



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Análisis del anudamiento del ADN intracelular

Antonio Valdés Gutiérrez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

Tesis doctoral

Facultad de Biología
Departamento de Genética
Programa de Genética

ANALISIS DEL ANUDAMIENTO DEL ADN INTRACELULAR

Memoria presentada por Antonio Valdés Gutiérrez para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Barcelona.

Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Joaquim Roca
Unidad de Biología Estructural del Instituto de Biología Molecular de Barcelona (CSIC)
Barcelona 2018

Director de la tesis

Tutor de la tesis

Autor de la tesis

Joaquim Roca Bosch

Pere Martínez Serra

Antonio Valdés Gutiérrez

Barcelona, Diciembre de 2018

*"You can't always get what you want.
But if you try sometime you find
you get what you need"*
(M. Jagger)

A mis padres.

Agradecimientos

Ha sido largo el camino que me ha traído hasta aquí, y complicado de recorrer si no es por todas las personas que me he ido encontrando y me han ayudado de una forma u otra a disfrutar de él y a reencontrarlo en los momentos más confusos.

La primera persona a quien querría dar las gracias es a Joaquim, por su confianza y permitirme trabajar en su laboratorio. Has sido más que un director de tesis, como escribió Lao Tze: *“El verdadero maestro actúa sin acción y enseña sin palabras”*. Gracias por tu formación y por enseñarme lo que realmente es esencial en la ciencia. Y a Pere, tutor de esta tesis, gracias por el seguimiento y tener la puerta de tu despacho siempre abierta para mí.

Nací en Asturias y esta tierra siempre me ha contagiado un gran interés por la naturaleza; observando su costa nació mi pasión por la biología y por el misterio de lo vivo. Muchos profesores han contribuido a seguir cultivando mi interés en esta ciencia y a ellos también les debo mucho. En el instituto, Rafa, fuiste quien mejor me inculcó la idea de que toda la naturaleza está conectada. En la universidad, Freije, me transmitiste pasión, curiosidad y espíritu crítico. De esta misma época también he de agradecer a Jose Antonio la oportunidad de realizar mi trabajo fin de máster con tu grupo y a Yaisel, por todas tus lecciones de cómo trabajar en un laboratorio que me acompañarán siempre.

En Asturias tengo grandes amigos que de una forma diferente también han contribuido a que llegara hasta aquí y que siempre serán uno de los motivos por los que volver a casa. Gracias a Fer, que siempre me recuerdas lo importante que es pasárselo bien. A Omar que siempre me nutres de buena música y nuevas cervezas. Y sobre todo a Álvaro, mi hermano, un faro que enfoca a la vida. Desgraciadamente, creo que la mayoría de las cosas vividas juntos no pueden escribirse aquí.

Durante los años en Barcelona me he cruzado con mucha gente que ha conseguido que esta gran ciudad ya forme parte de mí. De entre todos ellos quisiera agradecer en especial a Salva, sembraste la semilla de la afición a la montaña y me mostraste lugares maravillosos de Cataluña y un espíritu de compañerismo que espero poder transmitir allá donde vaya con la misma naturalidad que tú lo haces. A Gago, te has convertido en un verdadero amigo y confesor. A Luca, el italiano loco, que entre cerveza y cerveza me enseñaste que los átomos no son realmente bolas de colores con bolitas más pequeñas girando a su alrededor. Y gracias al grupo de Tai Chi, hermanos de práctica con quienes he seguido cultivando este arte y especialmente a Joshu, maestro de caligrafía y autor de esta portada.

Una de las personas más importantes durante mi etapa en Barcelona ha sido sin duda, Tito. Gracias a ti, a Mari Carmen, a Loren y a Irene. Nunca podré agradecer suficiente cómo me acogisteis en vuestra casa, habéis sido mi familia. Sin olvidar los libritos de Mari Carmen, ya famosos en el Parc Científic.

Mi paso por el PEBC, aunque breve, fue muy enriquecedor. Gracias a Puri por su confianza, además de los desayunos juntos, me ayudaste a empezar a crecer y a madurar como científico. Y gracias a Vicky, con quien compartí largos experimentos llenos de conversaciones y discusiones científicas que siempre echaré en falta.

Dentro del IBMB también he encontrado grandes compañeros y científicos. Gracias a todo el laboratorio del Carme y Martí, siempre habéis compartido todo con generosidad y especialmente gracias a David, mago de las levaduras y enciclopedia de protocolos. Gracias a Iracema, por compartir tus habilidades en repostería y tus recomendaciones musicales, descubrir nuevos sonidos es uno de los mayores placeres. Y a Raquel, por las estimulantes conversaciones y tu espíritu científico.

Gracias a Kim, por darme la oportunidad de hacer la estancia en tu laboratorio y por enseñarme que lo más importante siempre es saber cuál es la pregunta. Y a Johanna, que me acogiste y confiaste en mí desde el primer día, gracias por tu hospitalidad, mi estancia en Oxford habría sido completamente distinta sin ti.

Dentro del laboratorio de Joaquim las gracias son infinitas. Gracias a Xavi, has sido mi mentor en el mundo de la topología, compartiré tu conocimiento allí donde vaya. A Ricky, energía motivadora, agradezco mucho tus consejos de cómo continuar en esta larga carrera científica, también me enseñaste bien la lección de que no se le puede ganar a un inglés bebiendo cerveza. A Ofelia, compañera del Norte y agradecido público de mi humor, me has hecho sentir más cerca de mi tierra. A Belén, por compartir conversaciones y consejos personales, por ser una gran fuente de cultura musical y cinéfila y porque gran parte de esta tesis te pertenece a ti también. A Joana, hemos recorrido todo este camino juntos, nos hemos quejado, nos hemos reído...y te has convertido en una gran amiga. Y a Silvia, que a pesar de haber llegado casi al final, te has quedado para siempre. Ni el Lab ni el barrio habrían sido lo mismo sin ti.

A Susana, un ser de otro mundo capaz de conectar lo material y lo etéreo. Me has enseñado que la ciencia sin arte no tiene sentido y que la intuición es una herramienta poderosa que también hay que aprender a escuchar.

Y por su puesto, un millón de gracias a toda mi familia, por haberme mostrado lo que es un hogar. A mis padres por vuestros sacrificios y por haberme apoyado siempre. Y en especial, por haberme regalado una infancia feliz sobre la que ahora puedo construir una vida sana. A Isa y Rosi por lo que me habéis aguantado y haber seguido siempre a mi lado. Por la educación y alimentar mi curiosidad desde pequeño. Y a Tanin y Elda, por haberme enseñado a tener paciencia y sobre todo por haberme mostrado siempre amor.

Gracias a todos.

Índice

Prólogo	13
Introducción	17
1. Estructura del ADN	19
2. Perspectiva histórica de la topología del ADN	20
3. Topología del ADN	22
3.1. Parámetros para describir la topología del ADN	23
3.2. La topología del ADN en la regulación del genoma	27
4. Topoisomerasas	28
4.1. Topoisomerasas tipo IA.....	29
4.2. Topoisomerasas tipo IB.....	30
4.3. Topoisomerasas tipo II	31
4.4. Principales funciones de las topoisomerasas	34
5. Cromatina	36
5.1. Estructura básica del nucleosoma	36
5.2. Organización superior de la fibra de nucleosomas	37
5.3. Organización tridimensional de la cromatina en el núcleo	39
6. Interrelación entre cromatina, topología del ADN y topoisomerasas	41
7. Anudamiento del ADN	43
7.1. ¿Qué es un nudo?.....	44
7.2. Nudos de ADN	48
7.3. Métodos para la caracterización del anudamiento de ADN.....	50
8. Hipótesis de partida	54
Material y métodos	59
1. Materiales	61
1.1. Anillos de ADN y Plásmidos	61
1.2. Cepas bacterianas	62
1.3. Cepas de levadura	62
2. Técnicas generales de biología molecular	62
2.1. Transformación de <i>E. coli</i> mediante electroporación	62
2.2. Obtención analítica y preparativa de plásmidos (miniprep y maxiprep)	63
2.3. Cultivo de levadura.....	63
2.4. Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con ADN circular	63
3. Técnicas de topología del ADN	64
3.1. Técnicas electroforéticas para el estudio de la topología del ADN.....	64
3.1.1. Análisis de Lk mediante electroforesis en gel 2D.....	64
3.1.2. Análisis de anillos de ADN anudados mediante electroforesis en gel 2D.....	67
3.1.3. Transferencia del ADN (Southern), hibridación y detección de señales mediante quimioluminiscencia	70
3.2. Preparación de muestras <i>in vitro</i>	70
3.2.1. Formación de nudos de ADN mediante incubación de plásmidos con un exceso de topoisomerasa II	70

3.2.2. Formación de nudos positivos y negativos de ADN mediante circularización de ADN.....	71
3.2.3. Ajuste de la densidad de superenrollamiento negativo en los anillos de ADN 72	
3.3. Preparación de muestras <i>in vivo</i>	73
3.3.1. Extracción del ADN de minicromosoma circular de <i>S. cerevisiae</i>	73
Resultados	75
1. Formación de nudos de ADN en cromatina eucariótica.....	77
1.1. Nudos de ADN en cromatina eucariota.....	77
1.2. Los nudos en cromatina no son producto de la replicación del ADN	80
1.3. La actividad de la topoisomerasa II mantiene activamente las fracciones de ADN anudado	82
1.4. La probabilidad de anudamiento del ADN <i>in vivo</i> no incrementa proporcionalmente con la longitud de la fibra de cromatina.....	84
2. Efectos del superenrollamiento del ADN en la formación nudos en la cromatina intracelular.	89
2.1. El superenrollamiento (+) y (-) del ADN afectan de manera diferente a la formación de nudos en la cromatina intracelular	89
2.2. El superenrollamiento (+) del ADN aumenta la probabilidad y complejidad de anudamiento del ADN.....	95
2.3. Los nudos de ADN se forman debido a la condensación de la cromatina inducida por el superenrollamiento (+)	97
3. Estudio de la quiralidad de nudos de ADN in vivo	101
3.1. Enfoque teórico para discernir la quiralidad de nudos de ADN mediante electroforesis.	102
3.2. Quiralidad de los nudos de trébol de ADN generados <i>in vitro</i>	106
3.3. Quiralidad de los tréboles de ADN generados <i>in vivo</i>	110
Discusión	113
1. Nudos de ADN en la cromatina eucariótica.....	115
2. El superenrollamiento del ADN intracelular aumenta su probabilidad de anudamiento al compactarse la cromatina	123
3. Los nudos de ADN excluyen un plegamiento quiral de la fibra de nucleosomas in vivo.....	127
Conclusiones	131
Bibliografía.....	135

Prólogo

Prólogo

La mayoría de las transacciones del genoma producen estrés topológico en el ADN, que se reduce gracias a la acción de las topoisomerasas. Por ejemplo, durante la transcripción y replicación del ADN, las topoisomerasas I y II cortan transitoriamente las cadenas de ADN para poder pasar unas a través de otras y relajar así el superenrollamiento del ADN producido por el avance de las polimerasas. Durante la replicación del ADN la actividad de la topoisomerasa II es esencial, ya que elimina los encadenamientos que se generan entre las cromátidas hermanas. Sin embargo, la singular actividad de las topoisomerasas entraña también varios riesgos. Por un lado, los cortes que producen en el ADN son potencialmente dañinos, lo que se ha explotado como diana terapéutica. Por otro lado, su mecanismo de traspaso de cadenas de ADN puede acabar enredando las moléculas de ADN intracelular y producir encadenamientos entre cromosomas o dentro de un mismo cromosoma. Desde los años 80, estudios *in vitro* han demostrado que el ADN puede anudarse. El análisis de estos nudos ha sido muy útil para determinar propiedades físicas y conformacionales del ADN. Desde entonces, varios estudios han demostrado que la aparición de nudos de ADN es frecuente en plásmidos y cromosomas bacterianos. Sin embargo, en células eucariotas la aparición de nudos en el ADN aún no ha sido documentada. En este sentido, la hipótesis de partida de esta tesis es que, dada la condensación del ADN en las fibras de cromatina y la abundante actividad de la topoisomerasa II en el núcleo celular, la presencia de nudos de ADN en la cromatina es muy probable. Si fuera así, la caracterización de esos nudos sería útil para desvelar nuevos aspectos de la conformación y propiedades biofísicas de las fibras de cromatina *in vivo*.

Esta tesis doctoral constituye un reto de investigación novedoso y original por dos motivos. Primero, se trata del primer estudio sobre nudos de ADN en cromatina nativa y abre, por lo tanto, un campo nuevo en el estudio de la topología del genoma en eucariotas. Segundo, el tipo de experimentos y análisis realizados ha conllevado el desarrollo de nuevas metodologías para el estudio de la topología del ADN intracelular.

Introducción

1. Estructura del ADN

Una de las ideas seminales de la biología es que todos los organismos vivos están formados por células que no aparecen *de novo*, sino que surgen del crecimiento y división de células ya preexistentes, siendo el ADN el principal vehículo que transfiere la información genética entre células madre e hijas.

El ADN, químicamente, se compone de dos cadenas de nucleótidos. Cada nucleótido consiste en una pentosa (2'-desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (Adenina, Timina, Guanina o Citosina). Cada una de estas pentosas forma un enlace fosfodiéster con los dos fosfatos adyacentes, uno a través de su hidroxilo 3' y otro a través del hidroxilo 5'. La esencia de la doble cadena de ADN es el emparejamiento específico entre las bases complementarias de dos cadenas a través de puentes de hidrógeno. Adenina empareja con timina, y guanina se empareja con citosina. La secuencia de las cadenas de nucleótidos es lo que se conoce como estructura primaria del ADN (Figura I1).

Las cadenas complementarias de nucleótidos se disponen en una orientación antiparalela, en la que los pares de bases (pb) se apilan con un giro en sentido dextrógiro de unos 36 grados con respecto al par anterior. Este apilamiento hace que las dos cadenas apareadas configuren una doble hélice que gira en sentido dextrógiro (Watson & Crick, 1953a), en cuyo interior hidrófobo se apilan las bases nitrogenadas y en cuyo exterior hidrófilo se exponen las pentosas y fosfatos. Esta estructura helicoidal es lo que se conoce como estructura secundaria del ADN (Figura I1).

En el modelo canónico de la doble hélice de ADN, conocido como forma B, cada vuelta de la hélice incluye 10,5 pb, y tiene una longitud de 3,5 nm y diámetro geométrico de 2,3 nm, aproximadamente. Sin embargo, estos parámetros fluctúan por la termodinámica del ADN y varían según la secuencia de nucleótidos y el medio físico-químico del ADN (fuerza iónica, pH, temperatura).

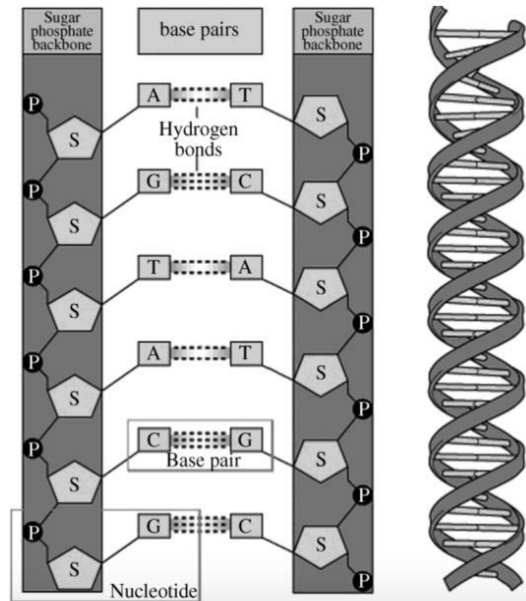


Figura I1. Estructura primaria (izquierda) y secundaria (derecha) de ADN (Buck, 2009).

La estructura secundaria del ADN proporciona cierta rigidez a la molécula, lo que se traduce en una longitud de persistencia (*Persistence Length* o P_L) relativamente grande ($P_L = 50 \text{ nm} = \sim 150 \text{ pb}$) en comparación a su diámetro (2-3 nm). Además de doblarse, la doble hélice del ADN se puede estirar y retorcer respecto a su eje longitudinal, lo que se estudia en el ámbito de la física mediante módulos de estiramiento y de torsión. Si bien la conformación en doble hélice confiere estabilidad estructural al ADN, también supone un problema cuando hay que separar las dos hebras durante los procesos de transcripción y replicación.

2. Perspectiva histórica de la topología del ADN

La determinación de la estructura del ADN (Watson & Crick, 1953a) es, sin duda, uno de los mayores logros científicos del siglo XX. Sin embargo, inmediatamente se vieron las consecuencias que acarrearía una estructura en doble hélice: al estar las dos cadenas entrelazadas, éstas deberían desenrollarse antes de separarse; *“una cantidad considerable de desenrollamiento sería necesario; [...] aunque es difícil imaginar cómo estos procesos pueden ocurrir sin que todo se enrede, no creemos que este problema sea insuperable”* (Watson & Crick, 1953b). Un año más tarde, Delbrück

propuso una solución a este problema con el llamado “modelo de ruptura y reunión”, en donde una hebra se corta para que la otra hebra pase a través de la brecha antes de que ésta vuelva a sellarse (Delbrück, 1954). Delbrück incorporó esta idea a un complicado modelo de la replicación del ADN que finalmente resultó no ser del todo correcto. Sin embargo, sí que intuyó correctamente el mecanismo que permitiría solucionar los problemas topológicos derivados de la estructura de doble hélice del ADN.

Cuando a principios de los años 60 varios grupos estudiaban las moléculas de ADN de poliomavirus, se observaron dos formas de ADN que presentaban diferente velocidad de sedimentación. Ambas formas (I y II) eran moléculas circulares de ADN de doble hebra. La forma mayoritaria (I) poseía un coeficiente de sedimentación mayor, presentaba mayor resistencia a la desnaturalización (ya fuera por temperatura o pH), y una vez desnaturalizada, las hebras no se separaban una de la otra. La solución a este enigma vino a través de microscopía electrónica. Las imágenes mostraban que las moléculas de la forma I estaban retorcidas formando muchos cruces, mientras que las moléculas de la forma II eran mayoritariamente anillos relajados. Con esta información, Vinograd y sus colaboradores propusieron en 1965 que la forma I era una forma superenrollada del ADN debido a la tensión helicoidal entre las dos hebras de la doble hélice. Por el contrario, la forma II tenía uno o varios cortes de cadena sencilla (*nicks*) y carecía, por tanto, de tensión helicoidal (Vinograd *et al.*, 1965). Este trabajo puede considerarse el primero en el campo de la topología del ADN. La mayoría de estudios sobre topología del ADN se centraron entonces en el ADN del fago λ de *Escherichia coli*, que es una molécula lineal pero con extremos cohesivos que permiten cerrar la molécula en forma de anillo (Hershey *et al.*, 1963). Estos anillos de ADN se convertían en moléculas covalentemente cerradas *in vivo* o tras incubarlos con ligasas de ADN *in vitro*. Este tipo de estudios permitieron calcular la periodicidad helicoidal o *helical repeat* del ADN en disolución (10.5 pares de bases por giro helicoidal) y su variación con la temperatura y fuerza iónica del medio (Wang, 1969; Wang, 1979). También permitieron medir los cambios en la estructura del ADN producidos por la interacción de otras moléculas. Por ejemplo, cada molécula de bromuro de etidio desenrolla aproximadamente 26 grados la doble hélice de ADN cuando se intercala entre sus bases (Wang, 1974a).

En 1971, se produce otro descubrimiento seminal en el campo de la topología del ADN. Cuando un lisado de células de *E. coli* infectadas se dejó olvidado a temperatura ambiente, en vez de a 4°C, James Wang observó que la mayoría de anillos del fago λ no estaban superenrollados como se esperaba, sino que estaban relajados (Wang,

2009). La actividad responsable de eliminar el superenrollamiento (o relajar el ADN) fue aislada y resultó ser una única proteína (Wang, 1971). Esta enzima, nombrada ω , era capaz de producir roturas transitorias en las hebras de ADN, alterar su topología, y posteriormente religar la rotura, exactamente como predijo Delbrück. La proteína ω fue la primera topoisomerasa identificada. Desde entonces, la búsqueda de topoisomerasas creció y se descubrieron en todos los procariotas y eucariotas (Gellert *et al.*, 1976a, Liu y Wang, 1978). Simultáneamente se observó que las topoisomerasas desempeñaban papeles vitales en el metabolismo del ADN, incluida la replicación (Champoux y Dulbecco, 1972; Wang, 1971), la transcripción (Wang, 1973) y la recombinación (Kikuchi y Nash, 1979).

A pesar de todos los hallazgos logrados desde 1953, muchas preguntas sobre cómo se regula la topología del ADN intracelular y la actividad de las topoisomerasas *in vivo* siguen abiertas. Si bien la topología del ADN subyace en casi todos los procesos cromosómicos, hay pocos grupos especializados en este campo. Por el contrario, otro tipo de estudios han sido de interés para muchos grupos ya que las topoisomerasas son una importante diana farmacológica por su capacidad de producir daño en el ADN.

3. Topología del ADN

En el caso de las moléculas cortas de ADN lineal, la separación de las dos cadenas se produce fácilmente gracias a la libre rotación de los extremos de la doble hélice. Sin embargo, cuando las moléculas de ADN son circulares o muy largas, separar las dos hebras de ADN trae consigo problemas topológicos. Los genomas consisten en moléculas de ADN extraordinariamente largas, que se pliegan formando bucles (*loops*) mediante complejos proteicos y que topológicamente se comportan como un dominio cerrado o circular de ADN (Mirkin, 2001). En general, cualquier segmento de ADN donde no se permita o se dificulte la rotación axial de sus extremos es un dominio cerrado con restricciones topológicas. Estas restricciones pueden definirse matemáticamente debido a la analogía de las cadenas de ADN con curvas cerradas en espacios tridimensionales.



Figura I2. La separación de las hebras de una doble hélice conlleva estrés topológico cuando no es posible la libre rotación de los extremos.

3.1. Parámetros para describir la topología del ADN

Uno de los parámetros fundamentales para describir la topología de un dominio de ADN es su número de enlace (*linking number* o *Lk*). *Lk* describe el número de veces que dos curvas cerradas se entrelazan entre sí. En una molécula de ADN circular, donde cada cadena de la doble hélice es una curva cerrada en el espacio, *Lk* es necesariamente un número entero y positivo (siendo la doble hélice dextrógira) (Figura I3). *Lk* es un invariante topológico, puesto que no se altera por las deformaciones geométricas de las cadenas de ADN. *Lk* puede alterarse sólo si se cortan una o ambas cadenas (Bates y Maxwell, 2005).

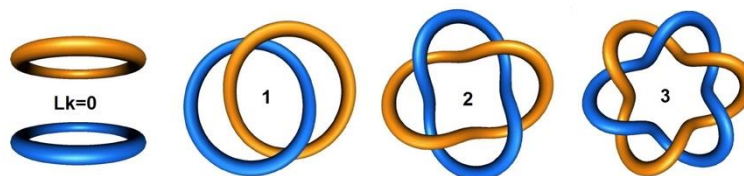


Figura I3. Valores de número de enlace entre dos curvas cerradas (Díaz-Ingelmo, 2014).

Sin embargo, aunque Lk es invariante mientras no se corte el ADN, su valor puede descomponerse matemáticamente en la suma de dos magnitudes que varían con la geometría, el número de torsión (T_w) y el número de enrollamiento (W_r) (White, 1969):

$$Lk = T_w + W_r$$

El valor de T_w indica el número de vueltas de las hebras de ADN alrededor del eje central de la doble hélice, por tanto, indica el paso de hélice (*helical pitch*) o número de pb para completar una vuelta (Bates & Maxwell, 2005). Cuando toda la molécula de ADN se encuentra sobre un plano, $T_w = Lk$. Por su parte, el valor de W_r es una medida de las desviaciones no planares del eje central de la doble hélice. El valor de W_r se puede calcular promediando el número de veces que el eje central se cruza sobre sí mismo tras proyectarlo en múltiples planos del espacio (Roca J., 2011). Como Lk es invariante, cualquier cambio de T_w es compensado por una variación opuesta de W_r , y viceversa.

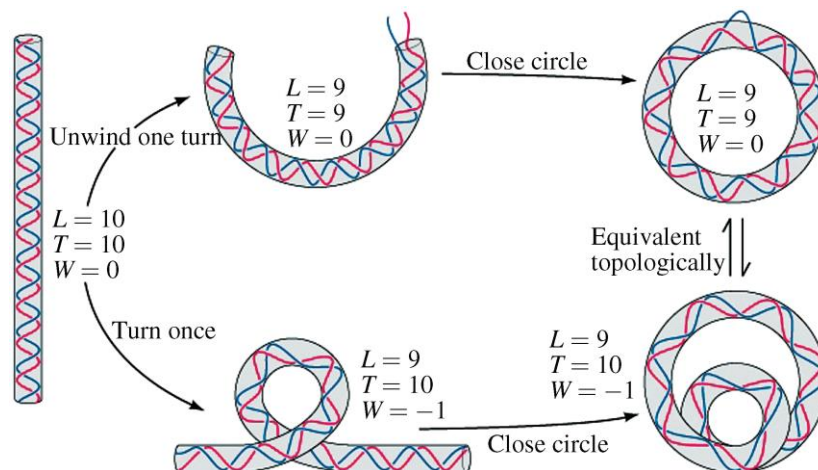


Figura I4. Equivalencias entre T_w y W_r (Voet & Voet, 2004)

El valor de Lk en el ADN equivale también al cociente N/h , siendo N el número de pb de la molécula y h el número promedio de pb por paso de la doble hélice. El valor h del ADN varía según su entorno experimental (iones, pH, temperatura...), según su secuencia de bases y sus interacciones con otras moléculas. Cuando una molécula de ADN adopta su conformación de mínima energía (h_0) en un medio fisiológico (0.2 M

NaCl, pH 7, 37 °C), h_0 es aproximadamente 10,5 y el valor de Lk se denomina Lk_0 (Wang, 1979; Peck & Wang, 1981). Sin embargo, esto no significa que todas las moléculas tengan el valor de Lk_0 en esas condiciones. Cuando se circulariza una molécula de ADN, el valor de h_0 fluctúa con la oscilación termodinámica de la molécula, lo que genera una distribución gaussiana de valores enteros de Lk cuyo centro es Lk_0 . Por este motivo, las moléculas circulares de ADN suelen formar una pequeña escalera de topoisómeros cuando se resuelven mediante electroforesis en geles de agarosa (Figura I5). En muchos casos, el valor Lk_0 (o de mínima energía) puede no ser un número entero y, por tanto, no coincidir con un topoisómero concreto. En tal caso, el topoisómero más cercano a Lk_0 (el íntegro más cercano al centro de la distribución de Lk) se denomina Lk_m .

