

# **Genoma Eucariota: estructura 3-D y organización en isocoros**

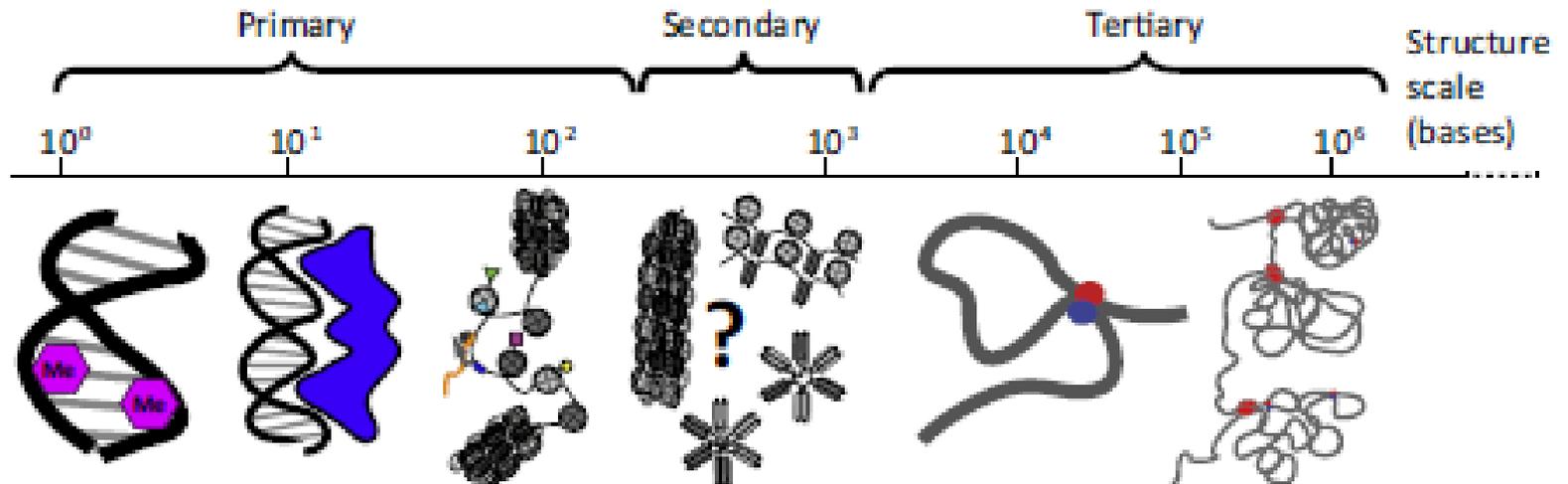
**Héctor Musto**

**Laboratorio de Genómica Evolutiva**

**[hmusto@gmail.com](mailto:hmusto@gmail.com)**

El genoma de los mamíferos es un objeto de una dimensión (1-D) «metido» en un núcleo que es 400.000 veces más corto que el eje más largo de todo el ADN. Esta **restricción espacial** necesita una compactación jerárquica del genoma 1-D hasta la cromatina 3-D dentro del núcleo.

# Jerarquías de compactación



# Esta compactación jerárquica...

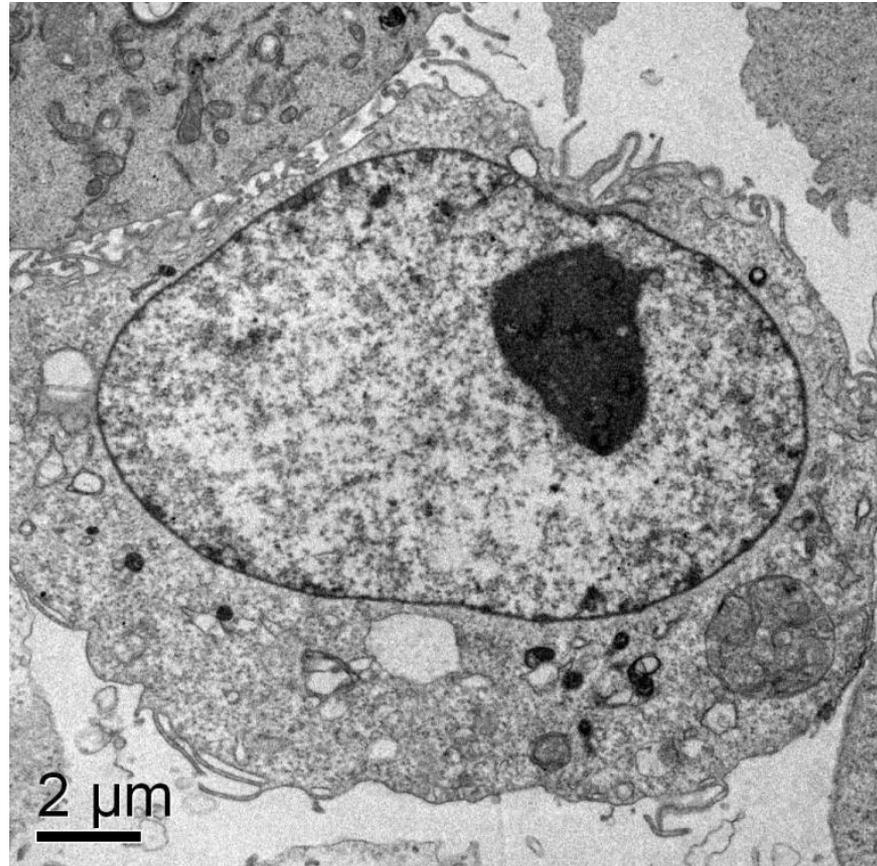
Es importante para la correcta coordinación de la expresión génica que regula el **desarrollo**, la **diferenciación** y la **homeostasis tisular**.

