C y posteriormente se lavaron en 4T. Para el revelado de la señal de biotina/digoxigenina se incubaron con una solución 1:200 de estreptavidina conjugada con Texas Red (rojo) y antidigoxigenina conjugada con FITC (verde) en 4A durante 45 minutos, a 37°C, en cámara húmeda y protegido de la luz. Finalmente, se lavó 2 veces en 4T durante 5 minutos cada vez, se deshidrató en la serie de alcoholes y se montó con Vectashield-DAPI (Vector).

III.4 FISH tridimensional en interfase

Para el estudio de la organización espacial del genoma se diseñó un protocolo específico de hibridación que permitía preservar la estructura tridimensional del núcleo. Cada tipo celular requirió ajustar las condiciones de fijación y de hibridación según sus características.

III.4.1 FISH sobre neuronas de ratón

Con el objeto de estudiar la organización espacial del genoma en interfase de células neuronales primarias, las células adheridas a los soportes de vidrio tratados con poli-L-ornitina se lavaron brevemente con PBS 1x y se fijaron con una solución de paraformaldehído 4% y ácido acético 1% en PBS 1x durante 10 min. La permeabilización de la membrana celular se realizó con una solución de Saponina 0,5%/TritónX-100 0,5% en PBS 1x durante 30 minutos. Posteriormente, las preparaciones se lavaron con PBS 1x y las células se trataron con HCl 0,1 N durante 20 minutos y se lavaron nuevamente con PBS 1x y 2xSSC. Para evitar la hibridación inespecífica del ARN las células se incubaron con una solución 100 µg/ml de

ARNasa (stock 20 mg/ml, dilución 1:200) en 2xSSC durante 30 min a 37°C. Finalmente las células se lavaron con 2xSSC durante 5 minutos y con F50. Las células se pueden conservar en esta solución a 4°C durante semanas.

-Precipitación de la sonda

Tal como se mencionó anteriormente, se utilizaron combinaciones de sondas para detectar en la misma hibridación dos genes simultáneamente. En la hibridación de neuronas se diseñó una primera sonda de genes distantes entre sí en la secuencia genómica, *Socs1*-Bio y *Dyrk1a*-Dig y una segunda sonda formada por genes que mapeaban próximos entre sí, *Sod1*-Bio y *Dscr3*-Dig. Se mezclaron en un tubo de microcentrífuga 50-100 ng de ADN marcado, 4 µg de COT ADN que cubría las secuencias repetitivas y 40 µg de ADN de esperma de salmón. Se añadió acetato de sodio 3M pH 5,2 0,1 parte/volumen y etanol 100% 3 partes/volumen, se incubaron a -80°C 1 hora y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 30 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 12 µl de una solución compuesta por formamida 50%/sulfato de dextrano 10%/ 2xSSC.

-Hibridación

La sonda se aplicó directamente sobre las preparaciones celulares fijadas en el cubreobjetos y se incubó conjuntamente durante 1 hora a 37°C en condiciones de humedad y protegido de la luz. Luego, se sometió a desnaturalización conjunta del ADN diana y de la sonda por calentamiento de las preparaciones en un termobloque a 80°C durante 9 minutos. Finalmente se incubó durante 72 h a 37° C en cámara húmeda.

-Lavados post-hibridatorios y revelado fluorescente

Las preparaciones se lavaron sucesivamente con F50, 1xSSC y 4T a 47° C durante 10 minutos en el primer paso y 5 minutos en cada uno de las soluciones subsiguientes, seguido de un último lavado en 4T a temperatura ambiente. Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con 4A durante 30 minutos a 37°C y se lavaron nuevamente en 4T. Para el revelado de la señal de biotina y digoxigenina se utilizó

un método de amplificación consistente en la incubación sucesiva con una solución 1:100 en 4A de anticuerpos anti-biotina (conejo) y anti-digoxigenina (ratón) y posteriormente con una solución 1:200 en 4A de anticuerpos secundarios anti-ratón conjugado con Texas Red y anti-conejo conjugado con FITC. La incubación con cada set de anticuerpos se llevó a cabo en cámara húmeda, durante 1 hora a 37°C e intercalada con 2 lavados en 4T durante 5 minutos entre cada una de las incubaciones. Finalmente, se coloreó con DAPI a una concentración 1 μ M en PBS 1x y se montó para fluorescencia con solución *Prolongfade*® (Molecular Probe).

III.4.2 Hibridación tridimensional de fibroblastos de ratón G7 y 3T3

Con el objeto de estudiar la organización espacial del genoma en interfase de fibroblastos de ratón, las células se dejaron crecer directamente sobre los cubreobjetos de vidrio hasta que alcanzaron aproximadamente un 60% de confluencia. Para realizar los experimentos las células se lavaron brevemente con PBS 1x y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS 1x durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las membranas celulares se permeabilizaron con una solución de saponina 0,5%/Tritón X-100 0,5% en PBS 1x durante 30 minutos y se lavaron con PBS 1x. Posteriormente las células se trataron con HCl 0,1 N durante 20 minutos y se lavaron con PBS y 2xSSC. Para evitar la hibridación inespecífica de ARN las células se incubaron con una solución 100 μ g/ml de ARNasa (stock 20 mg/ml, dilución 1:200) en 2xSSC durante 30 min a 37°C. Las células se conservan en formamida 50%/2xSSC a 4°C.

-Precipitación de la sonda

Para la hibridación en fibroblastos G7 y 3T3 se prepararon combinaciones de sondas para detectar los genes distantes *Socs1*-Bio y *Dyrk1a*-Dig y los genes *Sod1*-Bio y *Dscr3*-Dig que mapean próximos entre sí.

-Hibridación tridimensional

El procedimiento de hibridación en los fibroblastos G7 y 3T3 se realizó de forma similar al descrito para las neuronas, aunque con una ligera variación. Las

preparaciones celulares se dejaron escurrir para quitar el exceso de formamida 50%/2xSSC en el que se conservan las células y se les aplicó la sonda parcialmente desnaturalizada por calentamiento a 80°C durante 5 minutos. Cada preparación fue sellada con cemento sobre un portaobjetos y se sometió nuevamente a calentamiento a 75°C durante 7 minutos de forma conjunta. Finalmente se incubó durante 72 h a 37°C en cámara húmeda y protegido de la luz.

-Lavados post-hibridatorios y revelado fluorescente

Los lavados post-hibridatorios y el revelado fluorescente se realizaron igual que como se ha descrito para las neuronas primarias.

III.4.3 3D Inmuno-FISH en linfocitos de humano

Con el propósito de estudiar la organización espacial del cromosoma 21 y los genes de DSCR, se utilizaron las líneas celulares GM03714 y 4710-176 derivadas de linfocitos humanos disómicos y trisómicos, respectivamente. Debido a que estas células crecen en suspensión, los cultivos en fase de crecimiento se centrifugaron a 800 rpm durante 10 minutos y el precipitado de células se resuspendió en medio RPMI-Glutamax suplementado al 50% con SFB para favorecer la adhesión de los linfocitos al cubreobjetos de vidrio de 22x22mm previamente tratado con poli-L-lisina 0,1% en agua. Aproximadamente 5×10^5 células se depositaron sobre cada cubreobjetos y se dejaron sedimentar durante 1 hora en estufa de cultivo en las condiciones habituales. Una vez conseguida la adhesión de las células al soporte, se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS 0,3x durante 10 minutos. Las membranas celulares se permeabilizaron sucesivamente con una solución de saponina 0,5%/Tritón X-100 0,5% en PBS 1x durante 30 minutos y con HCl 0,1 N durante 20 minutos. Después, las preparaciones celulares se lavaron con PBS 1x y 2xSSC. Para evitar la hibridación inespecífica de ARN las células se incuban con una solución 100ug/ml de ARNasa (stock 20mg/ml, dilución 1:200) en 2xSSC durante 30 min a 37°C. Las células se mantuvieron en formamida 50%/2xSSC a 4°C hasta el momento de realizar las hibridaciones.

-Precipitación de la sonda

Para la hibridación en linfocitos humanos se utilizó una sonda combinada *SODI*-bio y *DYRK1A*-dig, que distan 5,7 Mbp en la secuencia genómica. Se mezclaron en un tubo de microcentrífuga 50-100 ng de ADN marcado de cada uno de los clones, 4 µg de COT ADN y 40 µg de ADN de esperma de salmón. Se añadió acetato de sodio 3M pH 5,2 0,1 parte/volumen y etanol 100% 3 partes/volumen, se incubaron las preparaciones a -80°C 1 hora y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 30 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 12 µl de una solución compuesta por formamida 50%/sulfato de dextrano 10%/ 2xSSC.

-Hibridación tridimensional

El procedimiento de hibridación en los linfocitos humanos se realizó de forma conjunta. Se aplicaron 6 µl de sonda sobre los cubreobjetos y éstos se invirtieron sobre un portaobjetos limpio. El sándwich formado se selló con goma y se incubó durante 1 h a 37°C hora en condiciones de humedad y protegido de la luz para favorecer la penetración de la sonda previo a la desnaturalización. Posteriormente, se realizó la desnaturalización conjunta por calentamiento a 80°C durante 8 minutos en un termobloque. La hibridación se realizó incubando las preparaciones durante 72 h a 37° C en cámara húmeda.

-Lavados post-hibridatorios y revelado fluorescente

Los lavados post-hibridatorios y el revelado fluorescente de los linfocitos humanos se realizaron según el protocolo previamente descrito, con amplificación de la señal. Con el objeto de medir la expresión de *SODI* y *DYRK1A* “in situ” realizamos inmunofluorescencia indirecta de ARN polimerasa II. Para ello las señales de ADN-FISH se fijaron con una solución de formalina 1% en PBS 1x, seguido de lavados sucesivos con PBS 1x y 4T. Posteriormente se incubó con una dilución 1:100 del anticuerpo primario de ratón anti-ARN polimerasa II en 4A durante 1 hora en cámara húmeda a 37°C. La reacción antígeno anticuerpo se detectó mediante la incubación con una solución 1:200 de un anticuerpo secundario de burro contra ratón marcado con Cy5 en 4A durante 1 hora en cámara húmeda a 37°C. Finalmente

las preparaciones se lavaron con PBS 1x y 4T, se contracoloraron con DAPI a una concentración de 1 μ M en PBS 1x y se montaron con 6 μ l de solución Prolongfade®

III.5 FISH sobre preparaciones histológicas

Las hibridaciones se realizaron sobre cortes histológicos de corteza cerebral de fetos con trisomía 21 de 5 μ m de espesor y con una sonda locus específico para el gen *DYRK1A*. La preparación de la sonda se realizó de manera similar a la descrita anteriormente con 100 η g de ADN del clon *DYRK1A* marcado con Dig.

Para la hibridación, las muestras se sometieron previamente a un tratamiento de desparafinización automatizado (Dako) y posteriormente se les aplicaron 12 μ l de sonda cubriendo completamente la preparación. La desnaturalización conjunta de los cromosomas con la sonda se realizó directamente en un aparato de hibridación de Dako a 80°C durante 10 minutos, que posteriormente se mantuvo a 37°C durante 48 horas en condiciones de humedad constante y protegido de la luz. Los lavados post-hibridatorios y el revelado fluorescente se realizaron de modo similar al que se describió previamente. Un resumen de los anticuerpos utilizados en la técnica de FISH se describe en la Tabla 6.

Tabla 6. Principales anticuerpos utilizados en la metodología FISH y condiciones de incubación. Longitud de onda de excitación y emisión del fluorocromo conjugado.

ANTICUERPO	HUÉSPED	DILUCIÓN	DISOLVENTE	TIEMPO	CONJUGADO, (EX EM)
α DigFITC	Ratón	1:200	4A	60 min	FITC (490-520)
StAvidin-TxRed	Ratón	1:200	4A	60 min	TxRed (595-620)
α Biotina	Conejo	1:100	4A	60 min	N/A
α Digoxigenina	Ratón	1:100	4A	60 min	N/A
D α M TxRed	Burro	1:200	4A	45 min	TxRed (595-620)
D α Rb FITC	Burro	1:200	4A	45 min	FITC (490-520)
D α M Cy5	Burro	1:200	4A	45 min	Cy5 (649-670)
M α RNApol II	Ratón	1:100	4A	60 min	N/A
NPMN	Ratón	1:100	4A	30 min	N/A

III.6 Microdissección de cromosomas en interfase

La microdissección láser es una tecnología que permite el aislamiento de células intactas a partir de cortes de parafina o bien de compartimentos de éstas a partir de extensiones celulares de forma precisa y totalmente libre de contaminación para su posterior análisis molecular proteómico o genómico. En nuestro caso particular utilizamos esta tecnología para aislar cromosomas que adoptan una distribución especial en el núcleo interfásico. Para esto, las extensiones celulares se hacen sobre un soporte de vidrio recubierto con una membrana de material sintético (*Poly ethylene naphtalate*, PEN), bioquímicamente inerte, que permite el corte y extracción del material de interés. Las membranas PEN utilizadas en nuestros experimentos poseen un espesor de 0,17 mm, lo que permite trabajar con objetivos 63X y 100X. Generalmente las microdissecciones se hacen a partir de cortes histológicos y el material a extraer es primeramente teñido mediante técnicas inmunohistoquímicas. En nuestro caso utilizamos preparaciones de linfocitos de

pacientes con Síndrome de Down que se sometieron a FISH para la identificación de los cromosomas del par 21. El sistema computarizado P.A.L.M. acoplado a un microscopio permite la delimitación de la región de interés y mediante un disparo o pulso de láser se impulsa la porción seleccionada a la tapa de un tubo de microcentrífuga. Es importante mencionar que el láser de corte posee una longitud de onda de 337 nm que no produce calor y, por lo tanto, no daña la muestra.

III.6.1 FISH sobre membranas PEN

Las condiciones de hibridación sobre membrana PEN se diseñaron de manera específica para la microdisección de cromosomas 21 en linfocitos humanos de Síndrome de Down.

-Extendido de metafases en membranas PEN

Previo a la confección de los extendidos celulares, las membranas PEN se irradiaron con luz UV (254 nm) durante 30 minutos y se lavaron consecutivamente con una serie de etanol 70%, 85% y 100%, y finalmente agua. Para favorecer el extendido de las células sobre la superficie de los cubreobjetos, éstos se conservan a -20°C. Posteriormente, se aplicaron dos-tres gotas de la suspensión de núcleos fijados con metanol:acético (3:1) y se dejaron a temperatura ambiente hasta que el fijador se evaporó y se incubaron a 37°C durante 12 horas para completar la desecación.

-Precipitado de la sonda

La hibridación se realizó sobre linfocitos trisómicos de la línea celular 4710-176 y con sondas dirigidas contra el cromosoma 21 (pintado cromosómico), preparadas con 200 ng de ADN marcado con digoxigenina de acuerdo al protocolo descrito anteriormente.

-Hibridación en membrana PEN

El procedimiento de hibridación en membrana PEN se realizó de forma conjunta, que incluyó la aplicación de 12 µl de sonda sobre la preparación celular, el sellado y un primer paso de prehibridación a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, se realizó la desnaturalización conjunta de los cromosomas con la sonda en el termobloque a

80°C durante 8 minutos y se incubó nuevamente la preparación durante 72 h a 37° C en cámara húmeda.

-Lavados posthibridatorios y revelado fluorescente

Se retiró el cubreobjetos sin dañar la membrana y las preparaciones se lavaron sucesivamente con F50, 1xSSC y 4T a 47° C durante 5 minutos en cada una de estas soluciones y, por último, con un lavado en 4T a temperatura ambiente. Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con 4A durante 30 minutos a 37°C y posteriormente las preparaciones se lavaron en 4T. Para el revelado se incubó con una solución de anticuerpo anti-digoxigenina conjugada con FITC (1:200) en 4A durante 60 minutos a 37° C en cámara húmeda protegido de la luz. Finalmente, se lavó 2 veces en 4T durante 5 minutos.

-Revelado colorimétrico

La microdissección de cromosomas se realiza bajo observación microscópica con luz transmitida por lo que es necesario hacer un revelado colorimétrico, es decir, mediante un procedimiento inmunocitoquímico de la señal de los cromosomas 21. El procedimiento enzimático incluye el uso de un anticuerpo frente a FITC conjugado con peroxidasa y esta reacción antígeno-anticuerpo se pone de manifiesto por medio de la incubación con el sustrato de la enzima que causa la formación del producto final azul visible en el lugar del antígeno (cromosoma 21) (Fig. 23A).

Para el revelado colorimétrico se usó el kit Dako DuoCISH™, de acuerdo a las indicaciones del fabricante, que incluyen dos lavados sucesivos de las preparaciones con TBS 1x/0,05% Tween 20 e incubación con la solución bloqueante de la peroxidasa endógena (peróxido de hidrogeno 3%/15mmol/L-azida sódica) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó nuevamente la preparación con TBS 1x/ 0,05% Tween 20 dos veces durante 3 minutos, se aplicaron 100 µl de la solución de anticuerpo anti-FITC conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en condiciones de humedad. Concluida la incubación se lavó con TBS 1x/0,05% Tween 20 durante 3 minutos y se cubrió la membrana con la solución cromogénica de reciente preparación y se

incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se eliminó el exceso de solución cromogénica y se realizaron lavados consecutivos de 5 min cada uno con TBS 1x/0,05% Tween 20, TBS 1x y agua. Las muestras se dejaron secar por completo a 60°C durante 30 minutos.

III.6.2 Microdissección de cromosomas 21

Se obtuvieron un total de 14 muestras de microdissección de linfocitos trisómicos en sendos tubos de microcentrífuga de 200 µl y se conservaron a -20°C. La señal del cromosoma 21 se visualizó como un precipitado azul, tanto en los cromosomas metafásicos como en el núcleo en interfase. Para el estudio se seleccionaron núcleos celulares que exhibían dos cromosomas próximos o yuxtapuestos entre sí (Fig. 23B).

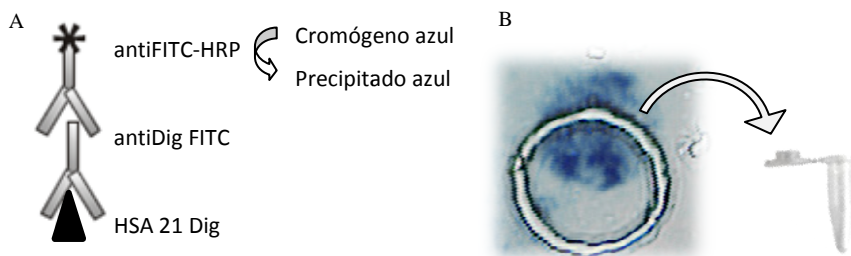


Fig. 23. Representación esquemática del método de revelado colorimétrico del cromosoma 21 (HSA21) (A). Imagen de FISH para el cromosoma 21 en azul en el núcleo interfásico. Área de corte sobre la membrana PEN para catapultado en el tubo de microcentrífuga (B).

El equipo de microdissección se encuentra en el departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal de la Universidad del País Vasco. Consta de un microscopio Olympus IX71 y un microdisector láser P.A.L.M. equipado con el programa Palm@Robo v.3.0. La calibración del sistema se realiza con luz transmitida y el objetivo de inmersión 100X, estableciéndose 35 unidades de foco y 52 unidades de energía para cortar con este sistema. Posteriormente, sobre el núcleo seleccionado se delimita el área de interés y con el láser se realiza un corte sobre la línea trazada a cinco pulsos por segundo. Posteriormente se realiza el catapultado de la muestra a la tapa de un tubo previamente adosado al sistema. Las condiciones de potencia y duración del pulso del láser para el catapultado de la muestra quedan automáticamente establecidas al realizar el corte. El sistema permite visualizar la

muestra que se recoge en la tapa del tubo para comprobar que el material es recogido eficazmente (Fig. 24).

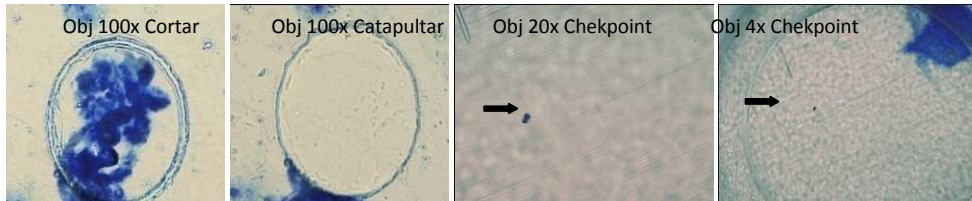


Fig. 24. Imagen de comprobación de la microdissección del material catapultado en la tapa de un tubo de microcentrifuga.

III.7 Análisis molecular de los cromosomas diseccionados

La genotipificación de los cromosomas diseccionados se realizó mediante la determinación de polimorfismos de microsatélites. Para el análisis molecular del producto de la microdissección de los cromosomas fue necesario realizar una amplificación del material genético total mediante PCR.

III.7.1 Amplificación del genoma completo

La amplificación del genoma completo a partir del par cromosómico diseccionado se realizó usando GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification Kit (WGA4 Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante. El fundamento de la tecnología utilizada por el kit se divide en tres pasos. En primer lugar, la fragmentación aleatoria del ADN, a continuación la preparación de una librería universal OmniPlex® y finalmente la amplificación degenerada del ADN.

- Lisis y fragmentación de la microdissección de cromosomas de célula única

La muestra de microdissección contenida en la tapa del tubo se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos y posteriormente se añadieron 9 μ l de agua en la tapa y se centrifugó nuevamente a 12.000 rpm 5 minutos. Se añadió 1 μ l de solución de fragmentación recientemente preparada (32 μ l de solución de lisis y 2 μ l de proteinasa K) y se incubó a 50°C durante 1 hora y a 99°C durante 4 minutos para la fragmentación aleatoria del ADN. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 minutos y se conservó en baño de hielo hasta su procesamiento.

- Preparación de la librería

La preparación de la librería se realizó mediante la conversión de los fragmentos de ADN de pequeño tamaño resultantes del paso anterior en moléculas amplificables mediante PCR. Para esto se unieron cebadores universales a los fragmentos de acuerdo al protocolo descrito por los fabricantes y en un volumen final de reacción de 14 μ l.

- Amplificación

La librería Omniplex® de amplificación universal generada de esta manera se sometió a amplificación. Sobre los 14 μ l de reacción se añadieron 7,5 μ l de solución de mezcla de amplificación comercial, 48,5 μ l de agua y 5 μ l de enzima ADN polimerasa. Las condiciones de la reacción consistieron en una desnaturalización inicial del ADN a 95°C durante 3 minutos y posteriormente 25 ciclos en el que cada uno incluyó un paso de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, la unión de los cebadores y la elongación de la cadena de ADN conjuntamente a 65°C durante 5 minutos. La calidad del producto de amplificación del genoma completo se controló mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. El ADN forma un chorreado característico en la zona que corresponde a los fragmentos de 100 a 500 bp. El producto de la reacción se almacenó a -20°C y aunque se recomienda la purificación mediante columnas, en nuestro caso el material se usó directamente porque se encontraron similares resultados con material purificado y no purificado.

III.7.2 PCR específica de microsatélites

Los microsatélites son marcadores genéticos de secuencia corta que se repiten en tándem en número variable (STR, *Short Tandem Repeat*). Las unidades de repetición pueden ser mono-, di-, tri-, o tetranucleotídicas. La complejidad de los microsatélites está definida por el tipo de repeticiones. Son secuencias abundantes en los genomas eucariontes y potencialmente polimórficas debido al mecanismo mutacional conocido como deslizamiento de una hebra durante la replicación del ADN.

La identificación de los alelos se determina por el número de repeticiones del microsatélite. En genomas diploides (2n) se encuentran 2 regiones microsatélites, un locus para cada cromosoma homólogo. Si los microsatélites son del mismo tamaño, se considera homocigoto para ese locus, si en cambio los microsatélites son de tamaño diferente, es heterocigoto para ese locus. Para el análisis de los microsatélites se utiliza comúnmente PCR con cebadores específicos para la secuencia flanqueante del microsatélite. El producto de PCR tiene diferentes tamaños, dependiendo del número de repeticiones de la unidad repetitiva, que es una característica de cada individuo (genotipo).

Se seleccionaron cinco microsatélites altamente polimórficos que mapean sobre el cromosoma 21: D21S270, microsatélite formado por el dinucleótido CA y que mapea en 21q22 (locus del gen *DYRK1A*); D21S11, D21S1270, D21S1411 (locus del gen *PDE9A*); D21S1435 (locus del gen *CYYRI*). Estos cuatro últimos marcadores son comúnmente utilizados para la identificación del origen parental del cromosoma extra en un análisis de diagnóstico prenatal (Mann y cols., 2004) y la unidad de repetición está formada por 4 nucleótidos combinados de modo complejo (D21S11, (TCTA)_n+ (TCTG)_n; D21S1270 (TAGA)_n; D21S1411, (GGAT)_n+ (GATA)_n; D21S1435 (TATC)_n). La secuencia de los cebadores se describe en la Tabla 7.

Tabla 7. Microsatélites analizados, secuencia de los cebadores empleados y tamaño estimado de los microsatélites.

MICROSATÉLITE	CEBADORES 5'→3'	TAMAÑO
D21S11	TTTCTCAGTCTCCATAAATATGTG GATGTTGTATTAGTCAATGTTCTC	225-280 pb
D21S1270	CTATCCCACTGTATTATTCAGGGC TGAGTCTCCAGGTTGCAGGTGACA	285-340 pb
D21S1411	ATAGGTAGATACATAAATATGATGA TATTAATGTGTGTCCTTCCAGGC	256-340 pb
D21S1435	CCCTCTCAATTGTTTGTCTACC ACAAAAGGAAAGCAAGAGATTCA	160-200 pb
D21S270	GAAATGTTTTAATAAATGGTGGTTA ACAAAGTTATGGTCAAGGGG	199-223 pb

Se realizó una PCR de los microsatélites utilizando *Hot Start Taq PCR Master Mix* (Metabion) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción contenía 3 µl de WGA ADN, la concentración de cebadores se ajustó a lo descrito por Mann y colaboradores en un volumen final de reacción de 10 µl (Mann y cols., 2004).

Las condiciones de PCR fueron: un primer paso de activación de la enzima polimerasa a 95°C durante 15 minutos, continuado por 5 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, unión de cebadores a 60°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos, y 30 ciclos posteriores de amplificación que incluyeron 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 57°C y 30 segundos a 72°C. Al final se añadió un ciclo de extensión de 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se conservaron a 4°C hasta el análisis electroforético. Como control, se utilizó ADN genómico de linfocitos trisómicos y el mismo material previamente amplificado con la tecnología WGA.

La electroforesis del producto de amplificación en gel de agarosa al 1,5% carece de sensibilidad para identificar los fragmentos obtenidos, por lo tanto, el análisis se realizó mediante electroforesis capilar en un bioanalizador computarizado (*Bioanalyzer 2100*) equipado con el kit DNA1000 (*Agilent Technology*) de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante. Brevemente, 1 µl de producto de cada PCR se mezcla con 5 µl de marcador fluorescente de ADN en los pocillos del dispositivo. El sistema automáticamente realiza la electroforesis capilar y mediante el programa 2100Expert (*Agilent Technology*) del ordenador acoplado al bioanalizador se pueden recoger los datos de la migración. Los resultados se presentan como un electroforegrama en cuyo eje de ordenadas se representa la intensidad de la señal de fluorescencia y en el de abscisas las unidades de tiempo de migración o el tamaño del fragmento de ADN en pares de bases por comparación con un control interno.

III.8 Western-blot

Previo a la extracción de proteínas, las preparaciones se lavaron con PBS^{Ca²⁺Mg²⁺} y las células se despegaron del soporte de cultivo mecánicamente en presencia de 200 µl de tampón de lisis (Cell signalling), que incluía inhibidores de proteasas. El lisado celular se sometió a centrifugación a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se determinó la concentración de proteína total mediante espectrofotometría a 560 nm utilizando el kit BCA (ThermoSCIENTIFIC).

-SDS PAGE

Se realizaron electroforesis de concentración y de separación en las que las características del gel de poliacrilamida dependieron del peso molecular de las proteínas de interés. En la Tabla 8 se detallan los reactivos y las concentraciones utilizadas en la preparación de los geles de una manera general. Consistentemente se cargaron 50 µg de proteínas totales disueltas en un tampón de carga que contiene β-mercaptoetanol y SDS, previamente desnaturalizadas por calentamiento a 99°C durante 10 minutos. Las electroforesis se realizaron en la cubeta de migración Bio-Rad MiniProtean3 con solución tampón Tris Glicina SDS 10% (Biorad) a un voltaje continuo de 120 V. Para la identificación de las proteínas, en todos los experimentos se migró un marcador de peso molecular conocido.

-Transferencia de las proteínas (Western blot).

Las proteínas separadas en gel de poliacrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Protran, Whatman) en un aparato de transferencia semiseca Bio-Rad durante 1 hora programado a 15 V y utilizando una solución tampón de transferencia Tris Glycina 10%/Metanol 20% .

Tabla 8. Reactivos utilizados en la preparación de los geles de concentración y de separación para SDS-PAGE.

GEL DE CONCENTRACIÓN		
Volumen	Reactivo	Concentración
0,83 ml	Acrilamida 30%	5%
2,5 ml	Solución Tampón de concentración 2x	0,125 M Tris pH: 6,8 0,1% SDS
1,6 ml	Agua	
50 µl	Persulfato amónico 10% (APS)	0,01%
10 µl	TEMED	0,002%
GEL DE SEPARACIÓN		
3,3 ml	Acrilamida 30%	10%
5 ml	Solución Tampón de separación 2x	0,125 M Tris pH: 6,8 0,1% SDS
1,6 ml	Agua	
0,15 ml	Persulfato amónico 10% (APS)	0,03%
15 µl	TEMED	0,003%

-Inmunodetección de proteínas

En todos los casos, previo a la detección de la proteína de interés, se bloquearon los sitios potenciales de unión inespecífica de los anticuerpos primarios mediante la incubación de las membranas con una solución 5% de leche desnatada o BSA en TBST 1x (20 mM TrisHCl/500 mM NaCl/0,05% Tween 20) durante 1 hora con agitación suave y continua. Posteriormente se incubó con la solución del anticuerpo primario correspondiente de acuerdo a las instrucciones del fabricante durante 1 hora con agitación. Los anticuerpos utilizados fueron SOD-1FL-154 (Santacruz Biotechnology) dilución 1:1000 en leche 5% TBST 1x, DYRK1A (Cell Signalling) dilución 1:1000 en BSA 5% TBST 1x y GADPH como control de carga (Chemicon) dilución 1:1000 en leche 5% TBST 1x. Posteriormente se realizaron tres lavados de 10 minutos con solución TBST 1x y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con HRP correspondiente, contra conejo para SOD1 y DYRK1A y contra ratón para revelar GADPH a una dilución 1:5000 en solución de bloqueo durante 45 minutos con agitación.

-Revelado

Las membranas se lavaron con TBST 1x y se revelaron por quimioluminiscencia utilizando un kit comercial ECL-Plus (Amershan Pharmacia Biotech). La identificación de las bandas correspondientes a las proteínas de interés se realizó según el peso molecular de DYRK1A (90 kDa), SOD1 (23 kDa) y GADPH (38 kDa). Eventualmente, se ensayaron distintas proteínas en una misma membrana previa remoción de anticuerpos con solución de lavado comercial e incubación con el nuevo anticuerpo de interés. El resumen de los principales anticuerpos utilizados y las condiciones se detallan en la Tabla 9.

Tabla 9. Anticuerpos utilizados en la detección de las proteínas y condiciones de Western-blot (H: humano, R: ratón).

ANTICUERPO	ORIGEN	ANTÍGENO	DILUCIÓN	DISOLVENTE
Cu/Zn SOD1	Conejo	H, R	1:1000	Leche 5% TBST
DYRK1A	Conejo	H, R	1:1000	BSA 5% TBST
GADPH	Ratón	H, R	1:5000	Leche 5% TBST
HRP-Conejo	Cabra	Conejo	1:5000	Leche 5% TBST
HRP-Ratón	Cabra	Ratón	1:5000	Leche 5% TBST

III.9 PCR cuantitativa

La PCR a tiempo real o PCR cuantitativa es una variación de la PCR estándar utilizada para la cuantificación del ARN mensajero (mARN) de una muestra. Utilizando cebadores específicos de secuencia, es posible determinar la cantidad relativa de una determinada secuencia de ARN.

-Extracción de ARN

La extracción de ARN total se realizó a partir de cultivos celulares empleando el kit comercial E.Z.N.ATM MicroEluteTM Total RNA (OMEGA bio-tek), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cultivos celulares se lavaron brevemente con PBS Ca^{2+} Mg^{2+} y se realizó la extracción inmediatamente por disgregación mecánica con 350 μl de tampón de lisis TRK- β -mercaptoetanol en baño en condiciones de esterilidad. Sobre el lisado celular se añadieron 350 μl de etanol 70% en agua tratada con DEPC, se mezcló por agitación en vórtex y se incubó en hielo durante 5 minutos. El ARN se separó mediante centrifugación en columnas MicroEluteTM. El material total se recargó en las columnas y se centrifugó a 12.000 rpm durante 45 segundos. A continuación se realizaron dos lavados de la columna por centrifugación a 12.000 rpm durante 45 s con 250 μl de solución de lavado. Los restos de ADN presentes en la muestra se eliminaron por incubación de la columna con 75 μl de solución de ADNasa (20 U/ μl) a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente, y sin centrifugar, se aplicaron 500 μl de solución de lavado y se centrifugó a 12.000rpm durante 1 minuto. Finalmente, el ARN se eluyó por centrifugación directamente sobre un tubo colector a 12.000 rpm durante 1 minuto con 40 μl de agua. Se determinó la concentración de ARN y se conservó a -20°C .

-Retrotranscripción

La obtención del cADN correspondiente al ARN extraído del cultivo celular se realizó con el kit comercial qScript cDNA SuperMix (Quanta Biosciences), mezclando en un tubo de microcentrífuga 1 μg de ARN, 4 μl de la solución comercial y agua hasta un volumen final de 20 μl . El procedimiento de retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador BioRad programado de la

siguiente manera: incubación a 25°C durante 5 minutos seguido de una incubación a 42°C durante 30 minutos y finalmente a 85°C durante 5 minutos. Se determinó la concentración final de cADN obtenido (50 ng/μl) y las muestras se almacenaron en un congelador a -80°C.

-PCR cuantitativa

Para cuantificar el nivel de expresión de ARN se realizó PCR a tiempo real utilizando el kit SYBR Green® quantitative PCR (Applied Biosystems) que incluye *Sybr Green* indicadora del proceso de amplificación. La reacción se realizó a partir de 50 ng/μl de cADN (1 μl de muestra), 0,2 μM de los cebadores correspondientes, 12,5 μl del tampón de reacción y agua hasta un volumen final de 25 μl. Las secuencias de los cebadores y las características de la reacción para cada uno de ellos se describen en la Tabla 10. La reacción se llevó a cabo en un termociclador BioRad bajo las siguientes condiciones: un primer paso de activación de la enzima polimerasa a 95°C durante 15 minutos, continuado por 35 ciclos en el que cada uno incluyó desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, unión de cebadores a la temperatura específica durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto. Finalmente se añade un ciclo que muestra el producto amplificado.