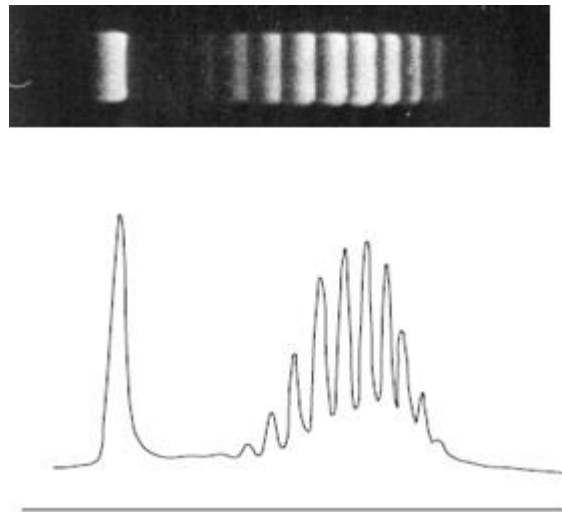


Figura I5. Distribución de topoisómeros en gel de agarosa (arriba) y cuantificación de las intensidades de las bandas correspondientes a topoisómeros individuales (abajo) (Bates & Maxwell, 2005).

En los sistemas biológicos, el valor de Lk del ADN es generalmente más pequeño que el de Lk_0 . Esta diferencia se denomina diferencia de enlace ($\Delta Lk = Lk - Lk_0$). La magnitud de ΔLk puede relativizarse respecto al tamaño de la molécula del ADN mediante la diferencia específica de enlace o densidad superhelicoidal (σ), tal que $\sigma = \Delta Lk / Lk_0$. En las células eucariotas y eubacterias, σ tiene un valor medio de -0.05 y -0.06, respectivamente (Bauer, 1978). Es decir, que respecto a Lk_0 (ADN desnudo y relajado), las moléculas de ADN *in vivo* presentan un déficit del 5-6% en el valor de Lk.

Los cambios de ΔLk implican cambios en el valor de Tw y Wr , tal que:

$$\Delta Lk = \Delta Tw + \Delta Wr$$

La energía libre asociada a estas deformaciones del ADN en forma de ΔTw y/o ΔWr pueden estar estabilizadas mediante interacciones del ADN con proteínas u otros ligandos. Por ejemplo, en cada nucleosoma se estabilizan aproximadamente 0.2 unidades de Tw y -1.45 unidades de Wr , lo que explica que el ADN tenga un ΔLk cercano a -1.25 por nucleosoma (Segura *et al.* 2018). Por el contrario, si los cambios de ΔTw y ΔWr no están estabilizados, el ADN se encuentra entonces bajo "tensión helicoidal" (Th). Cuando Th es negativa ($\sigma < 0$), decimos que el ADN adquiere superenrollamiento negativo. Cuando Th es positiva ($\sigma > 0$) las moléculas de ADN adquieren un superenrollamiento positivo. La tensión helicoidal provoca que la molécula de ADN se repliegue espontáneamente formando un plectonema (un bucle retorcido sobre sí mismo). En los plectonemas de ADN, los valores de ΔTw y ΔWr compensan, respectivamente, un 25% y 75% del valor de ΔLk aproximadamente.

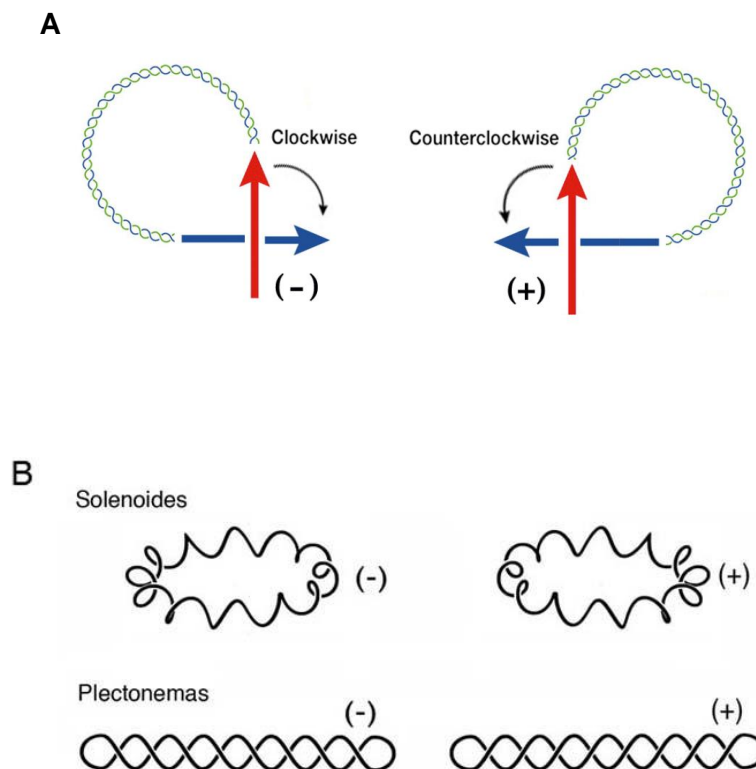


Figura I6. (A) Signo de un cruce según su orientación. (B) Conformaciones solenoidales y plectonómicas. La deformación plectonémica es espontánea en el ADN desnudo (tal como ocurre al retorcer un tubo de goma). La deformación solenoidal requiere un soporte físico para estabilizarse, tal como serían los octámeros de histonas u otros complejos ADN-proteína.

3.2. La topología del ADN en la regulación del genoma

La biología del ADN no está determinada únicamente por los elementos que reconocen e interactúan con secuencias específicas de nucleótidos, sino por la energía asociada al estado topológico de esas secuencias (Corless & Gilbert, 2016). Como se mencionó anteriormente, el ADN de la mayoría de organismos vivos tiene una densidad superhelicodal negativa, lo que favorece el desenrollamiento localizado y temporal de la doble hélice de ADN, facilitando el acceso a polimerasas de ARN y ADN, y su posterior avance. El superenrollamiento del ADN facilita también el acercamiento de regiones distantes del genoma, lo que tiene un efecto importante en la regulación de la expresión génica mediante elementos que pueden encontrarse a gran distancia (*enhancers* y *silencers*) de los elementos regulados (Vologodskii & Cozzarelli, 1996).

Por otro lado, la mayoría de las actividades del genoma producen a su vez cambios en la topología del ADN. Estas actividades alteran los valores de Lk , de Tw o de Wr (Figura 17). Para manipular el Lk es necesario cortar una o las dos hebras del ADN y religarlas. Las enzimas especializadas en esta tarea son las topoisomerasas de ADN. El Tw y Wr son generalmente alterados por cualquier elemento que interactúe con el ADN. El ejemplo más característico es el del nucleosoma, cuya formación estabiliza superenrollamiento negativo del ADN, como se explica más adelante.

El Tw y Wr del ADN *in vivo* se ven también alterados de manera extrema y muy dinámica por los motores moleculares que fuerzan la rotación axial del ADN, tales como la replicación o la transcripción (Bates & Maxwell, 2005). La velocidad de avance de las polimerasas de ADN en las horquillas de replicación en eucariotas ha sido estimada en 15–30 pb/s (Sekedat *et al.*, 2010), lo que significa que la doble hélice rota sobre sí misma tres veces por segundo por delante de la horquilla de replicación. La velocidad es aún mayor en el caso de la transcripción, donde la ARN Pol II avanza 70 pb/s *in vivo* (Darzacq *et al.*, 2007). Otro tipo de motor molecular que podría incluirse como factor que altera la disposición espacial y superenrollamiento de la doble hélice son los complejos SMC (*structural maintenance of chromosomes*). Recientemente se ha observado *in vitro* que la condensina (un complejo SMC) se desplaza a una velocidad superior a 1000 pb/s para formar un “*loop*” de ADN, lo que se ha propuesto como proceso clave en la organización del genoma (Ganji M. *et al.*, 2018). El estrés de torsión generado por todos estos motores moleculares puede amortiguarse hasta

cierto punto mediante la plasticidad de la cromatina, pero después tiene que reducirse mediante la acción de las topoisomerasas.

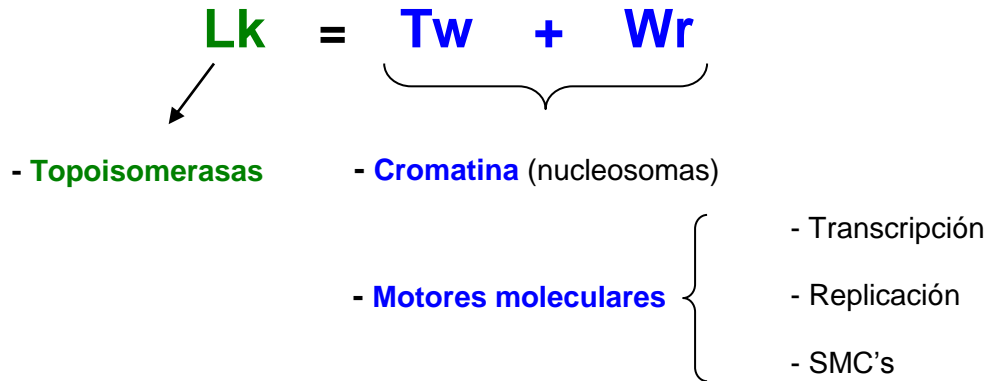


Figura 17. Factores que alteran el estado topológico del ADN *in vivo*.

4. **Topoisomerasas**

Las topoisomerasas constituyen una familia de enzimas cuyo mecanismo general tiene dos propiedades. Por un lado, cortan y sellan las hebras de ADN mediante reacciones de transesterificación, formando transitoriamente un intermediario covalente entre un hidroxilo de tirosina y un fosfato del ADN. Su otra propiedad común es que permiten el paso del otro segmento de ADN entre los extremos de las hebras transitoriamente escindidas (Figura 18).

Las topoisomerasas se clasifican en dos categorías. Las de tipo I producen roturas transitorias en una cadena de ADN, mientras que las de tipo II actúan como homodímeros para escindir temporalmente las dos cadenas de la doble hélice. A su vez las de tipo I se dividen en clase IA o IB, dependiendo de su mecanismo de acción y la polaridad 3' o 5' del enlace covalente entre el ADN y el enzima (Figura 18).

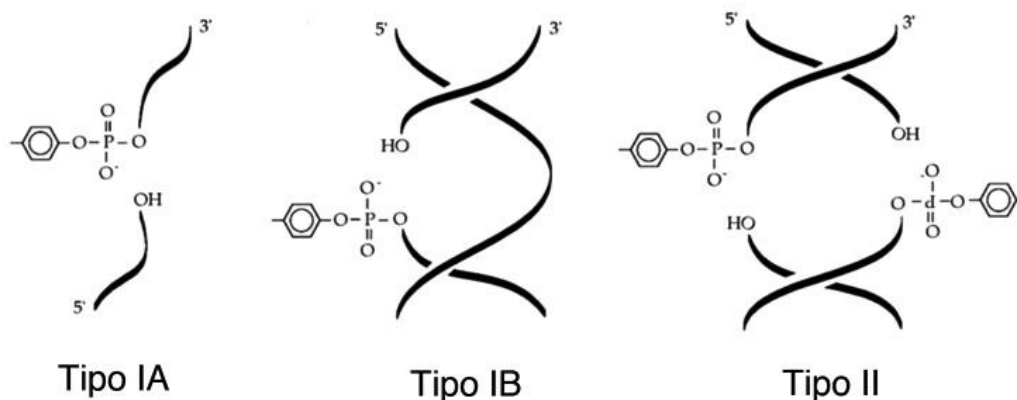


Figura 18. Tipos de topoisomerasas según el mecanismo de corte de las cadenas de ADN.

4.1. Topoisomerasas tipo IA

Las topoisomerasas tipo IA actúan en hebras simples de ADN formando el intermediario covalente entre una tirosina de su centro activo y el extremo 5'-fosfato del ADN. Ésta fue la primera actividad topoisomerasa descubierta por Wang en 1969. A través del corte pasan otras cadenas simples de ADN, de modo que pueden encadenar o desencadenar, anudar o desanudar moléculas de hebra simple. Con este mecanismo también pueden relajar parcialmente el ADN de doble cadena, siempre y cuando encuentren regiones de hebra sencilla. Esto ocurre cuando el ADN tiene tensión helicoidal negativa ($Lk < Lk_0$), lo que facilita la separación de las hebras del ADN (Kirkegaard & Wang, 1985) (Figura 19). Sin embargo, las topoisomerasas tipo IA no pueden relajar tensión helicoidal positiva ($Lk > Lk_0$), que dificulta la separación de las dos hebras de la doble hélice.

El enzima más representativo de esta subfamilia es la topoisomerasa I de *E. coli* (Wang, 1971). Tiene un peso molecular de 97 kDa y su principal función es reducir los excesos de tensión helicoidal negativa en la bacteria. Todos los procariotas presentan enzimas homólogos a la topoisomerasa I de *E. Coli*. También pertenece a esta subfamilia la topoisomerasa III presente en todos los eucariotas (Wallis *et al*, 1989). Aunque la topoisomerasa III es muy similar estructuralmente a la topoisomerasa I de *E. coli*, su actividad relajadora es más débil. La topoisomerasa III actúa principalmente sobre segmentos de ADN de cadena simple expuestos, por ejemplo, durante los procesos de recombinación y replicación (Wallis *et al.*, 1989; Kim & Wang, 1992).

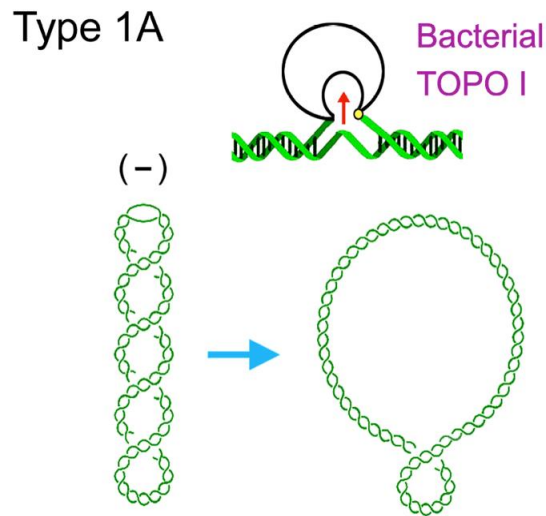


Figura 19. Mecanismo de acción de las topoisomerasas tipo IA. Permite reducir la tensión helicoidal negativa del ADN, sin llegar a una relajación completa (Lk_0) (Roca., 2011).

4.2. Topoisomerasas tipo IB

Las topoisomerasas tipo IB actúan sobre ADN de doble cadena y escinden una de las hebras, es decir, producen un "nick" transitorio. El intermediario covalente durante la escisión ocurre entre la tirosina del centro activo y el grupo 3'-fosfato de la cadena escindida. El enzima permite entonces que el otro extremo de la cadena pueda rotar alrededor de la hebra no escindida (McCoubrey & Champoux, 1986). Tras una o varias rotaciones, el enzima sella de nuevo la doble hélice del ADN. Mediante este mecanismo las topoisomerasas tipo IB relajan completamente las moléculas de ADN con tensión helicoidal positiva y negativa (Figura I10). Producen así distribuciones de Lk virtualmente centradas en Lk_0 (Champoux *et al.*, 1990). La enzima tipo IB más representativa de este grupo es la topoisomerasa I presente en todas las células eucariotas. Su peso molecular varía entre 95 y 135 kDa según el organismo (Eng *et al.*, 1989; Lynn *et al.* 1989). Otro enzima bien caracterizado de este grupo es la topoisomerasa I de los *Pox* virus (*Vaccinia virus*) (Shuman & Moss, 1987), que comprende solamente el dominio mínimo necesario para la actividad relajadora (32 kDa).

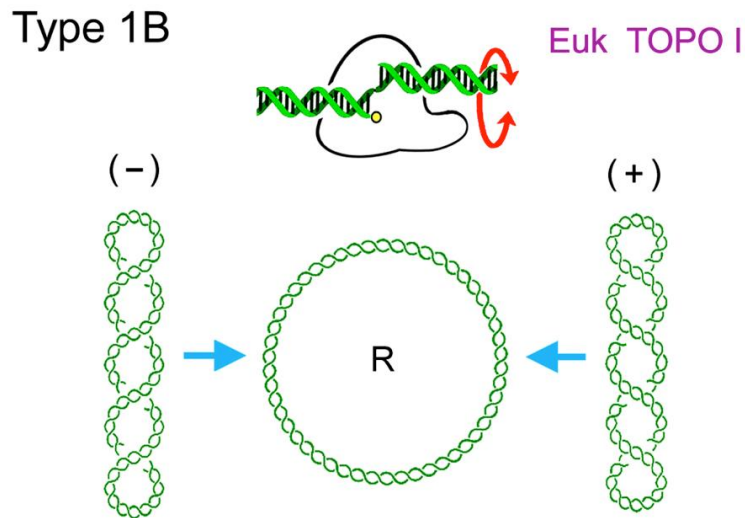


Figura I10. Mecanismo de acción de las topoisomerasas tipo IB. Permite relajar completamente la tensión helicoidal positiva y negativa del ADN generando distribuciones térmicas de Lk centradas en Lk_0 (Roca., 2011).

4.3. Topoisomerasas tipo II

A diferencia de las tipo IA y B, las topoisomerasas tipo II son homodímeros funcionales y dependen de un cofactor energético (ATP). Escinden simultáneamente las dos hebras del ADN, tal que los extremos 5'-fosfato del ADN quedan covalentemente unidos a dos tirosinas del centro activo, y transportan otra doble cadena a través del corte (Hsieh, 1990). Este mecanismo les permite invertir cualquier entrecruzamiento entre dos dobles hélices de ADN.

Diferentes estudios mecanísticos y estructurales han permitido elucidar su sofisticado mecanismo de transporte (Figura I11). Cada mitad de topoisomerasa tipo II consta de tres dominios muy conservados evolutivamente que corresponden a 3 compuertas: el dominio ATPasa o *N-gate*, el dominio de unión-escisión del ADN o *DNA-gate* y el dominio pivote o *C-gate* (Figura I11). Además, presenta un dominio C-terminal que está menos conservado (Corbet & Berger, 2004). El primer paso en el ciclo de transporte es la unión del segmento de ADN a escindir (segmento G) en el dominio *DNA-gate* quedando este segmento de doble hélice perpendicular al eje binario del

enzima. La unión de ATP en los dominios ATPasa provoca que la *N-gate* se cierre (Roca & Wang, 1992). Este cierre permite que otra doble hélice de ADN (segmento T) pueda ser capturada hacia el interior del enzima. En tal caso, el segmento T es empujado a través de la escisión que el enzima produce en el segmento G (Roca & Wang, 1992). Tras este paso, el segmento T puede salir a través de la *C-gate*, con lo que el segmento T habrá cruzado el segmento G y habrá atravesado completamente la interfaz dimérica del enzima (Roca & Wang, 1994; Roca *et al.*, 1996). Alternativamente, el segmento T puede retroceder y salir de nuevo por la *N-gate*, con lo que no se habrá producido ningún cambio topológico (Martínez-García *et al.*, 2013).

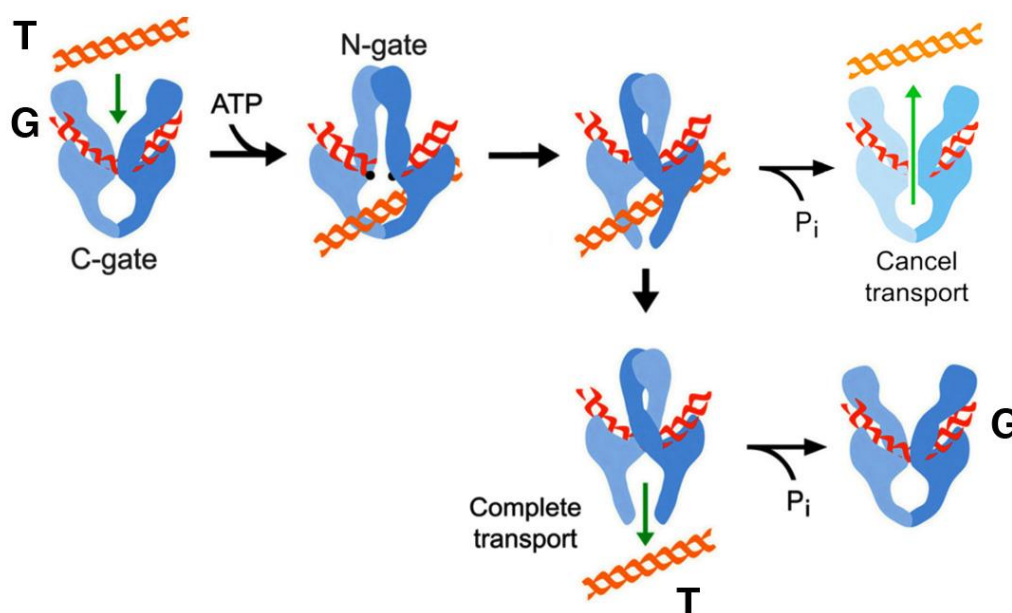


Figura I11. Mecanismo de acción de las topoisomerasas tipo II. Una vez el segmento G (rojo) se ha unido al enzima, el segmento T (naranja) es capturado y pasado a través del segmento G en un proceso ATP dependiente. Para completar el ciclo de transporte, el segmento T debe salir ahora por el lado opuesto del enzima. Alternativamente, el segmento T puede retroceder, cancelándose así el efecto del transporte (Martínez-García *et al.*, 2013).

Las topoisomerasas tipo II se subdividen en IIA y IIB, siendo las de tipo IIA las más representativas. Dentro del tipo IIA, cabe destacar la topoisomerasa II esencial en todas las células eucariotas y la topoisomerasa IV esencial en eubacterias (Kato *et al.*, 1990). Las topoisomerasas II y IV transportan segmentos T a través de segmentos G para llevar la topología del ADN a la conformaciones de equilibrio termodinámico o

incluso a conformaciones aún más simplificadas (Rybenkov *et al.*, 1997). Cuando los segmentos están en moléculas de ADN distintas, el resultado es un encadenamiento o desencadenamiento de las moléculas de ADN, según sea la concentración local de segmentos de ADN. En cambio, cuando los segmentos están en la misma molécula, el resultado puede ser un cambio de +/- 2 unidades en el valor de Lk, según se invierta un cruce negativo o positivo, respectivamente (Figura I12). Esto les permite relajar eficientemente el superenrollamiento negativo o positivo del ADN. Alternativamente, estando los dos segmentos en la misma molécula, las topoisomerasas II y IV pueden producir también un anudamiento o desanudamiento de la molécula de ADN, según sea la concentración y disposición espacial de los segmentos de ADN.

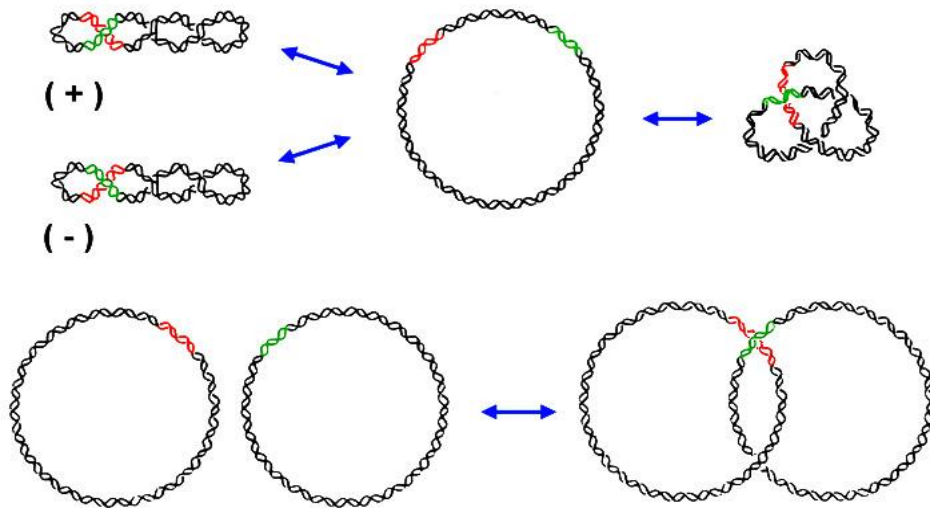


Figura I12. El transporte de un segmento de doble hélice a través de otro puede dar lugar a conversiones topológicas intramoleculares (enrollamiento y anudamiento del ADN) y conversiones intermoleculares (encadenamiento del ADN).

Un enzima especial del tipo IIA es la girasa de ADN presente en las eubacterias (Gellert *et al.*, 1976). A diferencia de las anteriores, la girasa transporta selectivamente segmentos T que forman un bucle positivo con un segmento G contiguo (Figura I13). En consecuencia, la girasa reduce el valor de Lk en 2 unidades en cada ciclo de transporte. Esta selectividad permite a la girasa generar Th (-) a partir de un ADN relajado o con Th (+), es decir, relaja superhelicidad positiva y genera superhelicidad

negativa. La girasa es por tanto ineficiente para relajar superhelicidad negativa y/o alterar el encadenamiento o anudamiento de moléculas de ADN.

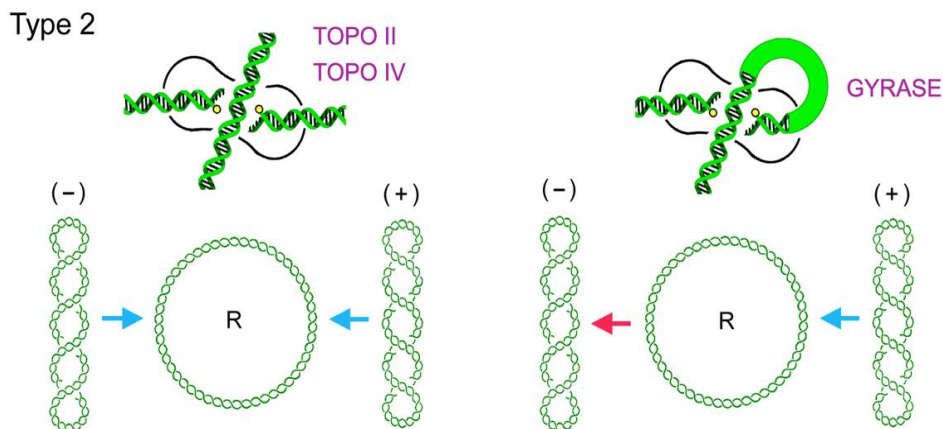


Figura 113. Las topoisomerasas II y IV invierten indistintamente cruces de ADN producidos por superenrollamiento negativo o positivo pudiendo relajar completamente el ADN. La girasa, en cambio, interacciona con bucles positivos y los invierte a negativos, es decir, relaja superenrollamiento positivo e introduce superenrollamiento negativo en la molécula de ADN (Roca, 2011).

4.4. Principales funciones de las topoisomerasas

Dada la ubicuidad de los problemas topológicos del ADN, el papel de las topoisomerasas guarda muchos paralelismos entre eucariotas y procariontes (revisado en Champoux, 2001; Wang, 2002; Roca, 2011). Durante la transcripción del ADN se genera Th(+) y Th(-) por delante y por detrás de las polimerasas de ARN, respectivamente. Esto ocurre porque la doble hélice de ADN se ve forzada a rotar durante la progresión del complejo de transcripción. De modo análogo, el avance de las horquillas de replicación genera Th(+) por delante de las polimerasas de ADN (Figura 114). Las topoisomerasas reducen la tensión helicoidal para facilitar el progreso de la maquinaria de transcripción y replicación. En eubacterias, la topoisomerasa I (tipo IA) relaja Th(-), la girasa relaja la Th(+) y la topoisomerasa IV relaja ambas. En eucariotas, tanto la topoisomerasa I (Tipo IB) como la topoisomerasa II participan relajando Th (+) y (-).