Para ello, la conformación genómica espacial debe asegurar la correcta interacción entre potenciadores y promotores de diferentes genes.

# **Yendo de lo más "macro" hacia lo más chico...**

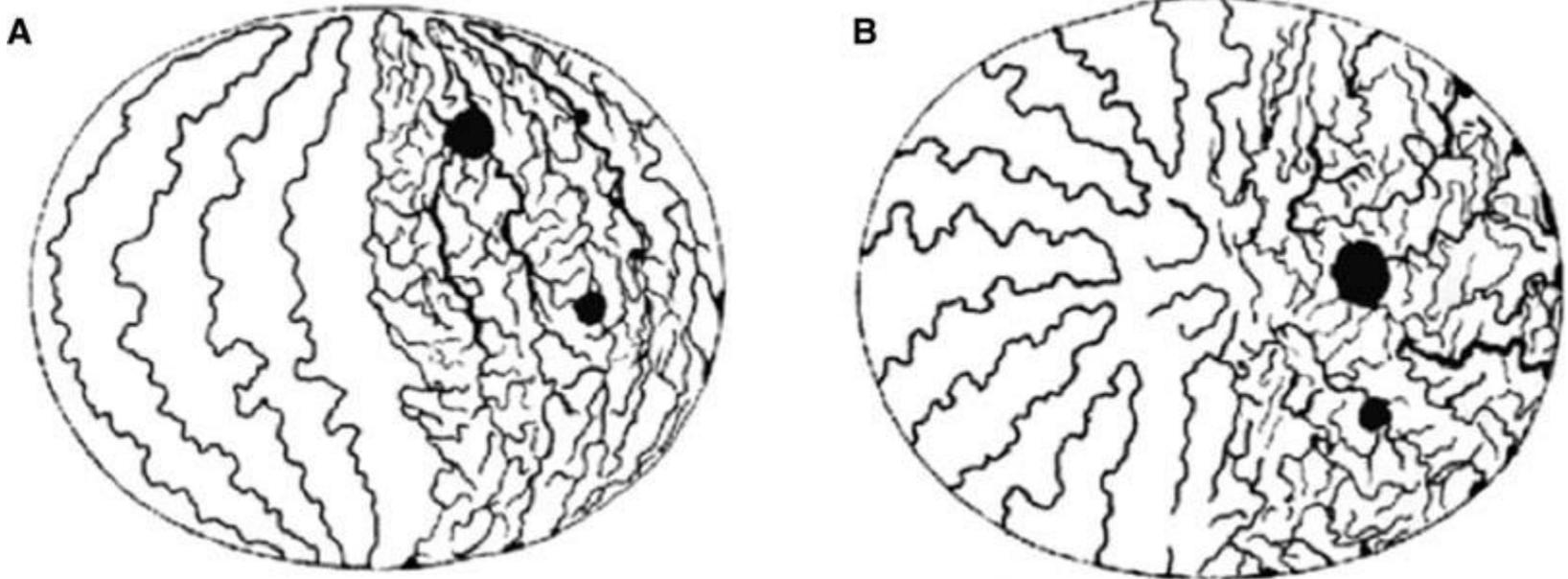
**Podemos preguntarnos cuál es la disposición de cada cromosoma en el núcleo interfásico, en particular durante la fase "S".**