-Análisis de los datos

Los datos se analizaron con el programa de BioRad provisto por los fabricantes del termociclador, que detecta la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y lo representa gráficamente respecto al número de ciclos. La cantidad de fragmentos de amplificación producidos es proporcional al número de moléculas de ARN inicial, de forma que en aquellas muestras con mayor expresión del gen la amplificación fluorescente aparecerá en ciclos anteriores (menor Ct). La medida de la expresión génica por medio de RT-PCR es una cuantificación relativa, en la que se compara entre las diferentes muestras la expresión del gen objeto de estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo que no varía en las condiciones del experimento (control endógeno). Es lo que se denomina como normalización de la expresión. Los cálculos necesarios se realizaron con el programa Microsoft Excel

mediante el cálculo de $\Delta\Delta Ct$. Para cada gen se obtuvo un valor de Ct (ciclo umbral) que se define como el ciclo en el que el fragmento amplificado emite una señal de fluorescencia sobre el umbral establecido. El valor de Ct de la muestra corresponde con la media de los duplicados del experimento (ΔCt). Dicho valor se hace relativo al valor de Ct del gen de referencia interno o control endógeno (ΔCt ; $Ct (gen) - Ct (housekeeping gene)$). Para el estudio en ratón se seleccionó *Gadph* como gen de referencia de control interno entre líneas celulares. Para el estudio en humanos se utilizó *ARP/36B4*. A continuación se normaliza la expresión de cada valor de ΔCt respecto del promedio obtenido en el ensayo para todas las muestras. Así se elimina la variación entre las muestras debido a la PCR. ($\Delta\Delta Ct$; $(\Delta Ct) \text{ problema} - (\Delta Ct) \text{ promedio de todas}$). Finalmente se realiza la conversión de fluorescencia que elimina el logaritmo equivalente a la eficiencia de amplificación ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Tabla 10. Secuencia de los cebadores para la PCR cuantitativa en humanos y en ratón. Condiciones según referencia. TA, temperatura de anillado o hibridación.

GEN	CEBADOR 5'→3'	TA	REFERENCIA
Ratón			
<i>Socs1</i>	TTCGAGCTGCTGGAGCACTACGTG TGAAGGGGAAGGAAGCACTCAGG	65°C	Krejci y cols., 2009
<i>Sod1</i>	CCAGTGCAGGACCTCATT TCCCAGCATTCCAGTCTTT	60-50°C	Reymond y cols., 2002
<i>Dscr3</i>	TGCTGAAGCCAGGAAAGATT CGGAGTGATCGTGAAGTCAA	60-50°C	Reymond y cols., 2002
<i>Dyrk1a</i>	TGGGTCGCCATTAATCAT TGCGAAACTTTCGTGTTAG	60-50°C	Reymond y cols., 2002
<i>GADPH</i>	AACGACCCCTTCATTGAC TCCACGACATACTCAGCAC	57°C	Simpson y cols., 2000
Humano			
<i>SOD1</i>	TCGCCAATAAACATTCCCTTG AAGTCTGGCAAAATACA GGTCATTG	60°C	Ait Yahya-Graison y cols., 2007
<i>DYRK1A</i>	ATCCGACGCACCAGCATC AATTGTAGACCCTTGGCCTGGT	60°C	Ait Yahya-Graison y cols., 2007
<i>ARP/36B4</i>	CGACCTGGAAGTCCAACACTAC ATCTGCTGCATCTGCTTG	53°C	Simpson y cols., 2000

III.10 Adquisición y análisis de imágenes

Los experimentos de FISH sobre metafases se observaron bajo un microscopio Olympus BX61 de fluorescencia, equipado con una cámara *Standard CCD* y un interferómetro para la adquisición de imágenes de cariotipado espectral. Adicionalmente, el microscopio está acoplado a un ordenador equipado con el programa Cell^M para la adquisición y el análisis de imágenes. Los parámetros de adquisición se establecieron previamente y se mantuvieron idénticos para todas las muestras analizadas en imágenes de formato jpg, de 1376 x 1038 píxeles de tamaño, en tres canales (rojo, verde y azul; *rgb*) y de 8 bits por canal.

Para el estudio de la organización del genoma en interfase se adquirieron imágenes de FISH del cromosoma 21 en linfocitos normales y linfocitos trisómicos fijados con metanol acético. El análisis de las imágenes digitales se realizó con el programa Volocity® de Improvision que permite definir en cada imagen objetos de interés de manera automática y simultáneamente medir la intensidad total de los píxeles que componen la señal. En cada célula se realizó la escisión de los canales azul y verde y se determinó el tamaño del núcleo mediante la intensidad de fluorescencia de DAPI y la selección de territorios cromosómicos mediante la intensidad de fluorescencia de FITC. Se obtuvo el área del núcleo en μm^2 , lo que permitió calcular el radio de un modo teórico con la formula $S = \pi r^2$ y las coordenadas del centro de masas de los territorios cromosómicos, para el cálculo de la distancia relativa entre cromosomas, $d_{A-B} = \sqrt{(x_B - x_A)^2 + (y_B - y_A)^2}$

-Imágenes tridimensionales

Con el objeto de analizar la organización del genoma en el espacio nuclear en interfase, se adquirieron imágenes en un microscopio confocal Leica TCS2. Éstas consistieron en series de imágenes individuales de 512 x 512 píxeles cada 200 nm que cubrieron la totalidad del espesor de núcleo (~10 μm). Las imágenes resultantes con información en los canales rojo, azul y verde (*rgb*) fueron analizadas con el programa Volocity®.

Se definieron regiones de interés en el canal azul que correspondían a los núcleos teñidos con DAPI mediante la determinación arbitraria del valor de intensidad del

voxel en 50. Subsiguientemente se realizó la misma operación en los canales verde y rojo, es decir objetos que corresponden a las señales correspondientes y los objetos así determinados se asociaron a sus respectivos núcleos. Posteriormente, se obtuvieron automáticamente el número de objetos y el volumen, las coordenadas del centro de masas de cada señal y la intensidad de fluorescencia recogida en la región de interés.

En los experimentos de organización espacial del genoma, el procesado de los datos crudos se realizó en Excel para el análisis de la posición radial, la distancia entre alelos y la distancia entre genes. Se determinó la posición radial de los elementos manualmente mediante la medida de la distancia del centro del núcleo a la señal genética y a la periferia más próxima en línea recta en los planos x-y-z. De este modo, se obtuvo la posición de la señal en el núcleo en interfase respecto del radio para cada célula. El cálculo de la distancia entre dos centros de masa/genes se determinó mediante la ecuación: $d_{A-B} = \sqrt{(x_B - x_A)^2 + (y_B - y_A)^2 + (z_B - z_A)^2}$ denominada también distancia cuadrática (Fig. 25).

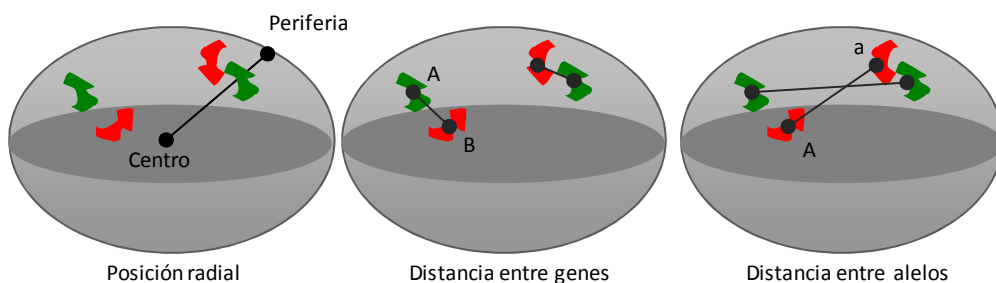


Fig. 25. Representación esquemática para la obtención de la posición radial y la posición relativa tridimensional entre genes y entre alelos.

La determinación del coeficiente de colocalización entre las señales *SOD1* y *DYRK1A* se realizó mediante el diseño de un protocolo específico en el programa Velocity® que cuantifica la fluorescencia de los canales rojo y verde en un mismo voxel. En los experimentos de inmuno-FISH en linfocitos humanos normales y trisómicos las imágenes fueron analizadas para los genes *SOD1* y *DYRK1A* junto con el valor de ARN pol II. La adquisición de las imágenes en el microscopio

confocal se realizó conservando los parámetros idénticos entre las células. Las imágenes resultantes contenían información de cuatro canales de fluorescencia. Se utilizó el protocolo descrito anteriormente para definir el núcleo contracolorado con DAPI y las señales genéticas comprendidas en su interior en los colores rojo y verde respectivamente. La expresión de *ARN pol II* se cuantificó mediante la determinación arbitraria del valor de intensidad de voxel en 50 para el canal celeste. De este modo, se obtuvo el volumen ocupado de ARN pol II en el núcleo en μm^3 y la intensidad promedio de la señal. En los genes *SOD1* y *DYRK1A* se determinó la expresión “in situ” de manera indirecta mediante el valor de intensidad de ARN pol II contenido en el locus específico.

III.11 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de nuestros experimentos se analizaron empleando el programa Statistica 9.0 y el programa SPSS. Se consideró el valor de $p < 0,05$ como indicativo de la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las muestras analizadas, lo que en las gráficas se indicó con un asterisco (*). Se consideraron las diferencias altamente significativas cuando el valor fue $p < 0,01$, lo que se indicó en las gráficas con un doble asterisco (**). Los valores de $p > 0,05$ se consideraron no significativamente diferentes. En los casos con un número elevado de comparaciones empleamos el criterio de Benjamini-Hochberg para corregir el nivel de significancia estadística.

La comparación de dos muestras independientes se realizó mediante la prueba t-Student de dos colas sin igualdad de varianzas y el test equivalente no paramétrico de Wilcoxon Mann Whitney. Por otro lado, empleamos el ANOVA de un factor que permite extender el estudio de tres o más muestras independientes. En los casos en los que el resultado del ANOVA fue significativo, se aplicó el ajuste de Bonferroni, realizando comparaciones dos a dos entre los diferentes grupos del ANOVA que ajusta el valor $p/\text{número de comparaciones}$. Se confeccionaron diagramas de colores que indicaban los resultados de la comparación estadística de manera visual, para el análisis de la distribución radial y la distancia entre genes. En éstos el color rojo

equivale a diferencias significativas y altamente significativas ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$), mientras que los colores verde y azul representaron valores de $p \geq 0,05$ y $p \geq 0,1$, respectivamente.

Utilizamos el coeficiente de correlación de Pearson y el equivalente de Kendall Tau para determinar la relación existente entre dos variables distintas. El análisis de colocalización entre genes respecto de la distancia tridimensional se representó mediante un diagrama de dispersión, junto con el valor de coeficiente de correlación y el valor de p . Para determinar la tendencia específica de asociación de los cromosomas y los genes se emplearon análisis de correlación y los datos obtenidos experimentalmente se compararon con los valores teóricos generados mediante el modelado matemático de Monte Carlo, que permitió determinar que la formación de pares de cromosomas era aleatoria ($\Delta C = 0$) o específica ($\Delta C \neq 0$).

IV. RESULTADOS

IV.1 Tamaño del núcleo

La información genética se encuentra codificada en el ADN. Esta molécula informativa no está desnuda, sino que está asociada a proteínas básicas llamadas histonas y a otras de naturaleza diversa, formando la cromatina (Luger y cols., 1997). Dada la extensión del genoma de las células eucariotas y el tamaño del núcleo que lo contiene se deduce que la cromatina debe sufrir importantes plegamientos con el fin de caber dentro del núcleo celular. No obstante el alto grado de compactación de la cromatina, el volumen del núcleo celular dependerá de la cantidad de material genético que porte la célula. Con el objeto de investigar la organización de los genomas con alteraciones en el número de cromosomas, primero determinamos el volumen y el radio nuclear de células con ganancias de cromosomas aislados (trisómicas) y con ganancias de complementos completos de cromosomas (poliploides).

IV.1.1 Células trisómicas

El genoma humano consiste en 23 pares de cromosomas. El Síndrome de Down es la condición humana asociada a una alteración numérica de los cromosomas, trisomía del par 21. Con el objeto de estudiar cómo afecta la presencia de una copia extra del cromosoma 21 en el tamaño nuclear se determinó el área, el volumen y el radio de linfocitos trisómicos de la línea celular 4710-176 establecida a partir de un paciente con Síndrome de Down y de linfocitos normales (línea GM 03714), empleada como control.

-Área y radio teórico del núcleo

En un primer análisis se determinó el tamaño del núcleo fijado con metanol acético, es decir una medición en dos dimensiones. Se analizaron 34 núcleos en interfase normales y 58 núcleos trisómicos. Mediante el programa Volocity® para cada célula se realizó la escisión del canal azul y se determinó el área del núcleo en μm^2 , lo que permitió calcular el radio de un modo teórico con la fórmula $S = \pi r^2$. El área del núcleo de los linfocitos normales fue de $66,59 \mu\text{m}^2$ y el radio promedio calculado fue de $4,58 \mu\text{m}$. En los linfocitos trisómicos los valores obtenidos del tamaño

nuclear resultaron similares, siendo el área $60,78 \mu\text{m}^2$ y el radio $4,37 \mu\text{m}$ respectivamente (Fig. 26A). Se aplicó la prueba t-Student de dos muestras con valores de significancia estadística de $p \leq 0,05$. El análisis reveló que la ganancia de un cromosoma en el genoma no indujo cambios significativos en el tamaño del núcleo (área, $p = 0,07$; radio, $p = 0,06$).

-Volumen del núcleo

El protocolo de fijación de las células, que incluye paraformaldehído, permite preservar la estructura tridimensional del núcleo. El volumen fue directamente estimado por computación a partir del canal correspondiente al contracolorado con DAPI de las imágenes de 59 núcleos de linfocitos normales y 52 de linfocitos portadores de trisomía 21. Este análisis mostró que el volumen promedio del núcleo en los linfocitos normales era de $142 \mu\text{m}^3$, mientras que el de los linfocitos con trisomía 21 era de $131 \mu\text{m}^3$. Se determinó mediante la prueba estadística t-Student que estas diferencias no eran significativas ($p = 0,09$), por lo que se puede concluir que la presencia de un cromosoma extra no induce variaciones en el volumen de los núcleos de los linfocitos humanos (Fig. 26B).

-Radio del núcleo tridimensional

La determinación del radio nuclear se realizó de dos modos: **1)** directamente extraído de manera computacional como el promedio de la distancia lineal del centro del núcleo a puntos de la periferia tomados aleatoriamente en 3 dimensiones (R-3D) y **2)** mediante la fórmula correspondiente, considerando al núcleo como una esfera (R-teórico, $v = 4/3\pi r^3$). El radio nuclear promedio (R-3D) de los linfocitos normales fue de $3,37 \mu\text{m}$ y el R-teórico calculado de $3,22 \mu\text{m}$. El análisis estadístico mediante t-Student mostró que había diferencia significativa entre estas dos estimaciones ($p = 0,01$), pero pensamos que podría deberse a que los núcleos celulares no son esferas perfectas o bien que el proceso de hibridación pudo introducir distorsiones leves en la morfología, ya que dichas diferencias no se observaron en los linfocitos trisómicos. De hecho, en los linfocitos trisómicos el R-3D y el R-teórico coincidieron en $3,13 \mu\text{m}$ ($p = 0,99$) (Fig. 26B).

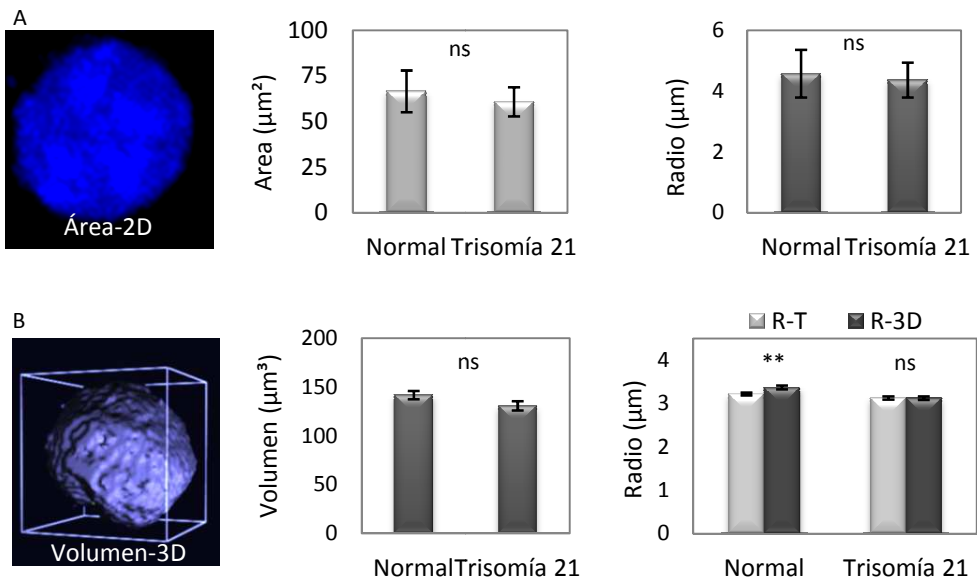


Fig. 26. Análisis en dos dimensiones del área y el radio nuclear (A). Reconstrucción tridimensional del núcleo. Volumen y radio nuclear mediante el cálculo teórico (R-T) y la cuantificación directa (R-3D) (B).

Interesante destacar que la medida del radio nuclear resultó diferente en el análisis en dos dimensiones (2D), realizado sobre preparaciones celulares que han sufrido un proceso de deshidratación con metanol ácido acético, y el análisis tridimensional (3D) de células que preservan la morfología nuclear y el volumen. Los resultados indican que el método de fijación celular influye en el tamaño del núcleo.

IV.1.2 Células poliploides

Para realizar este estudio se utilizaron cuatro líneas celulares derivadas de ratón: G7 (diploide), NIH3T3 (triploide), LB4 y P16 (tetraploides). Se eligió trabajar con estas líneas celulares para evitar trabajar con líneas celulares tumorales humanas que en la mayoría de los casos presentan alta inestabilidad cromosómica, es decir pérdidas y ganancias constantes de cromosomas. El genoma de ratón consta de 20 pares de cromosomas y el análisis citogenético regular de las células reveló que G7 posee un complemento cromosómico estable de 40 cromosomas, las células NIH3T3 tienen 66 cromosomas, LB4, 78 cromosomas y P16, 82 cromosomas. Además, se realizaron similares estudios en neuronas corticales de ratón (diploides).

-Volumen del núcleo

El volumen del núcleo se obtuvo mediante la sumatoria directa de voxel a partir de la imagen correspondiente de contracolorado con DAPI (V-3D), que se realizó en 330 núcleos de neuronas, 112 núcleos de fibroblastos G7 y 100 núcleos de fibroblastos NIH3T3. De estos datos se obtuvo que el volumen promedio del núcleo de una neurona era de $344 \mu\text{m}^3$, mientras que el de un fibroblasto G7 era de $317 \mu\text{m}^3$. Los volúmenes de los núcleos de ambos tipos celulares diploides, las neuronas y los fibroblastos G7, no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,11$). Por otro lado, el volumen promedio de los núcleos de las células NIH3T3 fue de $645 \mu\text{m}^3$, lo que resultó significativamente mayor que el núcleo de las neuronas y de los fibroblastos G7 ($p = 0,00$ para ambos) (Fig. 27). Habiendo determinado que el núcleo de una célula diploide tiene un volumen promedio aproximado de $330 \mu\text{m}^3$, cabría esperar que el volumen del núcleo de una célula triploide aumentase de forma proporcional, es decir, que fuese alrededor de $450 \mu\text{m}^3$. Sin embargo, los resultados indican que no existe una relación directa entre el volumen del núcleo y el nivel de ploidía.

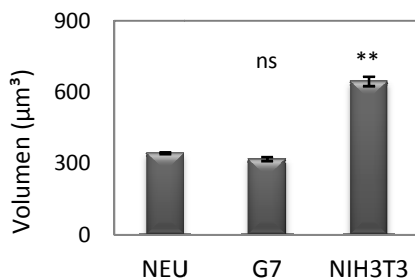


Fig. 27. Volumen del núcleo en interfase de células con diferente nivel de ploidía: neuronas (NEU), fibroblastos G7 y NIH3T3. Los asteriscos indican diferencias altamente significativas entre las células con genoma diploide y triploide.

-Radio del núcleo

La determinación del radio nuclear se realizó de la misma manera que para los linfocitos humanos (R-3D y R-teórico). Este análisis resultó en valores promedio de R-3D de $5,15 \mu\text{m}$, $4,85 \mu\text{m}$ y $7,70 \mu\text{m}$ para las células neuronales, los fibroblastos G7 y los NIH3T3, respectivamente. Los R-Teóricos fueron de $4,33 \mu\text{m}$, $4,20 \mu\text{m}$ y $5,31 \mu\text{m}$, respectivamente. Se aplicó la t-Student de muestras pareadas para

comparar los valores determinados computacionalmente con los calculados y en los tres tipos celulares el R-3D fue significativamente mayor que el radio teórico (Fig. 28A). Esta discordancia podría deberse a que la morfología del núcleo no se ajusta completamente a la de una esfera, tal y como representa el cálculo del radio teórico. Estos resultados revelan que las determinaciones directas a partir de las imágenes microscópicas del cálculo del radio observado se ajustan en mayor grado a los valores reales para cada tipo celular.

Considerando los valores obtenidos directamente o los calculados, aplicamos el test estadístico ANOVA de 1 factor para comparar el radio entre los tres tipos celulares con ajuste de Bonferroni y valores de $p < 0,05$. Se obtuvieron diferencias altamente significativas en el radio de las neuronas con respecto al de los fibroblastos G7 y NIH3T3 (R-Teórico, $F(2, 542) = 316,17$, $p = 0,000$) (R-3D, $F(2, 542) = 340,76$, $p = 0,000$) (Fig. 28B). El radio del núcleo de las neuronas y los fibroblastos G7, ambas células diploides, resultó significativamente diferente entre sí, a pesar de que poseen volúmenes similares.

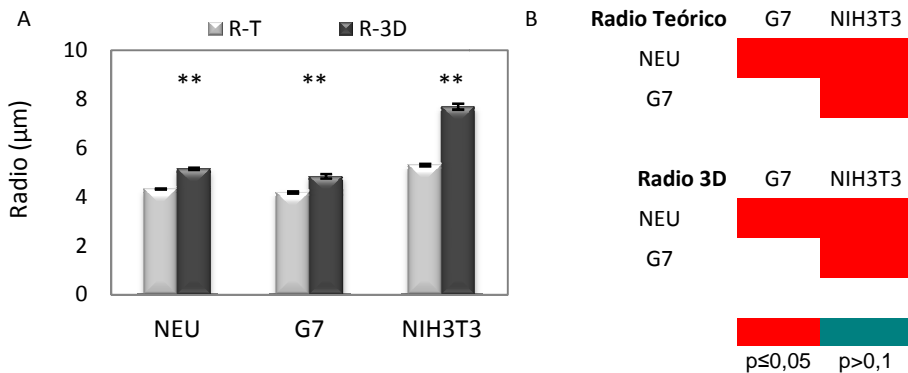


Fig. 28. Tamaño del núcleo de neuronas (NEU), fibroblastos G7 y NIH3T3 de ratón. Radio nuclear tridimensional (R-3D) y calculado (R-Teórico) (A). Las comparaciones estadísticamente significativas se representan en el diagrama de color rojo, mientras que los valores de $p > 0,1$ se expresan en azul (B).

Anteriormente se mencionó un aumento significativo del volumen en las células triploides NIH3T3. La medida del radio también se ve incrementada a consecuencia del aumento en la ploidía. No obstante, no se observó una relación proporcional del radio del núcleo entre los diferentes tipos celulares.

-Correlación entre el nivel de ploidía y el tamaño del núcleo

Debido a estos resultados, extendimos el estudio de la relación entre el nivel de ploidía con el tamaño del núcleo. Para ello se determinó el radio nuclear (R-Teórico) en células de las líneas G7 (diploide), NIH3T3 (triploide), P16 (tetraploide) y LB4 (tetraploide) utilizadas en otros estudios y que sometieron a FISH doble para los cromosomas 5-6 y 15-16. Los valores de los radios determinados para cada tipo celular se compararon estadísticamente mediante el test de Wilcoxon-Mann-Whitney, empleando el criterio de Benjamini-Hochberg para corregir el nivel de significancia que asume valores significativos de $p \leq 0,035$. Los valores de p se usaron para construir un diagrama de colores en el que el color rojo indica que la diferencia entre los valores comparados es estadísticamente significativa. En la figura 29 se puede apreciar que el valor promedio del radio del núcleo en estas células oscila entre 4,5 y 6,1 μm .

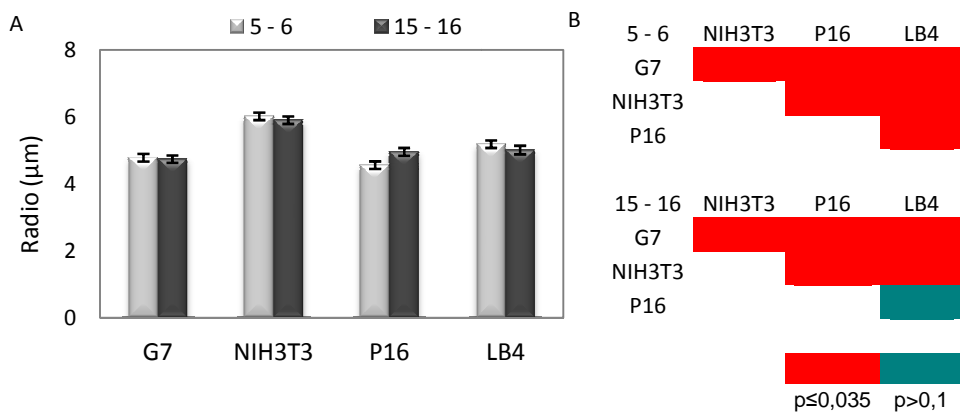


Fig. 29. Radio promedio del núcleo en células con diferente nivel de ploidía (G7, diploide; NIH3T3, triploide; P16 y LB4, tetraploide) (A). El diagrama de color representa los valores p obtenido en las comparaciones estadísticas entre dos tipos celulares (B).

Como cabía esperar el estudio reveló que el tamaño del núcleo era estadísticamente diferente entre las líneas celulares con diferente nivel de ploidía, excepto para las células de las líneas P16 y LB4, ambas tetraploides. Las diferencias en el tamaño del núcleo detectadas entre los dos tipos de experimentos realizados con la línea P16 estuvieron en el límite de significancia y podrían deberse a cuestiones intrínsecas de

los experimentos. No obstante, se puede concluir que el tamaño del núcleo no mantiene una relación directa con el nivel de ploidía.

Finalmente, con el objeto de evaluar específicamente si el número de cromosomas y el tamaño del núcleo son dos variables con tendencia a estar relacionadas, se aplicó el test de correlación entre dos variables cuantitativas dependientes de Kendall's Tau. Valores de Tau < 0 indican correlación negativa y valores > 0 , correlación positiva, que deben ir acompañados del valor de significancia estadística del test. El estudio reveló que los valores promedio del radio del núcleo y el nivel de ploidía del genoma eran variables independientes (Tau = 0,0845154; p = 0,64795).

En el gráfico se expresa la relación entre el radio del núcleo y el nivel de ploidía de un modo sencillo. P16 y LB4 tienen un contenido genético tetraploide, el doble que G7 (diploide) y aún así el radio nuclear teórico de estas células es similar, de aproximadamente 5 μm , mientras que el radio de la línea de fibroblastos triploides NIH3T3 difiere hasta aproximadamente 6 μm (Fig. 30).

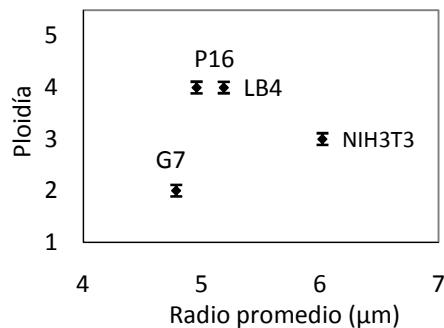


Fig. 30. Relación entre el nivel de ploidía y el tamaño del núcleo.

En conclusión, los datos sobre el radio en las células poliploides sugieren que otros factores, además del mero contenido genómico, como el tipo celular y el estado transcripcional del mismo, podrían determinar el tamaño del núcleo.

IV.2 Posición radial de cromosomas y genes

Los cromosomas y genes se distribuyen en el espacio nuclear de forma no aleatoria. La posición de éstos en interfase se describe comúnmente según su proximidad al centro de masas o a la membrana nuclear y a esto se le denomina distribución radial. Con el objeto de estudiar la organización espacial de los cromosomas y genes en las células con ganancias en el número de copias, se realizó FISH con sondas para el cromosoma 21 humano y para los cromosomas 5, 6, 15 y 16 de ratón en células de estas dos especies, como así también con sondas para genes que mapean en la DSCR. El análisis de distribución radial en ratón se realizó en cultivos de neuronas primarias, fibroblastos G7, NIH3T3, LB4 y P16, mientras que para los genes humanos se emplearon las líneas GM03714 y 4710-176 derivadas de linfocitos de una persona normal y con trisomía 21, respectivamente.

IV.2.1 Cromosomas 5, 6, 15 y 16 en células de ratón

Se realizó el análisis de la distribución radial de los cromosomas 5, 6, 15 y 16 en células de ratón con diferente nivel de ploidía: G7 (diploide), NIH3T3 (triploide), P16 (tetraploide) y LB4 (tetraploide). La posición 3D de los cromosomas se determinó computacionalmente y los resultados se expresaron respecto del radio del mismo núcleo para normalizar los datos debido a las diferencias intercelulares en el volumen nuclear. Debido a que los núcleos de los fibroblastos son frecuentemente aplanados, se realizó una proyección 2D y los datos de distribución se agruparon en unidades de distancia XY iguales a 0,2 para obtener frecuencias relativas de la posición radial de cada cromosoma.

En primer lugar, analizamos la posición radial del grupo de cromosomas 5, 6, 15 y 16 en el núcleo de cada tipo celular, con el objeto de determinar la distribución de los territorios cromosómicos en interfase en G7, NIH3T3, P16 y LB4. Se aplicó el test de Wilcoxon Mann Whitney y el criterio de Benjamini-Hochberg para corregir el nivel de significancia que asume valores significativos de $p < 0,03$ ($p \leq 0,05$ corresponde con falsos positivos). En el gráfico de columnas se resumen los valores promedio de posición radial para cada cromosoma en estos tipos celulares (Fig.

31A). Los diagramas de colores muestran la probabilidad estadística asociada de comparar los cromosomas distintos entre ellos por parejas (Fig. 31B).

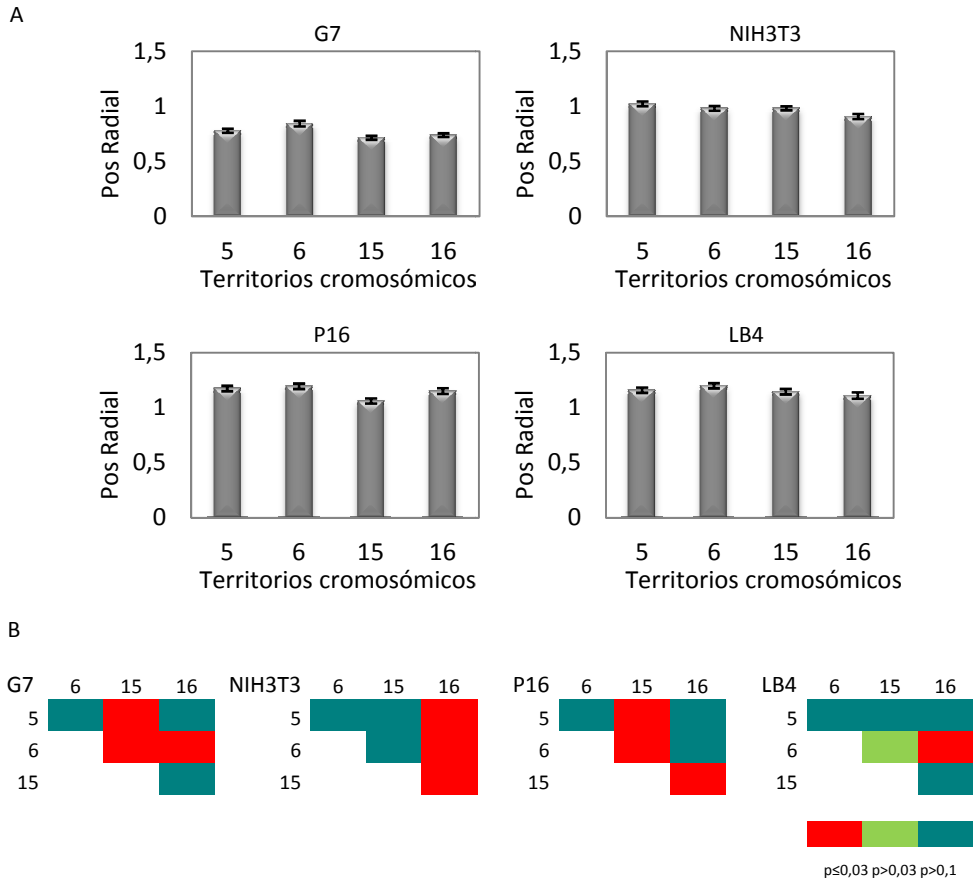


Fig. 31. Posición radial promedio de los territorios cromosómicos 5, 6, 15 y 16 en G7, NIH3T3, P16 y LB4 (A). Diagrama de colores asociado al análisis estadístico de la posición radial entre cromosomas distintos (B).

En G7 los cromosomas 5 y 6, relativamente mayores, se situaron próximos a la periferia, mientras que los cromosomas 15 y 16, de menor tamaño, se encontraron en un intervalo intermedio en el núcleo. En el caso de los cromosomas 5 y 6 se observó que mantienen una posición radial similar en el núcleo en el genoma diploide G7. A su vez también conservaron dicha organización en células con diferente nivel de ploidía, en las que la posición radial de estos dos cromosomas no cambió ($p > 0,1$). Esto sugirió una posible tendencia de los cromosomas 5 y 6 de encontrarse próximos en interfase, lo que además se mantuvo con el aumento en el número de copias.

En el caso de los cromosomas 15 y 16 también se encontraron en una posición radial similar en G7, aunque dicha asociación no se observó en las células con diferente nivel de ploidía, excepto en LB4.