Por otro lado, durante la replicación del ADN las nuevas dobles hélices tienden a quedar entrecruzadas por detrás de las horquillas de replicación, (Figura I14) lo que causa que las cromátidas recién replicadas presenten encadenamientos entre ellas. La topoisomerasa IV en eubacterias y la topoisomerasa II en eucariotas son esenciales para eliminar estos encadenamientos y para que se lleve a cabo una segregación correcta de los cromosomas durante la división celular. Aparte de eliminar los problemas topológicos generados durante la transcripción y replicación del ADN, las topoisomerasas juegan un papel esencial en mantener unos niveles de Th concretos que regulan la actividad del genoma. En eubacterias, el inicio de la replicación y la activación de muchos genes depende de Th(-), que es modulada por la acción conjunta de la girasa, topoisomerasa I y IV. La Th(-) es también determinante para configurar la arquitectura de los cromosomas bacterianos (Hattfield & Benham, 2012; Travers & Muskhelishvili, 2005).

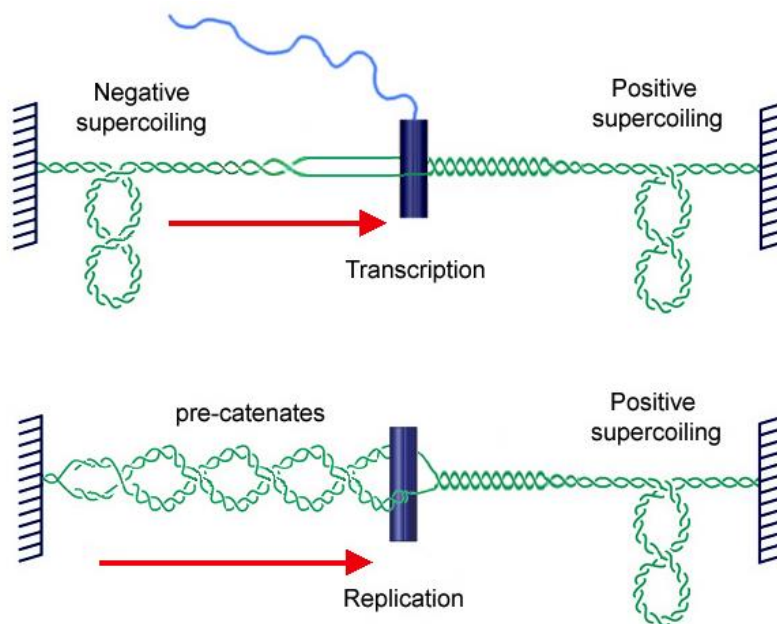


Figura I14. Problemas topológicos del ADN comunes en procariontes y eucariotas que deben solucionar las topoisomerasas. El avance de la maquinaria de transcripción genera tensión helicoidal (+) y (-) por delante y detrás de la polimerasa de ARN, respectivamente. El avance de las horquillas de replicación genera tensión helicoidal (+) por delante y ocasiona encadenamientos entre los dúplex recién replicados por detrás.

5. Cromatina

5.1. Estructura básica del nucleosoma

En los sistemas biológicos, el ADN no existe como un polímero lineal desnudo y desordenado, sino que se encuentra plegado y organizado mediante la unión a proteínas, dando lugar a estructuras complejas conocidas como fibras de cromatina. En los organismos eucariotas, la cromatina reduce la longitud del ADN varios órdenes de magnitud. Al formar esta estructura, las células organizan la disposición espacial del ADN dentro del núcleo, estableciendo regiones de mayor y menor accesibilidad que permiten regular la actividad genética.

La unidad estructural básica de la cromatina es el nucleosoma. En este complejo ADN-proteína de simetría binaria, aproximadamente 147 pb de ADN completan cerca de 1,7 vueltas en sentido levógiro sobre un octámero de histonas (Richmond *et al.*, 1984). El octámero está formado por un tetrámero central (histonas H3 + H4)₂, flanqueado por dos dímeros (histonas H2A + H2B)₁₊₁. Esta estructura, considerada habitualmente como el nucleosoma canónico, fue corroborada tras su cristalización por Luger *et al.* (1997). Los nucleosomas se forman a lo largo de las moléculas de ADN de forma periódica, separados por segmentos *linker* (30 a 90 bp), formando así una fibra similar a un collar de cuentas (Figura I15).

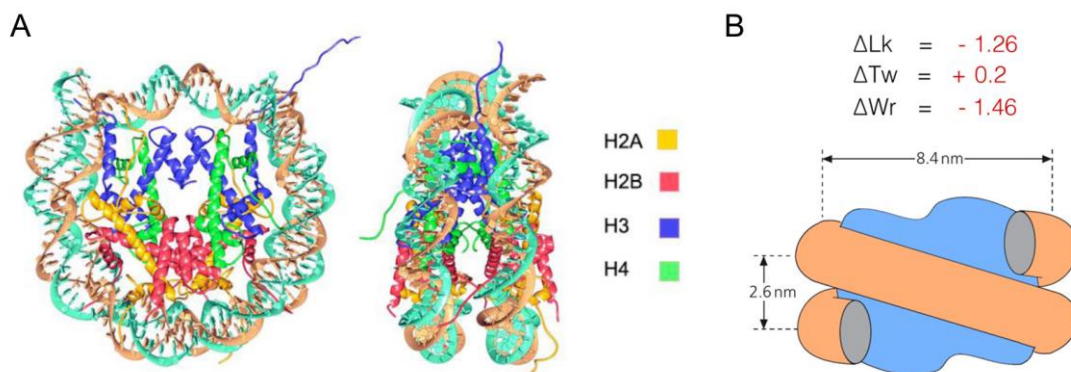


Figura I15. (A) Estructura del nucleosoma a partir de estudios cristalográficos (Luger *et al.* 1997). (B) Valores de ΔLk , ΔTw y ΔWr que definen la topología del ADN en el nucleosoma (Segura *et al.* 2018).

El enrollamiento del ADN alrededor del octámero de histonas produce marcados cambios en el valor de ΔTw y ΔWr de la doble hélice. A partir de la estructura cristalizada, y otros estudios bioquímicos, se ha calculado que cada nucleosoma deforma el ADN con +0.2 unidades de Tw y -1.45 unidades de Wr aproximadamente, lo que implica que cada nucleosoma debería estabilizar un ΔLk cercano a -1.25 (Bates & Maxwell, 2005). Sin embargo, desde los años 80 se ha estimado experimentalmente un valor ΔLk de -1 por nucleosoma. Esta discrepancia entre el valor de ΔLk teórico y el observado dio lugar a la denominada “paradoja del número de enlace” (*Linker number paradox*). Esta paradoja ha sido resuelta recientemente mediante un nuevo enfoque experimental con cromatina nativa, que ha demostrado un valor de -1.26 unidades de ΔLk estabilizadas por cada nucleosoma *in vivo* (Figura I15) (Segura *et al.* 2018).

En la cromatina se encuentra también un abundante número de proteínas no-histonas. Son proteínas que regulan la forma y composición de la fibra, como son los ensambladores y modificadores de histonas, factores reguladores de la transcripción y proteínas SMC (como cohesinas, condensinas o el complejo SMC5/6). La topoisomerasa II es también abundante, lo que ha hecho pensar en un posible papel estructural de esta proteína, anclando el ADN a estructuras nucleares durante la interfase (Saiatoh & Laemmli, 1993) y estabilizando la condensación los cromosomas durante la metafase (Bojanowski *et al.*, 1998).

5.2. Organización superior de la fibra de nucleosomas

La reconstrucción de fibras de nucleosomas con ADN y proteínas histonas *in vitro* en condiciones de baja salinidad produce la mencionada estructura del “collar de cuentas” o “*beads-on-a-string*”, también conocida como fibra de 10 nm. Los modelos más clásicos proponen que esta fibra de nucleosomas se pliega formando una estructura de orden superior de 30 nm. Experimentos basados en microscopía electrónica y cristalografía de rayos-X de fibras de cromatina reconstruidas *in vitro* han sugerido dos modelos de plegamiento para formar esa fibra de 30 nm: el modelo solenoidal y el modelo zig-zag (Figura I16). El modelo solenoidal tiene un diámetro de 33 nm con 6 nucleosomas cada 11 nm a lo largo del eje de la fibra (Robinson *et al.*, 2006). El modelo de zig-zag tiene un diámetro aproximado de 28 nm con 5 ó 6 nucleosomas cada 11 nm del eje de la fibra (Song *et al.*, 2014). A su vez, los modelos clásicos

proponen que esta fibra de 30 nm se pliega de nuevo en superestructuras helicoidales mayores hasta formar los cromosomas mitóticos (Belmont *et al.*, 1989 & 1994).

Sin embargo, las fibras de cromatina de 30 nm y superiores nunca han sido observadas *in vivo*. Técnicas microscópicas combinadas con técnicas de tinción, como FISH, proporcionan imágenes de dominios irregulares de cromatina en células individuales (Wiggins *et al.*, 2010), con diferentes dinámicas (Bronstein *et al.*, 2009), y co-localización variable con otros elementos nucleares. Más recientemente, la nanoscopía de alta resolución está permitiendo visualizar las fibras de cromatina *in vivo*. La cromatina parece una cadena desordenada de gránulos de 5 a 24 nm que se agrega formando dominios complejos de diferente tamaño y densidad (Ou *et al.*, 2017).

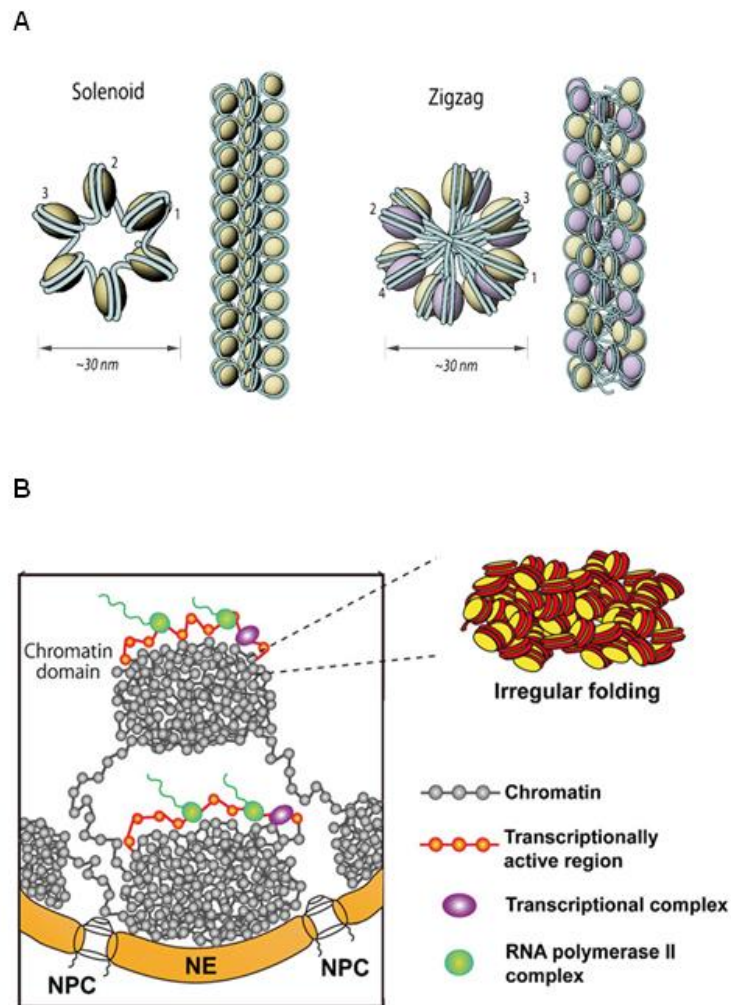


Figura I16. (A) Modelos clásicos de plegamiento de la fibra de nucleosomas, son modelos más regulares que proponen la estructura de la fibra de 30 nm. (B) Modelos actuales de plegamiento de la fibra de nucleosomas, modelos basados en experimentos *in vivo* que proponen un plegamiento irregular.

5.3. Organización tridimensional de la cromatina en el núcleo

La organización espacial de las fibras de cromatina, es decir, su disposición tridimensional dentro del núcleo celular, forma una compleja jerarquía de relaciones funcionales y dinámicas que cambian dependiendo del tipo celular y del momento del ciclo (Bonev B & Cavalli G, 2016). Sin embargo, a pesar de los avances metodológicos

en las últimas dos décadas, tenemos aún una comprensión limitada de los mecanismos moleculares que determinan la organización espacial de los genomas y su función.

El posicionamiento de los nucleosomas a escala genómica se puede conocer en detalle gracias al desarrollo de chips de ADN y de técnicas de secuenciación masiva (Pugh & Jiang, 2009). Por otro lado, se han desarrollado técnicas de captura de conformación de la cromatina (3C, 4C, Hi-C), que miden cuantitativamente las frecuencias de contactos espaciales entre distintos sitios (*loci*) genómicos (Dekker *et al.*, 2002; Simonis *et al.*, 2006; Lieberman-Aiden *et al.*, 2009) y permiten generar modelos de organización espacial de la cromatina. Utilizando *Hi-C*, la variante con más resolución, se han observado regiones cromosómicas de tamaño de 0,1 a 1 megabase (Mb), en las cuales las interacciones locales de la cromatina son más frecuentes que en la media. Estas regiones se bautizaron con el nombre de *topological associated domains* (TADs) (Dixon *et al.* 2012). Los TADs se observan en diferentes especies, y varían dependiendo del tipo y del momento del ciclo celular. A nivel funcional, los TADs han sido propuestos como una unidad básica en la macro-organización del genoma y juegan un papel fundamental en la coordinación y regulación de la expresión génica (Jin *et al.* 2013).

El avance y mejora de las técnicas de captura de conformación de la cromatina han permitido postular la presencia de asas de cromatina (*loops domains*) de una longitud media de 185 kilobases (kb) en diferentes especies y tipos celulares. Estos *loops* tienen una marcas epigenéticas características y en sus puntos de anclaje se han identificado proteínas características (proteínas CTCF, cohesinas, topoisomerasas II,...) (Rao *et al.* 2014). Estos *loops* parecen regular la distancia entre promotores y sus regiones reguladores distantes (*enhancers*), jugando, por tanto, un papel fundamental en la regulación de la expresión génica. Recientes experimentos con Hi-C y microscopía de células individuales (*single-cell*) han mostrado que tanto los TADs como los *loop domains* son estructuras muy dinámicas (Hansen *et al.* 2018). Para explicar la formación y dinámica de los *loops* se ha postulado el llamado modelo de “*loop extrusion*”. En este modelo, los complejos SMC son reclutados a una región con una proteína CTCF y comienzan a extrudir un *loop* de ADN hasta encontrar otra molécula CTCF con orientación convergente a la primera, formado así un *loop domain*. En estas regiones también está presente la topoisomerasa II, pero aún no se sabe qué papel juega en este escenario (Hansen *et al.* 2018; Sanborn *et al.*, 2015) (Figura I17).

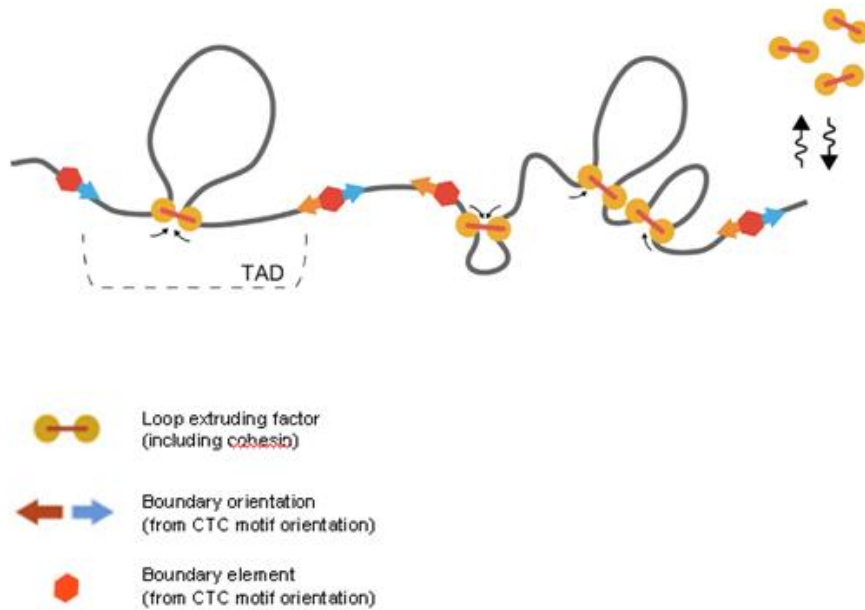


Figura I17. Formación de *loops* en el genoma mediante el modelo de *loop extrusion* (Fudenberg *et al.*, 2016).

A pesar de los avances en el estudio de la arquitectura y organización de la cromatina en el rango de 0,1 – 1 Mb, los mecanismos moleculares que juegan un papel más decisivo en la regulación genómica tienen lugar en la escala de <20 kb de ADN. Desafortunadamente, todavía no hay técnicas que permitan visualizar las interacciones espaciales y la trayectoria del ADN dentro de la cromatina con una resolución de pocas kilobases. Sin embargo, en esa pequeña escala, muchos aspectos de la arquitectura y dinámica de la cromatina *in vivo* pueden deducirse a partir del análisis de la topología del ADN. Un ejemplo son los cambios de estructura de la cromatina producidos por el superenrollamiento del ADN y su relajación mediante topoisomerasas durante la transcripción.

6. Interrelación entre cromatina, topología del ADN y topoisomerasas

En las células eucariotas, el estado topológico del ADN resulta de la interrelación entre la estructura de la cromatina, sus actividades motoras y la actividad de las

topoisomerasas (Roca J., 2011). Por ejemplo, aunque ambas topoisomerasas I y II pueden relajar indistintamente ADN con Th(-) y Th(+), se ha observado una especialización de estas enzimas cuando el ADN está organizado en fibras de cromatina (Figura I18). Mientras la topoisomerasa I es más eficiente relajando ADN desnudo, donde la rotación axial del dúplex puede ser rápida, la topoisomerasa II es eficiente relajando fibras de nucleosomas. Ello indica que las fibras de nucleosomas dificultan la rotación axial del ADN pero facilitan, en cambio, la yuxtaposición de segmentos de ADN para la actividad de la topoisomerasa II (Roca & Wang, 1996; Salceda *et al.*, 2006).

Otra especialización de estas enzimas, parte de que la topoisomerasas I y II no presentan ninguna preferencia para relajar Th(-) y Th(+) cuando el ADN está desnudo (Roca & Wang, 1996; Salceda *et al.*, 2006). Sin embargo, en fibras de cromatina, la topoisomerasa II es más eficiente relajando Th(+) que Th(-). Esta preferencia indica que las fibras de cromatina se deforman de manera diferente según acomodan Th(+) o (-). Experimentos *in vitro* mediante pinzas magnéticas han demostrado que la Th(+) acorta rápidamente la fibra de cromatina e invierte la quiralidad de las vueltas del ADN en el nucleosoma, pasando de levógiras a dextrógiras (Bancaud *et al.* 2006). Ambos tipos de deformaciones implican un incremento en el W_r del ADN con la formación de nuevos cruces (+), que son sustratos ideales para la actividad de la topoisomerasa II. En cambio, la Th(-) en el ADN cromatinizado no produce un efecto comparable de acortamiento de la fibra (Bancaud *et al.*, 2006). La fibra de cromatina acomoda la Th(-) estabilizando el enrollamiento levógiro del ADN alrededor de los nucleosomas y, en vez de reducir su valor de W_r , reduce principalmente el valor de T_w en las regiones de ADN internucleosomal (*DNA linker*). Por tanto, con Th(-) no se forman tantos entrecruzamientos de ADN necesarios para la actividad de la topoisomerasa II. El modelo de la Figura I18 ilustra las conformaciones que adoptaría la cromatina bajo Th(-) y (+) durante la transcripción del ADN y su efecto en la actividad de las topoisomerasas I y II.

La distinta capacidad de las topoisomerasas I y II para relajar cromatina, y su distinta eficiencia para relajar la tensión helicoidal (+) o (-), explica porque la Th(+) se relaja más rápidamente que la Th(-) en la cromatina (Fernández *et al.*, 2014). Puesto que durante la transcripción del ADN, se generan simultáneamente y de manera simétrica Th(+) y Th(-), su relajación asimétrica puede ser muy relevante. Se ha propuesto que, dado que las células eucarióticas no tienen una girasa para generar directamente Th(-), una relajación asimétrica de Th(+) y Th(-) durante la transcripción permite mantener

la Th(-) durante más tiempo y favorecer así la apertura de la doble hélice del ADN en regiones específicas de los genomas eucariotas (Fernández *et al.*, 2014).

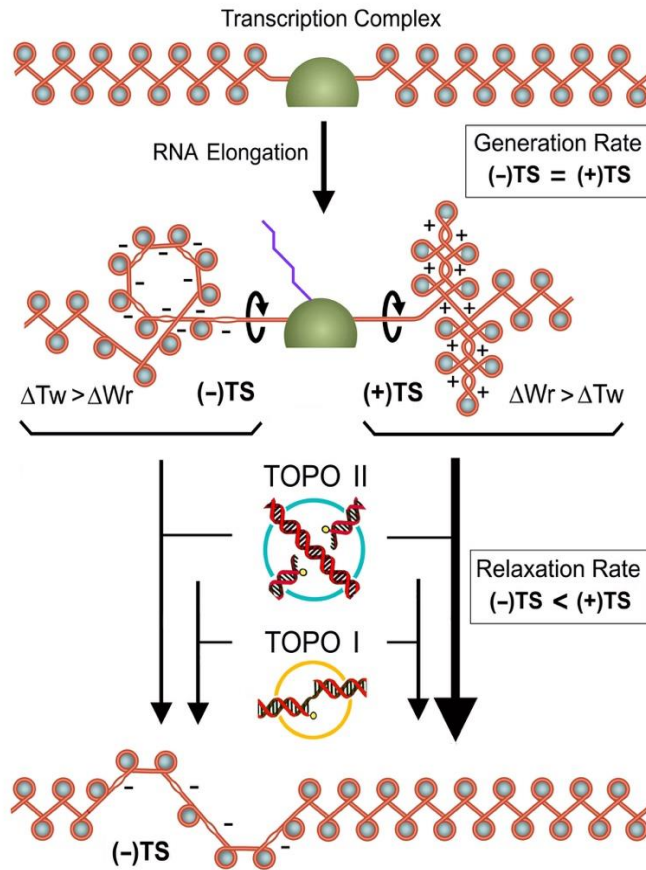


Figura I18. La tensión helicoidal (+) y (-) del ADN produce conformaciones distintas de la cromatina eucariota, que a su vez condicionan la eficiencia relajadora de las topoisomerasas. Durante la transcripción del ADN, Th(+) y Th(-) se generan a la misma velocidad, sin embargo, las topoisomerasas relajan más rápidamente la Th(+) que la (-). Como resultado, Th(-) persiste en determinadas regiones sin necesidad de una actividad girasa (Fernández *et al.*, 2014).

7. Anudamiento del ADN

El campo de la topología del ADN *in vivo* se ha centrado principalmente en el estudio de la tensión helicoidal y superenrollamiento del ADN y sus efectos en la expresión génica y la arquitectura de los cromosomas. También se ha estudiado en detalle cómo

se eliminan los encadenamientos entre las moléculas hermanas de ADN tras el proceso de replicación y sus efectos en la segregación y estabilidad de los cromosomas. Sin embargo, un aspecto de la topología del ADN mucho menos estudiado es su capacidad de anudamiento.

7.1. ¿Qué es un nudo?

Generalmente se sabe lo que es un nudo, al menos de forma intuitiva. Sin embargo, desde un punto de vista matemático, una definición sencilla, aunque no estrictamente formal, sería: un nudo es una curva cerrada sin intersecciones irreducibles dentro de un espacio tridimensional. Por intersecciones irreducibles se indica que no pueden eliminarse a base de deformar la curva (estirar, encoger, doblar, retorcer). Sólo pueden modificarse cortando y pegando segmentos de la curva, tal que ésta pueda pasar de una forma de anudamiento a otra.

Bajo esta definición de nudo, el primer caso posible es la ausencia de nudo, que corresponde con una curva cerrada o anillo que carece de intersecciones irreducibles. Este caso (ausencia de nudo) se llama nudo trivial (0_1). A partir de aquí, el primer nudo real posible aparece cuando hay 3 intersecciones irreducibles, ya que es imposible formar un anillo anudado con solo 1 o 2 intersecciones. Al nudo simple de 3 intersecciones (denominado 3_1 o trébol) le siguen el nudo de 4 cruces (4_1), dos posibles formas de nudo con 5 cruces (5_1 , 5_2), tres posibles formas con 6 cruces, y siete posibles formas con 7 cruces... (Figura I19). Esta progresión aumenta de modo exponencial, llegándose a miles de formas de nudos distintos cuando se consideran anillos con más de 10 intersecciones irreducibles. El número de intersecciones o cruces irreducibles se traduce en el concepto de "complejidad de un nudo".

Introducción

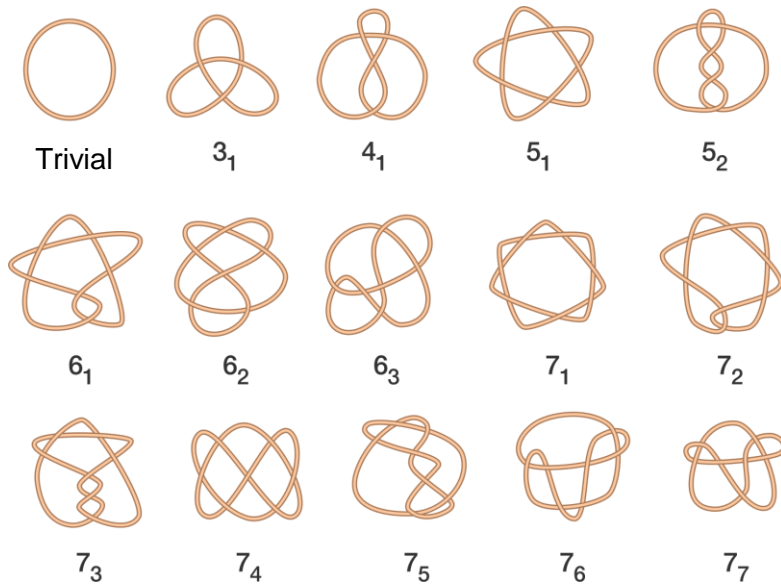


Figura I19. Representación de nudos de complejidad creciente, desde 0 hasta 7 cruces irreducibles.