# Micrografía electrónica de núcleo interfásico



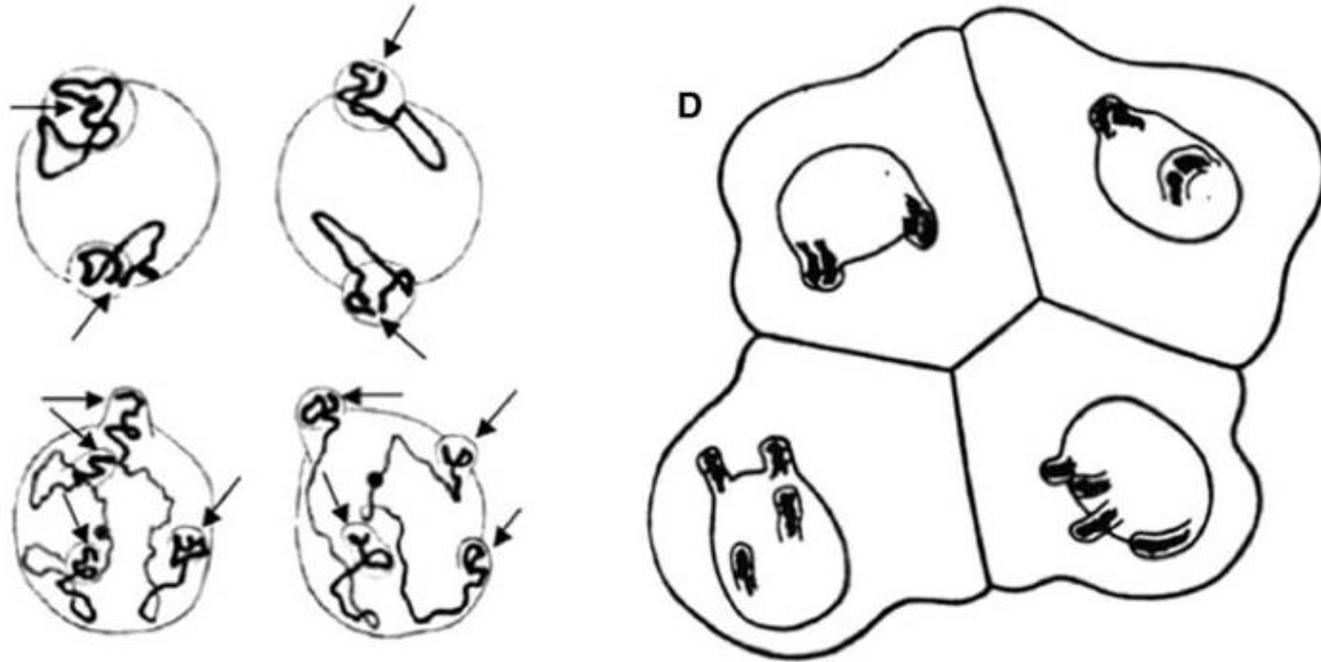
# Territorios cromosómicos

Sugerido por Carl Rabl (1885), a partir de estudios de células epiteliales de salamandra



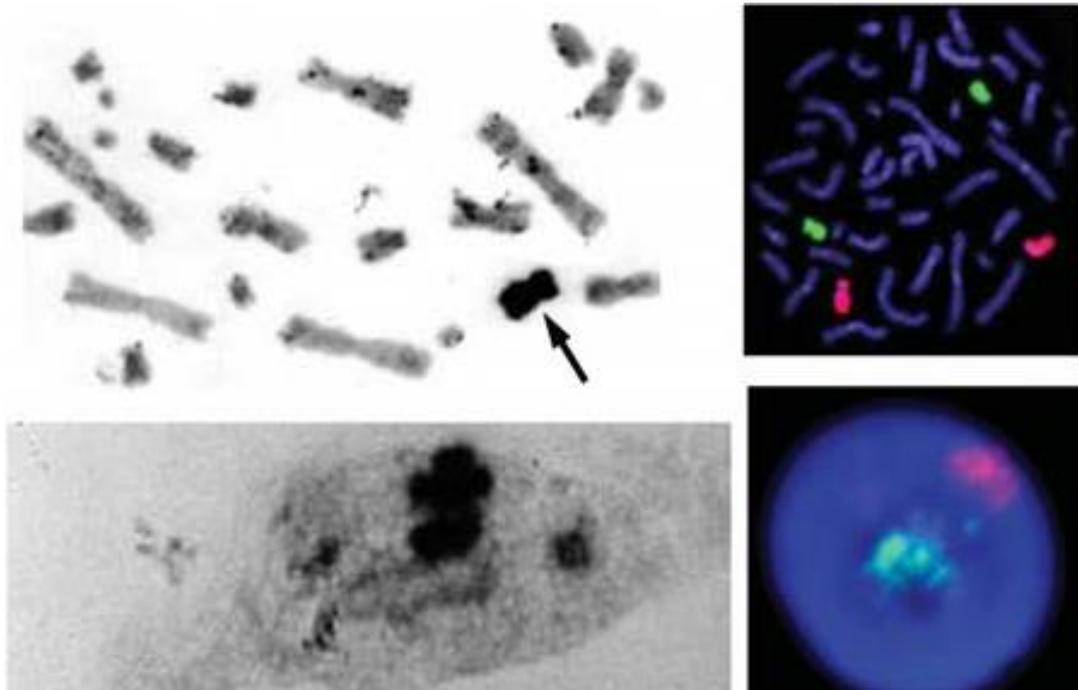
El concepto «**territorio cromosómico**» fue usado por primera vez por Theodor Boveri en 1909 estudiando los núcleos de *Parascaris equorum* y *P. univalens*, los que, en la línea germinal, poseen (de acuerdo a la especie) sólo uno o dos pares de cromosomas.