Por otro lado, se comparó la frecuencia de distribución radial de cada uno de los cromosomas entre las células con diferente nivel de ploidía. Los gráficos de frecuencia relativa y de frecuencia acumulada correspondientes ilustran este comportamiento (Fig. 32A). En ellos se observa que en las células G7 todos los cromosomas tienen una distribución preferentemente central, mientras que en las otras líneas celulares se produce un desplazamiento hacia la periferia conforme aumenta el nivel de ploidía. Además, en la línea celular NIH3T3 (triploide) la posición adoptada por los cromosomas 6 y 16 es intermedia a la de los cromosomas 5 y 15, mientras que en las células tetraploides la posición de todos es preferentemente hacia la membrana nuclear. Subsiguientemente se comparó la distribución radial de los cromosomas entre las cuatro líneas celulares mediante el test estadístico de Wilcoxon Mann Whitney y empleando el criterio de Benjamini-Hochberg para corregir el nivel de significancia que asume valores significativos de $p \leq 0,03$. Con los valores se construyó un diagrama de colores en el que el color rojo corresponde a valores de $p < 0,03$ y el azul a $p > 0,1$ (Fig. 32B).

Este análisis demostró que la distribución radial de los cromosomas 5, 6, 15 y 16 es estadísticamente diferente en cada tipo celular, excepto entre P16 y LB4 (tetraploides) que exhiben un patrón de distribución de los cromosomas 5, 6 y 16 similares.

Los datos sugieren, que la posición radial de los cromosomas no se conserva en células con diferente nivel de ploidía, y que los cromosomas se disponen más próximos a la periferia del núcleo conforme aumenta la ploidía.

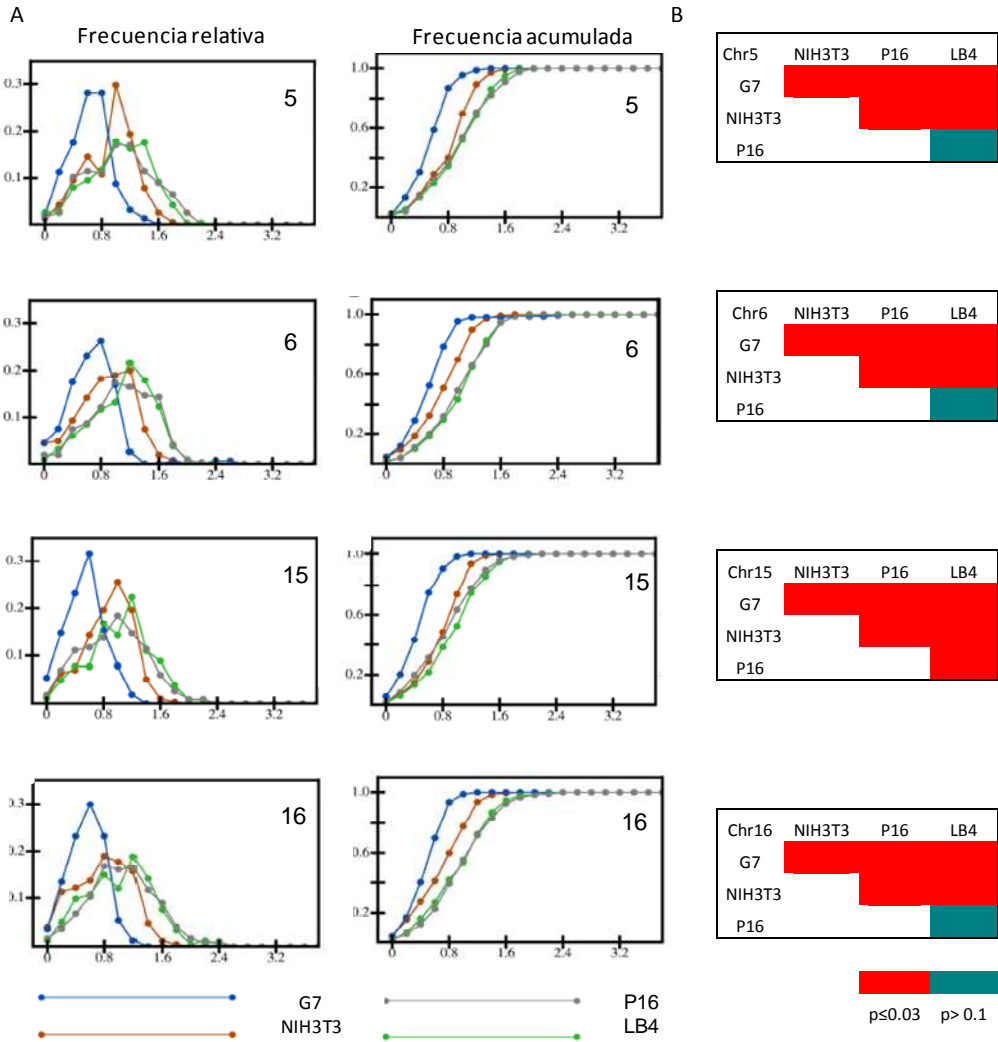


Fig. 32. Frecuencias relativas y acumuladas de la distribución radial de los cromosomas 5, 6, 15 y 16 en células G7, NIH3T3, P16 y LB4 (A). Diagrama de colores construido con los valores de “p” para las comparaciones estadísticas de distribución de los cromosomas en los diferentes tipos celulares (B).

Adicionalmente, se realizaron análisis estadísticos para explorar si existía correlación entre la posición radial de los cromosomas y el tamaño promedio del núcleo. El test de Kendall Tau demostró que la distribución espacial de los cromosomas no es dependiente del tamaño del núcleo (Tau = -0,0238095; SD = 0,185093; p = 0,897646). Sin embargo, la aplicación del mismo test para estudiar la relación entre la posición de los cromosomas y el número de copias de los mismos,

demonstró que existe una correlación positiva entre las variables comparadas ($Tau = 0,676123$; $SD = 0,185093$; $p = 0,000259302$), lo que indicó que el incremento de la ploidía parece estar asociado con un cambio en la posición radial de los cromosomas y que principalmente se produce una mayor proximidad a la envoltura nuclear.

IV.2.2 Distribución de los genes *Socs1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a*

Para estudiar la distribución espacial de algunos genes en células en estado poliploide, realizamos 3D-FISH con sondas para los genes *Socs1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a* en neuronas primarias, fibroblastos diploides G7 y fibroblastos triploides NIH3T3. El gen *Socs1* mapea próximo al centrómero en el cromosoma 16, mientras que *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a* mapean en ratón en la región homóloga a la DSCR (16qC4). La posición radial en el núcleo interfásico se determinó directamente de las imágenes confocales utilizando el programa Volocity® como la distancia entre el centro nuclear y el centro de masa de la señal fluorescente, mientras que el radio se determinó como la distancia de la línea que separa el centro nuclear del punto de la periferia más próxima pasando por la señal fluorescente. De este modo, se obtuvo la posición de la señal en el núcleo en interfase como un porcentaje del radio del núcleo de cada célula en tres dimensiones.

Se compararon los valores de la posición radial de los cuatro genes que mapean sobre el cromosoma 16 en cada tipo celular (Fig. 33A). Los resultados obtenidos para las distintos tipos celulares se compararon mediante el test estadístico ANOVA de un factor y ajuste de Bonferroni. Éstos se utilizaron para confeccionar diagramas de colores en los que valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos y se expresaron en la gráfica de color rojo (Fig. 33B). La posición radial de los genes *Socs1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a* resultó similar en el núcleo en interfase de los fibroblastos G7 ($p > 0,05$). Sin embargo, sí se observaron diferencias estadísticas para *Dyrk1a* en las neuronas, donde resultó más próximo al centro (55,7%) que *Sod1* ($p = 0,01$). Por otro lado, en la línea de fibroblastos triploide NIH3T3 la posición radial de los genes fue más heterogénea, *Dyrk1a* se encontró más próximo a la periferia que *Sod1* y *Dscr3* (70,7%, 63,2%) ($p = 0,014$).

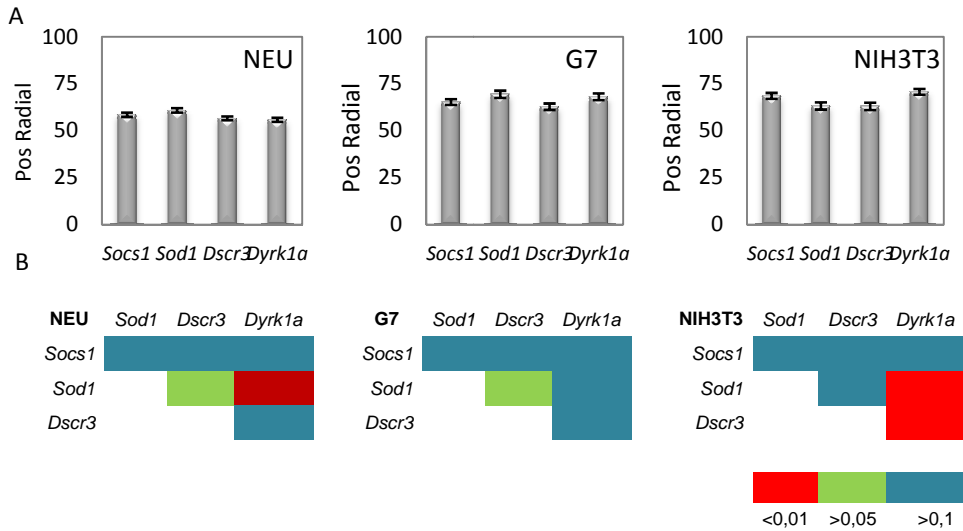


Fig. 33. Posición radial preferente de los genes *Socs1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a* en células de ratón diploides y triploides (A). Diagrama de colores asociado a los valores de significancia estadística obtenidos (B).

Subsiguientemente, estudiamos la distribución radial de cada gen en el núcleo de las neuronas y de los fibroblastos con diferente nivel de ploidía mediante la representación de la frecuencia acumulada de los datos de posición radial de los genes expresados en porcentaje del radio nuclear de la misma célula (Fig. 34A). Se observó que los genes se encontraron más centrales en las neuronas (56-61%) que en los fibroblastos, en los que se trasladaron a una posición intermedia (60-70%). El ejemplo más significativo lo constituye *Dyrk1a* que en las neuronas se localiza centralmente, mientras que en los fibroblastos lo hace significativamente más próximo a la periferia nuclear. Por otro lado, la distribución radial de los genes parecía similar con el aumento del nivel de ploidía en fibroblastos G7 y NIH3T3. Se aplicó el test ANOVA de un factor para comparar estadísticamente la distribución radial de los genes entre las células de ratón con diferente nivel de ploidía (*Socs1*, $F(2, 489) = 15,478$, $p = 0,000$), (*Sod1*, $F(2, 477) = 6,3749$, $p = 0,002$), (*Dscr3*, $F(2, 467) = 6,3351$, $p = 0,002$), (*Dyrk1a*, $F(2, 511) = 35,334$, $p = 0,000$). Los valores de significancia estadística obtenidos mediante Bonferroni se representaron asociados a un diagrama de colores. Se establecieron como significativos los valores de $p < 0,05$ en color rojo y $p > 0,1$ en azul (Fig. 34B).

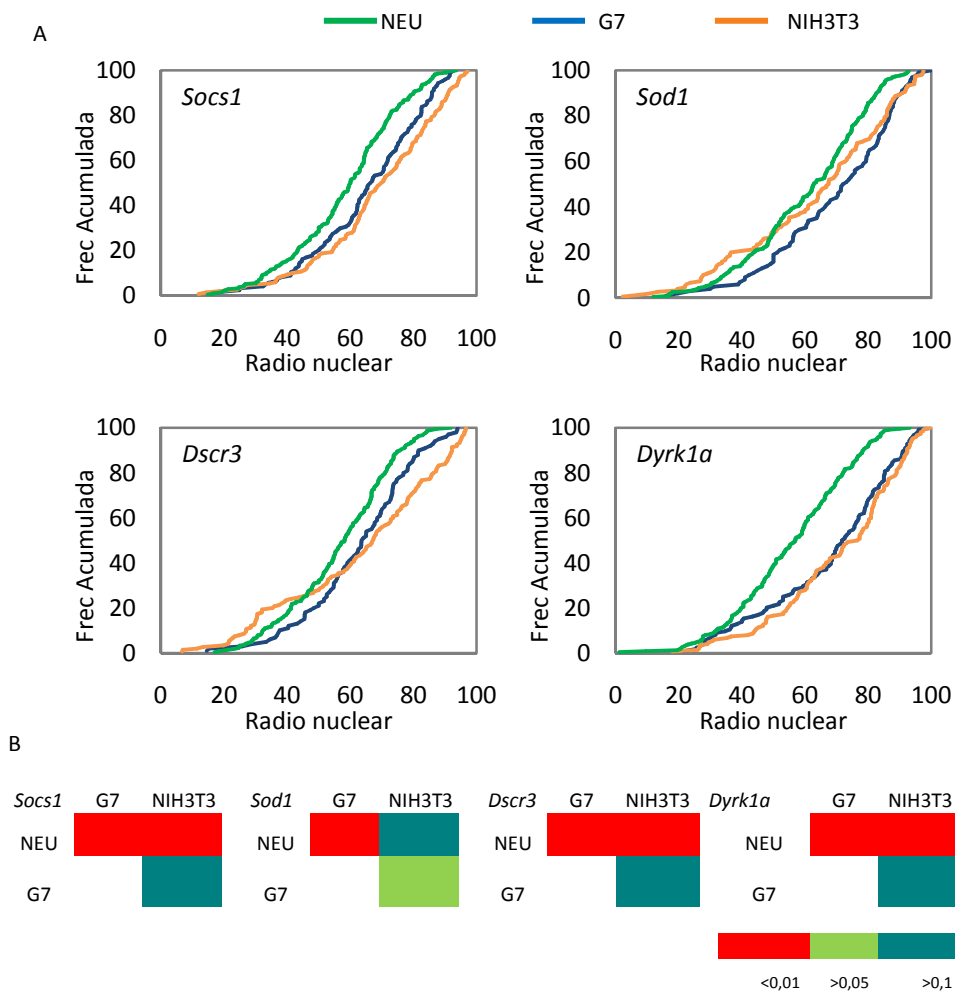


Fig. 34. Distribución de la frecuencia acumulada de la posición radial de los genes en las células de ratón (A). Diagrama de colores que representa los valores de significancia estadística obtenidos de la comparación entre las líneas celulares (B).

Las comparaciones estadísticas corroboraron lo observado mediante el estudio de la frecuencia acumulada. La posición radial de los genes resultó significativamente más central en neuronas que en fibroblastos G7 y NIH3T3 ($p = 0,000$). A excepción del gen *Sod1*, que mantiene una posición radial similar entre neuronas y NIH3T3 ($p > 0,1$) y en el límite de significancia estadística respecto de los fibroblastos murinos G7 ($p = 0,05$). Para el resto de genes *Socs1*, *Dscr3* y *Dyrk1a* el aumento de la ploidía entre G7 y NIH3T3 no provocó cambios en la posición radial de los genes ($p > 0,1$).

IV.2.3 Distribución de los genes *SOD1* y *DYRK1A* en células humanas

En el estudio anterior, se usaron fundamentalmente dos tipos celulares diferentes, fibroblastos y células epiteliales. La posición radial de los genes en fibroblastos con diferente nivel de ploidía resultó similar, es decir que el aumento de un set completo de cromosomas no provocó cambios en la posición radial de *Socs1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a*. Con el propósito de investigar cómo el aumento en el número copias de un cromosoma individual influía en la organización espacial del núcleo, se realizó 3D-FISH con sondas para los genes *SOD1* y *DYRK1A* en linfocitos humanos normales (GM03714) y en linfocitos con trisomía 21 (4710-176). La posición radial se determinó del modo descrito previamente para ratón. Se observó que *SOD1* y *DYRK1A* preferentemente ocupaban una posición radial intermedia entre el centro y la periferia del núcleo en linfocitos normales y trisómicos. Para comparar la posición relativa de los genes se aplicó el test de Student ($p \leq 0,05$; significancia estadística) y se encontró que no existían diferencias significativas en la posición de *SOD1* y *DYRK1A* ($p = 0,8$) en los linfocitos normales. En efecto, éstos localizan a una distancia promedio equivalente a 60,9% y 60,3% del radio del núcleo (Fig. 35A). Con los datos se construyeron los gráficos de frecuencia acumulada de señales respecto del radio nuclear. En los linfocitos trisómicos la posición de *DYRK1A* se conserva en 61,4% del radio nuclear, una diferencia estadísticamente no significativa respecto a los linfocitos normales ($p = 0,98$), mientras que *SOD1* ocupa una posición equivalente al 67,86% del radio nuclear en las células con trisomía 21, siendo este desplazamiento hacia la periferia del núcleo estadísticamente significativo ($p = 0,027$) (Fig. 35B).

Para concluir, parece que la sola presencia de una copia adicional de *SOD1* y *DYRK1A* no determina la posición radial de los genes, sino que otros factores, como por ejemplo la función, podrían influir en la organización espacial de los genomas trisómicos.

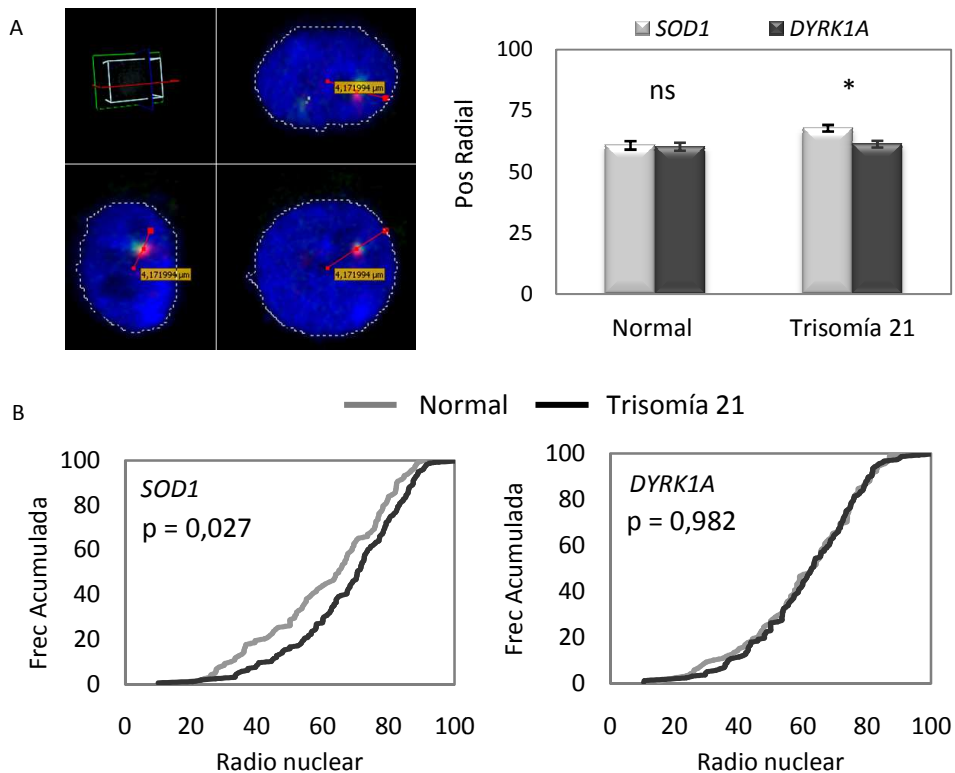


Fig. 35. Imagen de obtención de la posición radial en el núcleo en tres dimensiones y promedio de los genes *SOD1* y *DYRK1A* en los linfocitos humanos normales y los linfocitos con trisomía 21 (A). Distribución radial de los genes y comparación estadística (B).

IV.3 Posición relativa de los cromosomas y genes

La distribución de los cromosomas/genes en el núcleo interfásico puede estar también definida respecto de la localización de otro cromosoma/gen, de modo que los elementos genéticos se pueden considerar posicionados de manera distal o proximal uno respecto de otro. También la distribución se puede describir a través de la tendencia a formar grupos cromosómicos o dominios claramente distinguibles, como por ejemplo la organización de las secuencias de ADN codifican los ARN ribosomales (NOR, *nucleolar organization region*) que constituyen el nucléolo.

IV.3.1 Asociación de los cromosomas 5, 6, 15 y 16.

Con el objeto de estudiar la organización espacial del genoma en estados de aneuploidía se realizó la técnica FISH con sondas para los cromosomas 5, 6, 15 y 16

en células de ratón diploides (G7), triploides (NIH3T3) y tetraploides (P16 y LB4). La hibridación se realizó separadamente para el par 5-6 y el par 15-16 en los 4 tipos celulares y se midió la distancia entre ellos en los núcleos interfásicos. La distancia entre cromosomas se calculó en μm y se expresaron en unidades relativas respecto del radio de una esfera de igual volumen que el núcleo ($v = 4/3\pi r^3$). Los datos obtenidos se utilizaron para determinar la tendencia de los cromosomas de formar grupos entre ellos (pares), como así también para realizar estudios de correlación entre la posición relativa y el nivel de ploidía. Los valores de correlación positiva se asociaron con la proximidad y el agrupamiento cromosómico, mientras que los valores negativos de correlación se asociaron con la ausencia de agrupamiento entre los cromosomas. Los resultados del análisis de correlación igual a cero se interpretan como que la formación de grupos es aleatoria debida a la densidad cromosómica del núcleo en células poliploides y no a una tendencia específica de los cromosomas. El estudio de correlación se realizó para los cromosomas homólogos (5-5, 6-6, 15-15, 16-16) y para los cromosomas no homólogos (5-6, 15-16). En la línea de fibroblastos diploides G7, la correlación ΔC es igual a cero entre los cromosomas homólogos, por lo que se concluye que la distribución de homólogos en el núcleo es distante entre sí. Sin embargo, el análisis reveló una tendencia significativa de agrupamiento cromosómico entre los cromosomas 5 y 6, y 15 y 16 para esta línea celular (Fig. 36A). En las células NIH3T3, que poseen una copia extra del complemento cromosómico, los homólogos 15-15 y 16-16 exhiben una tendencia a agruparse en interfase. Similar tendencia a formar un par lo presentaron los cromosomas 5 y 6. Interesante destacar que el estudio reveló que en las células de la línea P16 (tetraploide) todos estos cromosomas muestran una tendencia al agrupamiento con su homólogo. Mientras que en los núcleos de las células LB4 (tetraploide) se detectó esta asociación sólo entre los pares cromosómicos 5-5, 6-6 y 5-6.

Con el propósito de estimar el nivel de significancia estadística de estos resultados, los datos obtenidos se compararon con valores teóricos generados mediante el modelado matemático de Monte Carlo. Mediante este procedimiento se generaron

10⁶ muestras del mismo tamaño que cada muestra experimental, en la cual los cromosomas exhibían una correlación negativa al agrupamiento. Se usó el criterio de Benjamini-Hochberg para establecer el nivel de $p \leq 0,0020232$ como estadísticamente significativo. Los resultados del análisis se representan como un diagrama de colores en el que el color rojo indica significancia y el color azul está asociado a valores de $p \geq 0,002$ (Fig. 36B). En resumen, valores de $p \leq 0,002$ implican que los datos de posición relativa uno respecto de otro obtenidos experimentalmente difieren significativamente de los obtenidos por modelado matemático y, por lo tanto, sugieren una disposición de los cromosomas formando pares que no es sólo debida al aumento de la densidad de cromosomas en el núcleo.

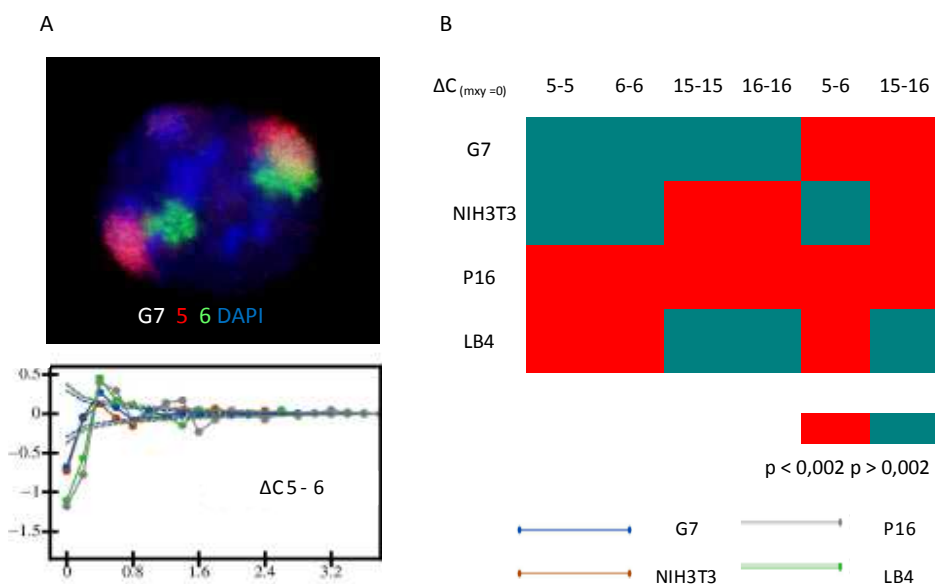


Fig. 36. FISH de territorios cromosómicos 5 (rojo) y 6 (verde). Correlación entre pares cromosómicos no homólogos 5-6 en el núcleo interfásico de células de ratón, G7, NIH3T3, P16 y LB4. (A). Diagrama de colores con los valores de p obtenidos del análisis estadístico de los cromosomas 5, 6, 15 y 16. $p \leq 0,002$ implica que la disposición de los cromosomas formando pares no es aleatoria (B).

IV.3.2 Posición relativa de los genes *Socs1-Dyrk1a* y *Sod1-Dscr3*

Los genes *Socs1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a* se encuentran en este orden dentro de la secuencia genómica del cromosoma 16 de ratón. *Socs1* y *Dyrk1a* distan 84 Mpb entre sí en la secuencia (genes distantes) y la distancia genómica entre *Sod1* y *Dscr3*

es de 4,5 Mpb (genes próximos). Con el objeto de estudiar la distribución relativa entre estos genes en el núcleo interfásico se realizó la técnica 3D-FISH con sondas locus-específicas sobre las neuronas y los fibroblastos G7 y NIH3T3. En primer lugar se realizó la validación de la sonda en metafase que demostró ausencia de alteraciones estructurales, es decir, la secuencia lineal de las señales de FISH coincidieron con lo esperado de acuerdo a lo descrito en la base de datos “Ensembl” (<http://www.ensembl.org>) (Fig. 37A). Para determinar la distancia 3D entre estos genes se obtuvieron las coordenadas x-y-z del centro de masas de cada elemento genético y las distancias a las que se encontraban separados en el núcleo en interfase se calcularon mediante la fórmula ($dAB = \sqrt{(x_2-x_1)^2 + (y_2-y_1)^2 + (z_2-z_1)^2}$) (Fig. 37A). El estudio reveló que la distancia promedio entre *Sod1* y *Dscr3* (4,5 Mpb a nivel genómico) en los núcleos de las neuronas era de 1,5 μm , mientras que en los fibroblastos G7 y NIH3T3 las mediciones resultaron en valores menores y relativamente similares entre sí, 0,83 μm y 0,97 μm , respectivamente. Con el fin de corregir las variaciones en el volumen nuclear, los valores absolutos de las posiciones relativas se normalizaron respecto del diámetro del núcleo (%Dn), y de esta manera se determinó que los genes *Sod1* y *Dscr3* se encontraban ubicados a una distancia equivalente a un 15% del diámetro nuclear en las neuronas. El diámetro del núcleo de las células NIH3T3 es significativamente mayor (~15 μm) que el del núcleo de G7 (~10 μm). Sin embargo, la normalización de los valores absolutos respecto del diámetro reveló que la distancia relativa entre *Sod1* y *Dscr3* en las células triploides era menor que en las células diploides (6,15% vs 10,14%).

El análisis de la posición relativa en interfase de genes distantes, es decir *Socs1* y *Dyrk1a* (84 Mpb a nivel genómico), reveló que éstos se encuentran a una distancia promedio de 2,22 μm en el espacio nuclear de las neuronas, equivalente a un 22,12% del diámetro del núcleo después de realizar la normalización correspondiente, mientras que la distancia que separa *Socs1* y *Dyrk1a* en interfase en la línea de fibroblastos diploide G7 y triploide NIH3T3 resultó en 1,81 μm y 1,53 μm , respectivamente. Sin embargo, la determinación de la distancia en unidades relativas respecto del diámetro del núcleo fue nuevamente menor, 9,15%D en las células

NIH3T3 y 17,15%D en las G7 (Fig. 37B). Para la comparación estadística de los datos se utilizó ANOVA de un factor. La distancia entre *Sod1* y *Dscr3* en μm y en unidades relativas al diámetro nuclear (%Dn) resultó ser significativamente diferente entre neuronas, G7 y NIH3T3 ($F(2,363) = 33,468, p = 0,00000$) ($F(2,363) = 59,186, p = 0,0000$). De igual modo, la distancia relativa entre *Socs1* y *Dyrk1a* resultó estadísticamente diferente en cada tipo celular ($F(2,385) = 63,529, p = 0,0000$) ($F(2,385) = 14,708, p = 0,00000$).

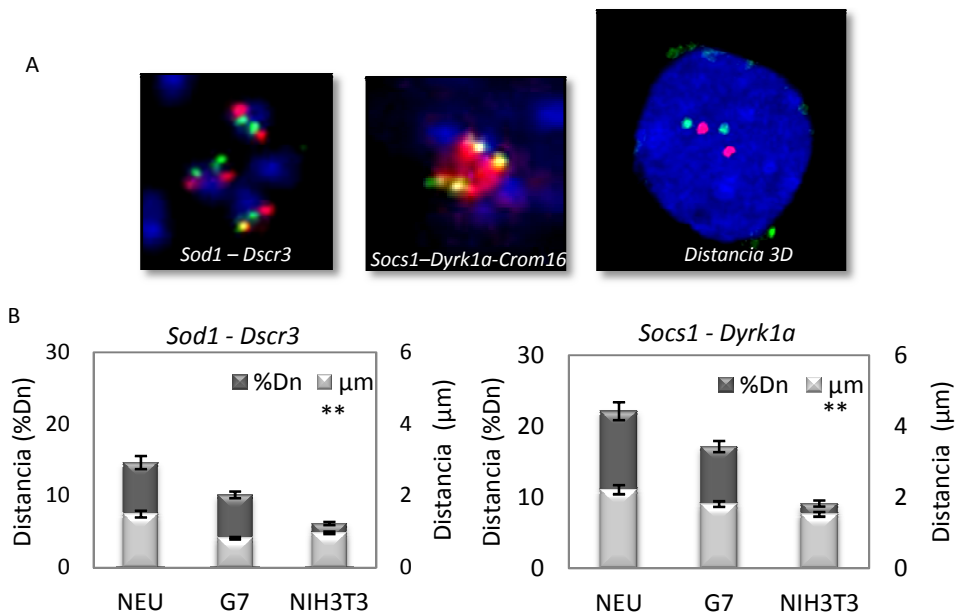


Fig. 37. Imagen de la distribución lineal de los genes próximos (*Sod1 - Dscr3*) y distantes (*Socs1 - Dyrk1a*) en el cromosoma metafásico y separación en el núcleo interfásico (A). Distancia tridimensional promedio en interfase expresada en valores relativos al diámetro nuclear (%Dn) (eje principal) y distancia en μm (eje secundario) (B).

En general, la distancia que separa los genes entre sí resultó mayor en las neuronas que en los fibroblastos, independientemente del nivel de ploidía. Por ejemplo, las neuronas y las G7 son células con un contenido cromosómico diploide y un tamaño nuclear similar, sin embargo las distancias *Sod1-Dscr3* y *Socs1-Dyrk1a* resultaron significativamente mayores en las neuronas respecto de los fibroblastos ($p = 0,00$). Estos resultados indican que la posición relativa entre los genes en interfase está relacionada con el tipo celular más que con el contenido genómico. Por otro lado, la

comparación de los valores de distancia entre las células G7 y NIH3T3 (ambos fibroblastos) mostró que estos eran significativamente diferentes ($p = 0,00$). En efecto, la ganancia de un set completo de cromosomas en las células NIH3T3 resultó en el aumento de casi el doble del volumen nuclear respecto de las células G7, pero aún así ocurrió una disminución muy significativa de la distancia relativa entre *Sod1-Dscr3* y *Socs1-Dyrk1a* en las células triploides con respecto de las células diploides. Por lo tanto, se podría especular que adicionalmente al tipo celular, la actividad de los genes influye en la organización espacial de éstos en el núcleo en interfase.

Finalmente, cabe destacar que aunque *Socs1* y *Dyrk1a* se disponen dentro del espacio nuclear más alejados entre sí que *Sod1* y *Dscr3*, éstos no lo hacen de modo proporcional a su distancia genómica, es decir, 20 veces mayor en el caso de *Socs1* y *Dyrk1a* (84,5 Mpb) que en el de *Sod1* y *Dscr3* (4,5 Mpb).

-Correlación de la distancia entre los genes en el estado diploide y poliploide.

Adicionalmente se realizó un estudio sobre la tendencia del agrupamiento de los genes entre sí en el núcleo interfásico de células G7 y NIH3T3. Con los valores de distancia entre *Socs1-Dyrk1a* y *Sod1-Dscr3* expresados en unidades relativas al radio del núcleo, se realizó el mismo análisis de correlación entre *Sod1-Dscr3* y *Socs1-Dyrk1a* mediante la comparación de la posición relativa observada respecto de un modelo teórico de distribución aleatoria. Si la correlación era positiva, la proximidad entre los genes estaba favorecida y era probable que esos genes se encontrasen agrupados, mientras que los valores negativos de correlación se asociaban con falta de agrupamiento.

En la figura 38A se puede observar que los valores de correlación (eje de ordenadas) son positivos entre los genes que se disponen a una distancia mínima relativa de 0,2 unidades en interfase (eje de abscisas). En la línea de fibroblastos G7, se encontraron valores de correlación entre *Socs1-Dyrk1a* igual a 3, mientras que entre *Sod1-Dscr3* este valor alcanzó las 8 unidades, indicando que hay una tendencia de agrupación significativamente mayor. En la línea de fibroblastos triploide NIH3T3, el análisis de correlación entre estos genes mostró que hay una tendencia

marcadamente mayor de los genes a formar grupos que en las células G7, lo que se indica en la escala del gráfico. En general, la tendencia de los genes próximos de agruparse entre sí resultó mayor que para los genes distantes, además este fenómeno fue más pronunciado en células NIH3T3 que en fibroblastos G7 (Fig. 38A). En la figura 38B se compararon estadísticamente los datos de la distribución de la frecuencia acumulada de la distancia relativa entre los genes *Sod1-Dscr3* y *Socs1-Dyrk1a* en las células G7 y NIH3T3.