Se dice que un nudo es "primo" cuando no puede descomponerse como la suma de dos nudos más simples (no triviales). Se dice que un nudo es "compuesto" si se puede describir como la suma de dos o más nudos primos (Figura I20).

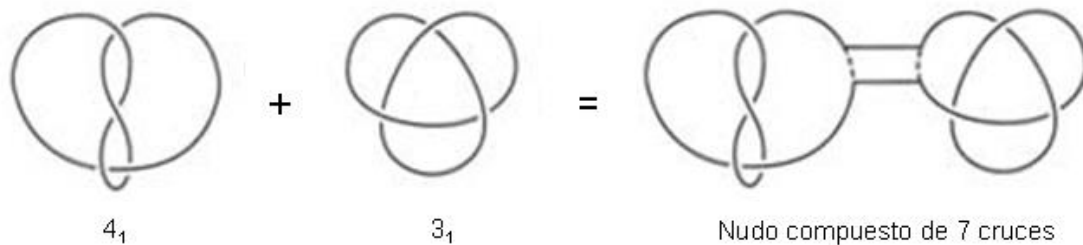


Figura I20. Composición de nudos primos 4_1 y 3_1 para formar un nudo compuesto de 7 cruces.

Otro concepto importante es el de quiralidad, lo que guarda relación con el signo topológico (+) o (-) de las intersecciones del nudo. Por ejemplo, el nudo trébol es quiral y por tanto podemos diferenciar entre la forma $3_1(+)$ y $3_1(-)$, es decir, una forma con tres entrecruzamientos (+) y otra con tres (-), que equivale a su imagen especular. Sin

embargo el nudo de cuatro cruces 4_1 es aquiral, ya que este nudo y su imagen especular siempre tienen dos entrecruzamientos (+) y dos (-).

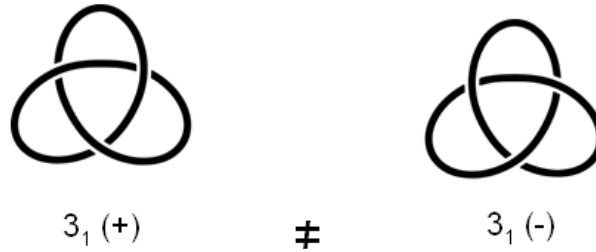


Figura I21. Quiralidad del nudo 3_1 . Una forma tiene 3 entrecruzamientos (+) y la otra 3 (-), que es su imagen especular.

En relación al signo (+) o (-) y geometría de los entrecruzamientos de un nudo, se puede determinar también el valor Wr de cada forma anudada. El nudo trivial tiene $Wr=0$, ya que todo su contorno puede acomodarse sobre una superficie (plana o curva). El nudo aquiral de cuatro cruces 4_1 también tiene $Wr=0$, ya que el Wr de los dos entrecruzamientos (+) se compensa con el de los dos (-). Los demás nudos tienen valores Wr específicos, no necesariamente proporcionales a la complejidad del nudo (Tabla I1).

Nudo	Wr medio
3_1	3.47
4_1	0
5_1	6.31
5_2	4.59
6_1	1.18
6_2	2.89
6_3	0
7_1	9.13
7_5	7.48
7_7	0.54
8_1	2.37
8_{15}	8.02

Tabla I1: Valores de W_r de diferentes nudos (Braser *et al.*, 2013)

Un último concepto útil es el número de desanudamiento (*unknotting number*), que indica el mínimo número de inversiones de cruces que hay que hacer para convertir un nudo en el nudo trivial (ausencia de nudo). Por ejemplo, los nudos del tipo *twist* (como el 5_2 y 7_2), que consisten en una región retorcida en forma plectonémica que se cierra enlazando sus dos extremos, tienen número de desanudamiento igual a uno, ya que se deshacen al invertir el cruce de sus extremos (Figura I22). Ocurre lo mismo con los nudos 3_1 y 4_1 . En cambio, los nudos de tipo toroidal (como el 5_1 y 7_1) tienen los números de desanudamiento más elevados (Figura I22).

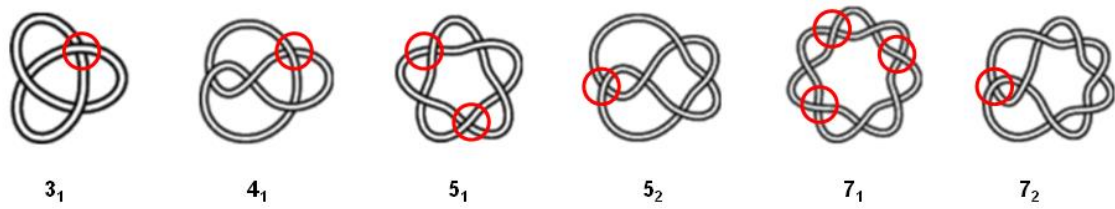


Figura 122. *Unknotting number.* Al invertir los cruces indicados (círculo rojo) se deshace totalmente el nudo.

Después de comprender lo que es un nudo desde el punto de vista topológico resulta fácil ver su relación con el ADN debido a la similitud entre un círculo que se entrecruza en el espacio y una molécula circular o dominio cerrado de ADN, donde pueden formarse o invertirse cruces de ADN mediante la acción de topoisomerasas y otros mecanismos.

7.2. Nudos de ADN

Los nudos de ADN pueden formarse en moléculas de hebra simple y de doble hebra. Nos centraremos aquí en los nudos de doble hebra, ya que es la forma más común de la molécula del ADN y de más interés en el desarrollo de esta tesis. Estos nudos pueden formarse mediante tres mecanismos: durante la circularización de una molécula lineal de ADN, mediante la acción de las topoisomerasas tipo-2 sobre dominios cerrados de ADN, y mediante procesos de recombinación intramolecular.

La circularización de moléculas lineales de ADN *in vitro* puede llevar a la formación de nudos de ADN (Shawn & Wang, 1993; Rybenkov *et al.*, 1993). La probabilidad de anudamiento al cerrar un círculo de ADN en disolución libre refleja el equilibrio de conformaciones termodinámicas de la molécula de ADN. La probabilidad de anudamiento en estas condiciones depende principalmente de la longitud de la molécula (a mayor longitud mayor probabilidad de anudamiento). También depende de las condiciones del medio, especialmente de la concentración de iones (monovalentes

o divalentes) y policationes (por ejemplo espermina o espermidina) que afectan la flexibilidad del ADN facilitando o no el acercamiento de segmentos de ADN. El análisis de los nudos producidos mediante circularización *in vitro* junto con simulaciones computacionales de anudamiento de polímeros (Kamenetskii *et al.*, 1975) han permitido calcular así parámetros biofísicos del ADN en disolución. Por ejemplo, de este modo se ha calculado que el diámetro efectivo de la doble hélice del ADN es de 5 nm (Shaw y Wang, 1993; Rybenkov *et al.*, 1993).

Un caso especial de anudamiento por circularización del ADN se da en los virus que contienen moléculas lineales de ADN con extremos cohesivos. Por ejemplo, el genoma del bacteriófago P4 consiste en una molécula de ADN lineal de 10 – 11,5 kb, con extremos cohesivos de 16 pb. Tras la extracción del ADN de la cápside de estos virus se observan moléculas de ADN altamente anudadas (Liu & Davis, 1981). La caracterización de estos nudos, junto con simulaciones de formación de nudos de polímeros en volúmenes restringidos, indicó que estos nudos se forman durante una circularización accidental del ADN dentro de la cápside del fago (Arsuaga *et al.*, 2002). El análisis de estos nudos permitió demostrar que el ADN viral no se encuentra empaquetado al azar dentro de la cápside, sino que sigue una trayectoria ordenada altamente quiral (Arsuaga *et al.*, 2005).

Mediante su mecanismo de inversión de entrecruzamientos de ADN, las topoisomerasas de tipo-2, (topoisomerasas II y IV) son capaces de formar o deshacer nudos en dominios cerrados de ADN (Liu *et al.*, 1980). Estudios *in vitro* han mostrado que estos nudos son abundantes y complejos cuando la probabilidad de yuxtaposición de segmentos intra-moleculares de ADN es elevada. Esto ocurre cuando el ADN está superenrollado y/o hay proteínas unidas u otros agentes que condensan la molécula (Hsieh, 1983; Wassermann & Cozzarelli, 1991; Roca *et al.*, 1993). Por otro lado, cuando las moléculas de ADN anudadas se descondensan y se incuban de nuevo con topoisomerasas II o IV, estas enzimas reducen entonces la fracción de moléculas anudadas, incluso hasta valores inferiores a los del equilibrio termodinámico (Rybenkov *et al.*, 1997).

Finalmente, el ADN puede anudarse también durante procesos de recombinación intramolecular. El análisis de los nudos producidos por distintas recombinasas, ha permitido descubrir la orientación de los segmentos de ADN en el momento de la reacción (Wasserman & Cozzarelli, 1985). Por otro lado, analizando los nudos producidos por recombinasas expresadas *in vivo* se pudo demostrar de que el

superenrollamiento negativo del ADN en bacterias forma plectonemas en lugar de solenoides (Spengler *et al.* 1985).

Los anteriores mecanismos de formación de nudos de ADN pueden operar *in vivo*. Sin embargo, el estudio de nudos *in vivo* está muy poco desarrollado. En bacterias, se han encontrado nudos en plásmidos, especialmente cuando la actividad de las topoisomerasas está alterada (Shishido *et al.*, 1987; Ishii *et al.*, 1991). También se ha observado la formación de nudos de ADN en las burbujas de replicación de plásmidos bacterianos cuando se bloquea la horquilla de replicación (Sogo *et al.*, 1999; Olavarrieta *et al.* 2002). Se sabe que estos nudos están producidos y son eventualmente eliminados por la topoisomerasa IV, pero no se conoce su significado ni qué provoca su formación. En el caso de células eucariotas, la existencia de nudos de ADN nunca ha sido documentada. Experimentos *in vitro* han mostrado que los nudos de ADN pueden interferir con el ensamblaje de nucleosomas y la transcripción del ADN (Rodríguez-Campos, 1996; Portugal & Rodríguez-Campos, 1996). Por lo tanto, se asume en general que el ADN eucariótico debe estar esencialmente libre de nudos.

7.3. Métodos para la caracterización del anudamiento de ADN

La detección y caracterización de nudos de ADN no es algo experimentalmente sencillo debido a la gran variedad de topoisómeros posibles que se pueden formar. Hay dos métodos para analizar nudos de ADN: la electroforesis en geles de agarosa y la microscopía electrónica. En ambos casos es necesario cortar una hebra de la doble hélice del ADN (hacer un *nick*), con el fin de eliminar toda la tensión helicoidal de la molécula. Así se evita confundir los topoisómeros de ADN anudados con los superenrollados.

El primer parámetro en el estudio de nudos de ADN es saber qué fracción de una muestra de ADN está anudada, es decir, conocer la probabilidad de anudamiento (K_P). La electroforesis del ADN en un gel de agarosa es el método más sencillo y eficaz para separar las moléculas anudadas y desanudadas, lo que permite calcular K_P . Esto es posible ya que la velocidad de una molécula circular de ADN en un gel depende de su compactación y todo nudo, hasta el más sencillo (el 3_1), es más compacto que la forma desanudada. Así, todas las formas anudadas adquieren una velocidad mayor que la forma desanudada (nudo trivial). Además, cuanto más complejo es el nudo, mayor es la compactación de la molécula de ADN. Existe entonces una correlación

entre la distancia de migración electroforética y el número de cruces irreducibles de los nudos de ADN. De un modo más exacto, la velocidad de un nudo en un gel guarda relación lineal con su número promedio de cruces (*Average Crossing Number* o *ACN*) (Stasiak *et al.*, 1998) (Figura I22). El *ACN* es el promedio de cruces visibles al proyectar en todas las direcciones posibles la trayectoria de un polímero (por ejemplo, ADN). El *ACN* es parecido, pero no equivalente, al número de cruces irreducibles de cada nudo. La electroforesis consigue, de este modo, separar los nudos en base a su número de cruces irreducibles, pero también los nudos que, con el mismo número de cruces irreducibles, difieren ligeramente en el *ACN*. Por ejemplo, debido a pequeñas diferencias en la geometría de sus cruces, el nudo 5_1 (*torus*) y el 5_2 (*twist*) tienen valores *ACN* distintos, y pueden por tanto llegar a separarse en una electroforesis suficientemente larga. Lo mismo ocurre con el nudo 7_1 (*torus*) y el 7_2 (*twist*) (Figura I23).

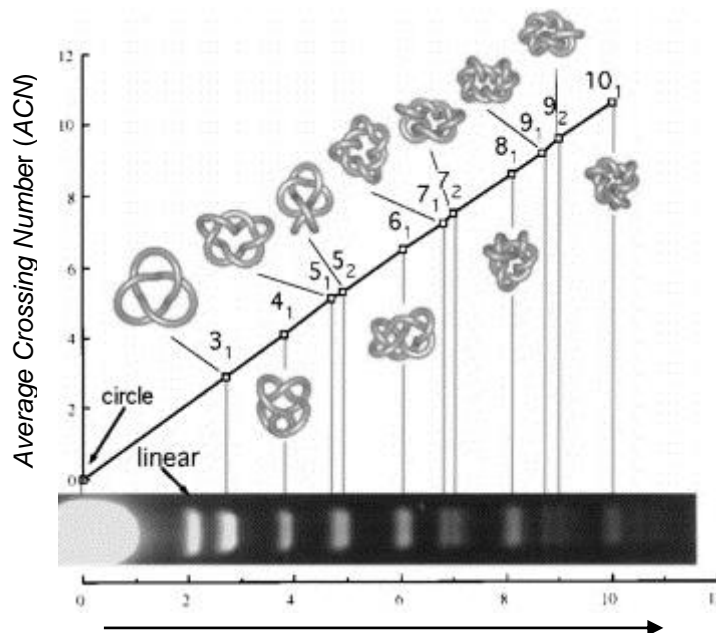


Figura I23. Electroforesis de nudos de ADN (círculos con *nicks*) en un gel de agarosa. La gráfica muestra la relación lineal entre el *Average Crossing Number* (*ACN*) y la movilidad electroforética (Vologodskii *et al.*, 1998).

Como ya se comentó antes, uno de los estudios más extensos de nudos de ADN se llevó a cabo en bacteriófagos (Arsuaga *et al.*, 2002; 2005). Para realizar estos trabajos se desarrolló un método de electroforesis bidimensional de alta resolución (Trigueros *et al.* 2001). En la primera dimensión, a bajo voltaje, se separan los nudos respecto a

su ACN. En la segunda dimensión, a alto voltaje, se separan poblaciones de nudos primos y compuestos con el mismo número de cruces, y se evita su solapamiento de los nudos con los fragmentos lineales de ADN (Figura I24).

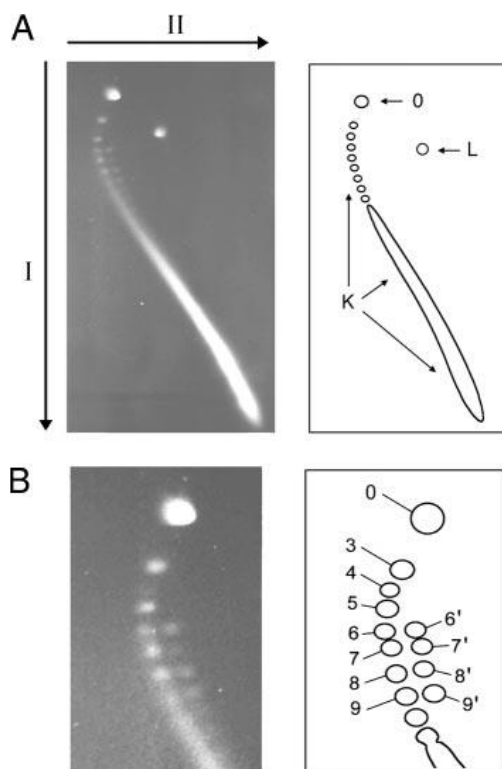


Figura I24. Análisis de nudos de ADN mediante electroforesis bidimensional de alta resolución. (A) El ADN (círculos con *nicks*) fue extraído de bacteriófagos P4. I: Primera dimensión a voltaje bajo (de arriba a abajo). II: Segunda dimensión a voltaje alto (de izquierda a derecha). 0: nudo trivial, L: moléculas de ADN lineales, K: poblaciones de ADN anudado. (B) Área ampliada del gel con población de nudos. En el arco principal las poblaciones de nudos primos que tienen de tres a nueve cruces están indicadas (3 – 9). Se puede ver un segundo arco, resuelto en la segunda dimensión, en el que aparecen subpoblaciones de nudos compuestos de seis a nueve cruces y se indican (6' – 9').

Aparte de la probabilidad y complejidad de un nudo, una característica importante, por la información que puede aportar, es su quiralidad. Es decir, cómo distinguir un nudo de su imagen especular (Figura I21). Dado que las dos imágenes especulares de cualquier nudo producen una compactación idéntica y un mismo ACN, es imposible discernir la quiralidad de un nudo mediante la electroforesis de moléculas circulares relajadas (con *nick*). La quiralidad de un nudo se tiene que descubrir mediante la

visualización del signo topológico de sus cruces irreducibles con microscopía electrónica (Lynn y Crisona, 1999). Este procedimiento es complejo. Primero, se requiere purificar las moléculas de ADN anudadas y recubrirlas después con proteína *Rec-A* antes de examinarlas con el microscopio. Esto permite distinguir en cada cruce qué segmento de ADN pasa por encima y cuál por debajo (Figura I25). Tras procesar una gran cantidad de imágenes de nudos individuales, se puede hacer un análisis semicuantitativo de su quiralidad. Sin embargo, en la mayoría de muestras biológicas, las moléculas anudadas representan una pequeña fracción del total de ADN y no pueden purificarse. Por tanto, se puede examinar la probabilidad y la complejidad de los nudos mediante electroforesis, pero difícilmente su quiralidad.

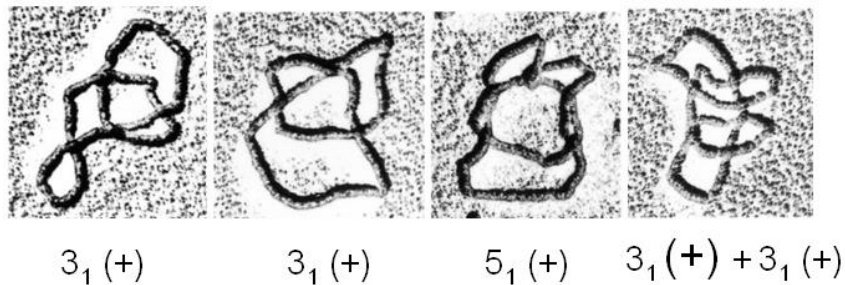


Figura I25. Imágenes de microscopía electrónica de moléculas anudadas de ADN, una vez purificadas y recubiertas de proteína *Rec-A* (Kimura *et al.*, 1999).

8. Hipótesis de partida

Actualmente, existe la suposición general de que el ADN en células eucariotas se encuentra libre de nudos. Sin embargo, la existencia de nudos de ADN en eucariotas nunca ha sido testada experimentalmente. En este sentido, la hipótesis de partida de esta tesis es que, dada la condensación de ADN en las fibras de cromatina y la abundante actividad de la topoisomerasa II en el núcleo celular, la presencia de nudos de ADN en la cromatina es muy probable.

Para testar esta hipótesis, utilizaremos el sistema modelo de nuestro laboratorio, que son minicromosomas circulares de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En estudios previos hemos utilizado estos minicromosomas con diferentes elementos estructurales y funcionales para estudiar cómo el superenrollamiento del ADN generado durante la transcripción afecta a la conformación de la cromatina *in vivo* (Salceda *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2014). Utilizando este mismo sistema, llevaremos a cabo el primer estudio de anudamiento del ADN intracelular.

La caracterización de estos nudos puede proporcionar nuevos conocimientos sobre las propiedades biofísicas de la cromatina *in vivo*, sobre su conformación y distintos grados de condensación, y sobre la trayectoria espacial del ADN en escalas de pocas kilobases.

Objetivos

Objetivos

1. Comprobar la existencia de nudos de ADN en minichromosomas circulares de *S. Cereviseae*, calcular su probabilidad y analizar el patrón de anudamiento.
2. Determinar cómo cambia la probabilidad de anudamiento en función de la longitud del ADN, elementos de la cromatina, y los procesos de transcripción y replicación del ADN.
3. Determinar cómo afecta el superenrollamiento del ADN intracelular a la probabilidad de anudamiento.
4. Desarrollar un método que permita determinar la quiralidad de nudos de ADN sin necesidad de purificarlos.
5. Analizar la quiralidad de los nudos de ADN formados *in vivo* en *E. coli* y *S. cerevisiae*.

Material y métodos

1. Materiales

1.1. Anillos de ADN y Plásmidos

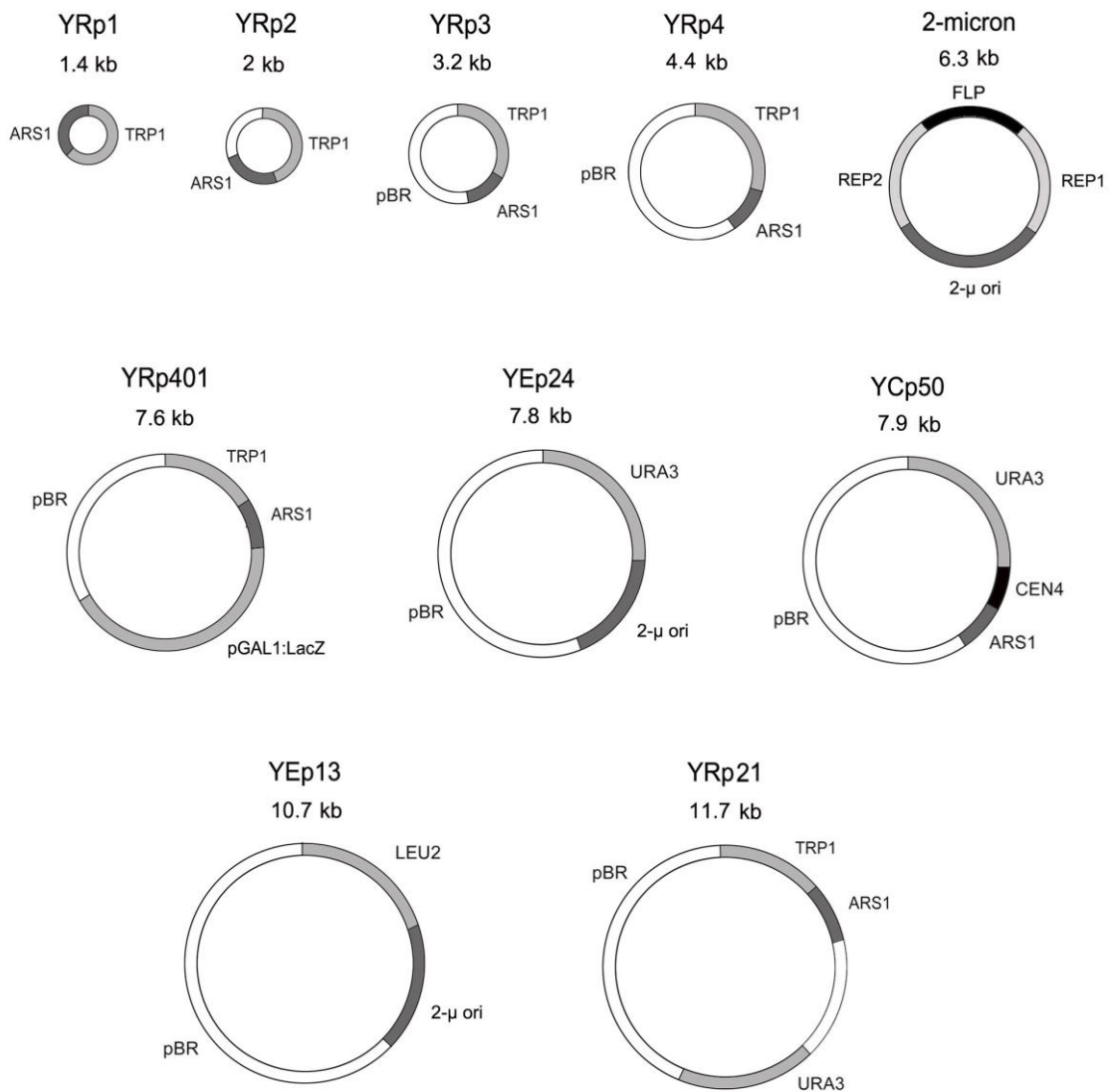


Figura M1. Tamaño y configuración genética de los micromosomas de levadura analizados en esta tesis. YRp3, YRp4, YRp401, YEp24, YCp50, YEp13 y YRp21 fueron amplificados como plásmidos bacterianos en *E. coli*. YRp1 y YRp2, que no llevan secuencias bacterianas, fueron construidos por circularización de fragmentos lineales de ADN generados por amplificación PCR (Díaz-Ingelmo *et al.*, 2015) Los micromosomas fueron transfectados a células de *S. cerevisiae* por electroporación. El plásmido de 2-micras era endógeno de las cepas de levadura usadas.

1.2. Cepas bacterianas

DH5 α (*fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*) fue la cepa bacteriana usada para la transformación y la obtención analítica o preparativa de plásmidos. Las bacterias se cultivaron en medio LB (sin o con ampicilina) en base sólida (placas de agar) o base líquida preparadas según protocolos estándar (Sambrook *et al.*, 1989).

1.3. Cepas de levadura

Las cepas JCW25, JCW26, JCW27 y JCW28 derivan de la cepa FY251 (*MATa his3-D200 leu2-D1 trp1-D63 ura3-52*) y se diferencian por sus mutaciones en los genes *TOP1* y/o *TOP2*. JCW25 (*TOP1 TOP2*) es FY251. JCW26 (*TOP1 top2-4*) lleva una mutación termosensible (Prolina821 a Glicina) en el gen *TOP2* (Thomas *et al.*, 1991). Esta mutación inactiva la actividad topoisomerasa II cuando las células se incuban a más de 30 °C. JCW26 fue construida mediante reemplazo génico (Rothstein, 1983). JCW27 (Δ *top1 TOP2*) y JCW28 (Δ *top1 top2-4*) se construyeron a partir de JCW25 y JCW26, respectivamente, mediante un sistema "hit-and-run" que eliminó la secuencia genómica del gen *TOP1* (Roca *et al.*, 1992).

2. Técnicas generales de biología molecular

2.1. Transformación de *E. coli* mediante electroporación

El ADN (plásmido con gen de resistencia a ampicilina) se microdializó frente a agua mediante filtros de nitrocelulosa (MILLIPORE® VSWP01300) durante 20 min. El ADN se añadió en frío a 50 μ l de bacterias competentes DH5 α , preparadas según protocolos estándar (Sambrook *et al.*, 1989). La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 0.2 cm y se sometió a choque eléctrico en un electroporador (Micropulser Electroporator BIO-RAD®) configurado a 25 μ F y 2.2 kV. Acto seguido, las células se resuspendieron en 1 ml de LB, se incubaron 1 hora a 37 °C y se sembraron en placas de LB con ampicilina.