# Dibujo de Boveri

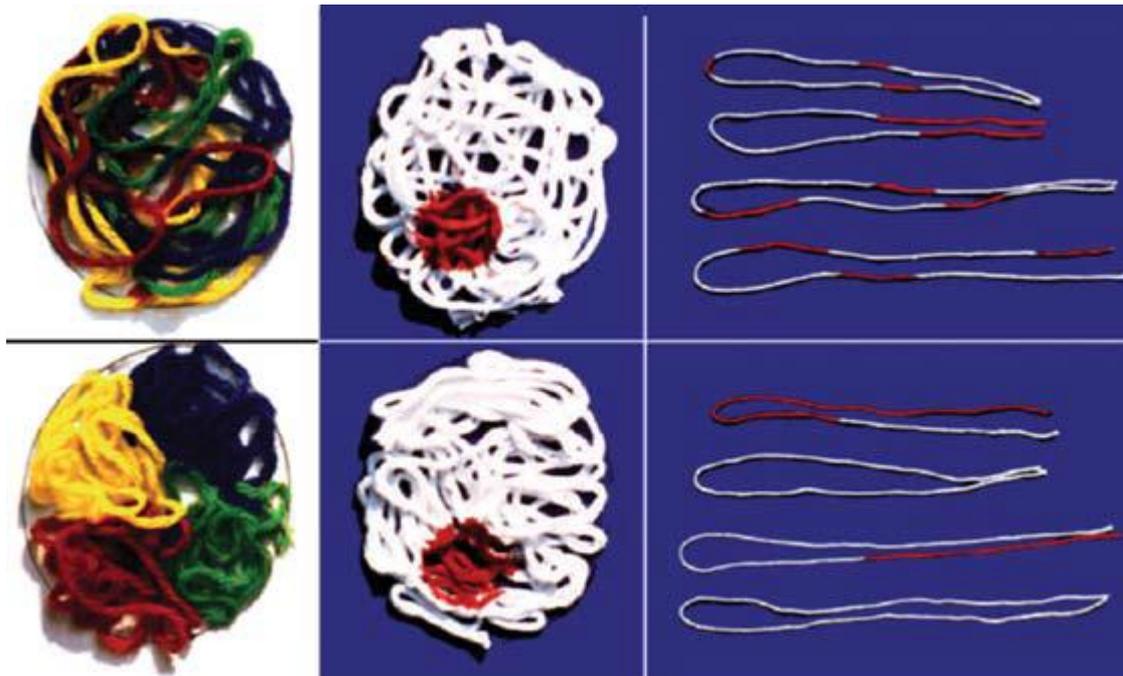


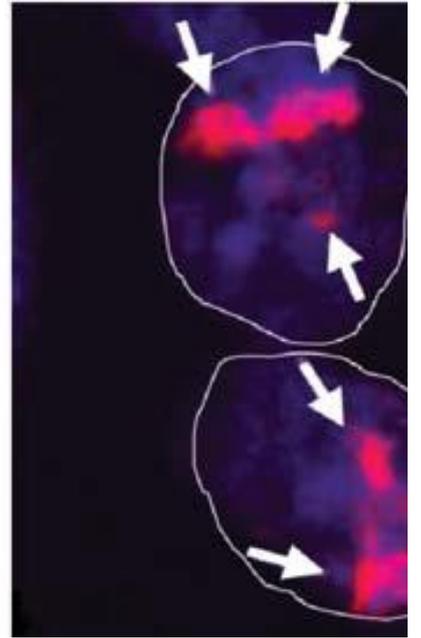
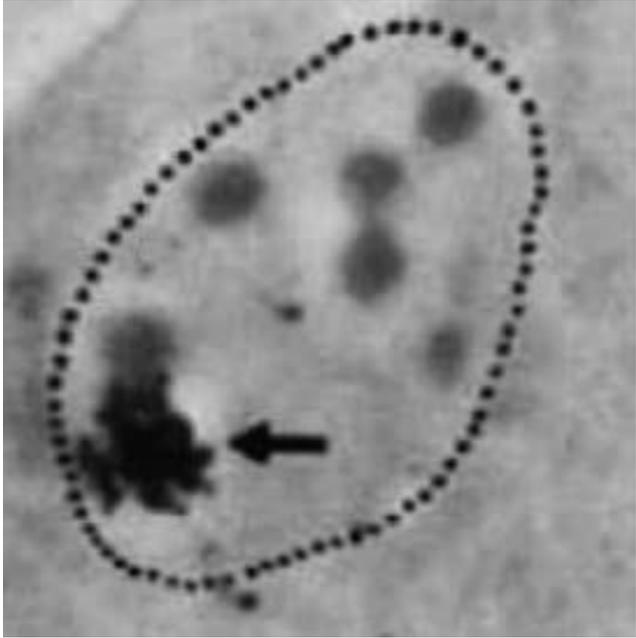
# Evidencia experimental de los TC

**Experimentos de hibridización *in situ*:**  
a la izquierda cromosoma X, a la derecha  
cromosomas humanos 19 (verde,  
cromosoma humano más denso en genes)  
y 18 (rojo; el menos denso en genes).