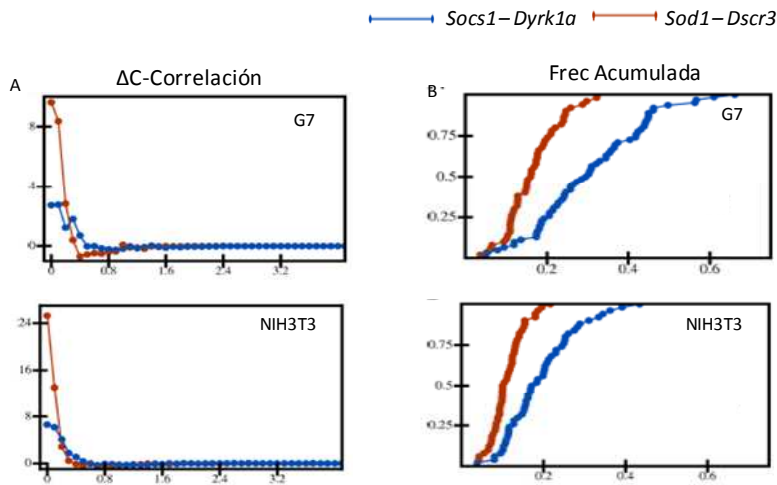


Fig. 38. Análisis de correlación entre *Socs1-Dyrk1a* (azul) y *Sod1-Dscr3* (rojo). Correlación positiva de agrupamiento de genes (eje abscisas) (A). Frecuencia acumulada de la distribución de distancia entre *Sod1-Dscr3* y *Socs1-Dyrk1a* en la línea diploide G7 y triploide NIH3T3 (B).

Se aplicó la prueba estadística de Wilcoxon Mann Whitney ($p \leq 0,05$; estadísticamente significativo) y se encontró que la distribución de los genes en el núcleo de las células G7 es significativamente diferente ($p = 8,7 \times 10^{-9}$). De igual modo, en NIH3T3, *Sod1* y *Dscr3* se encontraron significativamente más próximos entre sí que *Socs1* y *Dyrk1a* ($p = 4,8 \times 10^{-8}$) (Fig. 38B). En resumen, los genes *Sod1* y *Dscr3* se encuentran próximos en la secuencia genómica y presentaron una mayor tendencia de agrupamiento que los genes *Socs1* y *Dyrk1a*. El estudio de correlación, descrito en la sección anterior, reveló que existe una tendencia estadísticamente significativa de agrupamiento de los cromosomas homólogos 16-16 en la línea celular triploide NIH3T3.

El cromosoma 16 de ratón es ortólogo del cromosoma 21 humano y en la región

sinténica entre estas dos especies mapean genes críticos implicados en la patología del Síndrome de Down. Entre los numerosos genes presentes en esta región genómica, se seleccionaron *Socs1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a* y se estudió su posición en el núcleo interfásico de células G7 (diploides) y NIH3T3 (triploides). Es decir, se determinó la distancia entre los alelos de un mismo gen y la tendencia de agrupamiento entre ellos (*Socs1-Socs1*, *Sod1-Sod1*, *Dscr3-Dscr3* y *Dyrk1a-Dyrk1a*) mediante un análisis de correlación similar al descrito anteriormente. Para cada núcleo la distancia se expresó en unidades relativas respecto del radio de una esfera de igual volumen que el núcleo analizado. Acorde a lo esperado, el estudio reveló que los alelos siguen un patrón de distribución similar al obtenido para los cromosomas 16 homólogos en células NIH3T3. Los alelos que se disponen a una distancia equivalente a 0,25 del radio nuclear presentaron valores de correlación negativa, por lo que se los consideró distantes (no forman un par) en este tipo celular. En G7, la correlación (ΔC) entre los alelos resultó similar a cero, mientras que en NIH3T3 se obtuvieron valores de correlación positiva y eventos de agrupamiento específico de las señales para una distancia relativa entre alelos de 0,5 unidades del radio nuclear, respectivamente. Aunque parece que la distancia podría variar relativamente entre los diferentes genes. En general, las unidades de correlación resultaron menores para los genes que para los cromosomas, lo que se representó en la escala del gráfico (Fig. 39).

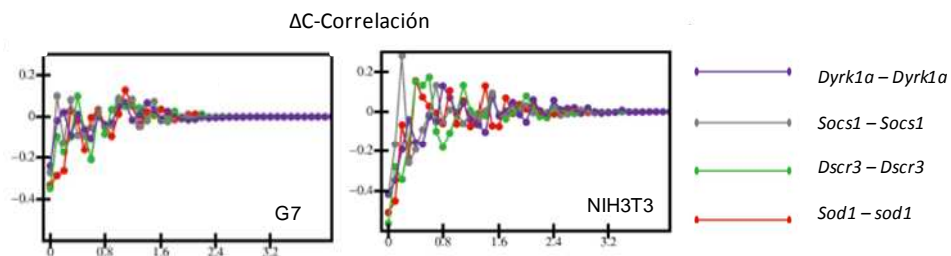


Fig. 39. Posición relativa entre alelos de un mismo gen en la línea de fibroblastos diploide G7 y en la triploide NIH3T3. En el eje de ordenadas se representan los resultados del estudio de correlación, mientras que en el eje de abscisas se representan las distancias relativas entre alelos, expresadas como fracción del radio nuclear.

IV.3.3 Distribución relativa entre alelos

Con el objeto de estudiar más detalladamente la posición relativa entre genes, se determinó la posición tridimensional de cada alelo en los fibroblastos G7 y NIH3T3 y adicionalmente se estudiaron estos mismos genes en cultivos primarios de neuronas. Con estos datos se calcularon las distancias entre los diferentes elementos genéticos en el espacio nuclear mediante la fórmula $dAB = \sqrt{(x_2-x_1)^2 + (y_2-y_1)^2 + (z_2-z_1)^2}$. Debido a las variaciones intercelulares del volumen nuclear, las distancias se expresaron de forma relativa respecto del diámetro del correspondiente núcleo (%Dn).

En la figura 40 se presentan las distancias promedio entre los alelos de *Socs1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a* en cada tipo celular. En las neuronas, la distancia que separa los alelos de todos estos genes uno respecto del otro es similar, alrededor del 40% del diámetro nuclear. En los fibroblastos G7, los alelos se encuentran separados entre sí a una distancia promedio equivalente a 50% del diámetro nuclear, mientras que en los fibroblastos NIH3T3, la distribución resulta más heterogénea, y los alelos de *Dyrk1a* se encuentran más alejados (54% del diámetro nuclear), los alelos de *Socs1* se ubican a una distancia equivalente al 50% del diámetro nuclear, y *Sod1* y *Dscr3* son los que localizan más próximos entre sí (45%). El análisis estadístico aplicando ANOVA de 1 factor y $p \leq 0,05$ como significativo, reveló que no existen diferencias estadísticas en la separación de los alelos de los genes *Socs1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a* en neuronas y fibroblastos G7 (Neu, $F(3,443) = 1,8354$, $p = 0,13994$) (G7, $F(3,220) = 2,2224$, $p = 0,08645$). Estos resultados demuestran que la organización espacial de los cuatro genes que mapean sobre el cromosoma 16 de ratón guarda correlación con lo observado para los territorios cromosómicos. En la línea de fibroblastos NIH3T3 (triploide), las distancias interalélicas promedio fueron estadísticamente diferentes para los genes ensayados ($F(3, 596) = 6,5672$, $p = 0,00023$). La aplicación del ajuste de Bonferroni (considerando valores de $p \leq 0,05$ como significativos) reveló que la distancia entre los alelos de *Sod1* y *Dscr3* resultó significativamente menor que la distancia entre los alelos de *Dyrk1a* en células NIH3T3 ($p = 0,001$). Estos resultados sugieren que la presencia de copias adicionales del gen está asociada a una

organización espacial del genoma diferente a la de las células con una dosis génica cuantitativamente normal (Fig. 40).

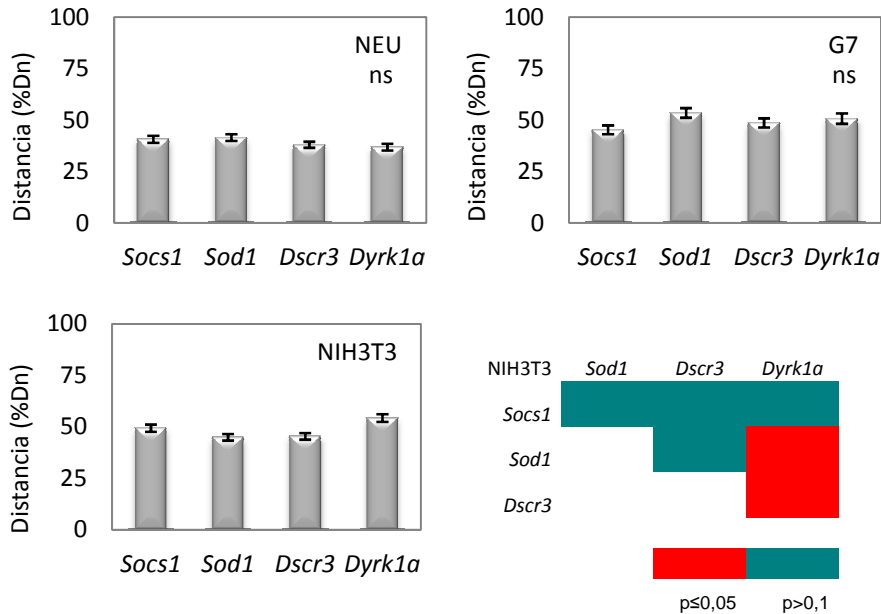


Fig. 40. Distancia promedio entre los alelos de los genes *SocS1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a* para neuronas, fibroblastos G7 y NIH3T3 (dAlelos %Dn). Diagrama de colores con la probabilidad asociada en NIH3T3.

En general se obtuvieron distancias más pequeñas entre alelos en las neuronas que en los fibroblastos diploides y triploides (promedio 39%-50%-49%). El diagrama de frecuencia relativa muestra este fenómeno, se observó un mayor porcentaje de casos con una distancia interalélica de *SocS1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a* menor (20-40%Dn) en las neuronas que en G7 y NIH3T3 (Fig. 41A). Para cada gen se comparó la distancia interalélica en los tres tipos celulares. Se utilizó la prueba estadística ANOVA con ajuste de Bonferroni y con los valores de p obtenidos de las comparaciones se confeccionó un diagrama de colores en el que el color rojo indica valores de $p \leq 0,05$ y el color azul valores de $p \geq 0,1$ (Fig. 41B).

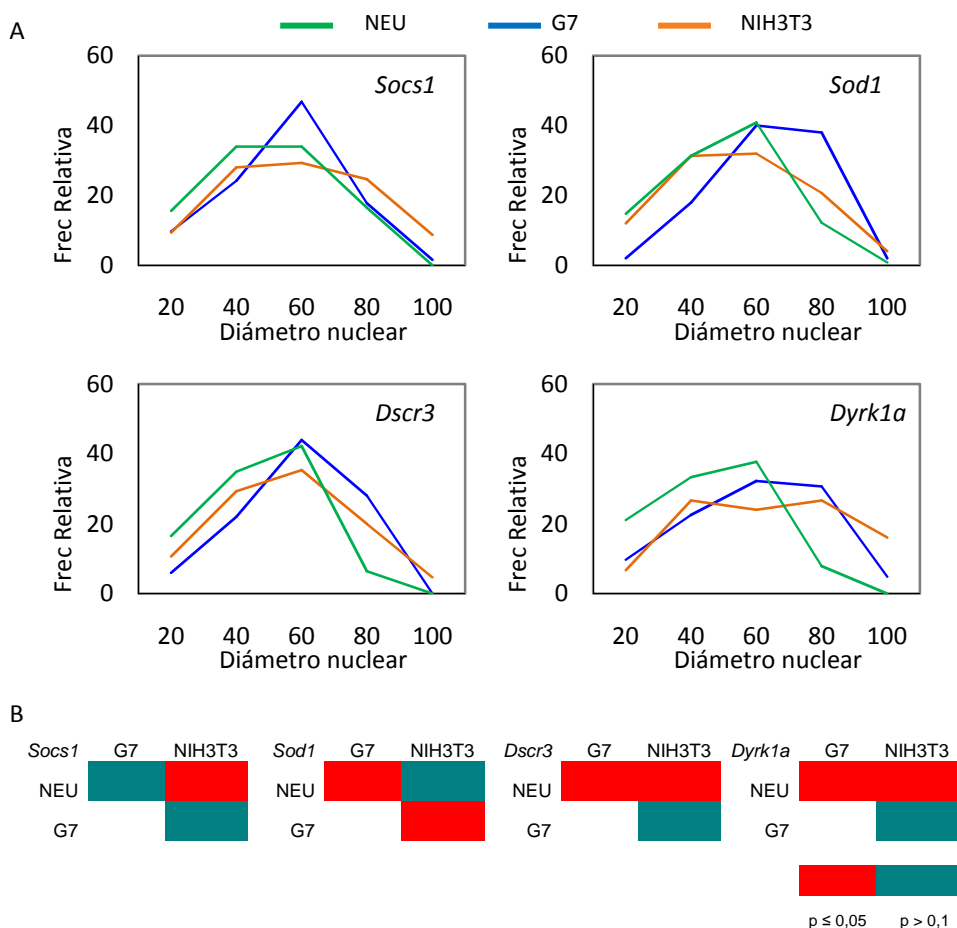


Fig. 41. Frecuencia relativa de la separación entre alelos en el cultivo primario de neuronas y fibroblastos de ratón con diferente nivel de ploidía, G7 y NIH3T3 (A). Diagrama de color obtenido con los valores de “p” (B).

Este análisis demostró que, a excepción de los alelos del gen *Socs1*, la distancia interalélica para los otros genes es significativamente menor en neuronas que en G7 ($p = 0,00$). Similar comparación entre las neuronas y los fibroblastos NIH3T3 reveló que las distancias entre alelos eran estadísticamente diferentes, excepto para *Sod1* ($p = 0,41$) que resultó a una separación similar respecto de las neuronas y más próximo entre los fibroblastos murinos triploides y diploides ($p = 0,01$). Sin embargo, para el resto de genes del cromosoma 16 la separación de alelos *Socs1*, *Dscr3* y *Dyrk1a* no resultó estadísticamente diferente en células con diferente nivel de ploidía ($p > 0,1$). Los datos demuestran que la distancia entre alelos parece ser característica de cada

tipo celular, es decir, la distribución de alelos es similar en células con el mismo estado de diferenciación, aún cuando incrementa el nivel de ploidía.

-Distribución espacial de los alelos en células triploides

La observación directa de las imágenes obtenidas para las células NIH3T3 reveló la existencia de una distribución peculiar de los alelos en el núcleo interfásico, consistente en que dos señales se disponen próximas entre sí y relativamente alejadas del tercer alelo. Interesante destacar que esta distribución se correlaciona con los datos de agrupamiento de los cromosomas homólogos (16-16) en este tipo celular. Por lo tanto, se realizó un análisis adicional con los datos de distancia tridimensional de los alelos de los genes *Socs1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a*, consistente en el agrupamiento de los datos en tres categorías de distancia, d1, d2 y d3, que corresponderían a los lados del triángulo observado en la imagen en interfase. Primeramente, con los datos crudos, se confeccionaron diagramas de cajas (Fig. 42) que incluían el 50% de los valores de cada grupo comprendidos entre el cuartil 25 (Q25) y el cuartil 75 (Q75). Los extremos de las barras de cada caja representaban los valores máximos y mínimos de la población. La distribución de los datos crudos permitió determinar la dispersión de los valores. En general, el 50% de las mediciones de distancia entre alelos se encontraban entre el 20-40% del diámetro nuclear para d1, 40-60% para d2 y para d3 entre el 60-80%. El análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor reveló diferencias altamente significativas en la distribución de las distancias d1, d2 y d3. En efecto, para *Socs1* se obtuvo $F(2,147) = 90,48$ ($p = 0,00$); para *Sod1* $F(2,147) = 72,62$ ($p = 0,00$); para *Dscr3* $F(2,147) = 78,18$ ($p = 0,00$) y para *Dyrk1a* $F(2,147) = 98,65$ ($p = 0,00$). Por tanto, se concluye que la distribución de alelos en células NIH3T3 con dos alelos próximos entre sí y un alelo distante es la más frecuente, ya que al menos el 50% de los valores se ajusta al patrón detectado por observación microscópica directa. De los cuatro genes estudiados, los alelos del gen *Dyrk1a* exhiben esta distribución más claramente, la distancia entre los alelos próximos se encuentra en un intervalo correspondiente al 25-37% del diámetro nuclear, mientras que la distancia respecto del alelo distante es significativamente mayor.

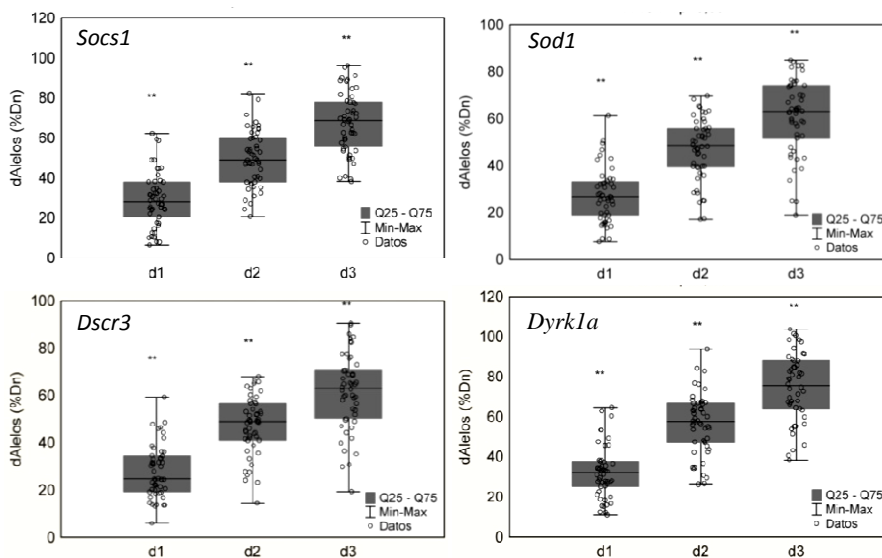


Fig. 42. Distribución de los valores de distancia interalélica (d1, d2 y d3) para los genes *Socs1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a* en la línea de fibroblastos NIH3T3. En todos los casos la distribución d1, d2 y d3 fue estadísticamente diferente ($p < 0,05$).

Con el objeto de determinar si la distancia d1, d2 y d3 en el núcleo de células trisómicas resultaba diferente a la separación entre alelos en células diploides, se aplicó t-Student y valores de $p < 0,05$ como significativos. Es decir, para cada gen se comparó la distancia obtenida en G7 con las distancias d1, d2 y d3 de NIH3T3 (Fig. 43). Este estudio reveló que la organización de los alelos/cromosomas es consistente con la observación de dos genes próximos entre sí y alejados del tercero. El conjunto de distancias d1 resultó significativamente inferior a la distancia entre alelos en G7 ($p = 0,00$), la distancia d2 resultó similar a la encontrada en células normales y no mostró cambios significativos ($p > 0,05$), mientras que d3 resultaron los alelos más alejados entre sí ($p = 0,00$). Dicha distribución se cumplió de forma consistente para *Socs1*, *Dscr3* y *Dyrk1a*, mientras que nuevamente resultó relativamente diferente en *Sod1*. En este caso, la separación del alelo distante de *Sod1* (d2 y d3) resultó en el límite de significancia estadística respecto de la distancia encontrada en las células normales ($p = 0,03$).

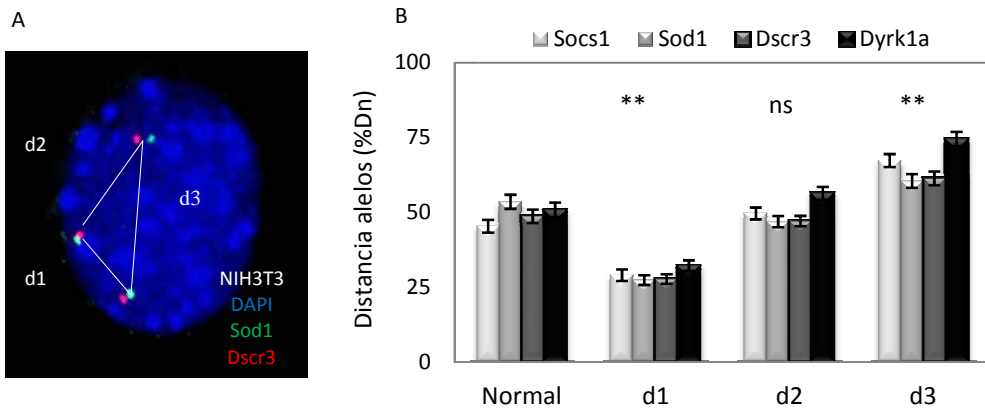


Fig. 43. Imagen FISH de distancia entre alelos en NIH3T3. Comparación de d1, d2 y d3 en células triploides respecto de fibroblastos G7 diploides.

Para finalizar, cabe destacar que la serie de datos d1 incluye el conjunto de distancias interalélicas equivalentes a 29%, 27%, 28% y 32% del diámetro nuclear para *Socs1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a*, respectivamente, y que corresponden a los alelos más próximos entre sí. Interesante destacar que en los análisis de correlación descritos previamente se observó una tendencia positiva de agrupamiento de los genes a una distancia aproximada de 0,5 unidades relativas del radio. Por lo que los valores obtenidos para d1, en torno a un 25% del diámetro del núcleo, se ajustarían a lo obtenido con los análisis de correlación. Un número similar de datos de distancias entre alelos fluctuaron alrededor de una distancia promedio equivalente al 50% del diámetro nuclear y se categorizaron como d2. Específicamente, éstos fueron 47% entre *Sod1* y *Dscr3*, 50% entre los alelos de *Socs1* y 56% entre los alelos de *Dyrk1a*. Finalmente, en la categoría d3 se incluyen los alelos más alejados entre sí, cuyas distancias fueron 67% del diámetro nuclear para *Socs1*, 60% para los alelos de *Sod1*, 61% para *Dscr3* y 74% para *Dyrk1a* (Fig. 44). El análisis estadístico mediante ANOVA de un factor de las distancias d1, d2 y d3 entre los alelos de los genes *Socs1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a* en NIH3T3 y ajuste de Bonferroni sugiere que las distancias en la categoría d1 son más homogéneas, ya que no existen diferencias significativas entre ellas. Mientras que este mismo análisis reveló que la distancia entre los alelos de *Dyrk1a* categorizados como d2 es significativamente diferente de

las que se establecen entre los alelos de los otros tres genes. Finalmente, las distancias interalélicas distales (d3) fueron estadísticamente diferentes para los cuatro genes (Fig. 44).

Estos datos indican que los alelos posicionados de manera distal (d3) guardan una relación diferente a la de los alelos ubicados proximalmente (d1) lo que podría ser debido a una organización espacial interna diferente del cromosoma ubicado distalmente. Alternativamente, podría considerarse que los cromosomas ubicados a una distancia d1 estarían más limitados de espacio. Más importante aún sería demostrar si este tipo de organización tiene relación alguna con la función.

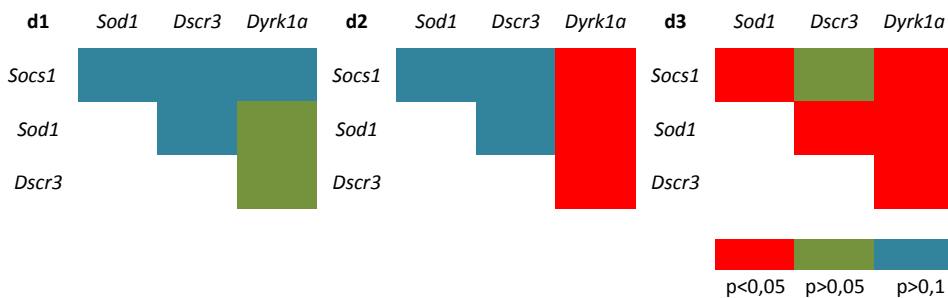


Fig. 44. Diagrama de colores confeccionado con los valores de “p” obtenidos de la comparación estadística entre d1, d2 y d3 de los genes *Socs1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a*.

IV.3.4 Posición relativa de los cromosomas 21 y de los genes *SOD1* y *DYRK1A*

En primer lugar, se determinó la posición relativa del par cromosómico 21 en 34 núcleos de linfocitos normales y en 58 núcleos de linfocitos trisómicos. En linfocitos normales se observó que un 44% de las células exhibían un territorio cromosómico 21 único, pero de mayor tamaño que en el 56% restante que presentó dos territorios claramente distinguibles. Probablemente este fenómeno sea debido a la yuxtaposición de los dos homólogos en interfase. En las células trisómicas se identificaron núcleos con tres, dos y un territorio cromosómico, en una frecuencia de 17%, 55% y 28%, respectivamente (Fig. 45A).

Para determinar la posición relativa de los cromosomas uno respecto de otro en el espacio nuclear se midieron las distancias que los separaban desde el centro de masa

de cada territorio cromosómico y se expresaron en valores relativos respecto del diámetro nuclear. La distancia promedio intercromosómica fue equivalente a 47% del diámetro nuclear en linfocitos disómicos. Como ocurriera para las células de ratón NIH3T3 (triploides), la observación microscópica directa de las preparaciones de FISH reveló que en las células humanas trisómicas los cromosomas 21 adoptaban una distribución espacial característica con dos cromosomas próximos entre sí y uno más alejado (Fig. 45A). Por lo tanto, se determinaron las tres distancias intercromosómicas y se agruparon en tres categorías, d1, d2 y d3, de la misma manera como se describió anteriormente. La distancia promedio entre los dos cromosomas localizados en proximidad (d1) fue de un 30% del diámetro nuclear. Mientras que las distancias intercromosómicas d2 y d3 fueron de 48 y 58%, respectivamente. Estos resultados se compararon estadísticamente mediante t-Student con respecto de la distancia entre los cromosomas 21 determinada en las células normales ($p < 0,05$; significativo). El análisis demostró que, en efecto, dos cromosomas 21 se disponen próximos entre sí a una distancia significativamente inferior ($p = 0,00$), mientras que el cromosoma distante se encontró a una separación similar a la observada en células disómicas o relativamente alejado ($p = 0,949$, $p = 0,04$) (Fig. 45B). Adicionalmente, la comparación entre d2 y d3 mediante la prueba t-Student no resultó en diferencias significativas ($p = 0,28$). La confirmación de que los cromosomas adoptan una distribución espacial característica en el núcleo interfásico se obtuvo con las células trisómicas en las que los cromosomas próximos que se encuentran yuxtapuestos se localizan respecto del cromosoma distante a una distancia similar a la determinada en las células normales ($p = 0,42$) (Fig. 45B).

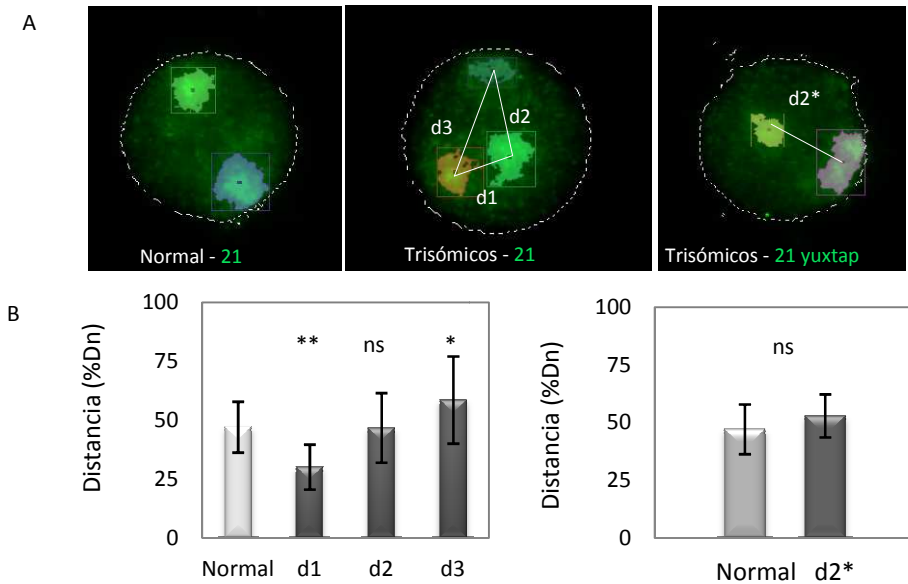


Fig. 45. FISH para el cromosoma 21 en linfocitos normales y derivados de pacientes con trisomía 21. Núcleos con tres territorios cromosómicos y con dos territorios cromosómicos (yuxtapuestos) (A). No se encontraron diferencias en la distancia promedio d2 de linfocitos trisómicos respecto de la distancia en linfocitos normales. Las distancias d1 y d3 resultaron estadísticamente diferentes (B).

Los cuatro genes ensayados anteriormente en células de ratón tienen sus genes sinténicos en humanos y éstos mapean sobre el cromosoma 21, específicamente en la región conocida como DSCR por su relación con la patología del Síndrome de Down. En esta oportunidad se seleccionaron dos genes representativos, *SOD1* y *DYRK1A*, y se estudió su organización espacial en el núcleo interfásico de manera similar a lo efectuado para los genes de ratón. La distancia entre los genes en la secuencia genómica es de 5,7 Mpb (Fig. 46A). La distancia tridimensional que separa el centro de masas de *SOD1* del centro de masas de *DYRK1A* se obtuvo mediante la fórmula $d_{AB} = \sqrt{(x_2-x_1)^2 + (y_2-y_1)^2 + (z_2-z_1)^2}$ en μm y estos valores se expresaron en valores relativos respecto del diámetro nuclear (%Dn). En las células disómicas la distancia promedio entre estos genes es de 0,8 μm , mientras que en las células con trisomía 21 es de 0,75 μm . El promedio de los valores relativos mostró que la distancia entre estos genes es similar en los dos tipos de células, 11,78%D y 12,04%D, respectivamente. La prueba estadística t-Student con valores de significancia de $p \leq 0,05$ reveló que la presencia de una copia extra del cromosoma

21 no induce cambios en la distancia tridimensional entre *SOD1* y *DYRK1A* ($p = 0,73$) (Fig. 46A). Sin embargo, la observación directa de las imágenes reveló que *SOD1* y *DYRK1A* en el núcleo en interfase podían encontrarse como señales distantes o como señales parcialmente solapadas entre sí, que se observaron en color amarillo por la superposición de los colores verde y rojo (*SOD1*, verde y *DYRK1A*, rojo). Por lo tanto, se realizó un análisis de colocalización de los dos canales de fluorescencia en esa región que se expresó en unidades relativas comprendidas en un rango de 0 (no colocalización) a 1 (valor máximo de colocalización). Se observó intensidad de fluorescencia roja y verde conjuntamente en una coordenada específica en el espacio nuclear (Fig. 46B). Posteriormente se cuantificó el número de veces en que ambas señales colocalizaban y se encontró que en los linfocitos disómicos un 47% de las señales dobles lo hacían, mientras que un 53% no. Mediante el test de la diferencia entre proporciones ($p \leq 0,05$; significativo) se mostró que las frecuencias eran similares ($p = 0,1969$), mientras que en los linfocitos trisómicos se observó un aumento relativo de la proporción de señales que colocalizan (58%) ($p = 0,000$).

La comparación estadística entre la proporción de señales que colocalizan en células trisómicas respecto de las disómicas revela que hay una tendencia al agrupamiento de estos dos genes en las células con trisomía 21 ($p = 0,0086$) (Fig. 46B).

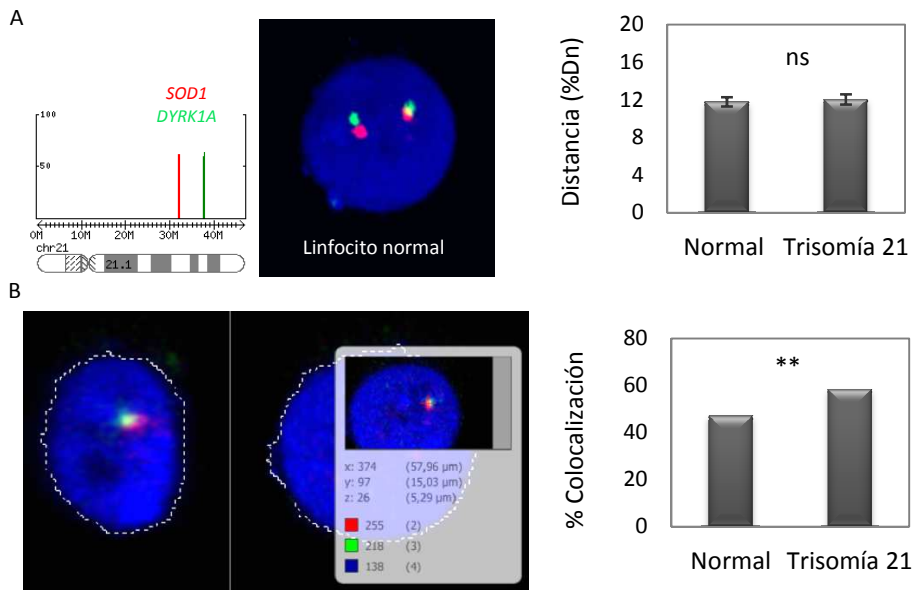


Fig. 46. Ideograma de la posición de *SOD1* y *DYRK1A* sobre el cromosoma 21 y 3D-FISH en el núcleo interfásico de un linfocito normal. Distancia tridimensional promedio entre *SOD1* y *DYRK1A* en interfase en unidades relativas al diámetro nuclear (%Dn) en linfocitos normales y trisómicos (A). Imagen de colocalización de señales parcialmente solapadas y valores de intensidad de fluorescencia rojo y verde en un mismo voxel. La frecuencia de colocalización resultó significativamente mayor en los linfocitos trisómicos que en los linfocitos normales (B).

Con el objeto de estudiar la relación entre la posición relativa de un gen respecto del otro y el grado de colocalización de señales de *SOD1* y *DYRK1A* en linfocitos normales y trisómicos, se aplicó la prueba estadística de correlación de variables de Pearson y se calculó la ecuación de la recta a la que se ajustaron los datos mediante regresión lineal. Coincidiendo con lo esperado, este análisis reveló que hay mayor grado de colocalización entre *SOD1* y *DYRK1A* para las señales próximas entre sí que para las señales más distantes, tanto en células normales como en trisómicas. De modo que se observaron genes próximos que presentaron valores de colocalización a una distancia inferior a un 10%Dn respectivamente en linfocitos normales y trisómicos (Fig. 47A y B).