2.2. Obtención analítica y preparativa de plásmidos (miniprep y maxiprep)

Para comprobar la correcta electroporación de las células de *E. coli*, las colonias transformantes se cultivaron en 3 ml de medio líquido hasta saturación, los plásmidos se solubilizaron por lisis alcalina de las células y se purificaron mediante el Plasmid Extraction Mini-Kit de Favorgen®. Para la obtención de plásmidos a gran escala (>0.5 mg de plásmido a partir de 500 ml de cultivo) se utilizó Plasmid Maxi Kit de Quiagen®.

2.3. Cultivo de levadura

Las cepas de levadura se cultivaron en medio YP (Yeast Peptone; 1.1% extracto de levadura, 2.2% bacto-peptona y 0.0055% adenina), suplementado con 2% de glucosa (YPD) o 2% rafinosa/galactosa (YPRaff) y en algunos casos se utilizó medio selectivo. Todos ellos preparados en base sólida (placas de agar) o líquida según protocolos estándar (Sambrook *et al.*, 1989).

2.4. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae* con ADN circular

La transformación de levadura con plásmidos (producidos en bacteria) o con otros anillos de ADN (fabricados *in vitro*) se llevó a cabo mediante electroporación. Para ello, cultivos en fase de crecimiento exponencial de *S. cerevisiae* que alcanzaron OD₆₀₀ ~1, se enfriaron en hielo durante 5 min para detener su crecimiento. Las células se sedimentaron, se lavaron con H₂OmQ estéril y después con sorbitol 1 M (4 °C). Aproximadamente 100 µl de células se diluyeron en un volumen de sorbitol 1 M y estos 200 µl se mezclaron con 10 µl de ADN. La mezcla se transfirió a cubetas de 0.2 cm y se sometió a choque eléctrico en un Micropulser Electroporator BIO-RAD® utilizando los ajustes recomendados para levaduras. Las células se diluyeron con 800 µl adicionales de sorbitol 1 M y se sembraron en placas de medio selectivo.

3. Técnicas de topología del ADN

3.1. Técnicas electroforéticas para el estudio de la topología del ADN

3.1.1. Análisis de Lk mediante electroforesis en gel 2D

La electroforesis en geles de agarosa permite separar las moléculas de ADN lineales y circulares en función de su masa (número de pares de bases) y separa también las moléculas circulares según su topología (grado de compactación proporcional a ΔW_r).

En el caso de moléculas lineales, la movilidad electroforética correlaciona inversamente a su longitud. En el caso de las moléculas circulares, un mayor grado de superenrollamiento incrementa el valor absoluto de ΔW_r y tiende a incrementar su velocidad de migración. La electroforesis permite separar así los distintos topoisómeros que forman una distribución térmica de Lk. Sin embargo, la velocidad de migración no diferencia el signo positivo o negativo de ΔW_r , ya que el grado de compactación es el mismo. Para saber el signo se añaden cantidades precisas de intercalantes de ADN, como cloroquina, en el tampón de electroforesis (Figura M2). Estos intercalantes reducen el T_w del ADN y, dado que Lk no varía en los círculos covalentemente cerrados, provocan un incremento positivo del W_r . Comparando la movilidad del ADN en ausencia o presencia de moléculas intercalantes puede deducirse entonces si ΔW_r (o ΔLk) entre distintos topoisómeros es positivo o negativo. Éste es el principio de los geles bidimensionales, en los que se utiliza una baja y una alta concentración de intercalante en la primera y segunda dimensión, respectivamente. Como resultado, los topoisómeros individuales se distribuyen a lo largo de un arco similar al ilustrado en la Figura M3 (Hanai & Roca, 1999).

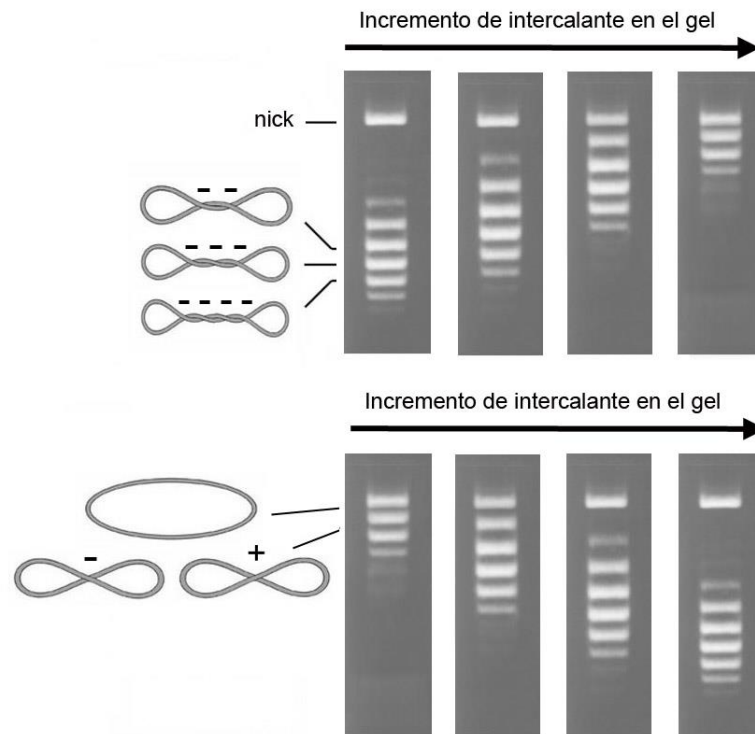


Figura M2. Esquema del efecto de un intercalante en la movilidad electroforética de distribuciones de Lk . En el panel superior, topoisómeros con superenrollamiento negativo ($\Delta W_r < 0$) son más compactos y migran más rápido que el ADN relajado ($\Delta W_r = 0$) o con cortes (*nick*). Al añadir intercalante durante la electroforesis, se reduce el T_w y estas moléculas de ADN covalentemente cerradas lo compensan incrementando el W_r . En consecuencia migran más despacio. En el panel inferior, topoisómeros cercanos a Lk^0 (distribución relajada, $\Delta W_r = 0$) migran cercanos al ADN con cortes (*nick*). Al añadir intercalante, se reduce el T_w y estas moléculas de ADN lo compensan incrementando el W_r , que en este caso pasa a ser $W_r > 0$. En consecuencia, adquieren mayor velocidad en el gel que la molécula con cortes (*nick*).

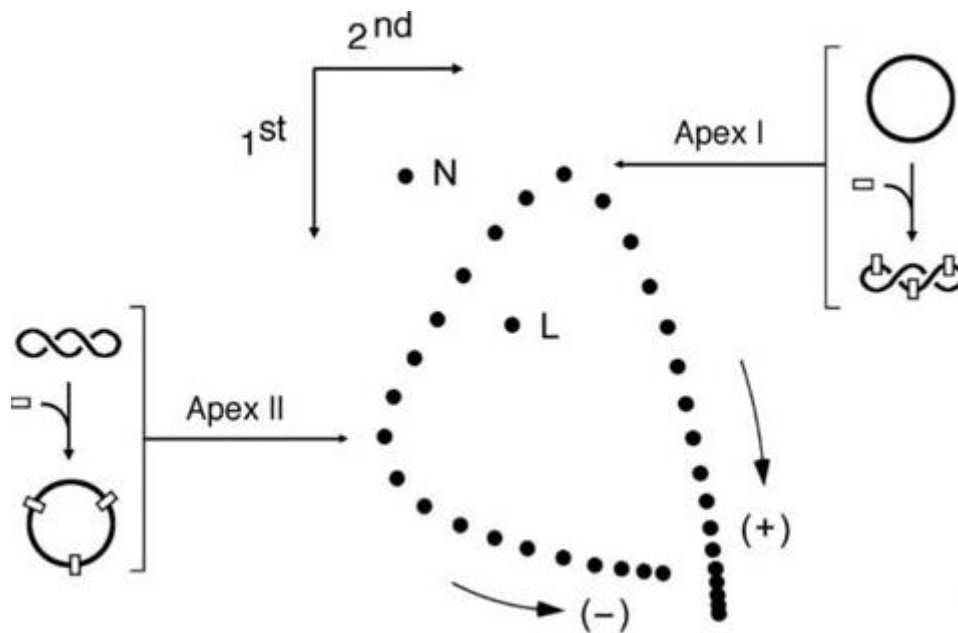


Figura M3. Separación de topoisómeros superenrollados mediante electroforesis 2D. En el esquema, los topoisómeros (puntos negros) se sometieron a electroforesis sin intercalante durante la primera dimensión y con intercalante durante la segunda dimensión. El Apex I indica el topoisómero que tuvo el menor W_r , y por lo tanto la velocidad más baja, durante la primera dimensión. La unión del intercalante (rectángulos), aumentó el W_r de este topoisómero de manera que migró más rápido en la segunda dimensión. Apex II indica el topoisómero superenrollado negativamente en origen, que se convirtió en el topoisómero más lento en la segunda dimensión debido a que la unión del intercalante cambió su W_r a casi cero. Anillos de ADN con *nicks* (N) y ADN lineal (L).

Para observar la distribución L_k de los plásmidos y anillos de ADN analizados en esta tesis, se realizó una electroforesis bidimensional, cargando 10 μ l de muestra en un gel de agarosa en TBE (89 Tris-borate, 2mM EDTA). Las condiciones de electroforesis (concentración de agarosa, voltaje y tiempo) se ajustaron al tamaño de cada minicromosoma y se especifican en la tabla M1.

Las distribuciones de L_k se analizaron como se describió previamente en (Diaz-Ingelmo *et al.*, 2015). ΔL_k se calculó contando el número de L_k topoisómeros que se extienden desde el centro de la distribución problema de L_k hasta el centro de la distribución de L_k del ADN relajado.

3.1.2. Análisis de anillos de ADN anudados mediante electroforesis en gel 2D

Tal como se explicó en la introducción, la actividad intramolecular de la topoisomerasa II (topo II) puede invertir un cruce producido por superenrollamiento del ADN o, bien, invertir un cruce para dar lugar al anudamiento o desanudamiento de una molécula circular de ADN (Figura M4A). Tras introducir un *nick* en las moléculas de ADN, la tensión helicoidal se disipa porque el dúplex puede pivotar alrededor de la hebra intacta. Pero los nudos permanecen. Los nudos atrapados en los anillos de ADN pueden visualizarse por electroforesis en geles de agarosa ya que se mueven más rápido que los anillos no anudados (Figura M4B). Sin embargo, la identificación de anillos de ADN anudados mediante electroforesis de una dimensión es ambigua debido a que la migración de los nudos puede solapar con la posición de fragmentos lineales de ADN. Cuando se examinan muestras heterogéneas de ADN, por ejemplo de extractos celulares, abundantes fragmentos de ADN genómico suelen enmascarar los nudos de ADN. Este problema se resuelve haciendo una electroforesis bidimensional (2D) de alta resolución (Trigueros *et al.*, 2001) (Figura M4C). En la primera dimensión, a bajo voltaje, la velocidad de migración de las moléculas anudadas correlaciona con la complejidad del nudo (el número de cruces irreducible del nudo) (Stasiak *et al.*, 1996). Por tanto, en relación con la posición del anillo no anudado que tiene cero cruces (nudo trivial), las posiciones que corresponden con uno y dos cruces están vacíos porque el nudo más sencillo tiene tres cruces (nudo trébol o 3_1) (Figura M4C). Poblaciones de nudos de mayor complejidad forman una escalera que empieza con el 3_1 seguido por el nudo de cuatro cruces (4_1), dos nudos de cinco cruces (5_1 y 5_2), y así en adelante. En la segunda dimensión el gel se gira en dirección ortogonal y la electroforesis se hace a alto voltaje. En estas condiciones, la escalera de moléculas anudadas se retrasa en relación a la diagonal de fragmentos lineales (L), lo que permite la identificación inequívoca y la cuantificación de las poblaciones individuales de nudos (Figura M4C).

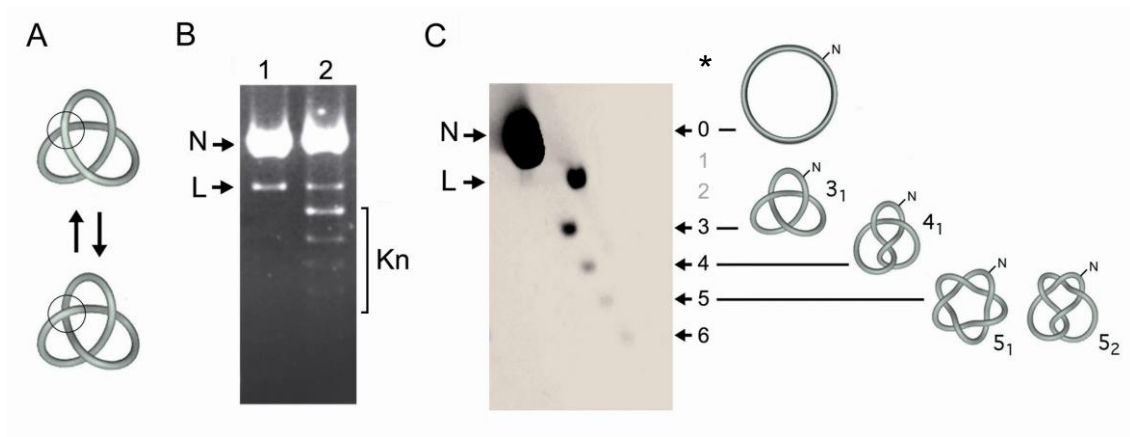


Figura M4. Identificación de nudos de ADN por electroforesis 2D. (A) Interconversión de formas no anudadas (arriba) y anudadas (abajo) de ADN circular de doble hebra por actividad de la topo II (circulo). (B) El gel de agarosa muestra un plásmido de ADN de 4.4 kb antes (carril 1) y después de ser incubado con un exceso de topo II para favorecer la formación de nudos (Kn) (carril 2). Después de la reacción, las muestras de ADN se trataron con una endonucleasa productora de *nicks* para eliminar los superenrollamientos. (C) La muestra del carril 2 se cargó en un gel de agarosa 2D. En la primera dimensión (de arriba a abajo) se separan los tipos de nudos por su número de cruces irreducibles (*). En la segunda dimensión (de izquierda a derecha) los fragmentos lineales de ADN (L) se separan de la escalera de nudos (Kn). Los puntos en el gel que corresponden a los nudos 3₁, 4₁, 5₁, y 5₂ están indicados. Las condiciones del gel 2D están descritas en Material y métodos.

Para observar la presencia de nudos en los plásmidos y anillos de ADN de esta tesis, se trataron 40 µl de muestra con endonucleasa productora de *nicks* Nt.BstNBI (NEB). Las condiciones de electroforesis (concentración de agarosa, voltaje y tiempo) se ajustaron al tamaño de cada minicromosoma y se especifican en la tabla M1.

Las poblaciones de nudos individuales se cuantificaron usando el software ImageJ en señales no saturadas obtenidas de diluciones seriadas (1, 0.1, 0.01, 0.001) de las muestras cargadas en los geles 2D. La abundancia relativa de las poblaciones individuales de nudos se calculó respecto a la cantidad total de anillos de ADN desanudados y anudados.

Material y métodos

ADN (kb)	Electroforesis de distribuciones de Lk Gel de agarosa de 20 x 20 cm			Electroforesis de nudos de ADN Gel de agarosa de 20 x 20 cm		
		1 ^a Dimensión Cloroquina 0.6 µg/mL	2 ^a Dimensión Cloroquina 3.0 µg/mL		1 ^a Dimensión	2 ^a Dimensión
	Agarosa (w/v)	Voltios x tiempo	Voltios x tiempo	Agarosa (w/v)	Voltios x tiempo	Voltios x tiempo
YRp1 (1.5 kb)	2 %	40V x 24h	100V x 4h	2 %	40V x 24h	200V x 3h
YRp2 (2 kb)	1.8 %	65V x 15h	100V x 4h	1.8 %	65V x 15h	165V x 3h
YRp3 (3.2 kb)	1.2 %	65V x 15h	100V x 4h	1.2 %	65V x 15h	150V x 3h
YRp4 (4.4 kb)	0.7 %	50V x 16h	70V x 4h	0.9 %	33V x 42h	150V x 3h
2-micras (6.3 kb)	0.6 %	22V x 42h	90V x 4h	0.6 %	22V x 42h	125V x 3h
YEp24 (7.8 kb) YCp50 (7.9 kb)	0.6 %	22V x 42h	90V x 4h	0.45 %	22V x 42h	125V x 4h
YEp13 (10.7 kb) YRp21 (11.7 kb)	0.4 %	20V x 42h	90V x 4h	0.4 %	33V x 42h	125V x 4h

Tabla M1. Condiciones para las electroforesis 2D.

3.1.3. Transferencia del ADN (Southern), hibridación y detección de señales mediante quimioluminiscencia

Los minicromosomas circulares de *S. cerevisiae* representan una pequeña fracción del ADN celular. Por ejemplo, de 10 ml de cultivo (OD600 ~ 1) contienen cerca de 30 µg de ADN genómico y 1-3 ng de minicromosomas centroméricos. Para su visualización tras las electroforesis es necesaria la transferencia de las moléculas de ADN desde su posición en el gel de agarosa a una membrana (Southern Blot) y su posterior detección mediante hibridación con una sonda que emita una señal.

Para el Southern blot, el gel se equilibró sucesivamente con una solución de depurinización que fragmenta el ADN (HCl 0.25 N, 10 min), una solución de desnaturalización (NaOH 0.5 N, NaCl 1.5 M, 30 min) y una solución de renaturalización (NH₄OAc 1 M, NaOH 0.02 N, 30 min). El ADN se transfirió por capilaridad durante >4 horas a una membrana de Nylon (Amersham Hybond-N+, GE Healthcare®). El ADN transferido se fijó covalentemente a la membrana mediante la irradiación UV (1200 µJ) de un aparato Stratalinker®.

Para la detección del ADN transferido se utilizó el sistema de quimioluminiscencia AlkPhos Direct de GE Healthcare®, que permite detectar <1 pg de ADN mediante una sonda de hibridación. En este sistema, la sonda se conjuga directamente a una fosfatasa alcalina termoestable. Tras la hibridación, la fosfatasa actúa sobre un reactivo (CDP-Star®) que al descomponerse emite luz visible.

3.2. Preparación de muestras *in vitro*

3.2.1. Formación de nudos de ADN mediante incubación de plásmidos con un exceso de topoisomerasa II

1 µg de topoisomerasa II de *S. cerevisiae* purificada como se describe en Díaz-Ingelmo, 2014, se incubó con 1 µg del plásmido YRp4 superenrollado negativamente en un volumen de 0.1 mL con 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mg/ml albúmina de suero bovino (BSA), 10 mM 2-mercaptoetanol, 4% (vol/vol) glicerol, 20 mM KCl, 20 mM MgCl₂ y 2 mM espermidina. Finalmente, se añadió AMPPNP (Merck), análogo de ATP no hidrolizable, a una concentración final de 2mM y la mezcla se incubó a 30 °C durante 5 min. La reacción se paró añadiendo fenol y se precipitó el ADN con EtOH.

3.2.2. Formación de nudos positivos y negativos de ADN mediante circularización de ADN

El plásmido YRp4 se cortó con el enzima de restricción de corte único *Hind* III y se purificó en gel el DNA lineal resultante de 4.4 kb. Se circularizaron 2 µg del ADN lineal mediante tratamiento con T4 ligasa de fago (NEB) a 16 °C durante 6 h en un volumen de reacción de 0.2 mL conteniendo 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mg/ml (BSA), 10 mM 2-mercaptoetanol, 1 mM ATP, 4% (vol/vol) glicerol, y 10 mM MgCl₂. La reacción se paró añadiendo fenol y se precipitó el ADN con EtOH. Se cargó una alícuota directamente en un gel de electroforesis para verificar que la mayoría de las moléculas de ADN estaban covalentemente cerradas y el resto de la alícuota se cargó después de un tratamiento con con la endonucleasa Nt. BstNBI (NEB) productora de *nicks* (Figura M5A). La misma muestra de anillos de ADN tratados con la endonucleasa se cargó en un gel de electroforesis 2D para el análisis cuantitativo de la formación de nudos (Figura M5B).

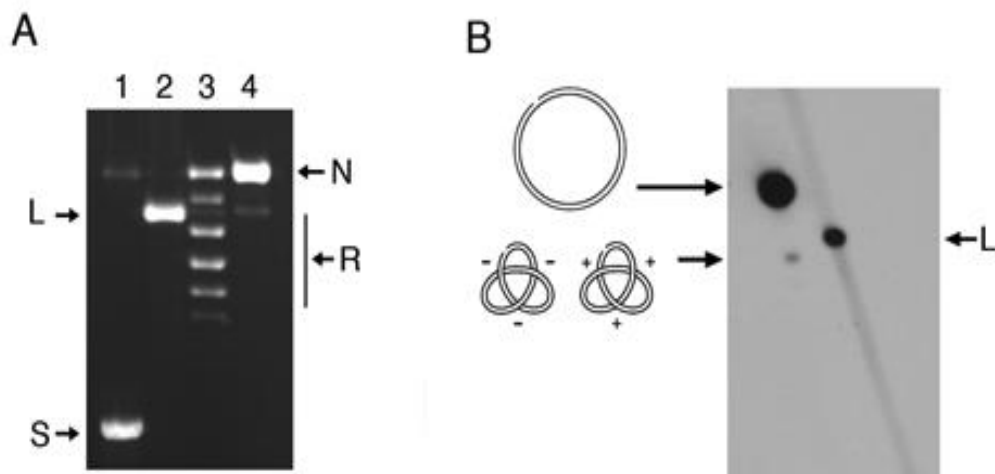


Figura M5. Formación de tréboles tras circularización de ADN lineal con T4 ADN ligasa. (A) El gel de agarosa teñido con bromuro de etidio muestra el plásmido YRp4 de 4.4kb superenrollado negativamente (carril 1) y después de la linealización con el enzima de restricción de corte único *Hind* III (carril 2). Las moléculas lineales se circularizaron tratándolas con ADN ligasa del fago T4 (NEB) (carril3). Tras confirmar que la mayoría de las moléculas de ADN se cerraron covalentemente como se indica mediante la distribución gaussiana de los topoisómeros Lk relajados en el carril 3, el ADN se trató con la endonucleasa Nt. BstNBI (NEB) para producir *nicks* (carril 4). La electroforesis 1D se realizó en gel de agarosa al 0,9% en tampón TBE (Tris-borato 100 mM, pH 8,3, EDTA 2 mM) a 40 V durabte 16 h. La posición de las formas del plásmido superenrolladas (S), lineal (L), relajada (R) y tratada con la

endonucleasa (N) están indicadas. (B) La mancha del gel 2D muestra los mismos anillos de ADN con *nick* obtenidos anteriormente (carril 4). La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 0,9% en tampón TBE en la primera dimensión (de arriba abajo, 33 V, 42 h) y la segunda dimensión (de izquierda a derecha, 150 V, 3 h). En estas condiciones de electroforesis, el nudo de trébol se retrasa con respecto a la diagonal de formas lineales (L), permitiendo así un análisis cuantitativo. La circularización de un plásmido de ADN de 4,5kb con ADN T4 ligasa produjo aproximadamente un 0,85% de nudos de trébol.

3.2.3. Ajuste de la densidad de superenrollamiento negativo en los anillos de ADN

Anillos de ADN de 4,4 kb covalentemente cerrados fueron incubados con topoisomerasa I de *Vaccinia virus* (Shuman & Moss, 1987) a 25° C durante 15 min a una concentración final de ADN de 100 µg/mL en un tampón de relajación de ADN (Tris-HCL 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl 8 mM, EDTA 1 mM, 2-mercaptoetanol 7 mM), conteniendo las concentraciones de difosfato de cloroquina (Merck) que están indicadas en la Figura M6. Los mismos productos de ADN se obtuvieron al cortar el ADN con la endonucleasa Nt-BstNBI (NEB) y al religar luego con ADN ligasa del fago T4 (NEB) en presencia de las mismas concentraciones de cloroquina. Las reacciones se pararon añadiendo dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1% y proteinasa K a 100 pg/mL, y las mezclas se incubaron a 60 °C durante 1 h previamente a la extracción con fenol y precipitación con etanol del ADN. Las muestras se cargaron en un gel de electroforesis 1D para comprobar los valores de Lk (Figura M6).

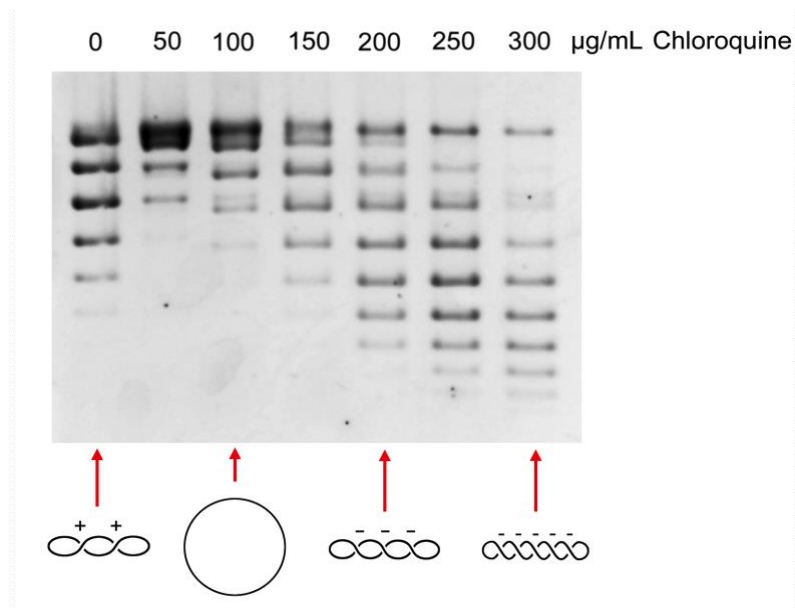


Figura M6. Reducción del valor de Lk del ADN mediante relajación con topoisomerasa I en presencia de cloroquina. La electroforesis (de arriba a abajo) se llevó a cabo en gel de agarosa al 1% en tampón TBE (Tris-borato 100 mM, pH 8,3, EDTA 2 mM) a 60 V durante 16 h. Los anillos de ADN relajados en ausencia de cloroquina adquirieron unos pocos superenrollamientos positivos durante la electroforesis, mientras que las concentraciones crecientes de cloroquina produjeron moléculas negativamente superenrolladas que incrementaba su movilidad en el gel. Las concentraciones de cloroquina de 200 a 300 µg/mL produjeron escaleras de topoisómeros superenrollados negativamente adecuados para resolver las dos formas quirales del nudo de trébol superenrollado.