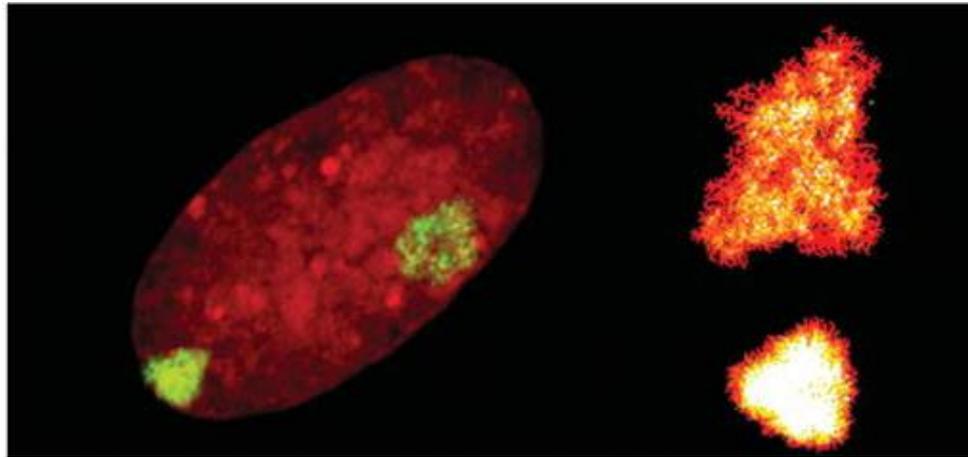


# Lógica del experimento con láser UV

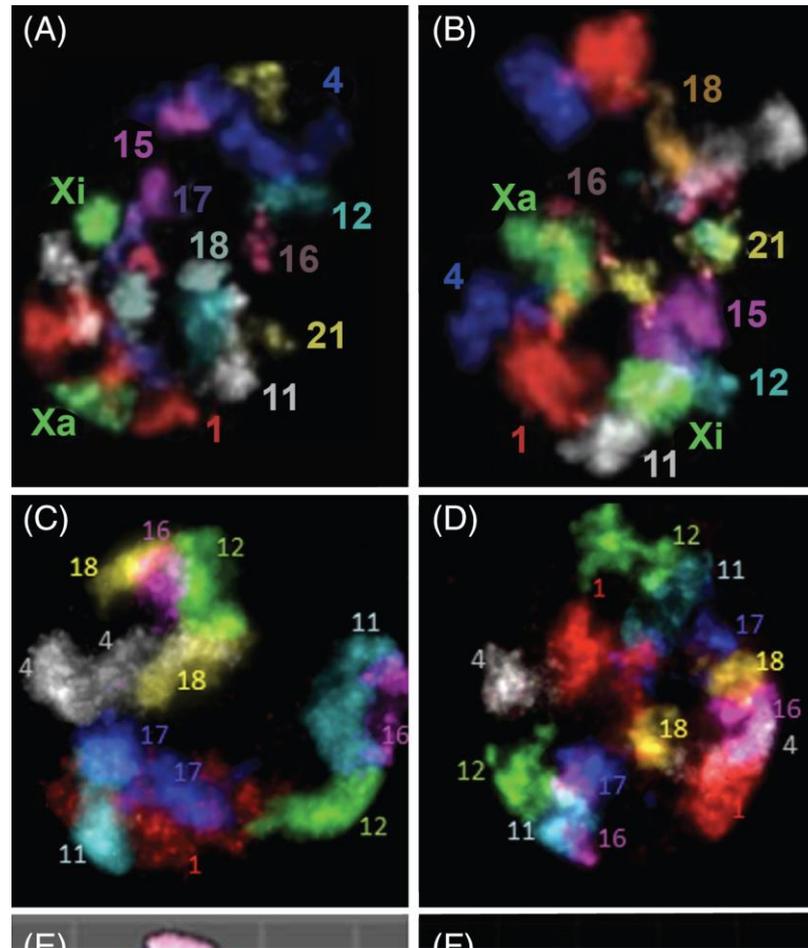




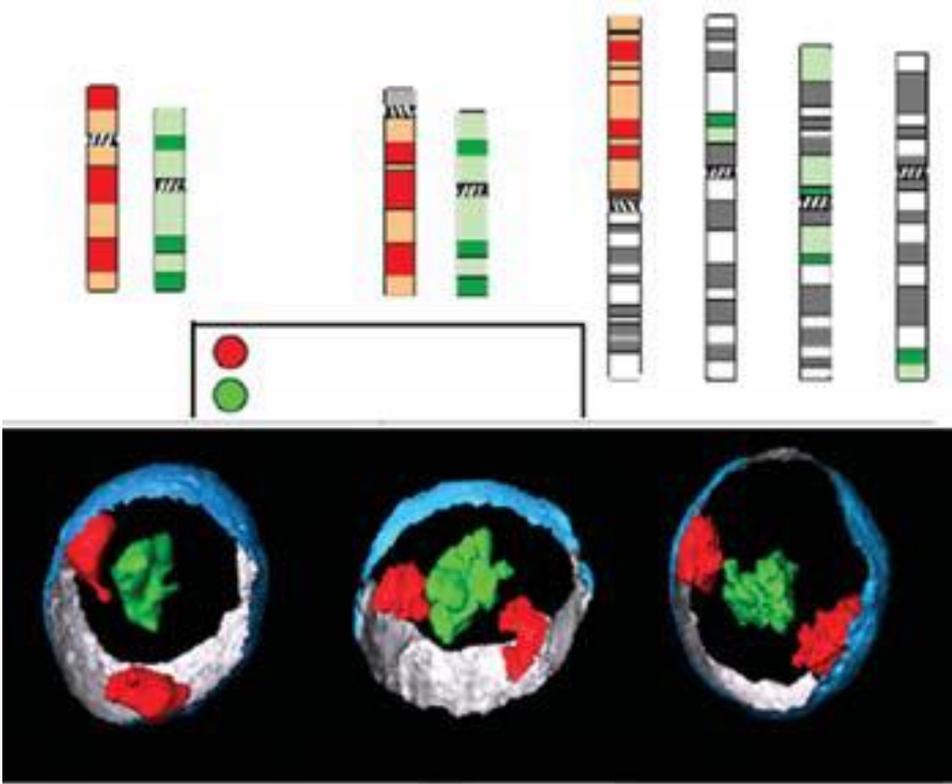
# Cromosoma X activo e inactivo



# Territorios cromosómicos en humano (FISH)



# Conservación evolutiva de la posición de los cromosomas en humano, orangután y gibbon



# Cómo se ve hoy



# Territorios cromosómicos... en resumen:

Los volúmenes espaciales de la cromatina pueden probablemente reflejar restricciones geométricas, las cuales obviamente afectan la distribución 3-D de Territorios Cromosómicos (TC) grandes y pequeños “amontonados” en el espacio nuclear.

Ocasionalmente, sin embargo, determinados tipos de proximidad ensamblados juntos *por azar*, pueden haber generado alguna *ventaja selectiva*, y por lo tanto pueden haber sido favorecidos por la *selección natural*.

**IMPORTANTE 1:** La proximidad entre genes localizados en sitios distantes del mismo cromosoma o en diferentes cromosomas, **sugiere** pero **NO PRUEBA** implicaciones funcionales. Por ejemplo, la proximidad de ciertos genes puede reflejar su distribución radial en el núcleo no al azar.