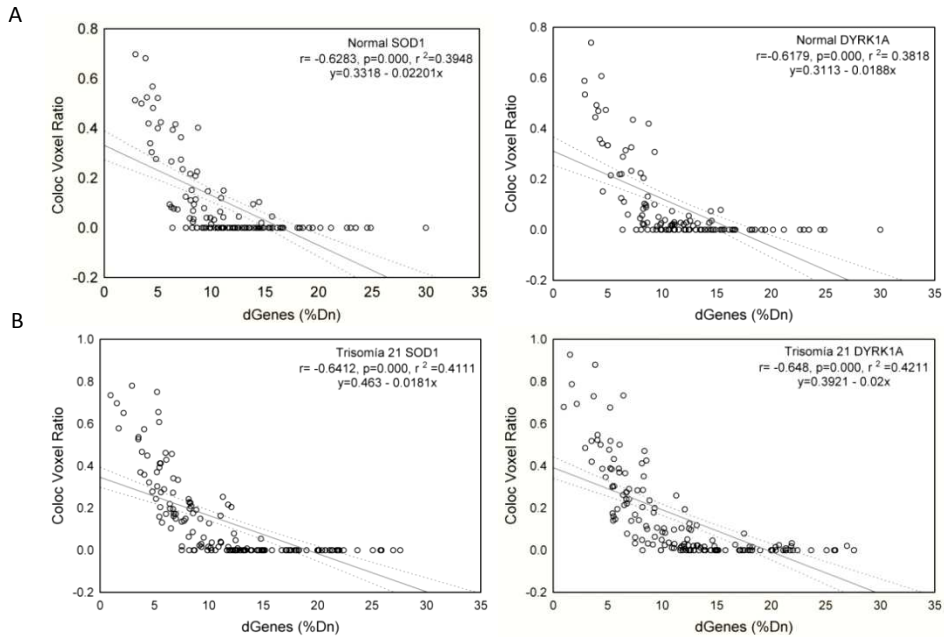


Fig. 47. Correlación y recta de regresión entre las variables de grado de colocalización y posición relativa de *SOD1* respecto de *DYRK1A* en linfocitos normales (A) y linfocitos trisómicos (B).

Como se mencionó anteriormente, en algunos núcleos las señales fluorescentes correspondientes a dos territorios cromosómicos se encontraban yuxtapuestas, por ello se decidió estudiar la distribución tridimensional de los alelos de *SOD1* y *DYRK1A*. Se determinó la posición relativa entre *SOD1-SOD1* y *DYRK1A-DYRK1A* midiendo la distancia que separaba a los dos alelos uno respecto de otro y el valor absoluto se expresó en función del diámetro nuclear para corregir las diferencias debido a las variaciones del volumen nuclear. En los linfocitos normales la distancia entre los alelos de *SOD1* fue de 42,45% y la de *DYRK1A* de 40,52%. Estos valores promedio obtenidos a partir de 59 núcleos se compararon estadísticamente mediante t-Student ($p < 0,05$; diferencia significativa) y el análisis reveló que en los linfocitos normales las distancias entre los alelos no presentaban diferencias significativas ($p = 0,515$). Estos datos concuerdan con los obtenidos para los cromosomas homólogos 21.

En 52 núcleos de células trisómicas, se observó que la presencia de una copia extra del cromosoma 21 modificaba significativamente la distancia entre los alelos de *SOD1*, los cuales se encontraron a una distancia promedio de 47,82% del diámetro nuclear. Este valor resultó estadísticamente diferente del encontrado en los linfocitos normales ($p = 0,037$). Sin embargo, la distancia promedio entre los alelos de *DYRK1A* se cuantificó en 43,71%, un valor que no resultó estadísticamente diferente del encontrado en células normales ($p = 0,175$) (Fig. 48A). Los datos indican que los alelos de *SOD1* se encuentran más alejados entre sí que *DYRK1A* y concuerdan con los datos de posición radial que demuestran que *SOD1* adquiere una posición más periférica en las células trisómicas. La distribución de frecuencia acumulada demostró una mayor proporción de señales distantes en *SOD1* que en *DYRK1A*, principalmente a una separación del 80%Dn (Fig. 48B).

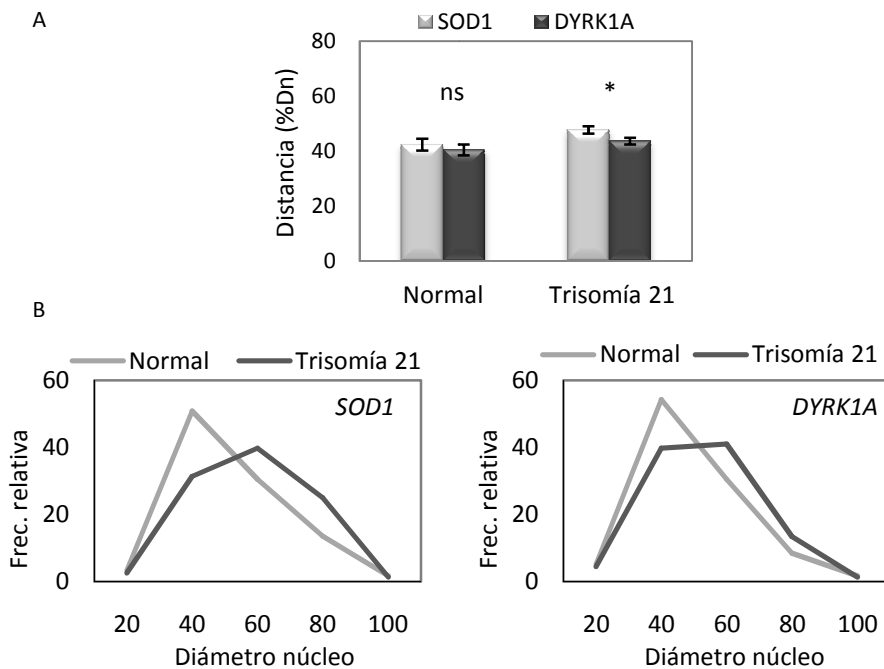


Fig. 48. Separación promedio entre los alelos de *SOD1* y *DYRK1A* en células disómicas y con trisomía 21 (A). Distribución de la frecuencia relativa de la distancia entre alelos (B).

Los datos de la distancia tridimensional entre los alelos *SOD1* y *DYRK1A* se ordenaron en tres grupos d1, d2 y d3, como se ha descrito anteriormente. Los valores de distancia d1, d2 y d3 se ordenaron también mediante gráfico de cajas y se analizaron estadísticamente. Se representaron el 50% central de los valores de cada grupo, mediante la mediana, el cuartil 25 (Q25) y el cuartil 75 (Q75). Los extremos de las barras representaron el valor mínimo y máximo de la distribución. También se representaron los valores individuales para mostrar la dispersión de los datos. El 50% de los valores se encontraron alrededor de la distancia promedio expuesta previamente en cada grupo. Con el objeto de comparar d1, d2 y d3 para cada gen se aplicó ANOVA de 1 factor y ajuste de Bonferroni con valores de $p < 0,05$. El análisis reveló que la separación entre alelos d1, d2 y d3 resultó significativamente diferente en el núcleo en interfase para *SOD1* ($F(2,153) = 65,92$, $p = 0,00$) y *DYRK1A* ($F(2,153) = 48,09$, $p = 0,00$) (Fig. 49), lo que confirmó que esta distribución parece la más frecuente en las células trisómicas, en un 50% de los casos.

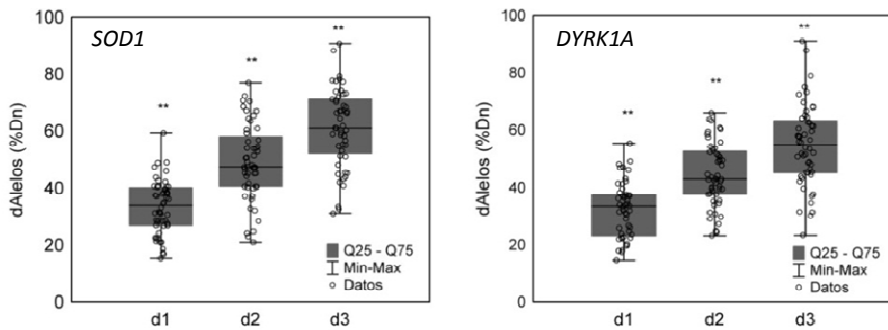


Fig. 49. Diagrama de cajas que representa el 50% de los valores centrales de cada grupo junto con la dispersión de los datos. Se observaron diferencias altamente significativas entre d1, d2 y d3 para cada gen.

Con el objeto de determinar si la organización observada en las células trisómicas era significativamente diferente a la distribución en las células disómicas, se aplicó la prueba estadística t-Student para comparar cada una de las categorías d1, d2 y d3 de distancia interalélica respecto de la distancia en las células diploides ($p < 0,05$;

diferencia significativa) (Fig. 50A). El análisis reveló que dos señales de *SOD1* y *DYRK1A* en las células trisómicas se encontraron significativamente más próximas entre sí que en las células normales. Mientras que d2 resultó similar a la separación normal en *DYRK1A* y relativamente más alejada en *SOD1* ($p = 0,12$ y $p = 0,023$) y el conjunto de distancias d3 correspondió con los alelos más separados entre sí de manera altamente significativa ($p = 0,00$) (Fig. 50B).

Dentro de la primera categoría (d1) la distancia promedio entre alelos *SOD1* fue de 33% y entre alelos *DYRK1A* fue de 32% del diámetro nuclear. Sin embargo, la distancia promedio entre alelos distantes de *SOD1* fue más grande, 49% y 61% para d2 y d3, respectivamente, mientras que las distancias d2 y d3 para *DYRK1A* fueron 45% y 54,7%, respectivamente.

Adicionalmente, se aplicó t-Student para comparar la distribución d1 entre *SOD1* y *DYRK1A*, y así sucesivamente con d2 y d3, lo que demostró que las distancias d1 entre alelos *SOD1* y *DYRK1A* no son estadísticamente diferentes ($p = 0,50$), mientras que la separación de los alelos más alejados entre sí resultó diferente, d3 ($p = 0,02$). Esto indica que el alelo distante de *SOD1* se encontró relativamente más alejado que *DYRK1A*.

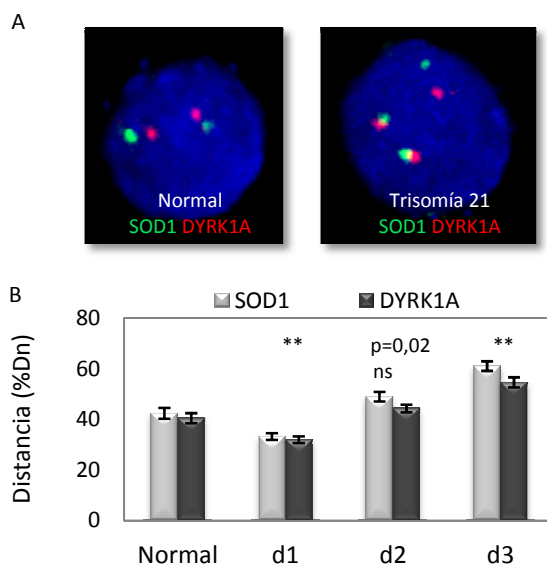


Fig. 50. Imagen 3D-FISH de *SOD1* y *DYRK1A* en linfocitos normales y trisómicos (A). Valores de la distancia promedio d1, d2 y d3 entre los alelos respecto de la distancia normal (B).

-Posición relativa del gen *DYRK1A* en tejido cerebral

Se realizó FISH con una sonda específica para el gen *DYRK1A* sobre cortes histológicos humanos de tejido cerebral embrionario con trisomía 21 (Fig. 51A). Las preparaciones se observaron bajo microscopio confocal y se adquirieron las imágenes correspondientes, con las que se determinó la distancia entre los alelos *DYRK1A* con respecto del diámetro celular en 25 células normales y en 25 células trisómicas. Los datos obtenidos se compararon estadísticamente mediante la prueba t-Student ($p < 0,05$; diferencia estadísticamente significativa). En un primer análisis se detectó que la distancia promedio entre los alelos *DYRK1A* se conservaba aún después de la ganancia de una copia extra del cromosoma 21 ($p = 0,79$). Esta observación directa de las preparaciones reveló que la organización espacial de los alelos era similar a la observada en las células en cultivo. Debido a esto los datos se ordenaron en tres grupos de distancias, d1, d2 y d3, y se confeccionaron gráficos de cajas en los que se podía apreciar que al menos el 50% de los datos se encontraban alrededor de tres valores promedio de distancia, a saber 30%, 45% y 58% del diámetro nuclear (Fig. 51B). Se aplicó la t-Student ($p < 0,05$; significativo) para comparar estos valores de distancia con los encontrados en células disómicas y efectivamente se demostró que en las células trisómicas dos alelos de *DYRK1A* se encuentran posicionados próximos entre sí, a una distancia inferior a la que se encuentran los alelos en las células normales ($p = 0,000$), y éstos están con respecto del otro alelo a una distancia similar a la que se encuentran los dos alelos en las células disómicas ($p = 0,94$). Este mismo análisis reveló que la distancia d2 no era significativamente diferente de la de estos alelos en células normales, pero sí lo era la distancia d3 (Fig. 51C). Estos datos confirman que los resultados obtenidos usando líneas celulares guardan correlación con los de la organización espacial del gen *DYRK1A* *en vivo*.

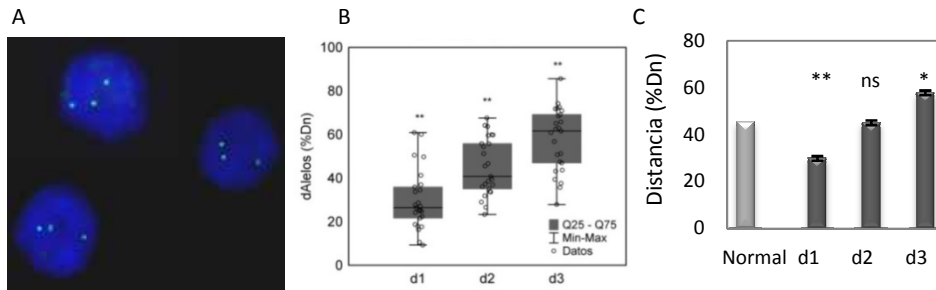


Fig. 51. FISH con sondas para el gen *DYRK1A* sobre cortes de tejido cerebral con trisomía 21 (A). Análisis de la distancia entre los alelos *DYRK1A* mediante gráfico de cajas (B). La distribución d1 y d3 es significativamente diferente a la normal (C).

IV.3.5 Identificación de los cromosomas 21 que se posicionan más próximos en el Síndrome de Down

El análisis FISH para el cromosoma 21 sobre preparaciones de linfocitos de pacientes con Síndrome de Down reveló que estos cromosomas adquieren una organización espacial característica consistente en la localización de dos de los cromosomas en estrecha proximidad, mientras que el otro se ubica generalmente alejado del par. Para determinar la identidad de los cromosomas posicionados en proximidad se realizó una microdissección de estos cromosomas, una amplificación primaria de este material y, finalmente, una caracterización genotípica mediante PCR específica para microsatélites que mapean sobre el cromosoma 21. La PCR con cebadores específicos para estas regiones permite obtener productos de diferentes tamaños dependiendo del número de repeticiones de la unidad que los constituye (característica de cada cromosoma). Para ello, se seleccionaron cinco marcadores: D21S270, D21S11, D21S1270, D21S1411 y D21S1435. Primeramente se aplicó una variante de la técnica de hibridación in situ (ISH) utilizada, consistente en revelar la preparación con un método colorimétrico que permite visualizar los cromosomas en interfase como un precipitado de color azul, rojo o marrón según el sistema colorimétrico utilizado. El sistema de microdissección a su vez permite delimitar la región de interés (par de cromosomas próximos) y mediante un pulso de láser cortar e impulsar los cromosomas (porción seleccionada) a la tapa de un tubo de microcentrífuga (ver Materiales y Métodos). Se diseccionaron los dos cromosomas

próximos entre sí de un total de 14 células independientes. En seis de los 14 núcleos, los cromosomas próximos estaban yuxtapuestos dando lugar a un territorio cromosómico visiblemente de mayor tamaño en interfase, mientras que en los ocho núcleos restantes los dos territorios estaban próximos (Fig. 52). Como control se utilizó ADN total de los mismos linfocitos trisómicos usados para ISH.

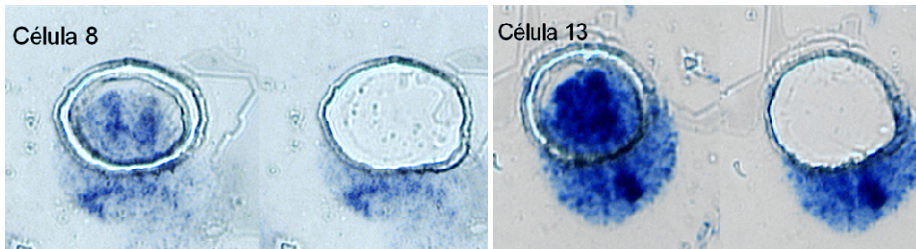


Fig. 52. Microdissección de cromosomas en interfase. Los cromosomas 21 se visualizan como un precipitado de color azul más oscuro. En la célula 8 dos cromosomas 21 están próximos entre sí, mientras que en la célula 13 los cromosomas están yuxtapuestos.

Un análisis preliminar utilizando ADN de linfocitos normales y linfocitos trisómicos reveló que los marcadores D21S1270 y D21S1411 resultaron ser no informativos, es decir, no se detectaron variantes polimórficas de estos microsatélites en los dos tipos celulares, mientras que los otros tres microsatélites restantes resultaron informativos. Sin embargo, una segunda prueba control para determinar la efectividad de la técnica de amplificación primaria reveló que los marcadores D21S11 y D21S270 tampoco son informativos cuando la PCR específica se realiza con material previamente amplificado de manera inespecífica. De modo que únicamente el microsatélite D21S1435 resultó apropiado para el presente estudio.

Una vez seleccionado el marcador se efectuó la PCR específica para D21S1435 y los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% y se observó la presencia de una banda de aproximadamente 200 pb (Fig. 53).

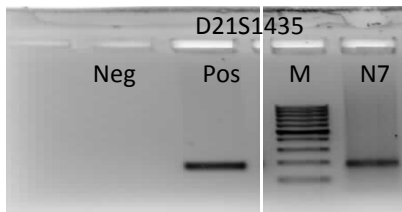


Fig. 53. Imagen del gel de agarosa obtenido de la migración del producto de PCR específica para el microsatélite D21S1435 en la muestra N7. Neg, control negativo de agua; Pos, control positivo; M, marcador de peso molecular. Los productos de la PCR específica migran en la región correspondiente.

Dada la insensibilidad para discriminar las dos variantes polimórficas, la determinación del tamaño de cada fragmento se realizó mediante electroforesis capilar en un bioanalizador (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies) de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante. Los pocillos del dispositivo de electroforesis (Agilent 1000 DNA Reagents) se cargaron con 1 μ l de cada muestra y se migraron por espacio de 30 minutos y los resultados se visualizan directamente como un electroforegrama en el ordenador acoplado al equipo. El programa computacional (Bioanalyzer 2100) permitió determinar directamente el tamaño del/ los fragmento/s obtenido por PCR específica. La utilización de este microsatélite (D21S1435) como marcador para la identificación de los cromosomas 21 en la línea celular trisómica permitió determinar que en ésta coexisten dos variantes polimórficas de 185 bp y 195 bp respectivamente. Es decir, aparentemente para este microsatélite dos cromosomas contienen alelos iguales y un cromosoma tiene un alelo de distinto tamaño (Fig. 54).

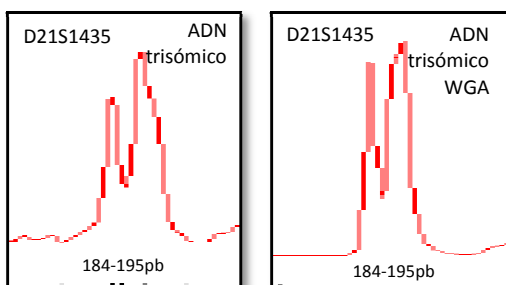


Fig. 54. Electroforegramas de dos muestras de ADN que denotan la presencia de dos variantes polimórficas del marcador D21S1435 en las células trisómicas.

De los 14 pares cromosómicos diseccionados, se obtuvieron resultados concluyentes solo en 5 células. En cuatro de ellas los cromosomas posicionados en proximidad dieron como resultado productos de PCR que migraron dando un solo pico en el

electroforegrama (Fig. 55B), mientras que en un caso, se observaron dos picos.

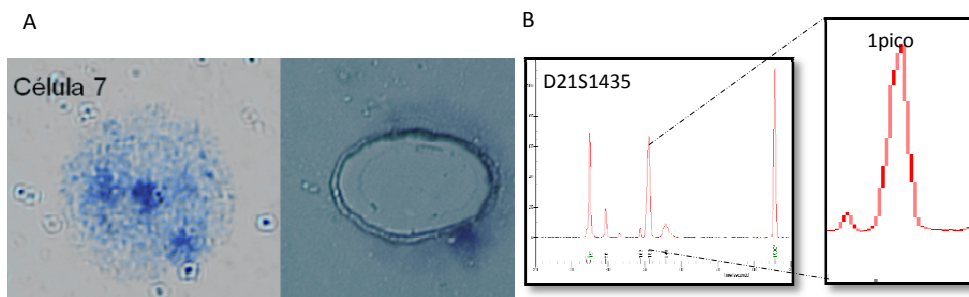


Fig. 55. Imagen de microdissección de los cromosomas 21 próximos (A). Electroforesis digital, en el eje de las ordenadas se representan las unidades de fluorescencia y el tamaño de los fragmentos en bp en el eje de las abscisas. Los picos inicial y final representan un control interno de migración. En la célula 7 se observa un pico único, que indica la presencia del mismo alelo en los dos cromosomas diseccionados (B).

IV.4 Expresión celular de los genes DSCR

La herencia de copias adicionales de cromosomas hace pensar en la modificación del nivel de expresión de los genes que mapean dentro de esos cromosomas. A este respecto, y con el objeto de estudiar la expresión de genes en células con ganancias del número de copias cromosómicas realizamos un análisis de ARN y de proteína tanto en células de ratón con diferentes niveles de ploidías como en células humanas normales y trisómicas.

IV.4.1 Expresión de proteínas en células de ratón

El análisis de las proteínas Socs1, Sod1, Dscr3 y Dyrk1a en células de ratón con diferente nivel de ploidía se realizó mediante Western-blot. Se obtuvieron y procesaron los extractos proteicos de las líneas celulares G7 y NIH3T3, así como también de neuronas en cultivo primario. En todos los casos se sometió a electroforesis la misma cantidad del lisado proteico de cada línea celular, se transfirió a las membranas apropiadas y las proteínas se revelaron con los anticuerpos correspondientes, de acuerdo a los protocolos descritos en la sección de Materiales y Métodos. Se utilizó como control de carga el perfil de expresión de la

proteína gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Gadph) que cambia su expresión de manera proporcional con la ploidía (Fig. 56).

El nivel de expresión de Sod1 fue relativamente similar en G7, NIH3T3 y el cultivo primario de neuronas. Por el contrario, el nivel de expresión de la proteína Dyrk1a fue distinto en los diferentes tipos celulares analizados. El nivel de la proteína Dyrk1a es superior en neuronas respecto de los fibroblastos, pero también se observaron diferencias de expresión entre las células con diferente nivel de ploidía (Fig. 56).

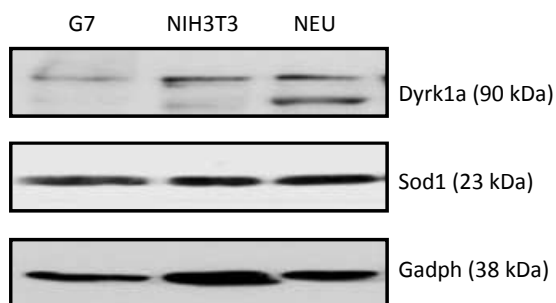


Fig. 56. Expresión de las proteínas Sod1 y Dyrk1a en fibroblastos G7 (diploides), NIH3T3 (triploides) y en neuronas (diploides).

El mayor nivel de expresión de Dyrk1a en las neuronas podría deberse al hecho de que este tipo celular fue extraído de cerebro de embriones de ratón, donde la proteína juega un papel importante durante el desarrollo. Por otro lado, las diferencias en el nivel de expresión de Dyrk1a entre los dos tipos de fibroblastos podrían estar relacionadas con la dosis génica. Estos análisis revelaron que la expresión de las proteínas codificadas por los genes *Socs1* y *Dscr3* es muy baja, a un nivel prácticamente indetectable con los anticuerpos y/o método utilizados.

IV.4.2 Cuantificación de ARN en células poliploides

Con el objeto de estudiar el efecto de la dosis de los genes *Socs1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a* en la expresión de ARN, se realizó PCR cuantitativa en fibroblastos de ratón con diferente nivel de ploidía y en neuronas de cultivos primarios.

Este análisis reveló que el nivel de transcripción de los genes *Socs1* y *Dscr3* era muy bajo. En efecto, se necesitaron un elevado número de ciclos de amplificación (Ct)

para detectar el mRNA de estos genes. Estos resultados son concordantes con los de la expresión de proteínas, descritos en el párrafo anterior. También en concordancia con los datos obtenidos a nivel proteico, los valores de Ct obtenidos para *Sod1* y *Dyrk1a* fueron consistentes con la noción de que estos genes tienen un nivel de transcripción superior a *Socs1* y *Dscr3*. Para el cálculo de $\Delta\Delta Ct$, los valores absolutos de cada gen se normalizaron respecto del valor de Ct de *Gadph* utilizado como control. La expresión relativa de *Sod1* y *Dyrk1a* en neuronas y en fibroblastos con diferente nivel de ploidía se obtuvo comparando los valores de ΔCt respecto del promedio de las muestras ($\Delta\Delta Ct$). Finalmente para obtener el valor del nivel de expresión, se aplicó la formula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ que realiza la conversión de los valores logarítmicos de fluorescencia obtenidos en la amplificación de la PCR, en unidades de expresión de ARN. Los resultados se representaron en unidades arbitrarias de expresión relativa de ARN entre las diferentes células de ratón ($2^{-\Delta\Delta Ct (Ct_{gen\ de\ estudio} - Ct_{Gadph})}$). (Fig. 57). Para comparar estadísticamente los niveles de expresión se aplicó la prueba de la t-Student y los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos. La expresión de ARN de los genes *Sod1* y *Dyrk1a* resultó significativamente superior en las neuronas que en los fibroblastos, mientras que el nivel de expresión de estos genes fue similar en los fibroblastos con diferente nivel de ploidía, lo que indica que el aumento de la dosis génica no se traduce en un aumento de la expresión de mRNA de *Sod1* y *Dyrk1a*.

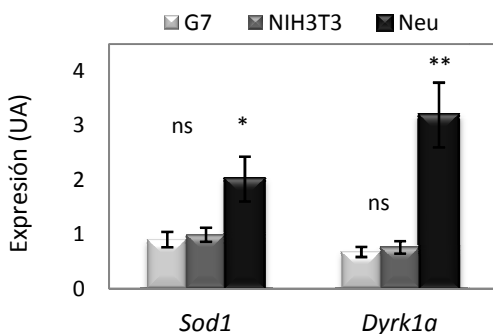


Fig. 57. Nivel de expresión relativa de ARN en unidades arbitrarias (UA) de los genes *Sod1* y *Dyrk1a* en las células de ratón G7 (diploides), NIH3T3 (triploides) y en neuronas.

Dyrk1a es uno de los genes que componen la DSCR y su producto juega un papel relevante en el desarrollo del sistema nervioso central en condiciones normales. Debido a esto, actualmente se considera que el desequilibrio de dosis estaría relacionado con el desarrollo de los signos, deficiencia mental entre otros, que caracterizan al Síndrome de Down. Los estudios de distribución de genes en el núcleo interfásico revelaron que el gen *Dyrk1a* ocupa una posición central en las neuronas de embriones de ratón e intermedia en fibroblastos G7 y NIH3T3. Sin embargo, el nivel de transcripción de este gen fue significativamente superior en las neuronas con respecto a los fibroblastos triploides. El patrón fue similar para el gen *Sod1*. La posición radial de *Sod1* en el núcleo en interfase de las neuronas, los fibroblastos G7 y NIH3T3 fue intermedia, y el nivel de expresión del mRNA fue superior en las neuronas que en los fibroblastos. Estos resultados indican que la ganancia en el número de copias génicas no provocó cambios en el nivel de expresión. El mayor nivel de expresión detectado en las neuronas muy probablemente esté relacionado con la función del gen durante el desarrollo embrionario, más que con el número de copias.

IV.4.3 Nivel de proteínas en las células humanas disómicas y trisómicas

Con el objeto de determinar el nivel de expresión de las proteínas SOD1 y DYRK1A en células humanas se llevó a cabo la técnica del Western-blot. Los extractos proteicos utilizados para la separación electroforética en gel de acrilamida se obtuvieron de la línea celular de linfocitos GM03714 (disómica) y de la línea celular 4710-176, derivada de una persona con Síndrome de Down. Se migraron cantidades similares de lisado proteico y la detección se realizó con los anticuerpos apropiados de acuerdo a los protocolos descritos en la sección de Materiales y Métodos. Como control de carga se utilizó el perfil de la proteína GAPDH (Fig. 58). Este análisis reveló que el nivel de expresión de la proteína de SOD1 era similar en los dos tipos de linfocitos. Por el contrario, el nivel de expresión de DYRK1A fue diferente entre los dos tipos de linfocitos, y los experimentos revelaron que las células trisómicas poseen un nivel mayor de esta proteína respecto de las disómicas.

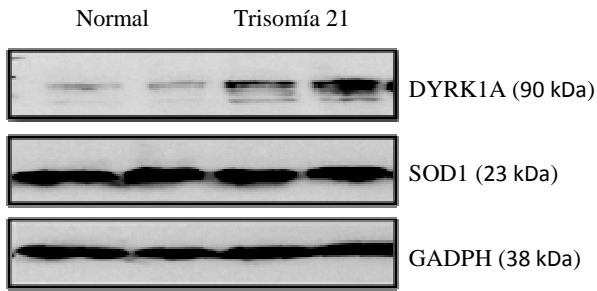


Fig. 58. Expresión de las proteínas SOD1 y DYRK1A en linfocitos disómicos y trisómicos.

IV.4.4 Transcripción de *SOD1* y *DYRK1A* en células humanas

El análisis proteómico demostró que la expresión de *DYRK1A* podría resultar sensible a la dosis de genes, mientras que *SOD1*, a pesar del aumento en el número de copias del gen, no mostró cambios respecto de las células normales. Con el objeto de estudiar más detalladamente este fenómeno, se determinó el nivel de expresión de *SOD1* y *DYRK1A* mediante PCR cuantitativa en células de la línea GM03714 (normal) y 4710-176, (trisómica). Se realizaron tres experimentos independientes, utilizándose como control para la normalización de los valores de expresión de *SOD1* y *DYRK1A* (ΔCt) el gen que codifica para la fosfoproteína ribosomal ácida P0, *36B4*. El valor de ΔCt promedio obtenido para *SOD1* fue de 6 ciclos, mientras que para *DYRK1A* resultó en 11 ciclos en linfocitos normales. Esto indica que el nivel de transcripción de *SOD1* es en términos generales mayor que el de *DYRK1A*, y a su vez están en concordancia con los resultados obtenidos para las proteínas respectivas. Para determinar si la dosis de genes tiene efecto en la expresión del mRNA, se compararon los datos de expresión relativa de *SOD1* y *DYRK1A* en la línea celular normal con los de la línea trisómica. En la figura 59 los resultados se representaron en unidades arbitrarias de la expresión relativa de ARN entre las diferentes células humanas, a partir de la formula $(2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} (\text{Ct gen de estudio} - \text{Ct } 36B4))$, que demuestran que hay un aumento relativo de la expresión de estos genes en los linfocitos trisómicos respecto de los disómicos (Fig. 59). Aplicando la prueba estadística t-Student ($p < 0,05$; significativo), se encontró que la diferencia en el nivel de expresión de *SOD1* no era estadísticamente significativa a pesar de la copia extra del gen ($p = 0,227$), mientras que una copia adicional del gen *DYRK1A* resultó

en un aumento estadísticamente significativo ($p = 0,023$) en el nivel de transcripción.

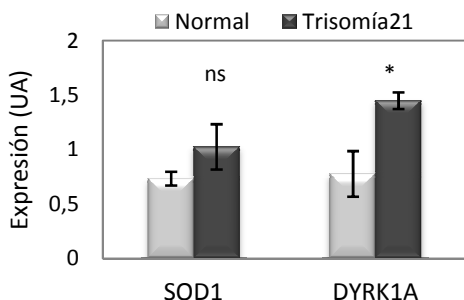


Fig. 59. Transcripción de los genes *SOD1* y *DYRK1A* en células humanas disómicas y trisómicas.

De manera similar a lo realizado con las células de ratón, nos preguntamos si el nivel de transcripción podría guardar relación con la posición de los genes en el espacio nuclear. Interesante destacar que la posición radial de *DYRK1A* es similar en las células disómicas y trisómicas, por lo tanto, podría considerarse que el mayor nivel de expresión estaría relacionado con la dosis génica. Por otro lado, los resultados del análisis de la distribución radial de *SOD1* mostraron que en las células trisómicas el gen sufre un desplazamiento hacia la periferia. Dado que esta región nuclear se ha considerado en ciertas ocasiones como menos apta para la transcripción, se podría especular que el menor nivel de expresión en el estado trisómico podría estar relacionado con la posición más periférica del gen.

IV.5 Distribución espacial y expresión génica

La distribución espacial de los cromosomas y los genes en el núcleo en interfase no es aleatoria. Por otro lado, el proceso de transcripción ocurre en toda la extensión del núcleo celular, sin embargo, en interfase, las enzimas especializadas y los complejos proteicos que intervienen en el proceso se concentran en regiones discretas. Entre ellos, la enzima ARN polimerasa II (ARN pol II) forma dominios donde varios genes son transcritos simultáneamente, tanto es así que actualmente se considera que la distribución espacial de cromosomas/genes en el núcleo es principalmente una consecuencia de las actividades del genoma.

Con el objeto de elucidar la relación de la distribución espacial de *SOD1* y *DYRK1A* con la función de estos genes, realizamos ADN-FISH locus específico combinado con inmunofluorescencia para ARN pol II. En un total de 59 núcleos de la línea celular normal y 52 núcleos de las células trisómicas, se cuantificó computacionalmente la intensidad de la fluorescencia de ARN pol II en la región donde localizan los genes y este dato se tomó como indicativo del nivel de la transcripción.