3.3. Preparación de muestras *in vivo*

3.3.1. Extracción del ADN de minicromosoma circular de *S. cerevisiae*

Para conocer el valor del número de enlace (Lk) de los minicromosomas circulares de *S. cerevisiae* en su estado nativo (*in vivo*) es esencial que el método de extracción de ADN evite posibles modificaciones del Lk durante el proceso. El paso de hélice más estable del ADN (h^0) cambia con la temperatura, de modo que Lk^0 se reduce al incrementarse la temperatura (la doble hélice tiende a desenrollarse). Aproximadamente, por cada grado centígrado de cambio, los pares de bases contiguas rotan 0.011 grados. En consecuencia, el número de enlace (Lk^0) de un mismo ADN circular desnudo, de 1500 pb relajado a 4 °C y a 37 °C difiere en 1,5 unidades ($33 \times 0.011 \times 1500 = 544.5$ grados). Los cambios de temperatura producidos durante la manipulación de los cultivos de levadura y la presencia de las topoisomerasas intracelulares durante la lisis celular, pueden producir desviaciones del Lk de los minicromosomas.

Para evitar alteraciones del Lk, antes de iniciar la extracción del material genético, las levaduras en cultivo se fijaron de forma instantánea al añadir un volumen frío (-20 °C) de etanol:tolueno (ToKill) (EtOH 95%, Tris HCl pH 8.8 20 mM, Tolueno 28 mM, EDTA 5 mM). Esta fijación detiene toda actividad enzimática y "congela" por tanto el valor de Lk de los minicromosomas *in vivo*. Para ello, cultivos de 20 ml de levadura creciendo en fase exponencial (OD600 ~ 0.8-0.9) se fijaron súbitamente añadiendo un volumen a -20 °C de ToKill. Las células se sedimentaron, lavaron y resuspendieron en 400 µl de TE (Tris HCl pH 7 10 mM, EDTA 1 mM). Se transfirieron a un tubo cónico de 1.5 ml (tipo eppendorf) al que se añadió un volumen de bolas de vidrio (GlassBeads Sigma®) y un volumen de fenol. La lisis mecánica de las células se llevó a cabo mediante agitación en un aparato FastPrep® durante 10 s en potencia 5. La fase acuosa del lisado se incubó con un exceso de RNAsa durante 10 min y se re-extrajo con un

Material y métodos

volumen de cloroformo. Los ácidos nucleicos (principalmente ADN) se precipitaron con etanol absoluto y se resuspendieron en 50 μ l de TE.

Resultados

1. Formación de nudos de ADN en cromatina eucariótica

1.1. Nudos de ADN en cromatina eucariota

Para examinar la presencia de nudos de ADN *in vivo*, se usaron células de *S. cerevisiae* transformadas con distintos minicromosomas circulares (Figura M1). Las células se cultivaron hasta fase exponencial y rápidamente se fijaron con la solución ToKill a -20°C , tal como se describió en Material y Métodos. Esta fijación inactiva las topoisomerasas y evita posibles alteraciones de la topología de los minicromosomas durante la extracción de ADN (Díaz-Ingelmo et al., 2015). Una parte de las muestras de ADN extraído se cargó en un gel 2D con cloroquina para examinar el número de enlace (Lk) de los minicromosomas. El resto de las muestras se trataron con endonucleasa y se cargaron en un gel 2D de alta resolución para detectar la presencia de nudos de ADN. En ambos tipos de electroforesis, el ADN de los geles se transfirió a membranas, que se hibridaron posteriormente con sondas específicas para los minicromosomas como se describe en Material y Métodos. La figura R1 muestra los resultados obtenidos con células conteniendo el minicromosoma YRp4 (4.4kb). Este minicromosoma presenta *in vivo* una distribución gaussiana de Lk. La comparación de las distribuciones de Lk del ADN de YRp4 *in vivo* y la del mismo ADN relajado *in vitro* muestran que el minicromosoma *in vivo* tiene una diferencia de número de enlace (ΔLk) de -22 (Figura R1A). Como se indica en anteriores estudios (Salceda *et al.*, 2006), este ΔLk es coherente con la presencia de unos 20 nucleosomas y la estabilización de $\Delta\text{Lk}\approx-1$ por nucleosoma (Simpson *et al.*, 1985), ya que la densidad nucleosomal el cromatina de levadura es aproximadamente 1 nucleosoma/200 pares de bases (Yuan *et al.*, 2005).

Una vez eliminado mediante *nicks* el superenrollamiento del ADN de YRp4, se reveló la presencia de nudos (Figura R1B). Se observó el nudo 3_1 seguido de una escalera de nudos de cada vez más complejidad. Nudos con más de ocho cruces fueron detectables después de una exposición larga de las membranas (Figura R1B). Se confirmó que esta escalera estaba formada sólo por nudos DNA de doble hebra porque se redujo al incubar la muestra con topo II (Figura R1C). Sin embargo, no se produjo ningún cambio al tratar la muestra con topo I (Figura R1C). La probabilidad de anudamiento (K^p_{CHR}) de YRp4 resultó ser 0.025 (2.5% de moléculas anudadas).

Se llevaron a cabo experimentos análogos con otros minicromosomas circulares de levadura, tales como el plásmido endógeno 2-micras (6.3 kb), el plásmido YEp24 (7.8 kb) y el plásmido centromérico YCp50 (7.9 kb) (Figura R2A). Estos minicromosomas presentaron una probabilidad de anudamiento (K^p_{CHR}) comparable a la de YRp4 (K^p_{CHR} entre 0.02 y 0.03) y un patrón de complejidad de nudos similar (Figura R2B).

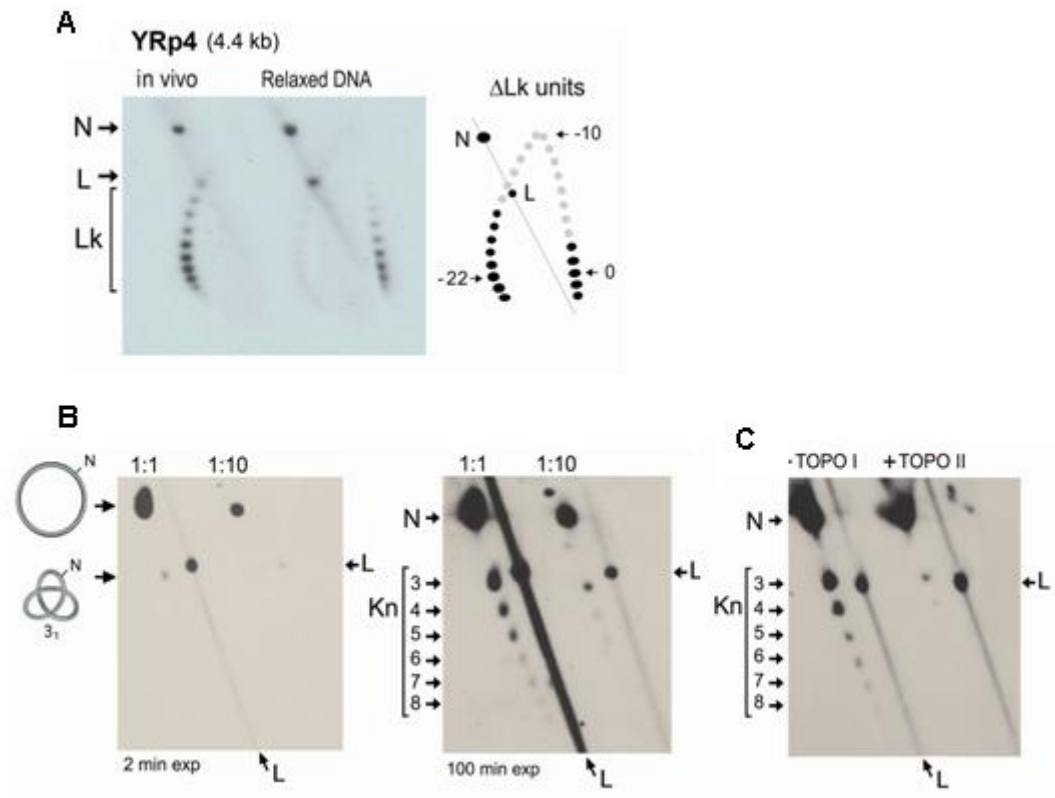


Figura R1. Los minicromosomas de levadura contienen nudos complejos de ADN. (A) El gel 2D muestra las distribuciones del número de enlace (Lk) del minicromosoma YRp4 *in vivo* y del YRp4 relajado *in vitro*. La diferencia de Lk se calculó como la distancia (unidades de ΔLk) entre los centros de ambas distribuciones de Lk a través del arco de topoisómeros Lk. (B) Análisis de nudos de ADN del minicromosoma YRp4. La muestra anterior de ADN *in vivo* de YRp4 se trató con endonucleasa y se cargó en un gel 2D como se describe en la Figura M4C. Los carriles del gel muestran diluciones 1:1 y 1:10 de la muestra. Los paneles de izquierda a derecha muestran, respectivamente, exposiciones cortas (2 min) y largas (100 min) del Southern-Blot. Los puntos del anillo no anudado (N), ADN lineal (L) y de los nudos (Kn) con números de cruces entre 3 y 8 están indicados. (C) El resultado de la incubación de la muestra de ADN de YRp4 con topoisomerasa I (TOPO I) y topoisomerasa II (TOPO II) de levadura.

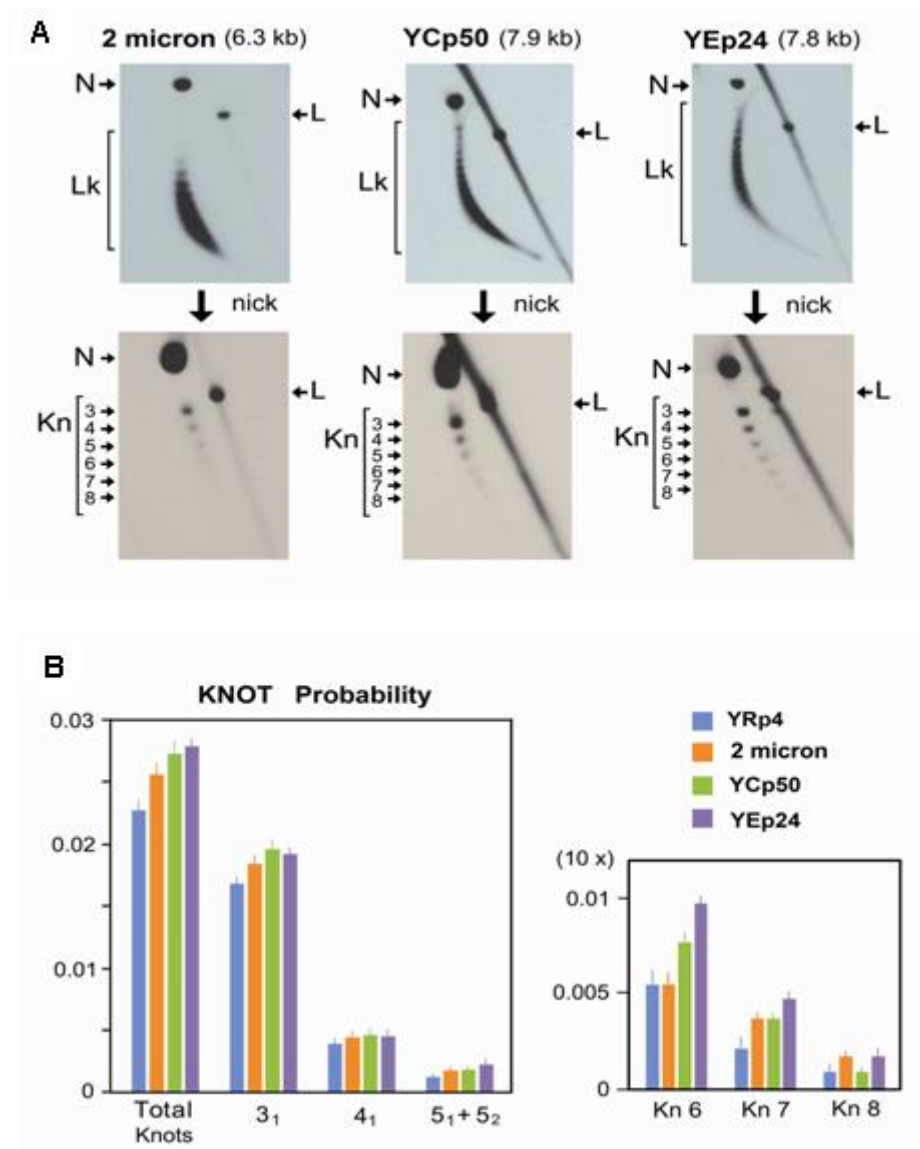


Figura R2. Probabilidad de anudamiento de diferentes minicromosomas circulares de levadura. (A) Las distribuciones de Lk (Lk) y los tipos de nudos (Kn) del plásmido 2-micras de levadura y los minicromosomas YCp50 y Yep24. Las condiciones de los geles 2D están descritas en Material y Métodos (Tabla M1). (B) La probabilidad de anudamiento total y la probabilidad de los nudos 3₁, 4₁, 5₁+5₂, y de los tipos de nudos de 6 a 8 cruces (Kn 6, Kn 7, Kn 8) en YRp4, YCp50, Yep24 y el plásmido 2-micras de levadura. Las gráficas muestran la media y la \pm SD de tres experimentos.

1.2. Los nudos en cromatina no son producto de la replicación del ADN

Los minicromosomas YRp4, YEp24, YCp50 y el plásmido endógeno 2-micras difieren en el número de copias y tienen diferentes orígenes de replicación y unidades de transcripción (Figura M1). La similitud en la probabilidad de anudamiento y en el patrón de complejidad de los nudos de estos distintos minicromosomas sugiere que los nudos no están relacionados con actividades del ADN, como replicación y transcripción, ó con la presencia de elementos específicos de cromatina, como centrómeros. Consistente con esto, se observó que la K^p_{CHR} no cambia cuando los cultivos de levadura pasan de fase exponencial a fase estacionaria y quiescente (Figura R3A). Por lo tanto, los valores de K^p_{CHR} no correlacionaron con la abundancia relativa de células replicando (Figura R3B).

A continuación se examinó la formación de nudos en levaduras mutantes de topoisomerasas. Las fracciones de nudos no presentaron cambios significativos en células carentes de topo I ($\Delta top1$) o en células con actividad topo II reducida ($top2-ts$) (Figura R4A y R4B). Una vez inactivada la topo II, se acumularon minicromosomas encadenados durante la replicación. Estos encadenamientos migran como estructuras compactadas en los geles 2D usados para el análisis del Lk (Figura R5B). Después de introducir *nicks* en el ADN, los encadenamientos produjeron una escalera de topoisómeros que difieren en el número de encadenamiento (Figura R5B). Incluso en estas condiciones, la fracción de moléculas anudadas no se alteró significativamente, lo que corroboró que los nudos observados no son un subproducto de la replicación del ADN (Figura R4C).

Resultados

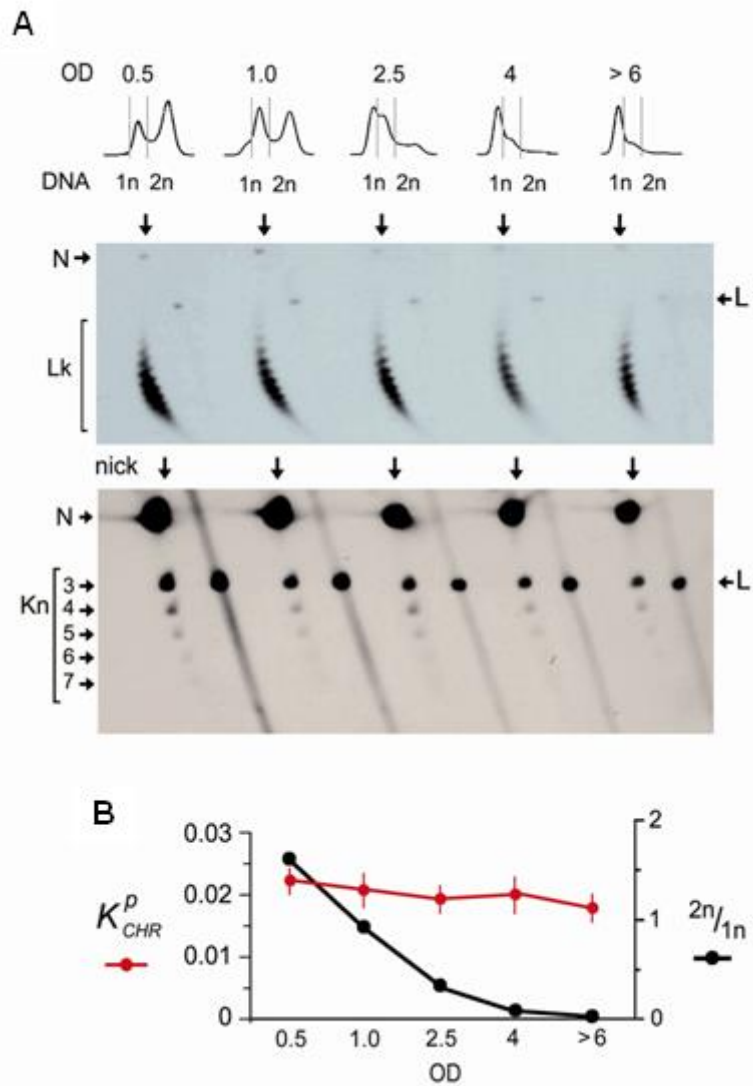


Figura R3. Los nudos de cromatina se forman independientemente de la proliferación celular y la replicación del ADN. (A) Se recogieron muestras de células con el minicromosoma YRp4 durante el crecimiento exponencial (OD 0.5 y 1.0) durante el cambio a la fase estacionaria (OD 2.5 y 4) y durante la fase quiescente (OD > 6). Se muestra el contenido de ADN celular (1n, 2n), las distribuciones de Lk (Lk) y los tipos de nudo (Kn) de YRp4 presentes en cada muestra. (B) Comparación de valores de K^p_{CHR} y la abundancia de células replicando ($2n/1n$) (media y \pm SD de tres experimentos).

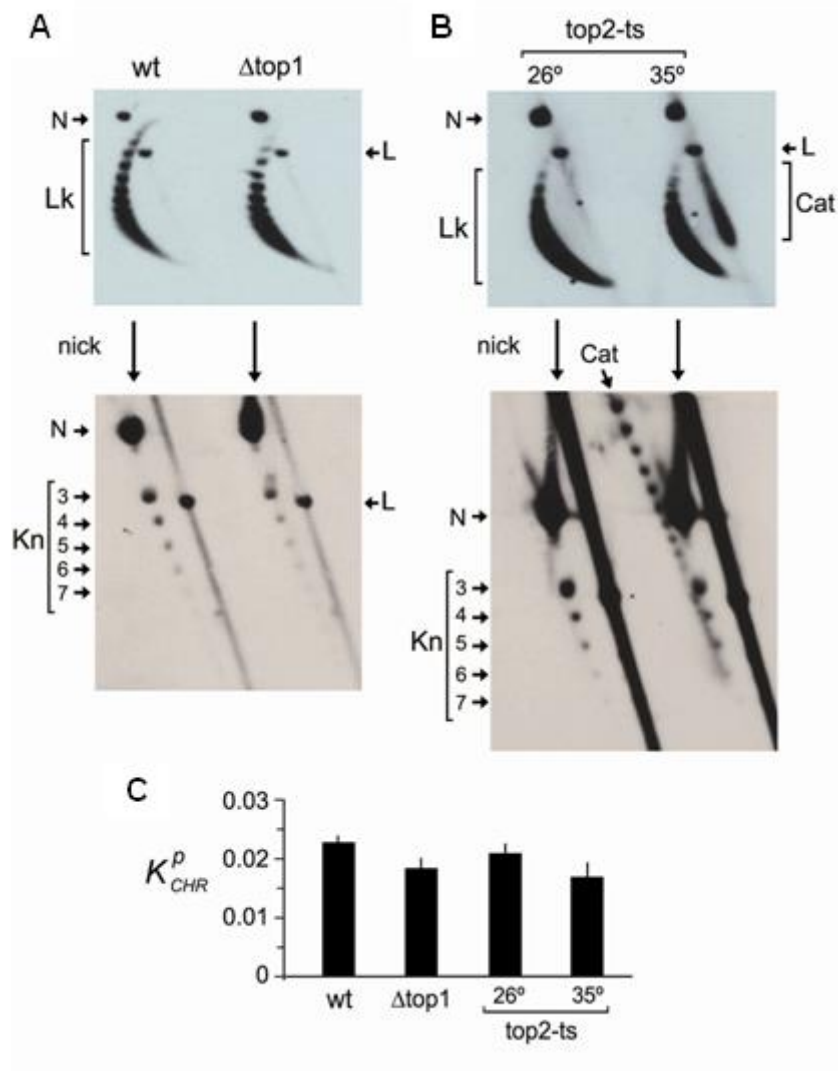


Figura R4. Formación de nudos en cepas de levadura mutantes de topoisomerasas. (A y B) Distribución de Lk (Lk) y tipos de nudos (Kn) de YRp4 presentes en células *wt*, mutantes $\Delta top1$ y *top2-ts* antes (26°C) y después de la inactivación de la topoisomerasa II durante 2 horas (35°C). Encadenamientos replicativos (Cat) están indicados en los geles de análisis de Lk y de nudos. (C) Valores de K^p_{CHR} (media y \pm SD de tres experimentos) en células *wt*, mutantes $\Delta top1$ y *top2-ts*.

1.3. La actividad de la topoisomerasa II mantiene activamente las fracciones de ADN anudado

Los resultados anteriores sugieren que la probabilidad de anudamiento de los minicromosomas en levadura refleja una propiedad general de la estructura de la cromatina *in vivo*. Si fuera así, la existencia de nudos podría verse alterada forzando

un cambio estructural en la población de minicromosomas, por ejemplo, activación de la transcripción. Para testar esta hipótesis, se utilizó el minicromosoma YRp401 (8.1 kb), que porta el gen *LacZ* bajo el promotor inducible *pGAL1* (Figura M1). Se examinó la formación de nudos en YRp401 antes y después de la inducción de la transcripción (Figura R5). Cuando *pGAL1* estaba reprimido en medio con glucosa, YRp401 tuvo una K^p_{CHR} de 0.027, una probabilidad de anudamiento comparable a la del plásmido endógeno 2-micras presente en las mismas células. Sin embargo, cuando el promotor *pGAL1* se activó en medio conteniendo galactosa, la K^p_{CHR} de YRp401 se redujo cuatro veces, y cuando la transcripción se reprimió en medio conteniendo glucosa otra vez, se recuperó el valor K^p_{CHR} inicial de este minicromosoma. La siguiente pregunta fue si este proceso de desanudamiento y anudamiento estaba catalizado por la actividad de la topo II. Para ello, se repitió el mismo experimento en la cepa mutante *topo2-ts*, en la cuál se inhibió la topo II antes de la activación de *pGAL1* (Figura R5). En estas condiciones, la transcripción del gen *LacZ* se elevó y reprimió de forma similar, como indicó la actividad beta-galactosidasa extraída de las células. Sin embargo, los procesos de desanudamiento y anudamiento no ocurrieron. Estos resultados indicaron que la formación y la resolución de los nudos de ADN es un proceso dinámico que se basa en la actividad la topoisomerasa II y que el estado estacionario de los nudos refleja un rasgo general la cromatina *in vivo*, posiblemente su equilibrio conformacional.

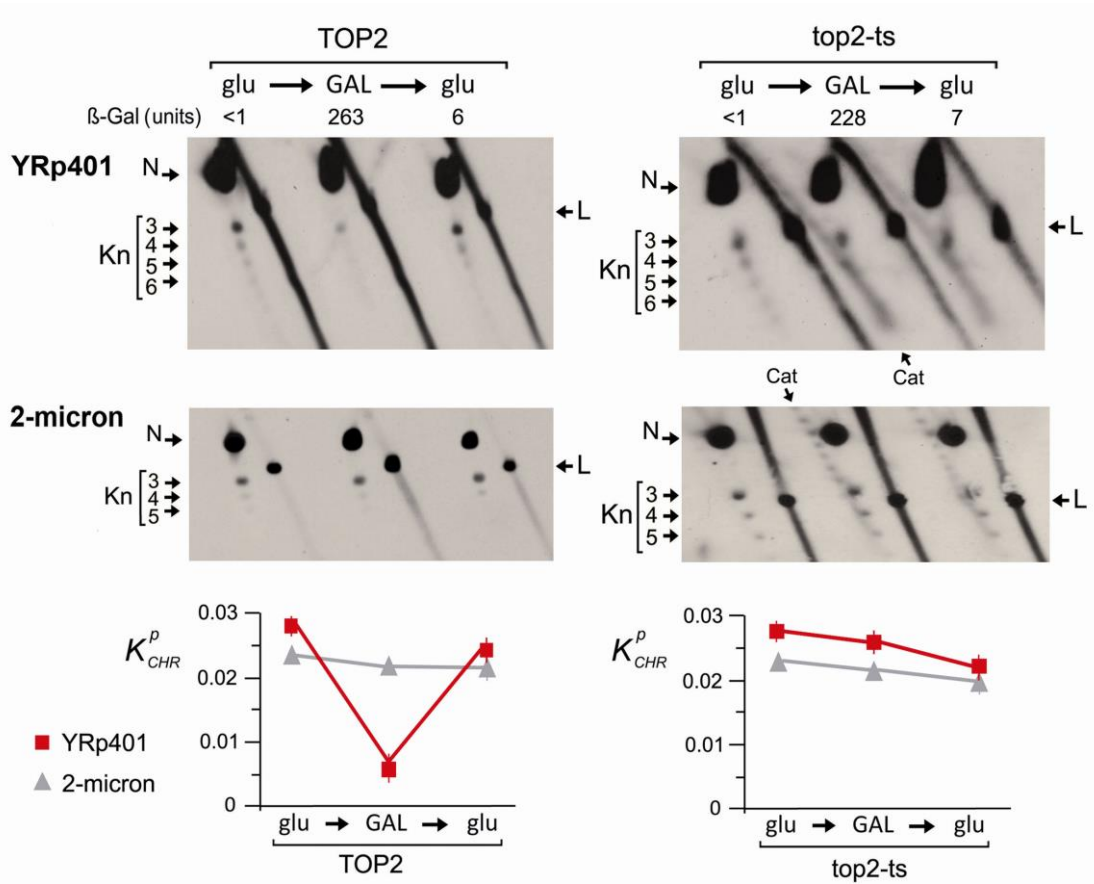


Figura R5. Los nudos de cromatina son eliminados y reconstruidos por la topoisomerasa II. Los geles 2D comparan la formación de nudos en el minicromosoma YRp401, que porta pGAL1:LacZ. Los experimentos se llevaron a cabo en cepas *TOP2* y cepas *top2-ts*, y se contrastaron los nudos producidos en YRp401 y el plásmido endógeno 2-micras. Se cogieron muestras de los cultivos de levadura durante el crecimiento exponencial a 26°C en medio conteniendo glucosa (glu), después se cambiaron 3 horas a 35°C en medio conteniendo galactosa (GAL), y después de 3 horas se volvieron a cambiar a medio conteniendo glucosa (glu). La transcripción de *LacZ* se controló mediante la actividad de la beta-galactosidasa en lisados celulares. Las gráficas muestran la media y \pm SD de dos experimentos.