**IMPORTANTE 2:** La distribución no al azar de los Territorios Cromosómicos DEPENDIENTES DE SU DENSIDAD GÉNICA fueron también observados en roedores, bovinos y aves, por lo que sería un **fenómeno universal**, al menos en el genoma de vertebrados.

**IMPORTANTE 3:** En bovinos, se observó que los territorios cromosómicos NO están definidos todavía en blastómeros (dos días post-fecundación, 4 células), pero SI son evidentes en los blastocistos (aproximadamente una semana post-fecundación, entre 70 y 100 células).

¿Qué factor(es) generan los territorios?

Los datos disponibles proporcionan evidencia sólida en que la **densidad local de genes en ventanas de 2-10 Mb** es aparentemente el factor crucial para la posición de la cromatina en el núcleo. Otros parámetros que también influyen son la **actividad transcripcional, tiempo de replicación, contenido en GC**. Sin embargo, hay una **clara interdependencia** entre todos estos aspectos. Por lo tanto no es sencillo determinar causalidad.

**La observación de que la posición de determinadas regiones génicas pueden diferir significativamente entre distintos tipos celulares, es un argumento a favor de que factores adicionales específicos de tejido (o de “tipo celular”) pueden influir en el arreglo espacial de los territorios.**

# **Arquitectura 3-D del genoma: TADs y LADs**

# TADs

Como vimos, los cromosomas están organizados dentro del núcleo en grandes compartimentos. A su vez, estos están divididos en regiones que se definen por su proximidad física: **T**opological **A**ssociated **D**omains (TADs). Están asociados, entre otras cosas, con la transcripción y replicación.

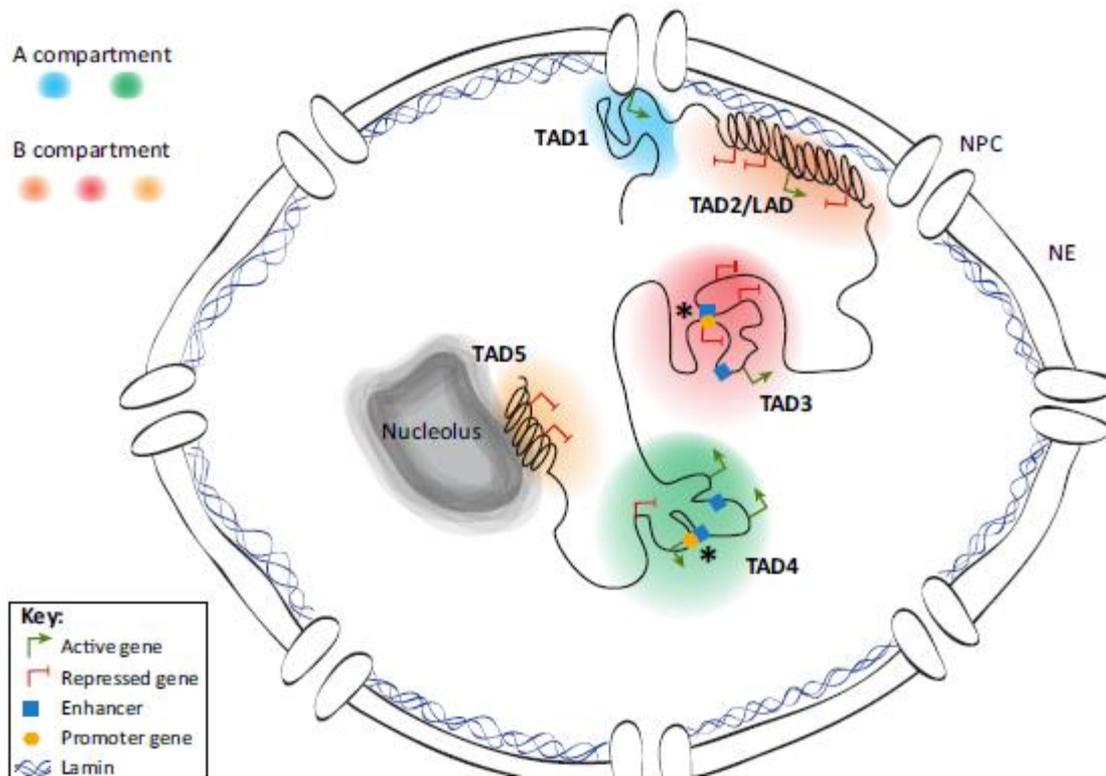
# TADs y transcripción

Para que se inicie la transcripción de un gen en particular, no alcanza con el promotor (que está en la estrecha vecindad del sitio de inicio de la transcripción) sino que también se necesitan reguladores distales (que actúan a distancia): los **enhancers**.