IV.5.1 ARN Pol II en el núcleo de las células disómicas y trisómicas

La distribución de la señal fluorescente correspondiente a ARN pol II en el núcleo no resultó homogénea. Se observaron regiones con mayor intensidad de fluorescencia, debido a una mayor concentración de la enzima, que a su vez estaba asociado con un mayor nivel de actividad transcripcional en esa región. La observación de las imágenes también reveló que el nucléolo, la región perinucleolar, la perinuclear y aquellas ocupadas por bloques de heterocromatina exhibían una menor concentración de la enzima respecto de otras regiones del núcleo (Fig. 60A), lo que podría corresponder con regiones de menor actividad transcripcional en el núcleo. En las células disómicas se detectó señal de ARN pol II en un 65% del espacio nuclear, mientras que en las células trisómicas, en un 58%. La prueba estadística t-Student con valores de $p < 0,05$ demostró que la extensión de la señal de ARN pol II en los linfocitos trisómicos resultó significativamente inferior a la de las células disómicas ($p = 0,00$). También la intensidad promedio de la señal de ARN pol II resultó significativamente menor en los linfocitos trisómicos que en los linfocitos normales ($p = 0,00$) (Fig. 60B). Considerando que el proceso de transcripción no es uniforme en todos los núcleos y con el objeto de comparar la intensidad de ARN pol II en las señales genéticas, se utilizaron valores relativos de la intensidad de ARN pol II en la región de interés respecto de la del núcleo correspondiente.

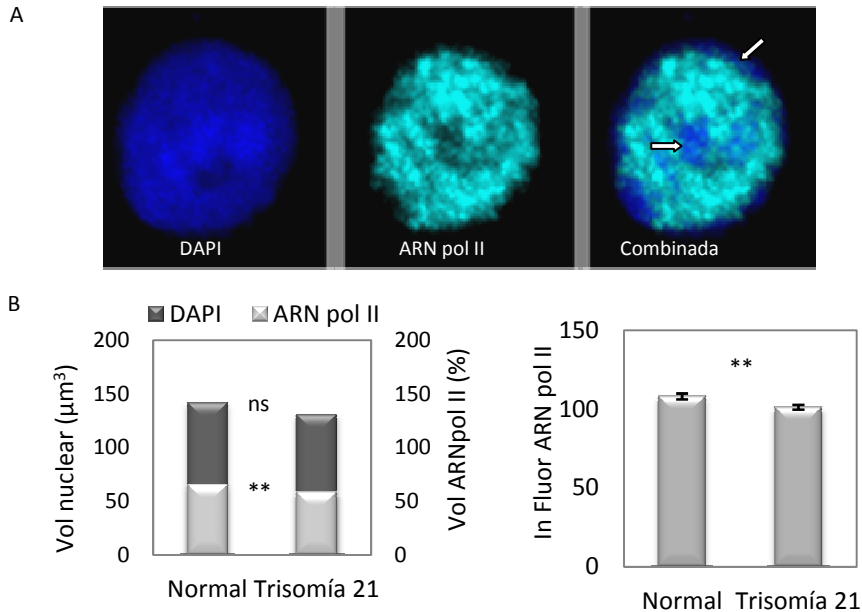


Fig. 60. Distribución de ARN pol II en el núcleo en interfase (A). Volumen ocupado por ARN pol II en el núcleo e intensidad de fluorescencia promedio de la señal (B).

IV.5.2 Intensidad de ARN Pol II en los loci de *SOD1* y *DYRK1A*

El grado de colocalización de ARN pol II con la señal locus específica se determinó midiendo la intensidad de fluorescencia de la enzima contenida en la señal FISH de *SOD1* y *DYRK1A*. Se obtuvieron imágenes confocales en cuatro canales de diferente longitud de onda que correspondieron al núcleo teñido con DAPI (430 nm), las señales FISH de *SOD1* (480 nm, verde) y *DYRK1A* (rojo, 535 nm) y la de la enzima ARN pol II (cyan, 630nm) de 59 núcleos normales y 52 trisómicos. Para descartar diferencias en la intensidad de ARN pol II causadas por las variaciones en el tamaño de la señal de FISH, se utilizó para el análisis un valor del volumen relativo del locus respecto del volumen nuclear. La comparación estadística de los datos de tamaño de *SOD1* y *DYRK1A* en las células normales y en las células trisómicas mediante la prueba t-Student ($p < 0,05$; significativo) reveló que no había diferencias significativas en el volumen de las señales de estos dos genes ($p = 0,07$ y $p = 0,11$), respectivamente (Fig. 61A). Sin embargo, cuando se consideraron los valores relativos, el tamaño de la señal de *SOD1* en linfocitos disómicos resultó menor (0,12%) que el de la señal en linfocitos trisómicos (0,15%) ($p = 0,00$),

mientras que el volumen de la señal *DYRK1A* se mantiene en un valor intermedio de alrededor del 0,14%, y similar en ambos tipos celulares ($p = 0,17$). La variación en el volumen de la señal de *SOD1* en los linfocitos trisómicos respecto de los disómicos podría estar relacionada con posibles cambios en la compactación de la cromatina en el locus, es decir, un mayor tamaño de la señal podría considerarse asociado a una organización más laxa de la cromatina que permitiría mayor actividad transcripcional. Cabe destacar, sin embargo, que las señales de *SOD1* tenían aspecto difuso y estaban compuestas por varias señales más pequeñas, mientras que las de *DYRK1A* fueron más uniformes en la distribución del fluorocromo. Subsiguientemente, se determinó la actividad transcripcional *in situ* de los genes midiendo la intensidad de ARN pol II en los loci de *SOD1* y *DYRK1A*. Éstas se expresaron en unidades relativas de intensidad de fluorescencia promedio en el locus, respecto de la misma medición correspondiente al núcleo completo. Tanto en las células disómicas como en las trisómicas, el nivel de ARN pol II en *SOD1* resultó significativamente menor que la encontrada en los loci *DYRK1A* ($p = 0,00$) (Fig. 61B), por lo que *DYRK1A* podría tener una mayor concentración de la enzima, según se observó mediante un aumento de la intensidad de ARN pol II en el locus.

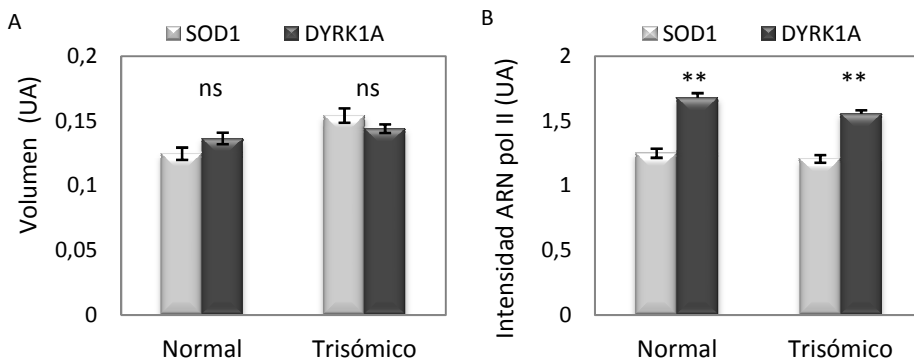


Fig. 61. Volumen relativo de las señales *SOD1* y *DYRK1A* en células disómicas y trisómicas. Intensidad de ARN pol II relativa en el locus.

Adicionalmente, la comparación estadística de la intensidad de ARN pol II entre las células disómicas y las trisómicas mediante t-Student ($p < 0,05$; significativo) reveló que en los loci *SOD1* el nivel de ARN pol II era similar en ambos tipos celulares ($p = 0,35$), mientras que el nivel de ARN pol II en los loci *DYRK1A* fue significativamente menor en las células trisómicas que en las células disómicas ($p = 0,00$).

IV.5.3 ARN Pol II y distribución relativa entre los genes

La observación de las preparaciones FISH de *SOD1* y *DYRK1A* reveló que las señales de estos dos genes en uno de los cromosomas se encontraban alejadas entre sí, mientras que las del otro cromosoma se encontraban parcialmente solapadas. Dicha organización diferencial dentro del mismo núcleo sugirió que el estado transcripcional de los genes podría determinar diferencias en la compactación de la cromatina y el nivel transcripcional (Fig. 62).

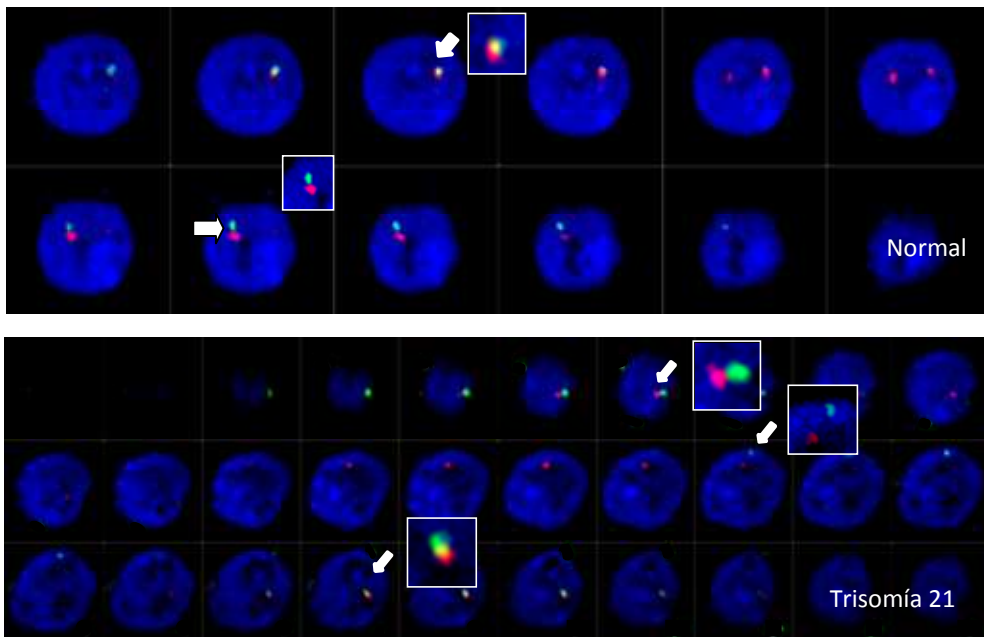


Fig. 62. Serie de planos del eje Z de imagen confocal de *SOD1* y *DYRK1A* en el núcleo de una célula normal y de una célula trisómica. Diferencia en el grado de compactación de las señales separadas respecto de las que se encuentran solapadas.

El análisis de estas imágenes reveló que en las señales parcialmente solapadas no se pueden discriminar las señales de ARN pol II de cada uno de los genes. Además, se detectó superposición completa de ARN pol II a medida que aumentaba el grado de colocalización entre *SODI* y *DYRK1A*, sugiriendo que existe una actividad conjunta cuando los genes se encuentran solapados entre sí. Por otro lado, en las señales alejadas, los niveles de ARN pol II en los loci *SODI* y *DYRK1A* resultaron diferentes, siendo generalmente mayores en la señal de *DYRK1A*. Por ello, se compararon los valores de intensidad relativa de ARN pol II en *SODI* y *DYRK1A* en las señales que colocalizan y en las que no lo hacen. Se consideraron señales parcialmente solapadas cuando presentaron yuxtaposición en un 20% de ambas y la intensidad de ARN pol II se expresó en unidades relativas de intensidad de fluorescencia respecto de la intensidad de la enzima en todo el núcleo. Aplicando la prueba estadística t-Student ($p < 0,05$; significativo) para comparar el nivel de ARN pol II en estos dos tipos de organización en células normales y trisómicas, se encontró que no hay diferencias significativas en el nivel de ARN pol II en los loci *DYRK1A* tanto en células disómicas ($p = 0,87$) como trisómicas ($p = 0,20$). Es decir la intensidad de ARN pol II en la región donde localiza este gen es similar ya estén las señales yuxtapuestas o alejadas.

En el caso de los loci *SODI*, sin embargo, se detectaron diferencias significativas en la intensidad de ARN pol II. De modo que en las células normales la intensidad de ARN pol II fue mayor en la región donde la señal de *SODI* se encontraba parcialmente solapada con la de *DYRK1A* ($p = 0,04$). De igual manera, en las células trisómicas el nivel de ARN pol II fue mayor en aquellas señales que se encontraban solapadas con las de *DYRK1A* ($p = 0,000$). Estos resultados indican que la posición relativa entre *SODI* y *DYRK1A* podría estar relacionada con el nivel de ARN pol II en el locus *SODI* (Fig. 63).

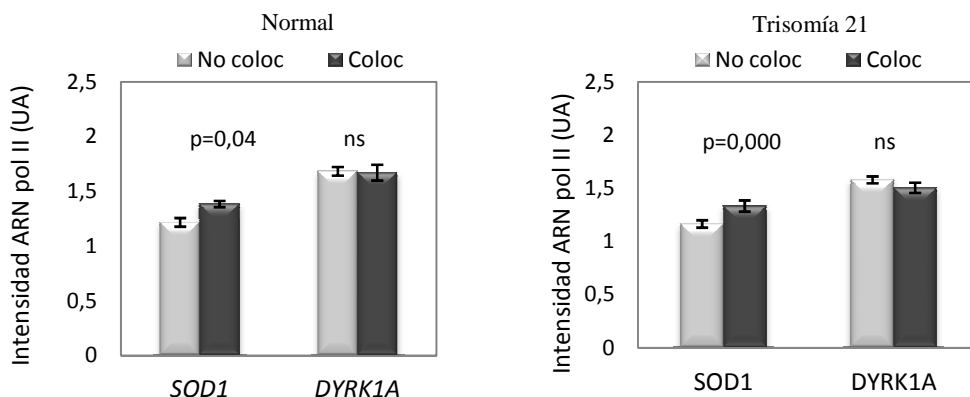


Fig. 63. Análisis de intensidad de ARN pol II en las señales de *SOD1* y *DYRK1A* alejadas y parcialmente solapadas entre sí en células disómicas y trisómicas.

Con el objeto de estudiar más detalladamente la relación entre el nivel de ARN pol II con la distancia relativa entre *SOD1* y *DYRK1A* en el núcleo interfásico, se midió computacionalmente la distancia real entre los genes y la intensidad de ARN pol II. Se determinó anteriormente que el radio promedio de una señal FISH era equivalente al 5% del diámetro nuclear (%D) y que un valor de distancia entre señales inferior al 8%D era equivalente a yuxtaposición de señales. Tomando en cuenta este criterio, y los valores de intensidad relativa de ARN pol II, se determinó que en las señales que estaban en el territorio cromosómico a una distancia inferior al 8%, la intensidad de ARN pol II en el locus de *SOD1* era un 90% de la de *DYRK1A*, tanto en células normales como trisómicas, mientras que cuando se encontraban separadas, la intensidad de ARN pol II en *SOD1* descendió hasta un 74% en las células disómicas y hasta un 76% en las trisómicas respecto de *DYRK1A*. El análisis estadístico mediante la prueba t-Student ($p < 0,05$; significativo) reveló que este cambio era estadísticamente significativo ($p = 0,000$) (Fig. 64).

Estos resultados sugieren que la posición relativa entre *SOD1* y *DYRK1A* guardaría relación con el estado transcripcional de los genes.

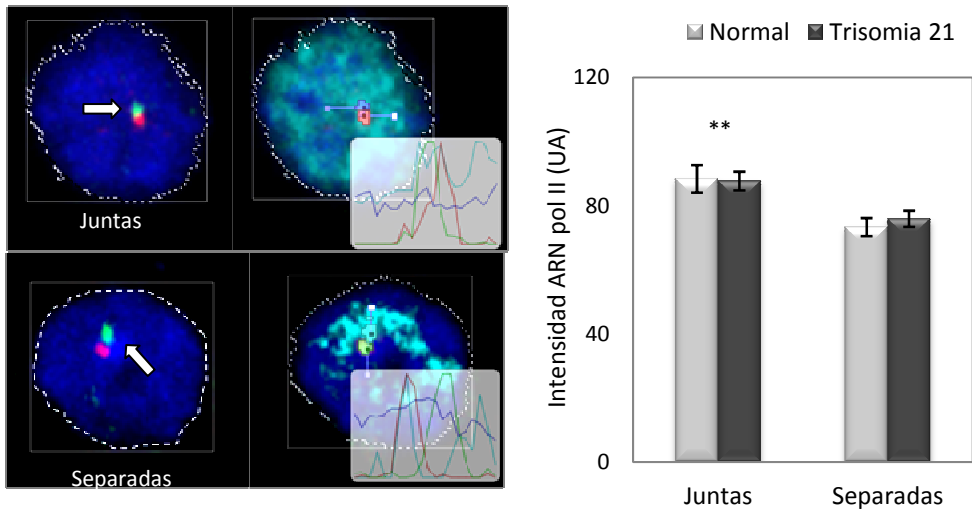


Fig. 64. Intensidad de ARN pol II relativa a *SOD1* respecto de *DYRK1A* en las señales próximas (<8%) y en las señales alejadas (>8%).

IV.5.4 Nivel de ARN Pol II y posición radial de *SOD1* y *DYRK1A*

El estudio de posición radial de los genes en las células disómicas y trisómicas reveló que *SOD1* se trasladaba hacia la periferia nuclear en presencia de una copia adicional, mientras que *DYRK1A* no presentaba cambios con respecto a los linfocitos normales. Para describir la relación entre la posición radial de *SOD1* en los linfocitos trisómicos con la actividad transcripcional, analizamos la intensidad de ARN pol II en las señales de *SOD1* y *DYRK1A* que se encontraron en una posición radial comprendida entre 60%-80% del diámetro nuclear (intermedia), como así también en aquellas que se encontraron en una posición periférica en el núcleo (80-100%). El porcentaje de señales de *SOD1* y *DYRK1A* que localizan en una posición intermedia en el núcleo resultó similar (44% y 45%, respectivamente), mientras que la proporción de señales periféricas de *SOD1* fue superior a las de *DYRK1A* (28% y 12%, respectivamente) (Fig. 65A). Se compararon estadísticamente, mediante la prueba t-Student (valores de $p < 0,050$; significativo), los valores de intensidad de la ARN pol II relativa de los genes posicionados internamente respecto de los posicionados periféricamente y se encontró que para el gen *DYRK1A* el nivel de ARN pol II no varió con respecto de la posición radial que ocupaba en el núcleo en

interfase ($p = 0,19$), mientras que las señales periféricas de *SOD1* presentaron niveles significativamente inferiores de ARN pol II que las que se encontraron en una posición intermedia en el núcleo ($p = 0,000$) (Fig. 65B). Estos datos sugieren que el estado transcripcional de *SOD1* podría estar relacionado con la posición radial. En otras palabras, el cambio en la posición radial de *SOD1* en las células trisómicas podría estar relacionado con una menor actividad transcripcional del gen.

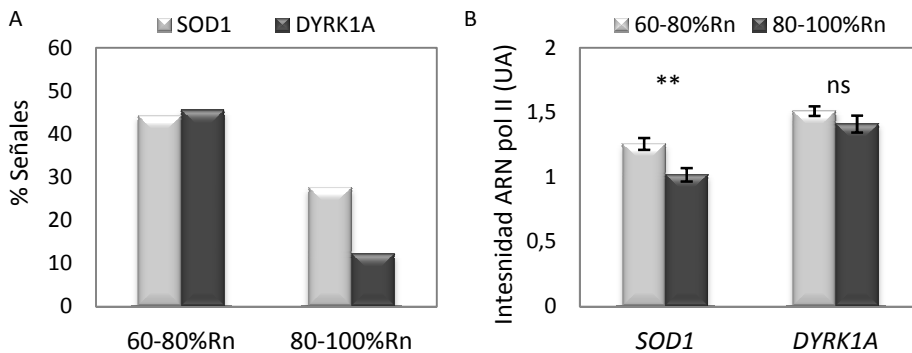


Fig. 65. Proporción de señales de *SOD1* y *DYRK1A* en los linfocitos trisómicos (Rn, radio nuclear) en las regiones intermedia (60-80%Rn) y periférica (80-100% Rn) del núcleo (A). Nivel de ARN pol II en unidades arbitrarias en los loci *SOD1* y *DYRK1A* (B).

IV.6 Resumen de los resultados

- Las ganancias de cromosomas individuales no implican cambios sustanciales en el volumen del núcleo en los linfocitos trisómicos humanos.
- Las ganancias de complementos completos de cromosomas en las células de ratón resultan en un incremento del tamaño del núcleo. Sin embargo, este incremento no guarda una relación proporcional con la cantidad de material genético adicional presente en las células.
- Los territorios cromosómicos 5 y 6 se disponen en el núcleo de los fibroblastos de ratón en una región próxima a la periferia, mientras que los territorios cromosómicos 15 y 16 se encuentran en un intervalo intermedio en el núcleo celular de los fibroblastos G7.

-
- El incremento en el nivel de ploidía trae aparejado un cambio en la distribución radial de los territorios cromosómicos 5, 6, 15 y 16 respecto de los fibroblastos diploides G7. En general, se observa un desplazamiento hacia la periferia nuclear de estos cromosomas.
 - Los genes *Socs1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a*, que mapean en este orden sobre el cromosoma 16 de ratón, ocupan una posición radial preferentemente más central en el núcleo de neuronas primarias que en fibroblastos de ratón. Esta diferencia de localización de los genes entre células epiteliales y mesenquimales se considera relacionada con la especificidad tisular de la distribución de cromosomas y genes.
 - El comportamiento más destacado lo presenta el gen *Dyrk1a* que en las neuronas localiza preferentemente en la parte central del núcleo y en los fibroblastos próximo a la membrana nuclear. Este gen se encuentra activado durante el desarrollo del sistema nervioso y su posicionamiento en la región interior del núcleo en las neuronas podría estar relacionada con este estado.
 - La posición radial de los genes *Socs1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a* en los fibroblastos G7 y NIH3T3 es similar, independientemente del nivel de ploidía de las células.
 - Los genes *SOD1* y *DYRK1A* que mapean en la DSCR del cromosoma 21 humano localizan preferentemente en una región intermedia en el núcleo de los linfocitos normales. En el estado trisómico el gen *DYRK1A* conserva esta posición, mientras que el gen *SOD1* se traslada hacia la periferia nuclear. Es decir, la presencia de un cromosoma 21 adicional en el núcleo no afecta de igual modo a los genes *SOD1* y *DYRK1A*.
 - Los genes murinos *Socs1* y *Dyrk1a* distan 84 Mpb entre sí en la secuencia (genes distantes) y la separación entre *Sod1* y *Dscr3* es de 4,5 Mpb (genes próximos). La distancia 3D entre los genes en el núcleo interfásico es mayor en las neuronas que en los fibroblastos, independientemente del nivel de ploidía, lo que sugiere que la posición relativa entre los genes en interfase parece estar relacionada con el tipo celular, al igual que la posición radial.

- La distancia *Socs1-Dyrk1a* y *Sod1-Dscr3* en el núcleo de las células triploides NIH3T3 es menor respecto de las células diploides G7.
- En humanos la distancia que separa *SOD1* y *DYRK1A* en la secuencia genómica es de 5,7 Mpb (genes próximos) y la distancia entre estos genes en el núcleo interfásico es similar en los linfocitos normales y en las células con un cromosoma 21 adicional.
- *DYRK1A* exhibe una mayor concentración de la enzima ARN Pol II que *SOD1* en el sitio de transcripción, tanto en las células disómicas como en las trisómicas.
- Los sitios de transcripción de *SOD1* y *DYRK1A* que colocan comparten conjuntamente el complejo ARN pol II. La concentración de la enzima (intensidad de la señal fluorescente) disminuye significativamente en *SOD1* cuando las señales se encuentran separadas.
- *SOD1* ocupa una posición más periférica que *DYRK1A* en las células trisómicas y la relocalización de *SOD1* hacia la envoltura nuclear podría implicar un nivel de actividad transcripcional del gen menor, es decir la posición espacial de los genes *SOD1* y *DYRK1A* en el núcleo interfásico actuaría como un factor involucrado en la modulación de la actividad génica.
- Existe una tendencia de asociación de los cromosomas 5 y 6 en los fibroblastos G7 (diploide), que se mantiene en otros fibroblastos poliploides.
- Los cromosomas 15 y 16 se encuentran posicionados en estrecha proximidad en las células G7 y también en las células triploides NIH3T3.
- En el núcleo interfásico de las células triploides NIH3T3 la distribución topográfica relativa entre los alelos *Socs*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a* más frecuente consiste en dos señales próximas entre sí y un alelo distante. Los linfocitos trisómicos humanos exhiben una distribución tridimensional de los alelos de *SOD1* y *DYRK1A* idéntica. Adicionalmente, el análisis de cortes histológicos de tejido cerebral embrionario de pacientes con Síndrome de Down demostró que la distribución espacial descrita se correlaciona con lo que ocurre *in vivo* para los

alelos de *DYRK1A*. Es decir, esta tendencia de asociación de los genes involucrados en el desarrollo de los signos y síntomas del Síndrome de Down está conservada entre las células humanas y de ratón con ganancias del cromosoma 21 en humanos y del 16 en ratón.

- La identidad de los cromosomas que localizan en estrecha proximidad en las células trisómicas no siempre es la misma. Sin embargo, existe aparentemente una mayor tendencia de los mismos cromosomas a posicionarse próximos entre sí o yuxtapuestos en el núcleo interfásico de las células trisómicas.
- El nivel de proteína *Sod1* es relativamente similar en los tres tipos celulares de ratón. Mientras que la expresión de la proteína *Dyrk1a* es mayor en las neuronas que en los fibroblastos, en la que esta diferencia cuantitativa podría estar relacionada con el papel de la proteína en el desarrollo del tejido nervioso central.
- El nivel de mRNA de los genes *Sod1* y *Dyrk1a* en las neuronas es mayor respecto del de los fibroblastos y probablemente esté relacionado con la función del gen durante el desarrollo embrionario, más que con el número de copias.
- No se detectaron diferencias aparentes en el nivel de las proteínas y de mRNA de *Sod1* y *Dyrk1a* entre los fibroblastos de ratón diploides y triploides.
- En las células trisómicas humanas el nivel de expresión de mRNA del gen *SOD1* con respecto de las células normales es menor que los de *DYRK1A*.
- La posición radial de *DYRK1A* es similar en las células disómicas y trisómicas, por lo que podría considerarse que el mayor nivel de expresión en el último tipo celular estaría relacionado con la dosis génica y su posición central.
- El gen *SOD1* sufre un desplazamiento hacia la periferia en las células trisómicas y su menor nivel de expresión aun en el estado trisómico podría estar relacionado con esta localización.

V. DISCUSIÓN

V.1 Nivel de ploidía y tamaño nuclear

El genoma se encuentra altamente organizado en el núcleo de las células eucariotas. El empaquetamiento de la información genética, codificada en el ADN, es un aspecto crítico en biología celular y puede ser considerado el primer nivel de organización del genoma. En efecto, las moléculas de ADN de una célula extendidas alcanzarían a medir hasta un metro y de no existir tal organización no cabrían en el núcleo en interfase de unas pocas μm de tamaño.

La cromatina ocupa aproximadamente la mitad del volumen nuclear, mientras que el espacio restante contiene estructuras nucleares y componentes moleculares implicados en la función y en la organización del genoma de manera dinámica. La relación entre el volumen del núcleo celular y la cantidad de material genético que porta la célula es conocida desde los comienzos de la citogenética como disciplina científica (Zink y cols., 2004).

La relación de tamaño núcleo/citoplasma es un parámetro usado por los patólogos para el diagnóstico del cáncer. Sin embargo, no fue hasta que se conoció que las células tumorales frecuentemente tenían alteraciones en la cantidad del material genético que estos cambios en la relación núcleo/citoplasma se adjudicaron a un aumento del tamaño del núcleo consecuente con la ganancia de material genético.

En el presente trabajo investigamos la relación entre el tamaño del núcleo y el nivel de ploidía, midiéndolo en células con ganancias de cromosomas aislados (células trisómicas) y con ganancias de sets completos de cromosomas (células poliploides). En el caso de células con ganancia de un único cromosoma, como son los linfocitos derivados de un paciente con Síndrome de Down, es decir con trisomía para el par 21, observamos que la presencia de este cromosoma adicional no implica cambios sustanciales en el volumen del núcleo de este tipo celular respecto de los linfocitos disómicos. Mientras que un análisis similar realizado en células de ratón con ganancias de complementos completos de cromosomas demostró que el tamaño del núcleo resultaba significativamente mayor conforme aumentaba el nivel de ploidía de las células.

Es de comentar, sin embargo, que este incremento del tamaño del núcleo no guarda una relación proporcional con la cantidad de material genético adicional presente en las células. En efecto, el volumen del núcleo de los fibroblastos triploides NIH3T3 es prácticamente el doble del volumen determinado para las células diploides, pero en las células tetraploides este parámetro resultó ser similar al de las células diploides. Esto sugiere que, además del contenido genómico, otros factores como el estado transcripcional y otras estructuras intranucleares que podrían afectar en la compactación de la cromatina contribuyen a determinar el tamaño del núcleo.

Este fenómeno de aumento del tamaño del núcleo se observa muy frecuentemente en las células tumorales con alteraciones en la cantidad de material genético y frecuentemente está asociado a alteraciones de la estructura de la cromatina, la función celular y la regulación de la transcripción génica (Zink y cols., 2004). Sin embargo, aún se desconoce de qué manera se encuentran relacionados el tamaño nuclear con los cambios en la expresión génica (Wu y cols., 2010).

Obviamente, el tamaño nuclear por sí solo no debería ser un factor que determine la función del genoma. Nosotros determinamos que los núcleos de los fibroblastos G7 y las neuronas primarias de ratón tienen un volumen similar y, sin embargo, su perfil transcripcional es totalmente distinto. Pajerowski y colaboradores propusieron que más que el tamaño, es la morfología del núcleo la que refleja la organización del genoma y la función celular (Pajerowski y cols., 2007). En concordancia con esto determinamos que las neuronas divergen de manera significativa en el radio del núcleo con los fibroblastos embrionarios de ratón G7 y esto resulta en las conocidas diferencias morfológicas de los núcleos de estos dos tipos celulares, esférico en las primeras y elipsoide en los fibroblastos.

V.2 Ploidía y distribución radial de cromosomas

Tal y como se mencionara anteriormente (ver Introducción), la cromatina que constituye los cromosomas ocupa un volumen exclusivo denominado territorios cromosómicos en el núcleo en interfase y éstos se encuentran distribuidos de manera no aleatoria en el espacio nuclear de plantas y animales (Parada y Misteli, 2002). Más aún, en el núcleo se establecen patrones de organización espacial de los cromosomas y los genes que resultan específicos de los tejidos (Parada y cols., 2004).

Durante el desarrollo de la presente tesis se estudió la distribución espacial de algunos cromosomas y genes en el espacio nuclear, prestando particular atención a la relación que guarda la posición de los cromosomas y los genes en el núcleo en interfase con la función del genoma en las células aneuploides. Para ello se han utilizado distintos tipos celulares de ratón, normales y con ganancia de complementos cromosómicos completos, pero con un cariotipo aneuploide estable, así como células humanas normales y con ganancia del cromosoma 21 (trisomía 21). El análisis realizado en células murinas diploides reveló que los territorios cromosómicos 5 y 6 se disponen en el núcleo de los fibroblastos de ratón en una región próxima a la periferia, mientras que los territorios cromosómicos 15 y 16 se encuentran en un intervalo intermedio en el núcleo celular. Estos resultados indican que el tamaño de los cromosomas es un factor que determina su posición y concuerdan con los de Bolzer y colaboradores, quienes mostraron esta correlación entre la distribución radial y la envergadura de los territorios cromosómicos en el núcleo aplanado de los fibroblastos (Bolzer y cols., 2005).

La posición de los cromosomas 5, 6 y 15 de ratón también fue estudiada por Parada y colaboradores en el núcleo en interfase de varios tejidos (Parada y cols., 2004). Ellos encontraron, por ejemplo, que el cromosoma 5 de ratón se dispone preferentemente en el interior del núcleo en las células hepáticas, en la periferia nuclear en las células de pulmón y en una posición intermedia en los linfocitos. La distribución radial de los cromosomas 6 y 15 también cambia entre las células de pulmón y las células hepáticas, por lo que los autores indican que la posición radial

de estos cromosomas en el núcleo en interfase resulta específica de los tejidos. Interesante destacar que se propuso que las células que compartían rutas de diferenciación presentaban similitudes en la distribución radial de todos los cromosomas, como por ejemplo las células grandes y pequeñas de pulmón. Los resultados obtenidos para los fibroblastos durante el desarrollo de la presente tesis concuerdan con lo postulado por estos autores acerca de que la posición radial específica podría establecerse durante la diferenciación celular (Parada y cols., 2004).

Nuestros conocimientos acerca del efecto de la organización específica del genoma sobre la expresión génica son aún escasos. Sin embargo, los datos científicos apuntan a que es la actividad transcripcional del genoma la que puede determinar su propia organización (Papantonis y Cook, 2010).

La descripción de patrones de distribución de cromosomas ha sido realizada, en la mayoría de los casos, en tipos celulares diploides. En el presente trabajo se extendieron los estudios utilizando sistemas celulares aneuploides. Nuestros resultados indican que conforme aumenta el nivel de ploidía, la distribución radial de los territorios cromosómicos 5, 6, 15 y 16 cambia respecto de la posición de estos cromosomas en los fibroblastos diploides G7. En general, se observa un desplazamiento hacia la periferia nuclear de estos cromosomas, pero en las células NIH3T3 la posición de los cromosomas 6 y 16 es ligeramente más central que la de los cromosomas 5 y 15. Los estudios también revelaron que los cromosomas 5 y 6, que poseen una distribución radial similar entre ellos en las células G7, conservan tal organización en las células poliploides, indicando que podría existir cierta asociación estructural o funcional entre ellos.

Hasta el presente, la mayoría de los estudios sobre la organización de los genomas aneuploides se realizaron en células tumorales, que tienen la característica de ser inestables cromosómicamente, esto es sufren ganancias y pérdidas constantes de cromosomas. Cremer y colaboradores describieron la posición radial de los territorios cromosómicos 18 y 19 humanos en la línea celular HDLM-2, derivada de un paciente con enfermedad de Hodgkin, y en células de adenocarcinoma de colon.

Los cariotipos de estas líneas celulares son complejos, con múltiples reordenamientos de material genético que resultan en trisomía parcial del cromosoma 19 en HDLM-2 y trisomía del cromosoma 18 en la otra. Sus resultados sobre la organización espacial de estos cromosomas indican que durante la tumorigénesis se produce una alteración de la distribución radial de los cromosomas 18 y 19 en el núcleo interfásico, más aun adquieren una posición radial invertida respecto de lo observado en las células no tumorales (Cremer y cols., 2003). Estos autores propusieron que los reordenamientos cromosómicos son causantes de tal cambio en la distribución radial de los cromosomas en las células cancerosas.