1.4. La probabilidad de anudamiento del ADN *in vivo* no incrementa proporcionalmente con la longitud de la fibra de cromatina

Simulaciones computacionales han demostrado que la probabilidad de anudamiento de una cadena flexible incrementa proporcionalmente con la longitud de la cadena (Frank-Kamenetskii *et al.*, 1975). Posteriores experimentos *in vitro* corroboraron que la K^p del ADN durante su circularización en solución libre también incrementa proporcionalmente con su longitud (Rybenkov *et al.*, 1993; Shaw *et al.*, 1993). Aquí se quiso observar si esta dependencia con la longitud aparece también

Resultados

cuando plásmidos de ADN de diferentes tamaños se anudan al incubarlos con un exceso de topo II *in vitro* como se detalla en Material y Métodos. Efectivamente también se observó una correlación lineal entre la longitud y K^p del ADN (Figura R6). Pero, curiosamente, esta correlación no parecía ocurrir *in vivo* en minicromosomas de entre 4.4 y 7.9 kb, ya que todos ellos presentan valores similares de K^p_{CHR} (Figura R2B). Así que se midió la K^p_{CHR} en un rango más amplio de tamaños de minicromosomas (Figura M1).

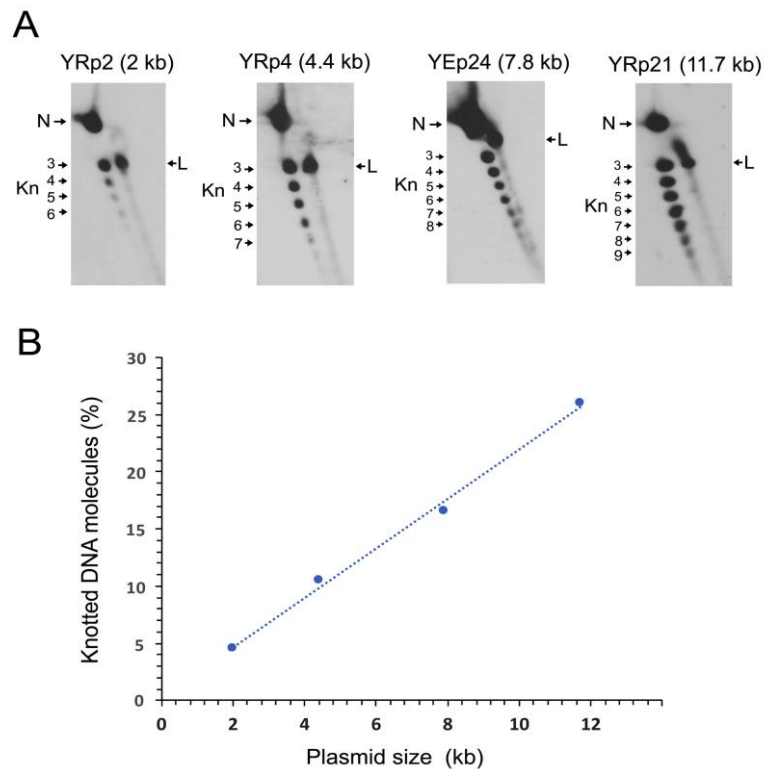


Figura R6. Dependencia del tamaño del plásmido en el anudamiento de ADN mediado por topo II. (A) Nudos de ADN producidos por un exceso de topo II en ADN desnudo de los plásmidos YRp2 (2 kb), YRp4 (4 kb), YEp24 (7.8 kb) y YRp21 (11.7 kb). Las reacciones se llevaron a cabo como se detalla en Material y Métodos. Se recuperaron las muestras de ADN y se trataron con la endonucleasa BstNBI (NEB) y se examinaron mediante electroforesis bidimensional como se describe en la Tabla M1. Los puntos del anillo no anudado (N), ADN lineal (L) y de los nudos (Kn) con números de cruces entre 3 y 9 están indicados. (B) La gráfica muestra la fracción de moléculas anudadas producidas (%) por tamaño de plásmido (kb).

Por un lado, los minicromosomas de mayor tamaño YEp13 (10.7 kb) y YRp21 (11.7 kb) presentaron una K^p_{CHR} de ~ 0.028 (Figura R7A). Este valor aún era

Resultados

comparable a la K^p_{CHR} de minicromosomas de la mitad de longitud. En cuanto a la complejidad de los nudos, YEp13 y YRp21 mostraron una escalera de nudos primos similar a la encontrada en los minicromosomas de entre 4.4 y 7.9 kb. Sin embargo, YEp13 y YRp21 presentaron una escalera de nudos compuestos adicionales (por ejemplo 3_1+3_1 y 3_1+4_1), los cuales no se detectaron en los minicromosomas más cortos. Estos nudos compuestos migraron en la primera dimensión de acuerdo a su mínimo número de cruces, pero se movieron más rápido que los nudos primos en la segunda dimensión (Figura R7A).

Se analizaron entonces los valores de K^p_{CHR} en minicromosomas más pequeños y se observó que K^p_{CHR} se reducía drásticamente en tamaños <4 kb (Figura R7B). Los minicromosomas YRp3 (3.2 kb) y YRp2 (2 kb) presentaron una K^p_{CHR} de 0.015 y 0.005, respectivamente. Su complejidad de nudos también se redujo. Se distinguieron nudos de hasta siete cruces en YRp3, pero sólo se detectó el nudo 3_1 en YRp2. Finalmente, no se encontró ningún nudo en YRp1 (1.4 kb), un minicromosoma que resulta de la circularización del segmento genómico de levadura TRP1ARS1 y que contiene siete nucleosomas (Thoma *et al.*, 1984). Por tanto, K^p_{CHR} aumentaba proporcionalmente con el tamaño de los minicromosomas en un rango de 2 a 5 kb. Sin embargo, por encima de este tamaño, la pendiente de K^p_{CHR} se reducía cinco veces ya que la formación de nudos apenas aumentaba en el rango de 5 a 12 kb (Figura R7C). La Tabla R1 resume los valores K^p_{CHR} totales y de nudos de distinta complejidad observados en los diferentes minicromosomas examinados.

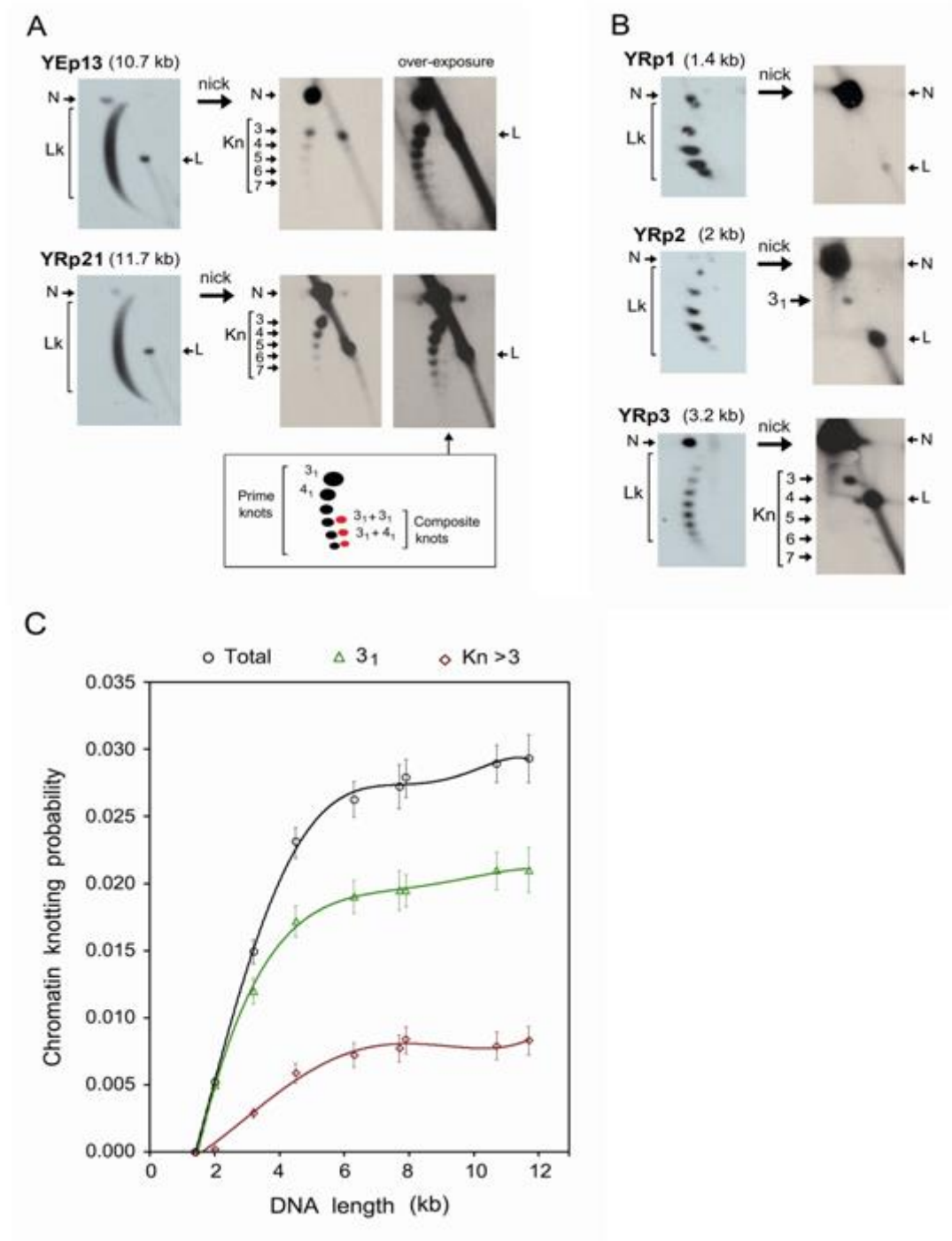


Figura R7. Dependencia de la probabilidad de anudamiento con la longitud de la cromatina. (A) Distribuciones de Lk (Lk) y tipos de nudos (Kn) de los minicromosomas YEp13 (10.7 kb) y YRp21 (11.7 kb). La sobreexposición de los Southern-Blots muestra nudos compuestos de seis cruces (3_1+3_1) y de siete cruces (3_1+4_1). (B) Distribuciones de Lk (Lk) y tipos de nudos (Kn) de los minicromosomas YRp1 (1.4 kb), YRp2 (2 kb), YRp3 (3.2 kb). Los puntos de ADN lineal (L), círculos no anudados (N) y el nudo de trébol (3_1) detectados en YRp2 están indicados. Las condiciones de los geles 2D para el análisis del Lk y los nudos en (A) y (B) se ajustaron para cada tamaño de ADN como se especifica en Material y Métodos (Tabla M1). (C) Gráfica resumen de la probabilidad de anudamiento del ADN en los minicromosomas de

Resultados

levadura en el rango de tamaños de 1.4 a 11.7 kb. La gráfica muestra la probabilidad (media y \pm SD de tres experimentos) del total de todos los tipos de nudos (Total), del nudo de trébol (3_1) y de los nudos con más de tres cruces ($Kn > 3$).

Cromosoma	Longitud (Kb)	K^p_{CHR}	Kn 3	Kn 4	Kn 5	Kn 6	Kn 7	Kn 8
YRp1	1,5	0,00						
YRp2	2,0	0,52	0,50	0,02				
YRp3	3,2	1,49	1,20	0,21	0,06	0,02		
YRp4	4,4	2,31	1,72	0,39	0,12	0,05	0,02	0,01
2-micron	6,3	2,62	1,90	0,44	0,17	0,05	0,04	0,02
Yep24	7,8	2,72	1,95	0,46	0,18	0,08	0,04	0,01
YCp50	7,9	2,79	1,95	0,45	0,22	0,10	0,05	0,02
Yep13	10,7	2,89	2,10	0,40	0,23	0,09	0,05	0,02
YRp21	11,7	2,93	2,10	0,40	0,25	0,11	0,05	0,02

Tabla R1. Probabilidad de anudamiento de los minicromosomas de levadura. K^p_{CHR} : Probabilidad de anudamiento total. Kn 3 a Kn 8: Probabilidad de los nudos de ADN con diferente número de cruces (de 3 a 8).

2. Efectos del superenrollamiento del ADN en la formación nudos en la cromatina intracelular.

2.1. El superenrollamiento (+) y (-) del ADN afectan de manera diferente a la formación de nudos en la cromatina intracelular

Como se explicó en la introducción, durante la transcripción del ADN se genera superenrollamiento (+) y (-) en las regiones de cromatina por delante y por detrás de la polimerasa de ARN, respectivamente. En minicromosomas circulares, el superenrollamiento (+) y (-) del DNA producidos por transcripción se pueden cancelar mutuamente. Sin embargo, en los cromosomas celulares este superenrollamiento no se disipa tan fácilmente y tiene que ser relajado por topoisomerasas.

Para investigar el efecto del superenrollamiento en el anudamiento del ADN en la cromatina intracelular, provocamos un acúmulo de superenrollamiento positivo (S(+)) y superenrollamiento negativo (S(-)) del ADN en minicromosomas circulares de *S. Cerevisiae* tal como se describió en estudios anteriores de este laboratorio (Salceda *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2014). Brevemente, el S(-) se acumuló mediante la inactivación térmica de la topo II en cepas mutantes $\Delta top1 top2-4$ (Fernández *et al.*, 2014). En esas condiciones, la preferencia en la relajación de S(+) por la actividad residual de la topo II conduce a la acumulación del S(-) normalmente generado durante la transcripción de ADN. Del mismo modo, el S(+) se acumuló inactivando la topo II en la cepa $\Delta top1 top2-4$ que expresaba constitutivamente *TopA*, la topoisomerasa tipo-1A de *E.coli* (Salceda *et al.*, 2006). En esas condiciones, la topoisomerasa bacteriana es la única topoisomerasa activa y relaja selectivamente el S(-) generado durante la transcripción del ADN, lo que permite el acúmulo de S(+) (Figura R8).

Resultados

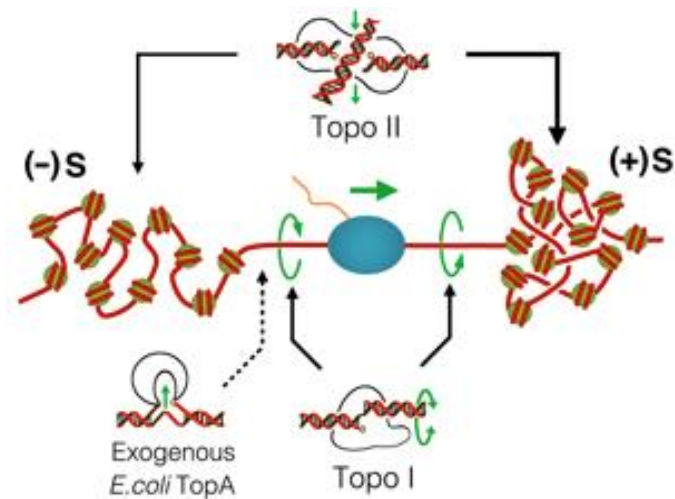


Figura R8. Actividades de la topoisomerasa que modulan el superenrollamiento del ADN en la cromatina intracelular. Topo I y topo II relajan el superenrollamiento (+) y (-) del ADN generado delante y detrás del complejo de transcripción. Como se explica con detalle en la Introducción, la topo I es más eficiente relajando zonas de ADN desnudo, cerca de la ARN polimerasa (azul), donde la rotación axial del dúplex puede ser rápida. Sin embargo, el mecanismo de inversión de cruces de ADN de la topo II se realiza en los cruces de ADN formados dentro de la fibra de nucleosomas y relaja principalmente S(+). En las células de levadura, la expresión exógena de la *TopA* relaja sólo el S(-) y, por tanto, conduce a la acumulación de S(+) cuando las topo I y topo II están inactivas.

El gel de electroforesis 2D en la figura R9A (arriba) muestra el típico patrón de topoisómeros de ADN obtenido una vez fijada la topología del ADN del minicromosoma circular YRP4 en las cepas $\Delta top1 top2-4$ y $\Delta top1 top2-4 TopA+$. Como se describió en Material y Métodos, los topoisómeros se distribuyen a lo largo de un arco en el cuál su valor de Lk incrementa en el sentido de las agujas del reloj (Figura M5).

En ausencia de superenrollamiento (carriles 1 y 3), la distribución de Lk tiene valor negativo respecto al ADN desnudo debido a los superenrollamientos negativos estabilizados por los nucleosomas nativos, tal como se explicó en los experimentos de la Figura R1. En este estado, la acumulación de S(-) se evidencia por un desplazamiento de la distribución de Lk en un sentido contrario a las agujas del reloj (carril 2) mientras que el S(+) produce un desplazamiento en el sentido de las agujas del reloj (carril 4).

Resultados

Para evaluar la presencia de nudos de ADN, incubamos las mismas muestras analizadas en la Figura R9 (arriba) con la endonucleasa que produce *nicks* y las examinamos en otra electroforesis en gel 2D. Tal como muestra la figura R9 (abajo), el acumulo de S(-) no se asoció a un cambio significativo en la formación de nudos. Sin embargo, el acumulo de S(+) se asoció a un gran aumento de intensidad de las señales de anudamiento.

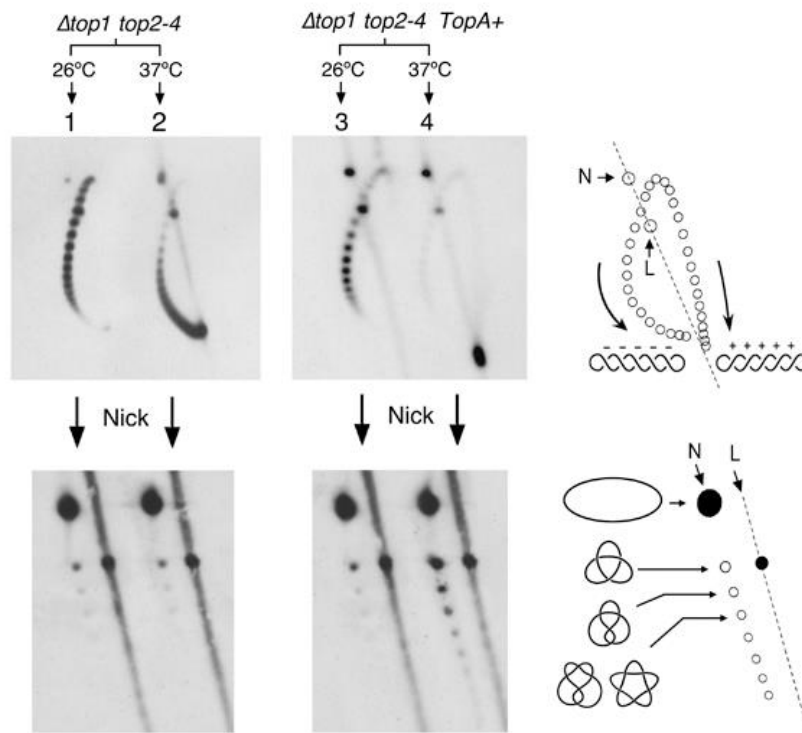


Figura R9. Superenrollamiento (-) y (+) del ADN y probabilidad de anudamiento del ADN en cromatina intracelular. Formas superenrolladas y anudadas del ADN del minicromosoma circular de levadura YRp4 (4.5 kb), en células $\Delta top1 top2-4$ a 26 °C (carril 1) y después de incubarlas 120 min a 37 °C (carril 2); y en células $\Delta top1 top2-4 TopA+$ a 26 °C (carril 3) y tras incubarlas 120 min a 37 °C (carril 4). Los paneles de arriba corresponden a electroforesis 2D para analizar la distribución de Lk y fueron llevados a cabo tal como se detalla en Material y Métodos. El esquema (derecha arriba) ilustra el desplazamiento de la distribución de topoisómeros Lk (puntos blancos) una vez acumulado S(+) y S(-). N, anillos de ADN con *nick*. L, moléculas de ADN lineal. Los paneles de abajo muestran las mismas muestras que los carriles 1-4 una vez tratado el ADN con la endonucleasa Nt.BstNBI (NEB). La electroforesis 2D para detectar los nudos se llevó a cabo tal como se detalla en Material y Métodos. El esquema

Resultados

(derecha abajo) indica la posición de poblaciones de nudos ADN (puntos blancos) según su número de cruces irreducibles ascendente ($kn\#$). El nudo de trébol (3_1), el nudo de cuatro cruces (4_1) y los dos nudos de cinco cruces (5_1 y 5_2) están indicados. N, anillos de ADN no anudados. L, moléculas de ADN lineales.

Al calcular la probabilidad de anudamiento (K^p) del minicromosoma YRP4 en células $\Delta top1 top2-4$ y $\Delta top1 top2-4 TopA+$ (Figura R10A), se observó que antes de la acumulación de superenrollamiento en el ADN, K^p era de aproximadamente 0,025, un valor similar al observado previamente en minicromosomas en cepas $TOP1 TOP2$ (Figura R1). Cuando el minicromosoma acumuló S(-), el valor de K^p no cambió. Sin embargo, la K^p aumentó aproximadamente 10 veces cuando se acumuló S(+) (Figura R10A).

Para corroborar que todas las poblaciones de ADN que aumentaban eran formas anudadas, se incubaron las muestras de ADN con topo I y topo II *in vitro*. Como se esperaba, la topo I no produjo ningún cambio, mientras que la topo II convirtió la población de nudos (kn) en anillos no anudados (N) (Figura R11B).

Los experimentos anteriores indicaron que la inactivación de la topo II en las células $\Delta top1 top2-4 TopA+$ produce la acumulación de S(+) y de moléculas de ADN anudadas. Para descartar que este aumento de la K^p pudiera ser consecuencia de la expresión de *TopA*, se examinó la formación de nudos en células $TOP1 TOP2$ con y sin *TopA*. Claramente, la expresión de *TopA* no producía el incremento de K^p (Figura R10C).

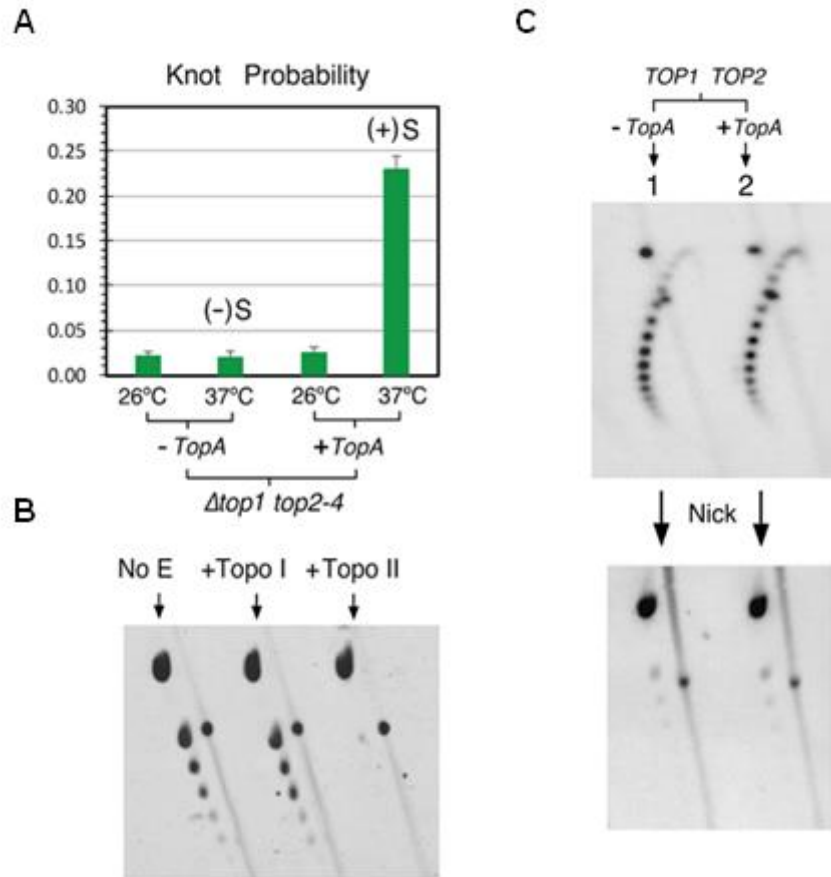


Figura R10. Efecto del superenrollamiento (+) del ADN en la probabilidad de anudamiento del ADN en cromatina intracelular. (A) K^p del ADN en células $\Delta top1 top2-4$ y $\Delta top1 top2-4 TopA+$ tras la inactivación de la topoisomerasa II (26°C a 37°C). (B) Efecto *in vitro* de las actividades de topo I y topo II en nudos de ADN producidos tras la acumulación de S(+) (carril 4 en Figura R9). (C) Efecto de la expresión de *TopA* en la formación de nudos. El ADN extraído de células *TOP1 TOP2* con y sin *TopA* (carriles 1 y 2) se analizó como en la figura R10.

De igual modo, para excluir que los cambios de K^p observados no se debieran a una singularidad del minicromosoma YRp4 (el minicromosoma de 4.4 kb analizado en la Figura R10), realizamos experimentos análogos con otros constructos, como el plásmido endógeno 2-micras y el minicromosoma YEp24. En todos los casos, el S(-) tuvo poco efecto en K^p , mientras que el S(+) se asoció a un incremento de K^p de unas 10 veces, tal como en YRp4 (Figura R11).