Problemas conceptuales que generó el descubrimiento de los enhancers.

**Modulando la accesibilidad del ADN a distintas proteínas (factores de transcripción) y los contactos entre elementos regulatorios (enhancers), la cromatina ayuda a establecer y mantener diferentes estados de actividad transcripcional. Grandes complejos con muchos componentes facilitan las interacciones de largo alcance, formando tanto loops (lazos) **intra**cromosómicos como contactos **inter**cromosómicos.**

## Spatial Organization of Chromatin Inside the Nucleus and its Impact on Gene Expression

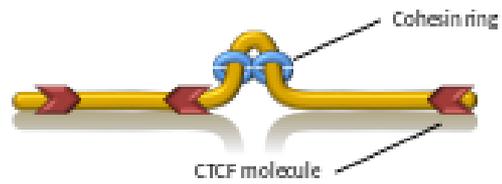


# Descubrimiento de los TADs

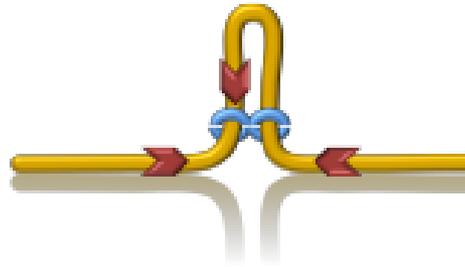
Aproximadamente en el 2005, se desarrolló una técnica llamada Captura de Conformación de la Cromatina. Se basa en el "crosslinking" (ligamiento cruzado) de sitios próximos espacialmente, su aislamiento y secuenciado.

"Unión conceptual" con sitios activos de transcripción mediante pulsos cortos de Uridina tritiada.

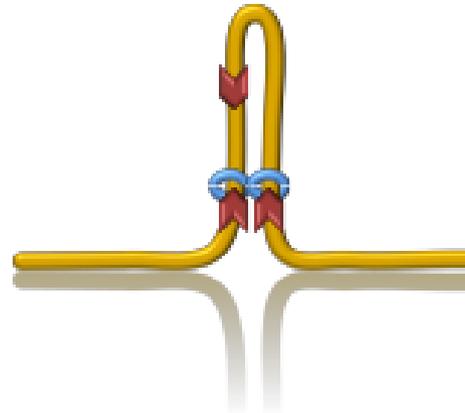
a) Cohesin rings binds bind to DNA



b) The cohesin rings slide over the CTCF molecules whose binding sequence points away from the loop. The loop continues to grow



c) Loop formation stops when each of the rings has reached an inward directed CTCF sequence



Entonces, los TADs se pueden definir como regiones de un cromosoma (o más de uno) que forman un dominio espacial donde ocurre con mayor frecuencia la transcripción.

A su vez, los TADs pueden ser clasificados de acuerdo **al nivel de transcripción, tiempo de replicación** (suelen ser de replicación temprana) y por el **tipo de histonas o proteínas no histónicas asociados**. Las histonas, en los TADs, suelen estar acetiladas.

# ¿Qué son los LADs?

A través de técnicas similares, se detectaron otros dominios de la cromatina que están asociados con las proteínas que conforman la lámina nuclear, y se las llamó **Lamina-Associated Domains (LADs)**.

Las LADs se asociaron con **baja actividad transcripcional y replicación tardía**.

## **En resumen:**

- a) Los cromosomas en interfase no están distribuidos al azar en el volumen nuclear sino que tienden a ocupar "sitios" específicos, llamados territorios cromosómicos.**
- b) Estos territorios se conservan en las células hijas.**
- c) Aquellos cromosomas con más densidad de genes tienden a ocupar el centro del núcleo.**

- d) Los territorios cromosómicos se conservan en la evolución.**
- e) A su vez, a nivel subcromosómico existen regiones definidas (TADs y LADs), que difieren por el nivel de transcripción, momento de replicación, tipo de proteínas que se unen al ADN.**
- f) Tanto los TADs como los LADs pueden estar formados por subregiones de más de un cromosoma.**
- g) Todo lo anterior, muestra que existe una gran complejidad (y orden) en el núcleo interfásico.**

# Algunos aspectos evolutivos

**a) Si bien el cromosoma procariota también presenta un ordenamiento espacial, el salto de procariotas a eucariotas representó un cambio cualitativo en cuanto al orden en el volumen nuclear.**

**b) Dado que no existen formas intermedias entre pro y eucariotas, queda mucho por entender cómo surgió todo este "orden".**