Nuestros resultados también apoyan la noción de que la posición radial de los cromosomas en el núcleo cambia en los estados de aneuploidía. Sin embargo, en nuestro caso, la contribución de las alteraciones estructurales de los cromosomas a este fenómeno no parece ser importante, ya que nuestros estudios se realizaron en células no tumorales con cariotipo estable. Sengupta y colaboradores determinaron la distribución espacial del cromosoma 7 en células en las que introdujeron artificialmente un cromosoma 7 extra y la compararon con la posición del mismo cromosoma en las células parentales diploides. Estos autores detectaron que el cromosoma 7 introducido artificialmente, es decir, generando una situación de aneuploidía, localizan en una posición radial similar a la de los homólogos (Sengupta y cols., 2007). Estos resultados sugieren que la ganancia de cromosomas aislados tiene un efecto diferente al de la ganancia de complementos completos de cromosomas, es decir, sugieren que la arquitectura nuclear no sufre mayor distorsión por la ganancia de un solo cromosoma. Sin embargo, ha sido demostrado que el comportamiento en términos de distribución espacial de las copias adicionales de cromosoma X en células de pacientes con polisomías es completamente diferente. En un caso excepcional de polisomía XXXXY, los cromosomas X adicionales se localizaron yuxtapuestos a la membrana nuclear, muy probablemente relacionado con la inactivación de los mismos, tendente a compensar la dosis de genes (Petrova y cols., 2007).

En conclusión, nosotros encontramos que la posición de los territorios

cromosómicos 5, 6, 15 y 16 es preferentemente periférica en el núcleo de las células poliploides y es tentador especular que esta distribución de cromosomas podría jugar un importante papel en la modulación de la expresión génica en condiciones de aumento de la dosis de genes. Cabe destacar también que algunos procesos moleculares tales como la reparación del ADN, la replicación, etc. ocurren en la región de la envoltura nuclear de manera más eficiente. Por ejemplo, las regiones genómicas con daños de doble cadena relocalizan en la región de los poros nucleares donde se lleva a cabo la reparación del ADN (Mekhail y Moazed 2010), mientras que otros estudios han descrito que la replicación temprana o tardía de la cromatina se asocia con la localización de cromosomas respecto de la envoltura nuclear (Hiratani y cols., 2008).

V.3 Ploidía y distribución radial de genes

En este estudio se seleccionaron los genes *Socs1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a* que mapean en este orden sobre el cromosoma 16 de ratón. *Socs1*, próximo al centrómero (16qA1), mientras que *Sod1* mapea sobre 16qC3.3, *Dscr3* y *Dyrk1a* en 16C4, próximos al telómero, la región sinténica con lo que se conoce como DSCR en el cromosoma 21 humano. Los experimentos de 3D-FISH se realizaron en neuronas (diploides), fibroblastos G7 (diploides) y fibroblastos NIH3T3 (triploides).

Encontramos que estos genes ocupan una posición radial, preferentemente más central en el núcleo de las neuronas primarias que en los fibroblastos de ratón. Esta diferencia de localización de genes entre las células epiteliales y las mesenquimales fue descrita anteriormente y se considera relacionada con la especificidad tisular de la distribución de cromosomas y genes (Parada y cols., 2004). El comportamiento más destacado lo presenta el gen *Dyrk1a*, que en las neuronas localiza preferentemente en la parte central del núcleo y en los fibroblastos, próximo a la membrana nuclear. Este gen se encuentra activado durante el desarrollo del sistema nervioso y su posicionamiento en la región interior del núcleo en las neuronas podría estar relacionado con este estado. En los fibroblastos, estos genes se encuentran desplazados hacia la periferia nuclear y estos resultados correlacionan con lo

descrito para el territorio cromosómico 16.

La comparación de la posición radial de los genes *Socs1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a* entre los dos tipos de fibroblastos, reveló que ésta es similar en G7 y NIH3T3, independientemente del nivel de ploidía de las células. Estos resultados sugieren que la distribución espacial de los genes estudiados no se modifica por la mera ganancia de material genético, mientras que el reposicionamiento de los genes sí ha sido observado durante tumorigénesis o en respuesta a procesos fisiológicos como la diferenciación celular (Kim y cols., 2004; Meaburn y Misteli, 2008).

El estudio 3D-FISH también se realizó para los genes humanos *SOD1* y *DYRK1A*, que mapean en la DSCR, en linfocitos normales y con trisomía 21. El análisis reveló que ambos genes localizan preferentemente en una región intermedia en el núcleo de los linfocitos humanos normales. En la línea celular derivada de una persona con Síndrome de Down, la posición radial del gen *DYRK1A* se mantiene en la misma región, mientras que el gen *SOD1* se traslada hacia la periferia nuclear en estos linfocitos trisómicos. Es decir, la presencia de un cromosoma 21 adicional en el núcleo no afecta de igual modo a los genes *SOD1* y *DYRK1A*. Interesante destacar que la posición que estos genes adquieren en los linfocitos humanos guarda estrecha similitud con la que tienen los homólogos en las neuronas de ratón. Anteriormente se mencionó que el posicionamiento de cromosomas y genes en la región perinuclear parece jugar un importante papel en la expresión génica.

La localización de loci en estrecha proximidad con la membrana nuclear se ha relacionado tanto con la activación transcripcional como con el silenciamiento génico. En efecto, la interacción o anclaje de ciertas regiones de la cromatina con la lámina conduce al silenciamiento de algunos genes en células animales. Las láminas son proteínas filamentosas que forman una red adyacente a la membrana interna del núcleo, conectando los poros nucleares entre sí y contribuyendo al mantenimiento de la morfología del núcleo.

Mewborn y colaboradores demostraron que mutaciones en el gen *LMNA* que codifica para las proteínas Lámina A-C perturba la posición en el núcleo del cromosoma 6 y de genes específicos, que adquieren una posición alejada de la

envoltura nuclear y se dispersan en el núcleo, pudiendo alterar su expresión génica (Mewborn y cols., 2010). La relación entre el silenciamiento génico y la lámina B de la envoltura nuclear también se demostró para los genes específicos de testículo, en *Drosophila*. Más aún, se demostró que deficiencias en la expresión de esta proteína por mutaciones del gen pertinente conducen a un incremento de la expresión de este cluster de genes debido a la liberación de los mismos de su anclaje a la envoltura nuclear (Shevelyov y cols., 2009). Obviamente, el efecto sobre la expresión génica de la relocalización de genes en la periferia parece no depender solamente de este posicionamiento, sino también de la presencia de factores reguladores de la cromatina y elementos de control de la transcripción en esa región (Mekhail y Moazed, 2010). Justamente para abordar la cuestión de si la proximidad a la envoltura nuclear resulta suficiente para el silenciamiento de dominios de cromatina, Finlan y colaboradores relocalizaron de manera artificial los cromosomas 4 y 11 humanos en la periferia del núcleo, mediante la inmovilización de la cromatina con la proteína Lap2 β de la membrana interna del núcleo, y demostraron que la expresión de los genes reclutados, aunque no de todos, disminuye como consecuencia de este procedimiento. El efecto más potente se observa en las regiones próximas al sitio de anclaje, aunque también hay evidencias de un descenso en la expresión de los genes a lo largo del cromosoma. La acción de las histonas deacetilasas HDAC de clase I/II presentes en la región perinuclear, caracterizada justamente por un estado de hipoacetilación de la cromatina, pueden intervenir en la inhibición de la transcripción. Finalmente, los autores sugieren que en procesos como el desarrollo embrionario y la diferenciación, la relocalización respecto de la periferia nuclear puede modular la expresión de determinados genes de manera específica, sin necesidad de afectar la actividad de los genes que lo rodean (Finlan y cols., 2008). Otros autores, utilizando una tecnología similar para relocalizar una construcción compuesta por 256 copias del operón lac integrada en la región 1p36 del genoma humano demostraron que el reclutamiento de este material genético en la periferia podía resultar en la inhibición de la actividad transcripcional (Reddy y cols., 2008).

Experimentos de FISH también han permitido demostrar cambios en la posición de una variedad de genes según su estado transcripcional. Los loci de inmunoglobulinas se trasladan desde la región rica en heterocromatina de la periferia nuclear hacia el interior cuando ocurre su activación, o viceversa durante el silenciamiento génico (Kosak y cols., 2002; Williams y cols., 2006; Takizawa y cols., 2008b). El gen *Dntt* (*DeoxyNucleotidylTransferaseTerminal*) tiene un comportamiento similar, cuando se encuentra silenciado durante la maduración de los timocitos se localiza preferentemente en regiones de heterocromatina, que pueden estar asociadas en la región perinuclear o perinucleolar (Su y cols., 2004). El gen de la β -globina en ratón sufre relocalización desde la periferia hacia el interior como consecuencia de la activación transcripcional (Ragoczy y cols., 2006). Meister y colaboradores midieron la posición radial *in vivo* y analizaron la transcripción de genes marcados con el sistema *lacO/LacI-GFP* durante el desarrollo de *C. elegans*. Observaron decondensación y relocalización desde la envoltura nuclear de algunos promotores específicos de tejido posteriormente a la activación de la transcripción, mientras que otros, incluidos algunos genes con elevada expresión (*housekeeping*), no cambiaron la posición respecto de la periferia nuclear. Los autores concluyeron que el reposicionamiento podría depender del tipo de gen y también de la presencia de factores reguladores de ese determinado locus (Meister y cols., 2010).

La heterocromatina que localiza de manera perinuclear y el grupo de proteínas *Polycomb* se encuentran entre las principales estructuras moleculares involucradas en el silenciamiento de la cromatina. Los mecanismos por los cuales ejercen esta acción implican la formación de complejos de inhibición mediante la unión de factores de transcripción tales como RB o KRAB y elementos reguladores como PRE (*Polycomb Regulated Elements*) al ADN. El mantenimiento de la cromatina inactiva requiere de mecanismos adicionales como modificaciones epigenéticas de las histonas, tales como la metilación de la lisina 9 de la histona H3, el reclutamiento de la proteína de heterocromatina 1 (HP1) y Suvar30H1 (SUV30H1) y también la unión de ARNs no codificantes (iARN, Xist/RepA, HOTAIR), que generan un ambiente local de inhibición de la expresión génica (Beisel y Paro, 2011).

En resumen, se ha detectado que la posición de algunos genes parece conservarse, mientras que otros sufren relocalización en estados de aneuploidía. En los linfocitos trisómicos el gen *DYRK1A* se comporta como los primeros, mientras que la posición del gen *SOD1* cambia haciéndose periférica respecto de las células disómicas. Es tentador especular que este reposicionamiento podría estar acompañado por una disminución de la actividad y relacionarla con la deficiencia mental de los pacientes de Síndrome de Down debido a una disminución de la capacidad de eliminar especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, es necesaria mucha mayor experimentación para fundamentar esta hipótesis. Cabe destacar nuevamente que la proximidad a la periferia por sí sola no parece determinar el resultado transcripcional y que factores como el ambiente genómico y la presencia de los complejos reguladores de un determinado locus resultan necesarios para la expresión génica.

V.4 Ploidía y posición relativa de cromosomas y genes

La organización del genoma no aleatoria que se observa en el núcleo interfásico también implica el establecimiento de relaciones espaciales entre los territorios cromosómicos. La descripción de la posición relativa de cromosomas y genes unos respecto de otros, o respecto de compartimentos nucleares, constituye una medida de la organización que se encuentra íntimamente relacionada con la función (Sexton y cols., 2009).

Durante el desarrollo de este proyecto se midió la posición relativa de cromosomas y genes en células con diferente nivel de ploidía. Los genes murinos *Socs1*, *Dyrk1a*, *Sod1* y *Dscr3* mapean sobre el cromosoma 16. Los dos primeros distan 84 Mpb entre sí en la secuencia (genes distantes) y la distancia genómica entre los dos últimos es de 4,5 Mpb (genes próximos). Con el objeto de estudiar la relación espacial entre ellos se midieron las distancias 3D en fibroblastos G7 y NIH3T3 y en neuronas disómicas. Se detectó que la distancia que separa los genes en el núcleo interfásico es mayor en las neuronas que en los fibroblastos, independientemente del nivel de ploidía. Estos resultados sugieren que la posición relativa entre genes en

interfase parece estar relacionada con el tipo celular, al igual que la posición radial. Por otro lado, demostramos una menor distancia *Socs1-Dyrk1a* y *Sod1-Dscr3* en el núcleo de las células triploides NIH3T3, con respecto de las células diploides G7. Interesante destacar que, a pesar del aumento del volumen nuclear, los genes se encuentran más próximos entre sí en el genoma de las células con un complemento adicional de cromosomas, lo que coincide con los datos de correlación obtenidos, en los que demostramos que los genes *Sod1-Dscr3* se encuentran próximos en la secuencia genómica y presentan una mayor tendencia de agrupamiento que *Socs1-Dyrk1a*, y que este fenómeno es más pronunciado en NIH3T3. Estos resultados son consistentes con la noción de que el descenso de la distancia entre los genes en las células NIH3T3, a pesar del aumento en el volumen nuclear, podría estar relacionado con cambios en la conformación de la cromatina del territorio cromosómico 16 (Woodcock y Ghosh, 2010).

En humanos la distancia que separa *SOD1* y *DYRK1A* en la secuencia genómica es de 5,7 Mpb (genes próximos) y la distancia entre estos genes en el núcleo interfásico es la misma en linfocitos normales y células con un cromosoma 21 adicional. Sin embargo, se observó que *SOD1* y *DYRK1A* pueden presentarse como un par de señales separadas o parcialmente solapadas en el espacio nuclear, y que el porcentaje de colocación aumenta de forma significativa en las células trisómicas. Se ha postulado que esta colocación de genes tiene por objeto compartir estructuras especializadas que se encuentran en número limitado respecto del número de genes en el núcleo, para de esta manera maximizar la eficiencia de la transcripción.

Un ejemplo paradigmático de este comportamiento lo constituyen los elementos genéticos del grupo *Polycomb* que forman cuerpos durante la transcripción conjunta en el núcleo celular en *Drosophila* (Lanzuolo y cols., 2007). Osborne y colaboradores demostraron que los genes *Igh* y *Myc* situados en los cromosomas 12 y 15, respectivamente, comparten el complejo ARN Pol II durante la transcripción coordinada en la misma región nuclear. Es decir, la colocación parece resultar de la asociación de los genes en tres dimensiones con funciones relacionadas o genes que se encuentran regulados de manera coordinada por factores comunes (Osborne y

cols., 2007).

Con el objeto de determinar la relación que guarda la posición relativa y la función se realizó inmunoFISH en linfocitos humanos, que consiste en detectar y determinar el nivel de ARN Pol II en la región de la señal de ADN locus específico de *SODI* y *DYRKIA*. Tanto en las células disómicas como en las trisómicas, *DYRKIA* parece tener una mayor concentración de la enzima ARN Pol II que *SODI*, en los casos en los que las dos señales FISH estaban separadas, mientras que en las situaciones donde las señales locus-específicas estaban solapadas, si bien es cierto que no se puede hacer una discriminación entre el nivel de ARN Pol II de ambas señales, se observó que la región tenía el aspecto de estar constituida por múltiples sitios de transcripción con cromatina más laxa, lo que eventualmente se podría interpretar como que facilitaría el acceso de los factores de transcripción al ADN, la misma enzima ARN Pol II. Mitchell y Fraser demostraron que genes de inmunoglobulinas y *cMyc* comparten dominios de ARN pol II durante su transcripción simultánea y que la disociación de los genes activos entre sí y respecto del complejo ARN Pol II ocurre en ausencia de transcripción, mientras que los agregados de la enzima se mantienen como estructuras intranucleares (Mitchell y Fraser, 2008).

Schoenfelder y colaboradores recientemente realizaron el primer análisis de genoma completo de interacciones transcripcionales de los genes de la globina de ratón en tejido hematopoyético y observaron que los genes activos de hemoglobina A y B (*Hba* y *Hbb*) comparten factorías de transcripción con cientos de otros genes tanto del mismo cromosoma como de cromosomas distintos. Mediante ARN-inmunoFISH demostraron la colocalización de genes activos en una misma factoría de transcripción y mediante análisis molecular determinaron que un grupo de genes que colocalizan con *Hbb* comparte sitios de unión en la secuencia del promotor del factor de transcripción Klf1 (*Erythroid Kruppel-like factor*). Los autores proponen que los genes co-regulados por Klf1 preferentemente comparten factorías de transcripción especializadas. En efecto, en ratones knockout de *klf1*, la colocalización entre *Hbb* y los genes regulados por dicho factor de transcripción se interrumpe (Schoenfelder y cols., 2010). Xu y Cook, mediante transfección con

plásmidos en “mini-cromosomas”, determinaron que la localización respecto de las factorías de transcripción parece depender de la estructura génica (Xu y Cook, 2008). Por ejemplo, plásmidos con diferentes promotores se situaron en distintas factorías, en los que raramente se observaron asociados entre sí, mientras que plásmidos con genes distintos regulados por promotores similares colocan frecuentemente en las mismas factorías. Plásmidos que contienen genes con intrones se situaron en factorías ricas en SC35, para la maduración del mRNA respectivamente. Adicionalmente los plásmidos transfectados se encontraron asociados en las factorías de los correspondientes endógenos, lo que sugiere que la localización de los constructos insertados no resulta aleatoria y forma parte de la organización del genoma en el núcleo interfásico. Aparentemente, todas las factorías de transcripción no funcionarían de igual modo, sino que serían estructuras especializadas en la transcripción de genes con una regulación similar, es decir, genes co-regulados se asociarían en un número limitado de factorías (Xu y Cook, 2008). En este contexto, cabe mencionar que la proteína SATB1 (*Special AT-rich sequence binding protein 1*) surge como un componente nuclear altamente involucrado en la organización de la cromatina y la regulación génica en el núcleo celular. SATB1 forma una red tridimensional que se observa en el espacio intercromatínico entre territorios cromosómicos específicos ocupado por lazos con una alta densidad de genes preparados para la actividad transcripcional (Galante y cols., 2007).

Los resultados de la presente tesis demuestran que las señales de *SOD1* y *DYRK1A* que colocan entre sí comparten conjuntamente el complejo ARN pol II, pero la concentración de la enzima (intensidad de la señal fluorescente) disminuye significativamente en *SOD1* cuando las señales se encuentran separadas. Estos resultados sugieren que la colocación de los genes supone la expresión de *SOD1* y *DYRK1A* de manera coordinada por factores comunes y que en las señales distantes la expresión de *SOD1* se encuentra disminuida. La intensidad relativa de ARN pol II en *SOD1* respecto de *DYRK1A* en las señales separadas pareció relativamente más baja (74%). Por otro lado, se determinó que un mayor porcentaje

de señales de *SOD1* que de *DYRK1A* ocupaba una posición próxima a la periferia, equivalente al 80-100% del radio nuclear y que esta proporción de señales de *SOD1* exhibía menor intensidad de ARN pol II que las señales de *SOD1* que localizaban en una región intermedia en el núcleo de células trisómicas. La relocalización de *SOD1* hacia la envoltura nuclear podría implicar un nivel de actividad transcripcional del gen menor, es decir, la posición espacial de los genes *SOD1* y *DYRK1A* en el núcleo interfásico actuaría como un factor involucrado en la modulación de la actividad génica.

En el espacio nuclear no sólo se establecen relaciones de proximidad entre genes, sino también entre cromosomas. En los estudios de correlación se demostró que existía una tendencia de asociación de los cromosomas 5 y 6 en los fibroblastos G7 (diploide), que se mantiene en otros fibroblastos poliploides.

Esta posición en estrecha proximidad de estos cromosomas fue descrita con anterioridad por Parada y colaboradores en células hepáticas de ratón. Interesante destacar que demostraron que este posicionamiento en proximidad es un factor que favorece la ocurrencia de traslocaciones entre los cromosomas 5 y 6 características de los hepatomas de ratón (Parada y cols., 2004). Los autores estudiaron distintos tipos celulares y encontraron que esta distribución era específica de hepatocitos, pero con el presente estudio se puede concluir que los fibroblastos comparten esta distribución. Por otro lado los cromosomas 15 y 16 también se encuentran posicionados en estrecha proximidad en las células G7 y también en las células triploides NIH3T3. Los cromosomas 15 y 16 contienen NOR y, por lo tanto, esta distribución formando pares yuxtapuestos podría estar relacionada con la transcripción de genes ribosomales. Similar asociación de cromosomas portadores de NOR se ha observado para los pares 12 y 15 en linfocitos de ratón (Parada y cols., 2002).

Durante el estudio se detectó una tendencia a la asociación entre los cromosomas homólogos, pero las pruebas estadísticas demostraron que en el caso de las células diploides esta asociación de los cromosomas homólogos resultaba aleatoria, mientras que el agrupamiento de los territorios cromosómicos 5, 6, 15 y 16 con sus

homólogos en las células tetraploides P16 era estadísticamente significativo. Los datos revelaron, sin embargo, que este patrón de asociación de cromosomas homólogos no era enteramente debido al aumento en la densidad de cromosomas en el núcleo interfásico. En efecto, en las células triploides NIH3T3 se forman pares sólo entre los cromosomas homólogos 15 y 16. La proximidad entre estos cromosomas con sus homólogos en las células NIH3T3 podría estar relacionada con la presencia de NOR y, por lo tanto, asociados con un mismo nucléolo. De igual modo, se podrían interpretar los resultados obtenidos para los linfocitos con trisomía 21, en los que demostramos que en la mayoría de las células (80%) dos territorios cromosómicos 21 (NOR+) se disponen yuxtapuestos o próximos entre sí en el núcleo interfásico. Sin embargo, esto no explica la asociación de los cromosomas 5 y 6 con sus homólogos en las células tetraploides, ya que estos cromosomas carecen de genes ribosomales. Por lo tanto, otros factores adicionales estarían jugando un papel en la distribución no aleatoria de los cromosomas homólogos en estrecha proximidad entre sí.

Con el objeto de estudiar más detalladamente esta asociación de los cromosomas homólogos, se midió la distancia tridimensional entre los alelos *Socs1-Socs1*, *Sod1-Sod1*, *Dscr3-Dscr3* y *Dyrk1a-Dyrk1a* en células NIH3T3. Estos experimentos demostraron que la distribución espacial más frecuente en el núcleo de las células triploides era la de dos alelos próximos entre sí y un alelo distante. De igual modo, la distribución tridimensional de los alelos de *SOD1* y *DYRK1A* en los linfocitos trisómicos humanos consiste en dos alelos que se encuentran próximos entre sí de manera significativa y a una distancia significativamente diferente de un tercero. Adicionalmente, se demostró mediante el análisis de cortes histológicos de tejido cerebral embrionario de pacientes con Síndrome de Down que la distribución espacial descrita se correlacionaba con lo que ocurre *in vivo* para los alelos de *DYRK1A*. Es decir esta tendencia de asociación de los genes involucrados en el desarrollo de los signos y síntomas del Síndrome de Down está conservada entre las células humanas y de ratón con ganancias de cromosomas 21 (humano) y 16 (ratón). Huettel y colaboradores observaron una ligera tendencia de asociación entre alelos

en variedades estables de *Arabidopsis thaliana* con una copia adicional del cromosoma 5 (Huettel y cols., 2008). La asociación de cromosomas homólogos es un fenómeno que se observa comúnmente en *Drosophila*, aunque en mamíferos es bastante infrecuente. Uno de los ejemplos más estudiados es la interacción transitoria de cromosomas homólogos X en mamíferos de sexo femenino, que inicia la inactivación de uno de ellos con el fin de compensar la dosis génica (Bacher y cols., 2006; Xu y cols., 2006). Los territorios cromosómicos X se disponen en la periferia nuclear de manera aleatoria uno respecto de otro, pero durante el proceso de inactivación se agrupan físicamente yuxtaponiendo la región Xic (*X inactivation center*). Esto conlleva al aumento de la expresión del ARN Xist, formando una barrera que se expande por la región interior del territorio cromosómico, mientras que la enzima ARN Pol II y la maquinaria de transcripción son excluidas de esta región. Los genes silenciados relocalizan hacia el interior del territorio cromosómico, mientras que los genes activos que escapan de la inactivación se extienden fuera del territorio cromosómico, tales como los genes ANT2 y ANT3 (Dietzel y cols., 1999).

Leitch y colaboradores propusieron que la asociación de cromosomas homólogos podría estar relacionada con los mecanismos de diferenciación celular y/o constituir un requisito para la correcta expresión génica en las células diferenciadas (Leitch y cols., 1994). En relación con esta idea Chandley y colaboradores realizaron FISH de los cromosomas humanos 3, 7, 8, 13, 17 y 21 y de los cromosomas sexuales en linfocitos y células de Sertoli y determinaron que en este último tipo celular la tendencia a la asociación entre estos cromosomas era mayor que en los linfocitos (Chandley y cols., 1996). Recientemente, otro estudio, que incluyó el análisis de la distribución de 10 cromosomas en células epiteliales y modelado matemático, confirmó que para algunos cromosomas la posición radial era suficiente para justificar la asociación entre homólogos, mientras que para otros, eran necesarios factores adicionales para que se establezcan estas relaciones topográficas (Heride y cols., 2010). La asociación de cromosomas se ha descrito también en diversas condiciones patológicas. Así, la formación de un par entre los homólogos 19 trae

aparejada la desregulación de la respuesta al tenor de oxígeno mediado por EGLN2 en células de oncocitoma renal (Koeman y cols., 2008). En linfocitos T de pacientes de síndrome de Prader-Willi y de síndrome de Angelman se detectó la asociación entre las regiones cromosómicas 15q11-q13 materno y paterno necesaria para el establecimiento y mantenimiento de la impronta génica responsable de la expresión monoalélica de los genes implicados (LaSalle y Lalande 1996). Sin embargo, un estudio reciente propone que tal asociación sería un efecto secundario a la asociación de los cromosomas 15 (NOR+) en un mismo nucléolo (Teller y cols., 2007).

En el caso particular de la asociación de los cromosomas 21 humanos en células de pacientes con Síndrome de Down en división, Nagele y colaboradores demostraron que, durante la prometafase, los cromosomas 21 homólogos se disponían enfrentados a una separación angular de $162,10^\circ \pm 16,80$ en la roseta correspondiente, mientras que en las células con trisomía 21 los cromosomas se disponían de manera que dos de los cromosomas 21 se encontraban relativamente yuxtapuestos a una separación de $22,6^\circ \pm 11,1$, mientras que el otro cromosoma restante ocupaba una posición opuesta similar a la observada en las células disómicas. Además, los autores observaron que el patrón descrito se conservaba en las sucesivas mitosis y determinaba la distribución en la interfase subsiguiente con dos cromosomas en estrecha proximidad (Nagele y cols., 1998). Estos resultados sugieren que la separación entre cromosomas homólogos permite el mantenimiento de la expresión de los alelos de forma individual para evitar la regulación conjunta entre sí, mientras que las interacciones transitorias serían requeridas en la expresión diferencial de los alelos. Por lo tanto, los datos sobre el posicionamiento de los homólogos en las células trisómicas y poliploides podrían estar relacionados con los mecanismos de regulación de la expresión génica.

Uno de los objetivos de este proyecto de tesis fue analizar la identidad de los cromosomas 21 posicionados en proximidad en las células trisómicas. Mediante microdissección se aislaron pares de cromosomas a partir de células individuales y mediante PCR específica para microsatélites se determinó el tamaño de los alelos

del marcador D21S1435 de los cromosomas presentes en este material (ver Materiales y Métodos). Como control se utilizó ADN genómico total y en éste se encontró que las células trisómicas eran heterocigotas para este marcador con dos variantes polimórficas de 184 y 195 pb. De las 14 células sometidas a disección, los resultados fueron informativos en 5 de ellas, de las cuales cuatro de ellas presentaron un perfil de alelos idénticos (195 bp), mientras que en la restante se detectó la presencia de los dos alelos en el material diseccionado. Estos resultados indican que hay variación en la identidad de los cromosomas que se localizan en estrecha proximidad en las células trisómicas. Sin embargo, sugieren que existe una mayor tendencia de los mismos cromosomas a posicionarse próximos entre sí o yuxtapuestos en el núcleo interfásico de las células trisómicas. Obviamente es necesario realizar más experimentos, incrementando el tamaño muestral y el repertorio de marcadores, que ayuden a confirmar o denegar esta hipótesis.

V.5 Ploidía y expresión génica

Se determinó mediante Western-blot el nivel de expresión de las proteínas *Socs1*, *Sod1*, *Dscr3* y *Dyrk1a* en neuronas de ratón (diploide), fibroblastos embrionarios G7 (diploide) y fibroblastos de ratón adulto NIH3T3 (triploide). El análisis reveló que la expresión de la proteína *Sod1* era superior a la del resto de proteínas, pero similar en los tres tipos celulares. Contrariamente se determinó que la expresión de la proteína *Dyrk1a* era mayor en las neuronas que en los fibroblastos. Esta diferencia cuantitativa podría estar relacionada con el papel de la proteína en el desarrollo del tejido nervioso central. También se determinó que el nivel de mRNA de los genes *Sod1* y *Dyrk1a* en las neuronas era mayor respecto del de los fibroblastos, lo que probablemente esté relacionado con la función del gen durante el desarrollo embrionario, más que con el número de copias. Interesante destacar que no se detectaron diferencias aparentes en el nivel de las proteínas y de mRNA de *Sod1* y *Dyrk1a* entre las células diploides y triploides, que podrían sospecharse debidos a dosis génica. En conclusión, nuestros resultados sugieren que la presencia de un complemento cromosómico completo adicional en las células NIH3T3 no supone

cambios en el nivel de expresión de los genes *Sod1* y *Dyrk1a*.

En las células trisómicas humanas demostramos que los niveles de expresión de mRNA del gen *SOD1* y de la proteína no se ven alterados de manera significativa en las células derivadas de una persona con Síndrome de Down respecto de las células normales. Sin embargo, una copia adicional del gen *DYRK1A* resulta en un aumento de la transcripción y del nivel de proteína. Este resultado coincide con los datos obtenidos mediante análisis de expresión del mRNA por microarray, los cuales demuestran que los genes que mapean sobre el cromosoma 21 y que se encuentran por triplicado en el Síndrome de Down no siempre siguen el patrón de expresión teórico esperado (Ait Yahya-Graison y cols., 2007; Prandini y cols., 2007).

Nos preguntamos si el nivel de transcripción podría guardar relación con la posición de los genes en el espacio nuclear. Interesante destacar que la posición radial de *DYRK1A* es similar en las células disómicas y en las trisómicas, por lo que podría considerarse que el mayor nivel de expresión en el último tipo celular estaría relacionado con la dosis génica. *DYRK1A* es uno de los genes que componen la DSCR y su producto juega un papel relevante en el desarrollo del sistema nervioso central en condiciones normales. Debido a esto, actualmente se considera un gen cuyo desequilibrio de dosis podría estar relacionado con el desarrollo de alguno de los signos, deficiencia mental entre otros, que caracterizan al Síndrome de Down.

El efecto de la dosis de genes de *DYRK1A* quedó demostrado después de los estudios de Møller y colaboradores, quienes encontraron que pequeños cambios en el nivel de expresión de *DYRK1A* tenían importantes consecuencias fenotípicas en el caso de dos pacientes con microcefalia y deficiencia en homocigosis del gen *DYRK1A* (Moller y cols., 2008). De igual modo, los modelos murinos han servido como ejemplo del efecto de la dosis del gen *Dyrk1a* genes durante el desarrollo embrionario y la neurogénesis (Dierssen y de Lagran 2006).

En el presente trabajo, el análisis de la distribución espacial de *SOD1* determinó que en las células trisómicas el gen sufría un desplazamiento hacia la periferia. Dado que esta región nuclear se ha considerado como menos apta para la transcripción, se podría especular que el menor nivel de expresión en el estado trisómico está

relacionado con la posición más periférica del gen. Adicionalmente, la posición relativa respecto de *DYRK1A* y la relación con compartimentos nucleares especializados podría influir en la regulación transcripcional de este gen.

Antonarakis y colaboradores proponen que la expresión de *DYRK1A* podría resultar sensible a la dosis e incluye a éste en el grupo de genes que codifican proteínas y en los que la presencia de tres copias puede contribuir a la severidad o al silenciamiento de un carácter fenotípico del Síndrome de Down (Antonarakis y cols., 2004). En el caso del gen *SOD1*, a pesar del aumento en el número de copias, el nivel de expresión resultó similar al de las células disómicas. Estos resultados sugieren que la posición radial preferentemente próxima a la membrana nuclear tendría un efecto sobre la expresión diferente de lo que ocurre para el gen *DYRK1A*. Indirectamente aportan evidencias de que la distribución espacial de *SOD1* y *DYRK1A* en el núcleo interfásico parece influir en parte en la regulación génica. Además, la expresión de los genes del cromosoma 21 puede tener un efecto indirecto sobre los genes y productos de otros cromosomas.

VI. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que:

1. El incremento del nivel de ploidía celular en ratón se acompaña de cambios en la posición relativa entre genes (*Socs1 - Dyrk1a* y *Sod1 - Dscr3*) y en la distribución radial de los cromosomas (5, 6, 15, 16), por lo que se puede afirmar que la organización espacial del genoma de las células aneuploides difiere del de las células cromosómicamente normales.
2. En estados de aneuploidía en humanos, la posición de algunos genes parece conservarse (*DYRK1A*), mientras que la de otros sufre relocalizaciones (*SOD1*). Por tanto, la ganancia de un cromosoma en el genoma no afecta de igual modo a los genes DSCR.
3. La expresión relativa de los genes no guarda una relación directa con el número de copias de los cromosomas de las células triploides y trisómicas. Consideramos que otros factores, además del contenido genético, pueden influir en las alteraciones de la expresión génica en los casos de aneuploidía.
4. Nuestros resultados indican que la localización de *SOD1* y *DYRK1A* en el núcleo interfásico determina en parte la expresión de estos genes en las células con trisomía 21. De modo que la distribución espacial guarda una correlación con la actividad transcripcional de los genes *in situ*.
5. Los resultados sugieren que, aunque en el fenotipo del Síndrome de Down la dosis génica es un factor fundamental, las alteraciones en la organización espacial de los genes de la DSCR podrían influir en la expresión de los mismos y, consecuentemente, en el fenotipo mostrado.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ait Yahya-Graison, E., J. Aubert, *et al.* (2007). "Classification of human chromosome 21 gene-expression variations in Down syndrome: impact on disease phenotypes." *Am J Hum Genet* 81(3): 475-91.
- Alexander, R. P., G. Fang, *et al.* (2010). "Annotating non-coding regions of the genome." *Nat Rev Genet* 11(8): 559-71.
- Allshire, R. C. and G. H. Karpen (2008). "Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks?" *Nat Rev Genet* 9(12): 923-37.
- Antonarakis, S. E., R. Lyle, *et al.* (2004). "Chromosome 21 and Down syndrome: from genomics to pathophysiology." *Nat Rev Genet* 5(10): 725-38.
- Arya, G., A. Maitra, *et al.* (2010). "A structural perspective on the where, how, why, and what of nucleosome positioning." *J Biomol Struct Dyn* 27(6): 803-20.
- Bacher, C. P., M. Guggiari, *et al.* (2006). "Transient colocalization of X-inactivation centres accompanies the initiation of X inactivation." *Nat Cell Biol* 8(3): 293-9.
- Bak, A. L., J. Zeuthen, *et al.* (1977). "Higher-order structure of human mitotic chromosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(4): 1595-9.
- Baumann, C., R. Korner, *et al.* (2007). "PICH, a centromere-associated SNF2 family ATPase, is regulated by Plk1 and required for the spindle checkpoint." *Cell* 128(1): 101-14.
- Becker, W. and W. Sippl (2011). "Activation, regulation, and inhibition of DYRK1A." *FEBS J* 278(2): 246-56.
- Beisel, C. and R. Paro (2011). "Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms." *Nat Rev Genet* 12(2): 123-35.
- Belmont, A. S. and K. Bruce (1994). "Visualization of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure." *J Cell Biol* 127(2): 287-302.
- Blomen, V. A. and J. Boonstra (2011). "Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle." *Cell Mol Life Sci* 68(1): 27-44.
- Boisvert, F. M., S. van Koningsbruggen, *et al.* (2007). "The multifunctional nucleolus." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7): 574-85.
- Bolzer, A., G. Kreth, *et al.* (2005). "Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes." *PLoS Biol* 3(5): e157.
- Bose, T. and J. L. Gerton (2010). "Cohesinopathies, gene expression, and chromatin organization." *J Cell Biol* 189(2): 201-10.
- Boyle, S., S. Gilchrist, *et al.* (2001). "The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells." *Hum Mol Genet* 10(3): 211-9.
- Branco, M. R. and A. Pombo (2006). "Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations." *PLoS Biol* 4(5): e138.
- Bridger, J. M., S. Boyle, *et al.* (2000). "Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts." *Curr Biol* 10(3): 149-52.
- Buske, F. A., J. S. Mattick, *et al.* (2011). "Potential in vivo roles of nucleic acid triple-helices." *RNA Biol* 8(3).
- Capo-Chichi, C. D., K. Q. Cai, *et al.* (2011). "Nuclear envelope structural defects cause chromosomal numerical instability and aneuploidy in ovarian cancer." *BMC Med* 9(1): 28.
- Carroll, C. W., K. J. Milks, *et al.* (2010). "Dual recognition of CENP-A nucleosomes is required for centromere assembly." *J Cell Biol* 189(7): 1143-55.
- Cedar, H. and Y. Bergman (2009). "Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms." *Nat Rev Genet* 10(5): 295-304.

- Cmarko, D., P. J. Verschure, *et al.* (1999). "Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection." *Mol Biol Cell* 10(1): 211-23.
- Cook, P. R. (1999). "The organization of replication and transcription." *Science* 284(5421): 1790-5.
- Cornforth, M. N., K. M. Greulich-Bode, *et al.* (2002). "Chromosomes are predominantly located randomly with respect to each other in interphase human cells." *J Cell Biol* 159(2): 237-44.
- Cremer, C., C. Zorn, *et al.* (1974). "An ultraviolet laser microbeam for 257 nm." *Microsc Acta* 75(4): 331-7.
- Cremer, T., G. Kreth, *et al.* (2000). "Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 10(2): 179-212.
- Cremer, T. and C. Cremer (2001). "Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells." *Nat Rev Genet* 2(4): 292-301.
- Cremer, M., J. von Hase, *et al.* (2001). "Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells." *Chromosome Res* 9(7): 541-67.
- Cremer, M., K. Kupper, *et al.* (2003). "Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei." *J Cell Biol* 162(5): 809-20.
- Cremer, M., F. Grasser, *et al.* (2008). "Multicolor 3D fluorescence in situ hybridization for imaging interphase chromosomes." *Methods Mol Biol* 463: 205-39.
- Cremer, T. and M. Cremer (2010). "Chromosome territories." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(3): a003889.
- Croft, J. A., J. M. Bridger, *et al.* (1999). "Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus." *J Cell Biol* 145(6): 1119-31.
- Crutchley, J. L., X. Q. Wang, *et al.* (2010). "Chromatin conformation signatures: ideal human disease biomarkers?" *Biomark Med* 4(4): 611-29.
- Chakalova, L., E. Debrand, *et al.* (2005). "Replication and transcription: shaping the landscape of the genome." *Nat Rev Genet* 6(9): 669-77.
- Chandley, A. C., R. M. Speed, *et al.* (1996). "Different distributions of homologous chromosomes in adult human Sertoli cells and in lymphocytes signify nuclear differentiation." *J Cell Sci* 109 (Pt 4): 773-6.
- Cheng, X. and R. M. Blumenthal (2010). "Coordinated chromatin control: structural and functional linkage of DNA and histone methylation." *Biochemistry* 49(14): 2999-3008.
- Cheutin, T., A. J. McNairn, *et al.* (2003). "Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding." *Science* 299(5607): 721-5.
- Chodavarapu, R. K., S. Feng, *et al.* (2010). "Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation." *Nature* 466(7304): 388-92.
- Daban, J. R. and A. Bermudez (1998). "Interdigitated solenoid model for compact chromatin fibers." *Biochemistry* 37(13): 4299-304.
- Dalton, W. B. and V. W. Yang (2009). "Role of prolonged mitotic checkpoint activation in the formation and treatment of cancer." *Future Oncol* 5(9): 1363-70.
- de Haan, J. B., E. J. Wolvetang, *et al.* (1997). "Reactive oxygen species and their contribution to pathology in Down syndrome." *Adv Pharmacol* 38: 379-402.
- de Laat, W. and F. Grosveld (2003). "Spatial organization of gene expression: the active chromatin hub." *Chromosome Res* 11(5): 447-59.
- de Lange, T. (2005). "Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres." *Genes Dev* 19(18): 2100-10.

- Dialynas, G. K., M. W. Vitalini, *et al.* (2008). "Linking Heterochromatin Protein 1 (HP1) to cancer progression." *Mutat Res* 647(1-2): 13-20.
- Diaz-Martinez, L. A. and D. J. Clarke (2009). "Chromosome cohesion and the spindle checkpoint." *Cell Cycle* 8(17): 2733-40.
- Dierssen, M. and M. M. de Lagran (2006). "DYRK1A (dual-specificity tyrosine-phosphorylated and -regulated kinase 1A): a gene with dosage effect during development and neurogenesis." *ScientificWorldJournal* 6: 1911-22.
- Dierssen, M., Y. Herault, *et al.* (2009). "Aneuploidy: from a physiological mechanism of variance to Down syndrome." *Physiol Rev* 89(3): 887-920.
- Dietzel, S., K. Schiebel, *et al.* (1999). "The 3D positioning of ANT2 and ANT3 genes within female X chromosome territories correlates with gene activity." *Exp Cell Res* 252(2): 363-75.
- Dimitri, P., N. Corradini, *et al.* (2005). "The paradox of functional heterochromatin." *Bioessays* 27(1): 29-41.
- Druker, B. J., C. L. Sawyers, *et al.* (2001). "Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome." *N Engl J Med* 344(14): 1038-42.
- Dunleavy, E. M., D. Roche, *et al.* (2009). "HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres." *Cell* 137(3): 485-97.
- Federico, C., C. Scavo, *et al.* (2006). "Gene-rich and gene-poor chromosomal regions have different locations in the interphase nuclei of cold-blooded vertebrates." *Chromosoma* 115(2): 123-8.
- Finlan, L. E., D. Sproul, *et al.* (2008). "Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells." *PLoS Genet* 4(3): e1000039.
- Francastel, C., D. Schubeler, *et al.* (2000). "Nuclear compartmentalization and gene activity." *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(2): 137-43.
- Fransz, P. and H. de Jong (2011). "From nucleosome to chromosome: a dynamic organization of genetic information." *Plant J* 66(1): 4-17.
- Fraser, P. and W. Bickmore (2007). "Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation." *Nature* 447(7143): 413-7.
- Fujii, S., A. H. Wang, *et al.* (1982). "Molecular structure of (m5 dC-dG)₃: the role of the methyl group on 5-methyl cytosine in stabilizing Z-DNA." *Nucleic Acids Res* 10(23): 7879-92.
- Galande, S., P. K. Purbey, *et al.* (2007). "The third dimension of gene regulation: organization of dynamic chromatin loopscape by SATB1." *Curr Opin Genet Dev* 17(5): 408-14.
- Ghildiyal, M. and P. D. Zamore (2009). "Small silencing RNAs: an expanding universe." *Nat Rev Genet* 10(2): 94-108.
- Girod, P. A., D. Q. Nguyen, *et al.* (2007). "Genome-wide prediction of matrix attachment regions that increase gene expression in mammalian cells." *Nat Methods* 4(9): 747-53.
- Goetze, S., J. Mateos-Langerak, *et al.* (2007). "The three-dimensional structure of human interphase chromosomes is related to the transcriptome map." *Mol Cell Biol* 27(12): 4475-87.
- Gondor, A. and R. Ohlsson (2009). "Chromosome crosstalk in three dimensions." *Nature* 461(7261): 212-7.
- Grande, M. A., I. van der Kraan, *et al.* (1997). "Nuclear distribution of transcription factors in relation to sites of transcription and RNA polymerase II." *J Cell Sci* 110 (Pt 15): 1781-91.
- Grasser, F., M. Neusser, *et al.* (2008). "Replication-timing-correlated spatial chromatin arrangements in cancer and in primate interphase nuclei." *J Cell Sci* 121(Pt 11): 1876-86.
- Grigorova, M., R. C. Lyman, *et al.* (2005). "Chromosome abnormalities in 10 lung cancer cell lines of the NCI-H series analyzed with spectral karyotyping." *Cancer Genet Cytogenet* 162(1): 1-9.

- Grigoryev, S. A., G. Arya, *et al.* (2009). "Evidence for heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(32): 13317-22.
- Guderian, G., J. Westendorf, *et al.* (2010). "Plk4 trans-autophosphorylation regulates centriole number by controlling betaTrCP-mediated degradation." *J Cell Sci* 123(Pt 13): 2163-9.
- Hadjur, S., L. M. Williams, *et al.* (2009). "Cohesins form chromosomal cis-interactions at the developmentally regulated IFNG locus." *Nature* 460(7253): 410-3.
- Hagstrom, K. A. and B. J. Meyer (2003). "Condensin and cohesin: more than chromosome compactor and glue." *Nat Rev Genet* 4(7): 520-34.
- Hanks, S., K. Coleman, *et al.* (2004). "Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B." *Nat Genet* 36(11): 1159-61.
- Hassold, T., H. Hall, *et al.* (2007). "The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going." *Hum Mol Genet* 16 Spec No. 2: R203-8.
- Hemmerich, P., L. Schmiedeberg, *et al.* (2011). "Dynamic as well as stable protein interactions contribute to genome function and maintenance." *Chromosome Res* 19(1): 131-51.
- Henikoff, S. (2008). "Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression." *Nat Rev Genet* 9(1): 15-26.
- Hepperger, C., A. Mannes, *et al.* (2008). "Three-dimensional positioning of genes in mouse cell nuclei." *Chromosoma* 117(6): 535-51.
- Heride, C., M. Ricoul, *et al.* (2010). "Distance between homologous chromosomes results from chromosome positioning constraints." *J Cell Sci* 123(Pt 23): 4063-75.
- Hirano, T. and T. J. Mitchison (1993). "Topoisomerase II does not play a scaffolding role in the organization of mitotic chromosomes assembled in *Xenopus* egg extracts." *J Cell Biol* 120(3): 601-12.
- Hirano, T. (2006). "At the heart of the chromosome: SMC proteins in action." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(5): 311-22.
- Hiratani, I., T. Ryba, *et al.* (2008). "Global reorganization of replication domains during embryonic stem cell differentiation." *PLoS Biol* 6(10): e245.
- Hock, R., T. Furusawa, *et al.* (2007). "HMG chromosomal proteins in development and disease." *Trends Cell Biol* 17(2): 72-9.
- Holmquist, G. P. (1992). "Chromosome bands, their chromatin flavors, and their functional features." *Am J Hum Genet* 51(1): 17-37.
- Hubner, M. R. and D. L. Spector (2010). "Chromatin dynamics." *Annu Rev Biophys* 39: 471-89.
- Huetzel, B., D. P. Kreil, *et al.* (2008). "Effects of aneuploidy on genome structure, expression, and interphase organization in *Arabidopsis thaliana*." *PLoS Genet* 4(10): e1000226.
- Hulten, M. A., S. D. Patel, *et al.* (2008). "On the origin of trisomy 21 Down syndrome." *Mol Cytogenet* 1: 21.
- International Human Genome Sequence Consortium. (2004). "Finishing the euchromatic sequence of the human genome." *Nature* 431(7011): 931-45.
- Iwaizumi, M., K. Shinmura, *et al.* (2009). "Human Sgo1 downregulation leads to chromosomal instability in colorectal cancer." *Gut* 58(2): 249-60.
- Jelluma, N., T. B. Dansen, *et al.* (2010). "Release of Mps1 from kinetochores is crucial for timely anaphase onset." *J Cell Biol* 191(2): 281-90.
- Johnson, G. D., C. Lalancette, *et al.* (2011). "The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix." *Reproduction* 141(1): 21-36.
- Kalmarova, M., E. Smirnov, *et al.* (2008). "Positioning of the NOR-bearing chromosomes in relation to nucleoli in daughter cells after mitosis." *Physiol Res* 57(3): 421-5.

- Kidd, J. M., G. M. Cooper, *et al.* (2008). "Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes." *Nature* 453(7191): 56-64.
- Kim, S. H., P. G. McQueen, *et al.* (2004). "Spatial genome organization during T-cell differentiation." *Cytogenet Genome Res* 105(2-4): 292-301.
- Koehler, D., V. Zakhartchenko, *et al.* (2009). "Changes of higher order chromatin arrangements during major genome activation in bovine preimplantation embryos." *Exp Cell Res* 315(12): 2053-63.
- Koeman, J. M., R. C. Russell, *et al.* (2008). "Somatic pairing of chromosome 19 in renal oncocyoma is associated with deregulated EGLN2-mediated [corrected] oxygen-sensing response." *PLoS Genet* 4(9): e1000176.
- Kornberg, R. D. and Y. Lorch (1999). "Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome." *Cell* 98(3): 285-94.
- Kosak, S. T., J. A. Skok, *et al.* (2002). "Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development." *Science* 296(5565): 158-62.
- Kozubek, S., E. Lukasova, *et al.* (1999). "The topological organization of chromosomes 9 and 22 in cell nuclei has a determinative role in the induction of t(9,22) translocations and in the pathogenesis of t(9,22) leukemias." *Chromosoma* 108(7): 426-35.
- Krejci, P., J. Prochazkova, *et al.* (2009). "Fibroblast growth factor inhibits interferon gamma-STAT1 and interleukin 6-STAT3 signaling in chondrocytes." *Cell Signal* 21(1): 151-60.
- Kumaran, R. I., R. Thakar, *et al.* (2008). "Chromatin dynamics and gene positioning." *Cell* 132(6): 929-34.
- Kupper, K., A. Kolbl, *et al.* (2007). "Radial chromatin positioning is shaped by local gene density, not by gene expression." *Chromosoma* 116(3): 285-306.
- Kurz, A., S. Lampel, *et al.* (1996). "Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories." *J Cell Biol* 135(5): 1195-205.
- Kutay, U. and M. W. Hetzer (2008). "Reorganization of the nuclear envelope during open mitosis." *Curr Opin Cell Biol* 20(6): 669-77.
- Lanctot, C., T. Cheutin, *et al.* (2007). "Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions." *Nat Rev Genet* 8(2): 104-15.
- Lander, E. S. (2011). "Initial impact of the sequencing of the human genome." *Nature* 470(7333): 187-97.
- Lanzuolo, C., V. Roure, *et al.* (2007). "Polycomb response elements mediate the formation of chromosome higher-order structures in the bithorax complex." *Nat Cell Biol* 9(10): 1167-74.
- LaSalle, J. M. and M. Lalonde (1996). "Homologous association of oppositely imprinted chromosomal domains." *Science* 272(5262): 725-8.
- Leitch, A. R., J. K. Brown, *et al.* (1994). "The spatial localization of homologous chromosomes in human fibroblasts at mitosis." *Hum Genet* 93(3): 275-80.
- Lejeune J, G. M., and Turpin R (1959). "Étude des chromosomes somatiques de neuf enfants." *Comptes Rendues de l'Academie des Sciences*(248): 1721-1722.
- Li, G., R. Margueron, *et al.* (2010). "Highly compacted chromatin formed in vitro reflects the dynamics of transcription activation in vivo." *Mol Cell* 38(1): 41-53.
- Lieberman-Aiden, E., N. L. van Berkum, *et al.* (2009). "Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome." *Science* 326(5950): 289-93.
- Lomvardas, S., G. Barnea, *et al.* (2006). "Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice." *Cell* 126(2): 403-13.
- Loncarek, J., O. Kisurina-Evgenieva, *et al.* (2007). "The centromere geometry essential for keeping mitosis error free is controlled by spindle forces." *Nature* 450(7170): 745-9.

- Lubec, G. and E. Engidawork (2002). "The brain in Down syndrome (TRISOMY 21)." *J Neurol* 249(10): 1347-56.
- Luger, K., A. W. Mader, *et al.* (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." *Nature* 389(6648): 251-60.
- Lyon, M. F. (1961). "Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.)." *Nature* 190: 372-3.
- Maeshima, K. and M. Eltsov (2008). "Packaging the genome: the structure of mitotic chromosomes." *J Biochem* 143(2): 145-53.
- Maeshima, K., S. Hihara, *et al.* (2010). "Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo?" *Curr Opin Cell Biol* 22(3): 291-7.
- Manders, E. M., H. Kimura, *et al.* (1999). "Direct imaging of DNA in living cells reveals the dynamics of chromosome formation." *J Cell Biol* 144(5): 813-21.
- Mann, K., C. Donaghue, *et al.* (2004). "Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy." *Eur J Hum Genet* 12(11): 907-15.
- Markaki, Y., M. Gunkel, *et al.* (2010). "Functional Nuclear Organization of Transcription and DNA Replication: A Topographical Marriage between Chromatin Domains and the Interchromatin Compartment." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*.
- Marko, J. F. (2008). "Micromechanical studies of mitotic chromosomes." *Chromosome Res* 16(3): 469-97.
- Mayer, R., A. Brero, *et al.* (2005). "Common themes and cell type specific variations of higher order chromatin arrangements in the mouse." *BMC Cell Biol* 6: 44.
- McBryant, S. J., X. Lu, *et al.* (2010). "Multifunctionality of the linker histones: an emerging role for protein-protein interactions." *Cell Res* 20(5): 519-28.
- Meaburn, K. J. and T. Misteli (2007). "Cell biology: chromosome territories." *Nature* 445(7126): 379-781.
- Meaburn, K. J. and T. Misteli (2008). "Locus-specific and activity-independent gene repositioning during early tumorigenesis." *J Cell Biol* 180(1): 39-50.
- Meister, P., B. D. Towbin, *et al.* (2010). "The spatial dynamics of tissue-specific promoters during *C. elegans* development." *Genes Dev* 24(8): 766-82.
- Mekhail, K. and D. Moazed (2010). "The nuclear envelope in genome organization, expression and stability." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(5): 317-28.
- Mewborn, S. K., M. J. Puckelwartz, *et al.* (2010). "Altered chromosomal positioning, compaction, and gene expression with a lamin A/C gene mutation." *PLoS One* 5(12): e14342.
- Mirkin, S. M. (2007). "Expandable DNA repeats and human disease." *Nature* 447(7147): 932-40.
- Mirkovitch, J., S. M. Gasser, *et al.* (1988). "Scaffold attachment of DNA loops in metaphase chromosomes." *J Mol Biol* 200(1): 101-9.
- Misteli, T. (2007). "Beyond the sequence: cellular organization of genome function." *Cell* 128(4): 787-800.
- Mitchell, J. A. and P. Fraser (2008). "Transcription factories are nuclear subcompartments that remain in the absence of transcription." *Genes Dev* 22(1): 20-5.
- Moller, R. S., S. Kubart, *et al.* (2008). "Truncation of the Down syndrome candidate gene DYRK1A in two unrelated patients with microcephaly." *Am J Hum Genet* 82(5): 1165-70.
- Morey, C., N. R. Da Silva, *et al.* (2007). "Nuclear reorganisation and chromatin decondensation are conserved, but distinct, mechanisms linked to Hox gene activation." *Development* 134(5): 909-19.
- Muller, I., S. Boyle, *et al.* (2010). "Stable morphology, but dynamic internal reorganisation, of interphase human chromosomes in living cells." *PLoS One* 5(7): e11560.

- Muotri, A. R., M. C. Marchetto, *et al.* (2010). "L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2." *Nature* 468(7322): 443-6.
- Murmann, A. E., J. Gao, *et al.* (2005). "Local gene density predicts the spatial position of genetic loci in the interphase nucleus." *Exp Cell Res* 311(1): 14-26.
- Nagele, R. G., T. Freeman, *et al.* (1998). "Chromosome spatial order in human cells: evidence for early origin and faithful propagation." *Chromosoma* 107(5): 330-8.
- Nambiar, M., G. Goldsmith, *et al.* (2011). "Formation of a G-quadruplex at the BCL2 major breakpoint region of the t(14;18) translocation in follicular lymphoma." *Nucleic Acids Res* 39(3): 936-48.
- Nasmyth, K. and C. H. Haering (2005). "The structure and function of SMC and kleisin complexes." *Annu Rev Biochem* 74: 595-648.
- Neusser, M., V. Schubel, *et al.* (2007). "Evolutionarily conserved, cell type and species-specific higher order chromatin arrangements in interphase nuclei of primates." *Chromosoma* 116(3): 307-20.
- Nigg, E. A. (2007). "Centrosome duplication: of rules and licenses." *Trends Cell Biol* 17(5): 215-21.
- Nitiss, J. L. (2009). "DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions." *Nat Rev Cancer* 9(5): 327-37.
- Nussbaum R. L., R. R. McInnes, H.F. Willard. *Genética en Medicina*. Thompson & Thompson. 7ª edición (2007). Elsevier-Masson, S.A., Barcelona.
- Okada, T., J. Ohzeki, *et al.* (2007). "CENP-B controls centromere formation depending on the chromatin context." *Cell* 131(7): 1287-300.
- Oliver, T. R., E. Feingold, *et al.* (2008). "New insights into human nondisjunction of chromosome 21 in oocytes." *PLoS Genet* 4(3): e1000033.
- Olson, L. E., R. J. Roper, *et al.* (2007). "Trisomy for the Down syndrome 'critical region' is necessary but not sufficient for brain phenotypes of trisomic mice." *Hum Mol Genet* 16(7): 774-82.
- Ono, T., A. Losada, *et al.* (2003). "Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells." *Cell* 115(1): 109-21.
- Osborne, C. S., L. Chakalova, *et al.* (2007). "Myc dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by Igh." *PLoS Biol* 5(8): e192.
- Pajeroski, J. D., K. N. Dahl, *et al.* (2007). "Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(40): 15619-24.
- Papantonis, A. and P. R. Cook (2010). "Genome architecture and the role of transcription." *Curr Opin Cell Biol* 22(3): 271-6.
- Parada, L. and T. Misteli (2002). "Chromosome positioning in the interphase nucleus." *Trends Cell Biol* 12(9): 425-32.
- Parada, L. A., P. G. McQueen, *et al.* (2002). "Conservation of relative chromosome positioning in normal and cancer cells." *Curr Biol* 12(19): 1692-7.
- Parada, L. A., J. J. Roix, *et al.* (2003). "An uncertainty principle in chromosome positioning." *Trends Cell Biol* 13(8): 393-6.
- Parada, L. A., P. G. McQueen, *et al.* (2004). "Tissue-specific spatial organization of genomes." *Genome Biol* 5(7): R44.
- Park, Y. J. and K. Luger (2008). "Histone chaperones in nucleosome eviction and histone exchange." *Curr Opin Struct Biol* 18(3): 282-9.
- Park, J., W. J. Song, *et al.* (2009). "Function and regulation of Dyrk1A: towards understanding Down syndrome." *Cell Mol Life Sci* 66(20): 3235-40.
- Patrushev, L. I. and I. G. Minkevich (2008). "The problem of the eukaryotic genome size." *Biochemistry (Mosc)* 73(13): 1519-52.

- Pennacchio, L. A., N. Ahituv, *et al.* (2006). "In vivo enhancer analysis of human conserved non-coding sequences." *Nature* 444(7118): 499-502.
- Petrova, N. V., Yakutenko, II, *et al.* (2007). "Changes in chromosome positioning may contribute to the development of diseases related to X-chromosome aneuploidy." *J Cell Physiol* 213(1): 278-83.
- Prandini, P., S. Deutsch, *et al.* (2007). "Natural gene-expression variation in Down syndrome modulates the outcome of gene-dosage imbalance." *Am J Hum Genet* 81(2): 252-63.
- Ragoczy, T., M. A. Bender, *et al.* (2006). "The locus control region is required for association of the murine beta-globin locus with engaged transcription factories during erythroid maturation." *Genes Dev* 20(11): 1447-57.
- Reddy, K. L., J. M. Zullo, *et al.* (2008). "Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina." *Nature* 452(7184): 243-7.
- Reymond, A., V. Marigo, *et al.* (2002). "Human chromosome 21 gene expression atlas in the mouse." *Nature* 420(6915): 582-6.
- Robinson, P. J., L. Fairall, *et al.* (2006). "EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(17): 6506-11.
- Roix, J. J., P. G. McQueen, *et al.* (2003). "Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas." *Nat Genet* 34(3): 287-91.
- Ronneberger, O., D. Baddeley, *et al.* (2008). "Spatial quantitative analysis of fluorescently labeled nuclear structures: problems, methods, pitfalls." *Chromosome Res* 16(3): 523-62.
- Roper, R. J. and R. H. Reeves (2006). "Understanding the basis for Down syndrome phenotypes." *PLoS Genet* 2(3): e50.
- Routh, A., S. Sandin, *et al.* (2008). "Nucleosome repeat length and linker histone stoichiometry determine chromatin fiber structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(26): 8872-7.
- Rowley, J. D. (2001). "Chromosome translocations: dangerous liaisons revisited." *Nat Rev Cancer* 1(3): 245-50.
- Royo, F., N. Paz, *et al.* (2009). "Spatial link between nucleoli and expression of the *Zac1* gene." *Chromosoma* 118(6): 711-22.
- Sargent, L. M., X. Zhou, *et al.* (1999). "Nonrandom cytogenetic alterations in hepatocellular carcinoma from transgenic mice overexpressing c-Myc and transforming growth factor-alpha in the liver." *Am J Pathol* 154(4): 1047-55.
- Schalch, T., S. Duda, *et al.* (2005). "X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre." *Nature* 436(7047): 138-41.
- Schlotterer, C. and D. Tautz (1992). "Slippage synthesis of simple sequence DNA." *Nucleic Acids Res* 20(2): 211-5.
- Schoenfelder, S., T. Sexton, *et al.* (2010). "Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells." *Nat Genet* 42(1): 53-61.
- Sengupta, K., M. B. Upender, *et al.* (2007). "Artificially introduced aneuploid chromosomes assume a conserved position in colon cancer cells." *PLoS One* 2(2): e199.
- Sexton, T., F. Bantignies, *et al.* (2009). "Genomic interactions: chromatin loops and gene meeting points in transcriptional regulation." *Semin Cell Dev Biol* 20(7): 849-55.
- Shen, J. J., B. J. Williams, *et al.* (1995). "Cytogenetic and molecular studies of Down syndrome individuals with leukemia." *Am J Hum Genet* 56(4): 915-25.
- Shevelyov, Y. Y., S. A. Lavrov, *et al.* (2009). "The B-type lamin is required for somatic repression of testis-specific gene clusters." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(9): 3282-7.
- Simpson, D. A., S. Feeney, *et al.* (2000). "Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR." *Mol Vis* 6: 178-83.

- Sinet, P. M., D. Theophile, *et al.* (1993). "Molecular mapping of the Down syndrome phenotype on chromosome 21." *Prog Clin Biol Res* 384: 63-86.
- Solomon, B. D., K. N. Rosenbaum, *et al.* (2010). "Holoprosencephaly due to numeric chromosome abnormalities." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 154C(1): 146-8.
- Soutoglou, E. and T. Misteli (2007). "Mobility and immobility of chromatin in transcription and genome stability." *Curr Opin Genet Dev* 17(5): 435-42.
- Stein, G. S., A. J. van Wijnen, *et al.* (2010). "Architectural genetic and epigenetic control of regulatory networks: compartmentalizing machinery for transcription and chromatin remodeling in nuclear microenvironments." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 20(2): 149-55.
- Strachan, T. and Read A. "Human molecular genetics" published by Garland Science Publishing, 4ª edición (2010).
- Strukov, Y. G. and A. S. Belmont (2009). "Mitotic chromosome structure: reproducibility of folding and symmetry between sister chromatids." *Biophys J* 96(4): 1617-28.
- Strydom, A., M. J. Dickinson, *et al.* (2009). "Oxidative stress and cognitive ability in adults with Down syndrome." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33(1): 76-80.
- Su, R. C., K. E. Brown, *et al.* (2004). "Dynamic assembly of silent chromatin during thymocyte maturation." *Nat Genet* 36(5): 502-6.
- Takizawa, T., K. J. Meaburn, *et al.* (2008a). "The meaning of gene positioning." *Cell* 135(1): 9-13.
- Takizawa, T., P. R. Gudla, *et al.* (2008b). "Allele-specific nuclear positioning of the monoallelically expressed astrocyte marker GFAP." *Genes Dev* 22(4): 489-98.
- Tanabe, H., S. Muller, *et al.* (2002). "Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7): 4424-9.
- Teller, K., I. Solovei, *et al.* (2007). "Maintenance of imprinting and nuclear architecture in cycling cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(38): 14970-5.
- Thompson, S. L., S. F. Bakhoun, *et al.* (2010). "Mechanisms of chromosomal instability." *Curr Biol* 20(6): R285-95.
- Tijo J.H. and Levan A. (1956). "The chromosome number of man." *Hereditas*(42): 1-6.
- Ting, D. T., D. Lipson, *et al.* (2011). "Aberrant overexpression of satellite repeats in pancreatic and other epithelial cancers." *Science* 331(6017): 593-6.
- Tolhuis, B., R. J. Palstra, *et al.* (2002). "Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus." *Mol Cell* 10(6): 1453-65.
- Tremethick, D. J. (2007). "Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber." *Cell* 128(4): 651-4.
- Vagnarelli, P., S. A. Ribeiro, *et al.* (2008). "Centromeres: old tales and new tools." *FEBS Lett* 582(14): 1950-9.
- van Steensel, B. (2011). "Chromatin: constructing the big picture." *EMBO J* 30(10): 1885-95.
- Vinces, M. D., M. Legendre, *et al.* (2009). "Unstable tandem repeats in promoters confer transcriptional evolvability." *Science* 324(5931): 1213-6.
- Visser, A. E., F. Jaunin, *et al.* (2000). "High resolution analysis of interphase chromosome domains." *J Cell Sci* 113 (Pt 14): 2585-93.
- Vogler, C., C. Huber, *et al.* (2011). "Histone H2A C-terminus regulates chromatin dynamics, remodeling, and histone H1 binding." *PLoS Genet* 6(12): e1001234.
- Walczak, C. E., S. Cai, *et al.* (2010). "Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(2): 91-102.
- Wang, T. Y., Z. M. Han, *et al.* (2010a). "A mini review of MAR-binding proteins." *Mol Biol Rep* 37(7): 3553-60.

- Wang, L. H., B. Mayer, *et al.* (2010b). "Centromere DNA decatenation depends on cohesin removal and is required for mammalian cell division." *J Cell Sci* 123(Pt 5): 806-13.
- Wang, C. C., Y. Kazuki, *et al.* (2011). "Gene dosage imbalance of human chromosome 21 in mouse embryonic stem cells differentiating to neurons." *Gene* 481(2): 93-101.
- Wansink, D. G., W. Schul, *et al.* (1993). "Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus." *J Cell Biol* 122(2): 283-93.
- Watson, J. D. and F. H. Crick (1974). "Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. J.D. Watson and F.H.C. Crick. Published in Nature, number 4356 April 25, 1953." *Nature* 248(5451): 765.
- Weake, V. M. and J. L. Workman (2010). "Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms." *Nat Rev Genet* 11(6): 426-37.
- Wegiel, J., C. X. Gong, *et al.* (2010). "The role of DYRK1A in neurodegenerative diseases." *FEBS J* 278(2): 236-45.
- Williams, R. R., V. Azuara, *et al.* (2006). "Neural induction promotes large-scale chromatin reorganisation of the Mash1 locus." *J Cell Sci* 119(Pt 1): 132-40.
- Williams, A., C. G. Spilianakis, *et al.* (2010). "Interchromosomal association and gene regulation in trans." *Trends Genet* 26(4): 188-97.
- Wong, H., J. M. Victor, *et al.* (2007). "An all-atom model of the chromatin fiber containing linker histones reveals a versatile structure tuned by the nucleosomal repeat length." *PLoS One* 2(9): e877.
- Woodcock, C. L. and R. P. Ghosh (2010). "Chromatin higher-order structure and dynamics." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(5): a000596.
- Wu, C., A. Bassett, *et al.* (2007). "A variable topology for the 30-nm chromatin fibre." *EMBO Rep* 8(12): 1129-34.
- Wu, C. Y., P. A. Rolfe, *et al.* (2010). "Control of transcription by cell size." *PLoS Biol* 8(11): e1000523.
- Wyatt, H. D., S. C. West, *et al.* (2010). "InTERTpreting telomerase structure and function." *Nucleic Acids Res* 38(17): 5609-22.
- Xu, N., C. L. Tsai, *et al.* (2006). "Transient homologous chromosome pairing marks the onset of X inactivation." *Science* 311(5764): 1149-52.
- Xu, M. and P. R. Cook (2008). "The role of specialized transcription factories in chromosome pairing." *Biochim Biophys Acta* 1783(11): 2155-60.
- Zaidi, S. K., D. W. Young, *et al.* (2010). "Mitotic bookmarking of genes: a novel dimension to epigenetic control." *Nat Rev Genet* 11(8): 583-9.
- Zhao, J., A. Bacolla, *et al.* (2010). "Non-B DNA structure-induced genetic instability and evolution." *Cell Mol Life Sci* 67(1): 43-62.
- Zhou, J., J. Y. Fan, *et al.* (2007). "The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression." *Nat Struct Mol Biol* 14(11): 1070-6.
- Zink, D., A. H. Fischer, *et al.* (2004). "Nuclear structure in cancer cells." *Nat Rev Cancer* 4(9): 677-87.