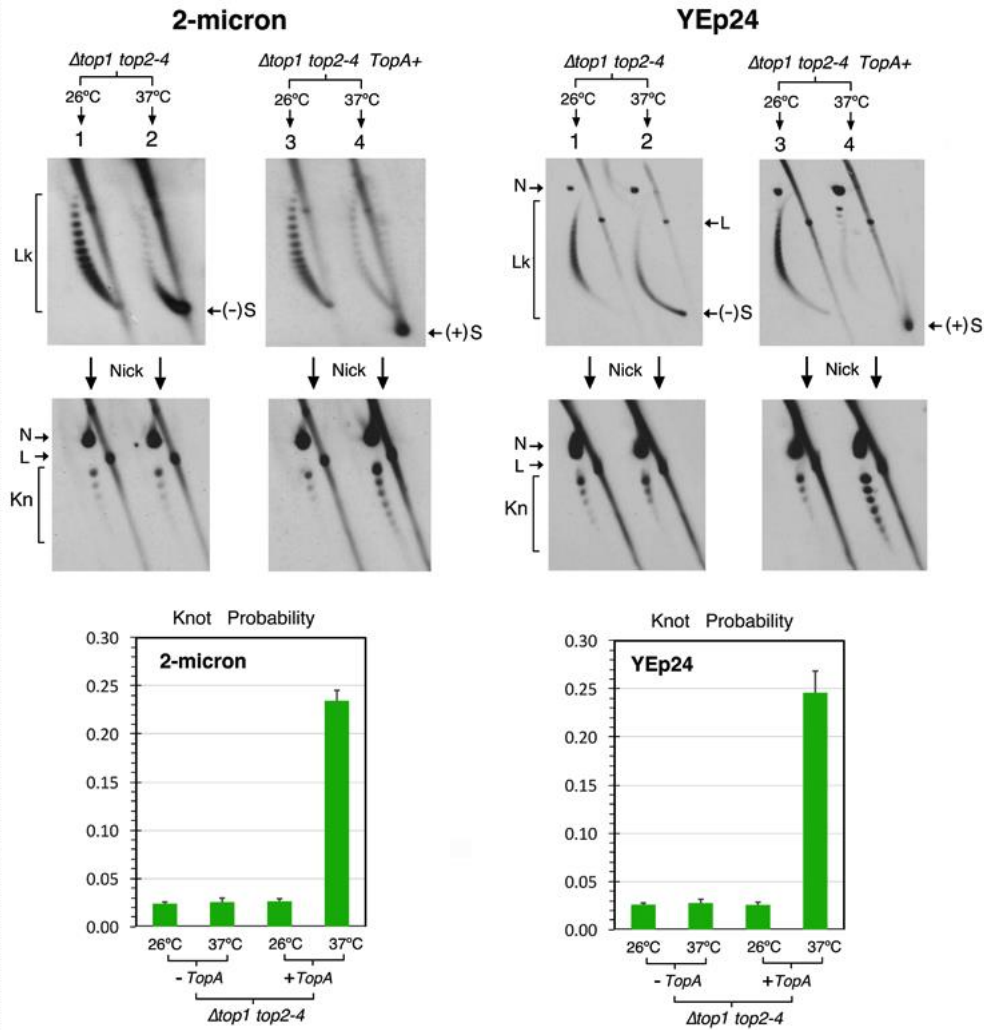


Figura R11. Anudamiento de distintos minicromosomas circulares de levadura tras la acumulación de S(-) y S(+). Cepas de levadura conteniendo el plásmido endógeno 2-micras (6.3 kb) y transformadas con el minicromosoma circular YEp24 (7.8 kb). El ADN total fue extraído de células $\Delta top1 top2-4$ a 26 °C (carril 1) y después de incubarlas 120 min a 37 °C (carril 2); y en células $\Delta top1 top2-4 TopA+$ a 26 °C (carril 3) y tras incubarlas 120 min a 37 °C (carril 4). Los paneles de arriba corresponden a electroforesis 2D para analizar la distribución de Lk y fueron llevados a cabo tal como se detalla en Material y Métodos. Los paneles de abajo muestran las mismas muestras que los carriles 1-4 una vez tratado el ADN con la endonucleasa Nt.BstNBI (NEB). La electroforesis 2D para detectar los nudos se llevó a cabo tal como se detalla en Material y Métodos. Lk, distribución de número de enlace de topoisómeros de ADN. (-)S y (+)S, ADN con un alto grado de superenrollamiento negativo y positivo, respectivamente. Kn, formas de ADN anudado. N, círculos de ADN no anudados. L, moléculas de ADN lineal. Las gráficas muestran la probabilidad de anudamiento del ADN de los minicromosomas 2-micras y YEp24 tras la acumulación de S(-) y S(+) (media y \pm SD de dos experimentos).

2.2. El superenrollamiento (+) del ADN aumenta la probabilidad y complejidad de anudamiento del ADN

Para corroborar que la formación de nudos era consecuencia del S(+), se comparó la tasa de acumulación de moléculas superenrolladas (+) con la tasa de moléculas anudadas recogiendo muestras en diferentes momentos después de la inactivación de la topo II (Figura R12A). Como se esperaba, se observó que la K^p aumentaba rápidamente tan pronto como empezaban a acumularse moléculas con S(+), pero no antes. Sin embargo, el rápido incremento de K^p no era paralelo con la continua acumulación de moléculas con S(+). La fracción de moléculas anudadas alcanzaba un máximo (K^p aproximadamente de 0,25) 30 min después de la inactivación de la topo II, cuando no más del 50% de los minicromosomas estaban con S(+) (Figura R12B). Estas diferentes cinéticas de acumulación eran explicables al considerar que el S(+) y el anudamiento de los minicromosomas se producen por mecanismos distintos. Una vez inactivada térmicamente la topo II en las células $\Delta top1 top2-4 TopA+$, sólo el S(-) generado durante la transcripción es relajado por la *TopA*. Esta relajación asimétrica puede continuar hasta que prácticamente todos los minicromosomas acaban con S(+). En cambio, los valores de K^p resultan del equilibrio de anudamiento y desanudamiento del ADN mantenido por la actividad de la topo II. Cuando empieza a acumularse S(+), la actividad residual de la topo II permite que la K^p aumente rápidamente. Pero cuando la topo II queda completamente inactivada (tras unos 30 min) la actividad de anudamiento y desanudamiento se para, mientras S(+) puede seguir acumulándose. En este sentido, si consideramos que K^p era aproximadamente de 0,25 cuando sólo un 50% de minicromosomas estaban con S(+), la K^p real producida por S(+) sería cercana a 0.5 (Figura R12B).

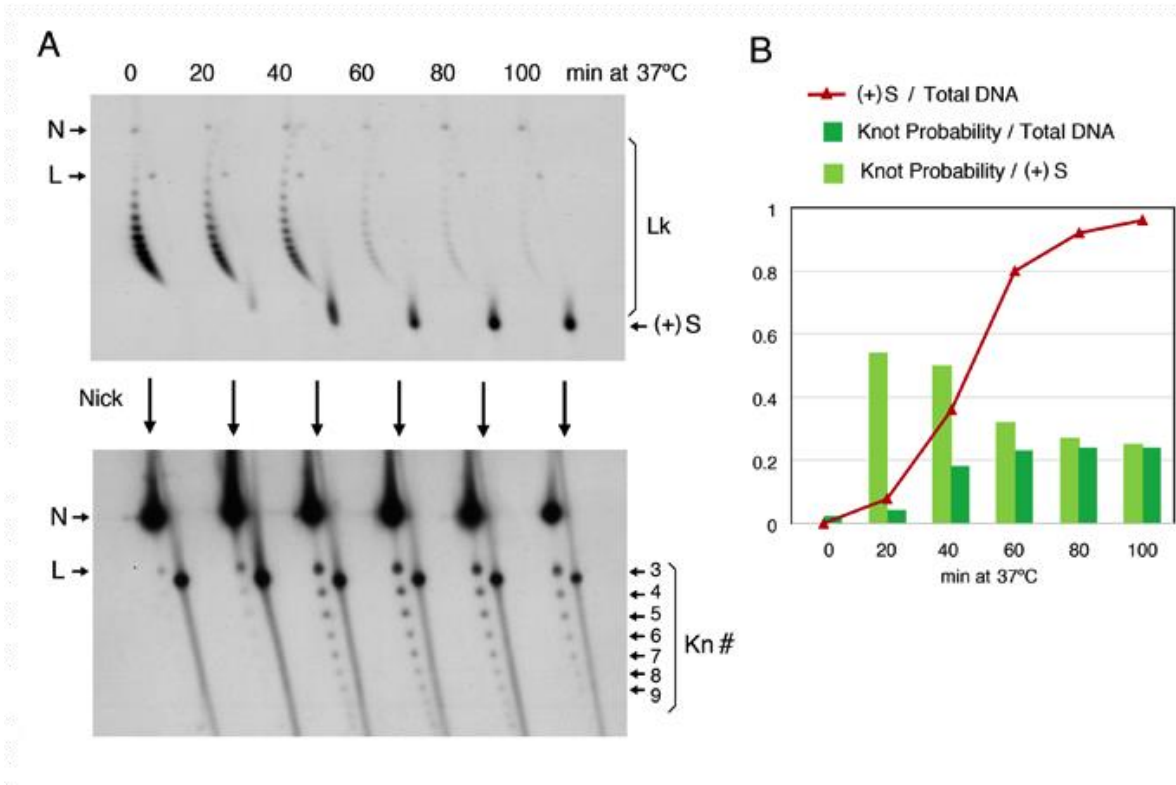


Figura R12. Correlación entre S(+) y el incremento en la probabilidad de anudamiento. (A) Células de levadura $\Delta top1 top2-4 TopA+$ transformadas con el minicromosoma YRp4 crecieron a 26 °C, y se extrajeron muestras en diferentes tiempos (min) tras incubarlas a 37 °C. La electroforesis 2D para examinar la acumulación de S(+) (panel superior) y el incremento en la formación de nudos (panel inferior) en YRp4 se llevó a cabo como se detalla en Material y Métodos. N, círculos de ADN no anudados. L, moléculas de ADN lineal. Lk, topoisómeros de número de enlace. (+)S, ADN superenrollado positivamente. Kn#, número de cruces irreducibles de ADN anudado. (B) Gráfica de la acumulación de ADN superenrollado (rojo) y la probabilidad de anudamiento del ADN en relación con el ADN total (verde oscuro) y con las fracciones de S(+) (verde claro).

Finalmente, se examinó si el S(+) de la cromatina alteraba también la complejidad de los nudos producidos. Para ello se comparó la abundancia relativa de las poblaciones de nudos de diferente valor de kn# antes y después de la acumulación de S(+) (Figura R13A). En ambas condiciones, el nudo de trébol (3_1) fue la forma predominante y la abundancia de los nudos más complejos disminuyó al aumentar su valor de kn#. Sin embargo, mientras que el nudo 3_1 representó >70% de las moléculas anudadas en la cromatina relajada, la cantidad relativa del nudo 3_1 fue del 45% en la cromatina con S(+) con el consiguiente aumento de los nudos más complejos (kn# >3). Por lo tanto,

el aumento de K^p inducido por S(+) se basaba en buena parte en un aumento de nudos complejos (Figura R13B).

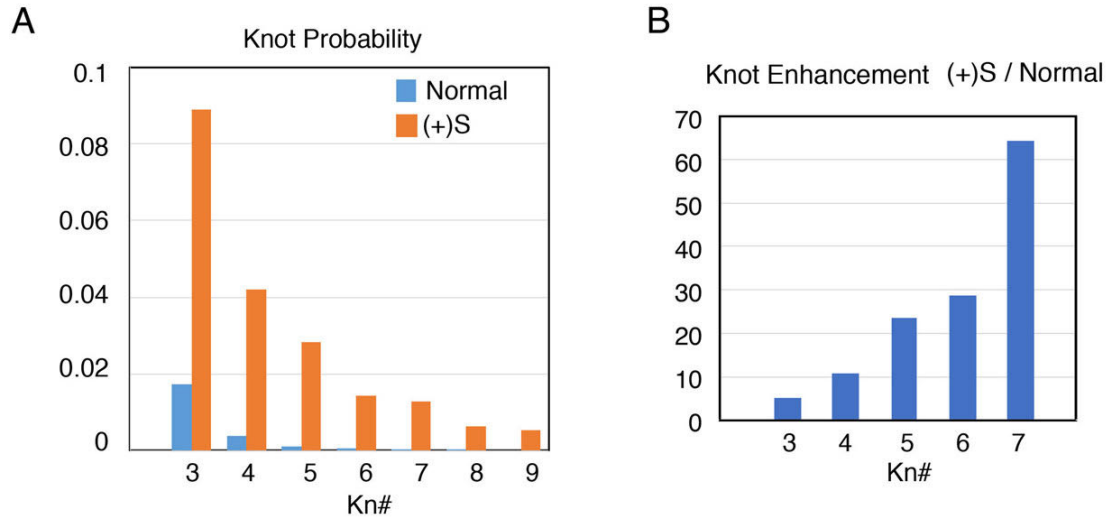


Figura R13. Correlación entre S(+) y el incremento en la complejidad de anudamiento. (A) Gráfica de la probabilidad de poblaciones individuales de nudos de kn# = 3 a 9 en ausencia de S(+) (azul) y una vez acumulado S(+) (naranja) en relación con el ADN total. (B) Aumento relativo de las poblaciones individuales de nudos de kn# = 3 a 7 una vez acumulado S(+).

2.3. Los nudos de ADN se forman debido a la condensación de la cromatina inducida por el superenrollamiento (+)

Simulaciones computacionales de cadenas poliméricas aleatorias demuestran que la compresión aumenta notablemente la probabilidad y complejidad del anudamiento (Arsuaga *et al.*, 2002; Micheletti *et al.*, 2008). Por tanto, se planteó la hipótesis de que la condensación de la cromatina impulsada por el S(+) produciría el gran aumento del anudamiento del ADN. Para testar esta hipótesis, se inició una colaboración con el grupo del Dr. Cristian Micheletti (SISSA, Trieste) para realizar simulaciones computacionales de formación de nudos en cromatina y examinar el efecto de la condensación. Para obtener un modelo representativo de fibras de nucleosomas, se generaron primero conformaciones aleatorias de anillos de N esferas (nucleosomas) de diámetro D conectadas por segmentos rectos infinitamente delgados y de longitud L, de modo que la distancia entre los centros de dos esferas consecutivas era igual a

D+L. La Figura R14 muestra la probabilidad de formación de nudos en función de D/L en anillos de 25 esferas. A continuación, con esta simulación, se vió que la probabilidad de anudamiento del ADN de los minicromosomas que contienen alrededor de 25 nucleosomas (por ejemplo, YRp4) en ausencia de S(+) *in vivo* ($K^p \approx 0,02$) coincidía con un ratio D/L de 0,47. Satisfactoriamente, este ratio D/L estaba dentro de las dimensiones posibles de las fibras nucleosomales, es decir, nucleosomas de 10 nm de diámetro separados por regiones *linker* de 20-25 nm de promedio.

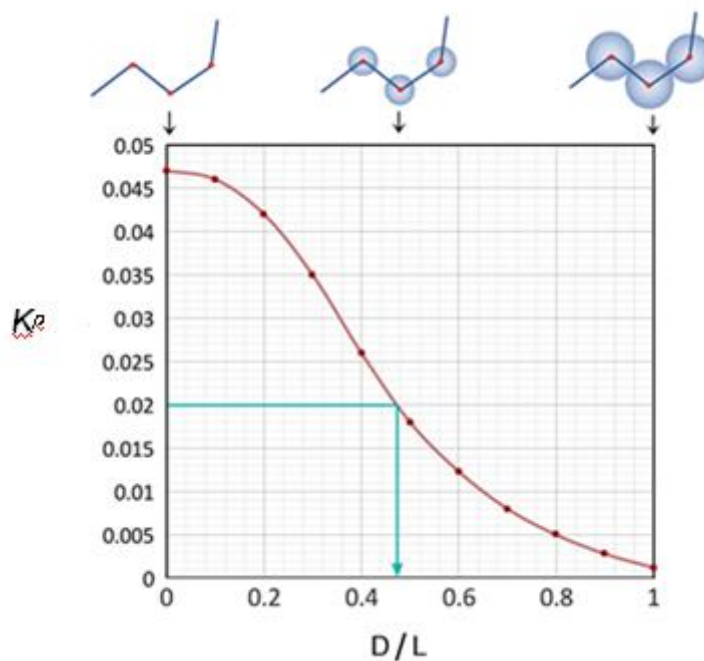


Figura R14. Probabilidad de anudamiento (K^p) de configuraciones aleatorias de anillos de $N = 25$ esferas de diámetro D conectadas por segmentos rectos infinitamente delgados y de longitud L , de modo que la distancia entre los centros de dos esferas consecutivas es igual a $D+L$. La K^p de la cromatina relajada *in vivo* ($K^p \approx 2$) se interpola y coincide con un ratio D/L de 0,47.

Utilizando como referencia el modelo de "collar de perlas" anterior como equivalente a la fibra de nucleosomas, se generaron millones de conformaciones aleatorias. Se comprobó entonces el impacto de la compresión de los collares en la formación de nudos. Para este fin, se establecieron varios valores de radio de giro (R_g^2) de las

configuraciones generadas al azar por computación y se calcularon las probabilidades de anudamiento de cada una considerando solo aquellas con un R_g^2 máximo (es decir, ocupando un volumen máximo). La figura R15A muestra la probabilidad de anudamiento calculada con los valores de R_g^2 , siendo el valor promedio de la distribución de probabilidad $R_g^2 = 1$ y su $K^p = 0,02$. Como se esperaba, la probabilidad de anudamiento aumentó exponencialmente al aumentar la compactación. El valor de K^p de aproximadamente 0,2 producido por el S(+) observada *in vivo* se alcanzó cuando los valores de R_g^2 eran 2-3 veces más pequeños que el promedio de R_g^2 de las conformaciones no compactadas. A continuación, se calculó el enriquecimiento relativo de poblaciones individuales de nudos (Kn#3, 4 y 5) para los diferentes niveles de compresión y se compararon con los datos *in vivo* (mostrados en la Figura R13B) Como muestra la figura R15B, los enriquecimientos de los nudos de Kn#3, 4 y 5 producidos por el S(+) se generaban con niveles de compresión similares, aproximadamente 2 veces más pequeños que el R_g^2 promedio. Los datos de las simulaciones apoyaban pues que los nudos de ADN observados en la cromatina son el resultado de la inversión aleatoria de cruces de ADN por la actividad de la topo II, y que el incremento en la formación y complejidad de los nudos producida por el S(+) del ADN era consecuente a una substancial compactación de la fibra nucleosomal (Figura R16).

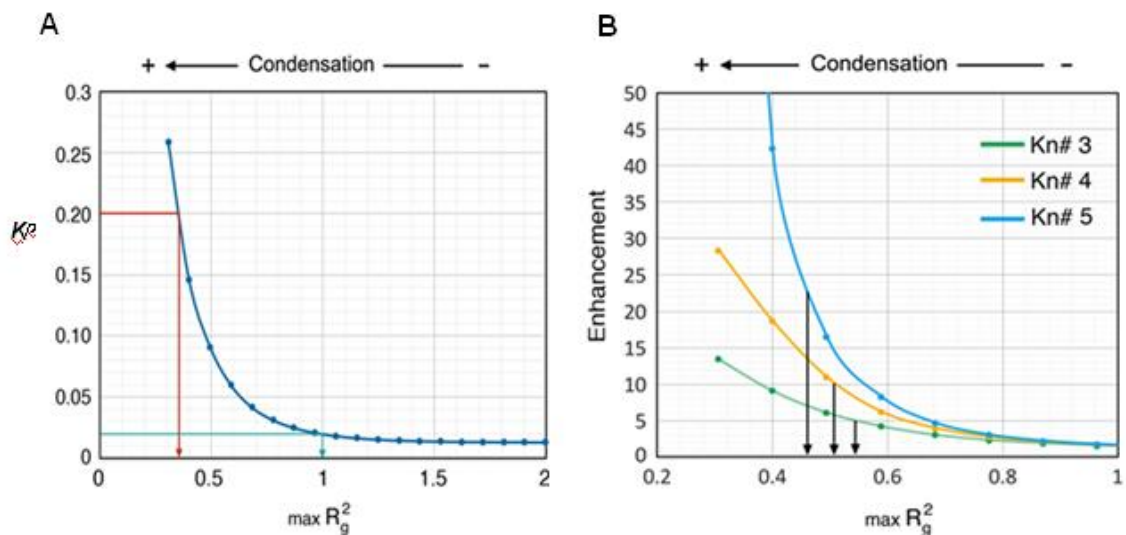


Figura R15. Simulaciones computacionales sobre el efecto de la condensación en la probabilidad de anudamiento del ADN en fibras de cromatina. (A) Valores de K^p del modelo de

referencia de la fibra nucleosomal ($N = 25$, $D/L = 0,47$) en función del radio de giro (R_g^2) de las configuraciones aleatorias. El radio de giro promedio de todas las configuraciones se normaliza como $R_g^2 = 1$. Cada punto calcula el valor de K^p de esas configuraciones con un radio de giro por debajo el un valor de corte ($\max R_g^2$). Los valores de K^p observados *in vivo* en la cromatina relajada ($K^p = 0,02$) y en la cromatina con S(+) ($K^p \geq 0,2$) se interpolan para obtener su correspondiente R_g^2 . (B) Enriquecimiento relativo de los tipos de nudos de $Kn\# = 3, 4$ y 5 en función de los valores de corte del radio de giro ($\max R_g^2$). Los enriquecimientos relativos de los tipos de nudo de $Kn\# = 3, 4$ y 5 observados *in vivo* (K^p de cromatina S(+)/ K^p de cromatina relajada) son interpoladas para obtener su R_g^2 correspondiente.

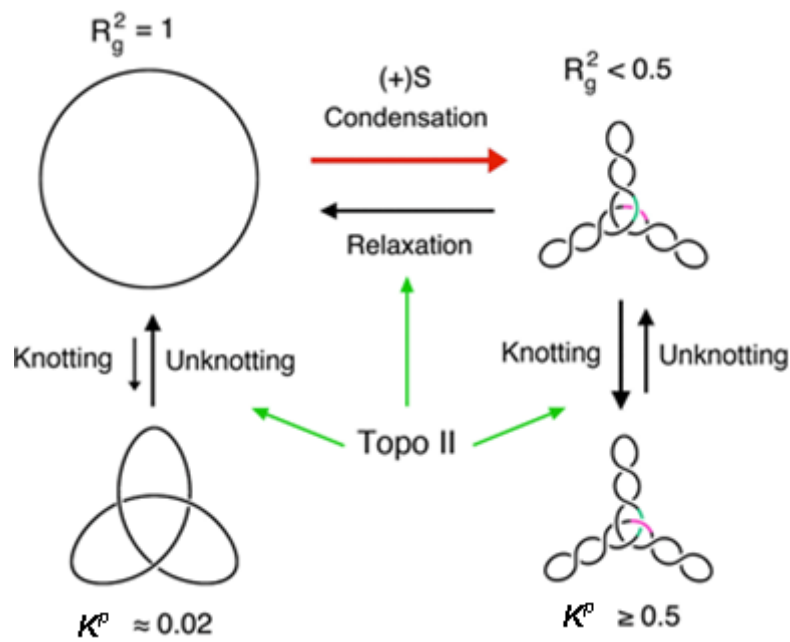


Figura R16. Resumen del modelo de la probabilidad de anudamiento del ADN mediada por la actividad de la topo II en cromatina relajada ($R_g^2 = 1$; $K^p \approx 0,02$) y cromatina condensada por S(+) ($R_g^2 \leq 0,5$; $K^p \geq 0,2$).

3. Estudio de la quiralidad de nudos de ADN in vivo

En los capítulos anteriores se ha descrito como la electroforesis en geles de agarosa permite determinar la probabilidad de anudamiento del ADN y caracterizar la complejidad de los nudos. La movilidad de los anillos de ADN en el gel depende de su compactación global. Por consiguiente, tras introducir *nicks* en el ADN para eliminar la contribución del superenrollamiento a la compactación molecular, las moléculas de ADN anudadas exhiben una velocidad en el gel que se correlaciona linealmente con la complejidad del nudo (Figura R17). En estas condiciones, cualquier nudo produce una compactación del ADN idéntica a su imagen especular. Por lo tanto, es imposible distinguir por este medio las dos formas quirales de cada nudos. Por ejemplo, el trébol de tres cruces negativos posee idéntica movilidad que del trébol de tres cruces positivos (Figura R17). Hasta ahora el único método para determinar la quiralidad de los nudos de ADN era visualizar el signo topológico de sus cruces mediante microscopía electrónica (Lynn y Crisona, 1999). Como ya se explicó en la introducción, este es un método complejo y no se puede aplicar para analizar nudos de ADN producidos en cromatina intracelular. Anteriormente, en esta tesis, hemos visto que los minicromosomas circulares que contienen nudos de ADN representan una pequeña fracción (<0.03%) del contenido de ADN intracelular, lo que hace imposible su purificación y posterior manipulación. Esto nos dirigió a desarrollar un procedimiento alternativo que nos permitiera determinar su quiralidad.

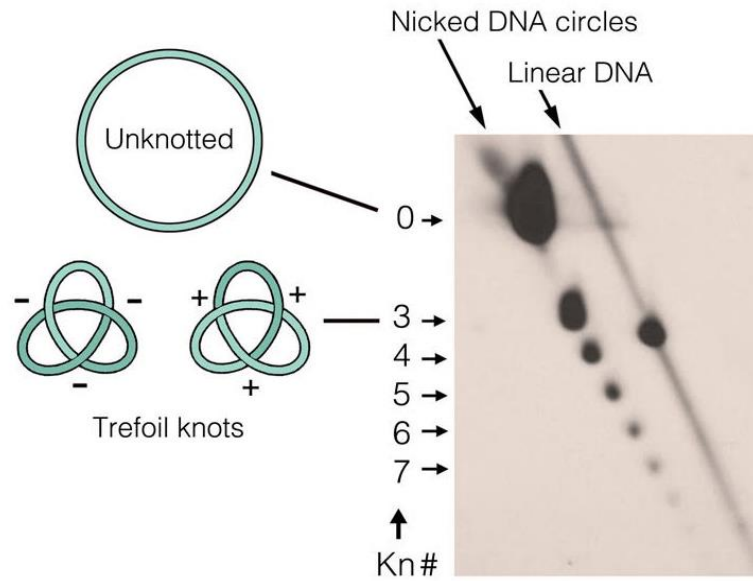


Figura R17. Movilidad de las dos formas quirales de un nudo en moléculas covalentemente abiertas (con *nicks*). El Southern-blot del gel 2D muestra el ADN del minicromosoma YRp4 extraído *in vivo* y después de ser tratado con la endonucleasa Nt.BstNBI (NEB) para eliminar el superenrollamiento y así con ello la distribución de topoisómeros Lk. Las condiciones de electroforesis están descritas en Material y Métodos (Tabla M1). Como las moléculas anudadas retenían su compactación molecular después de tratarlas con la endonucleasa, éstas se mueven más rápido que las formas no anudadas que contienen *nicks* (0), y su velocidad correlaciona linealmente con la complejidad del nudo. Las posiciones de los nudos conteniendo de 3 a 7 cruces irreducibles de ADN (kn) están indicadas. Ya que cualquier nudo tiene la compactación idéntica que su imagen especular, mediante este método no es posible distinguir los nudos de trébol con tres cruces negativos de los tréboles con tres cruces positivos.

3.1. Enfoque teórico para discernir la quiralidad de nudos de ADN mediante electroforesis.

Cuando los anillos de ADN de doble hebra que contienen un nudo están covalentemente cerrados (no tienen *nicks*), las moléculas de ADN conforman una distribución de número de enlace (Lk). Por tanto, las moléculas anudadas pueden adquirir diferentes grados de superenrollamiento que contribuyen también a la compactación de ADN y su movilidad en el gel. En estas condiciones, Shaw y Wang (1997) observaron que el superenrollamiento del ADN cambia levemente la conformación espacial de las dos formas quirales de los nudos 3_1 y, por tanto, su

comportamiento electroforético. Shaw y Wang observaron que el superenrollamiento negativo hacía que los topoisómeros Lk de tréboles con cruces negativos migraran ligeramente más rápido que el de los tréboles con cruces positivos, mientras que el superenrollamiento positivo producía el efecto opuesto. En consecuencia, después de una larga electroforesis, las dos formas quirales del nudo 3_1 llegaban a separarse en un doblete para cada valor de la distribución Lk del ADN superenrollado (Figura R18).

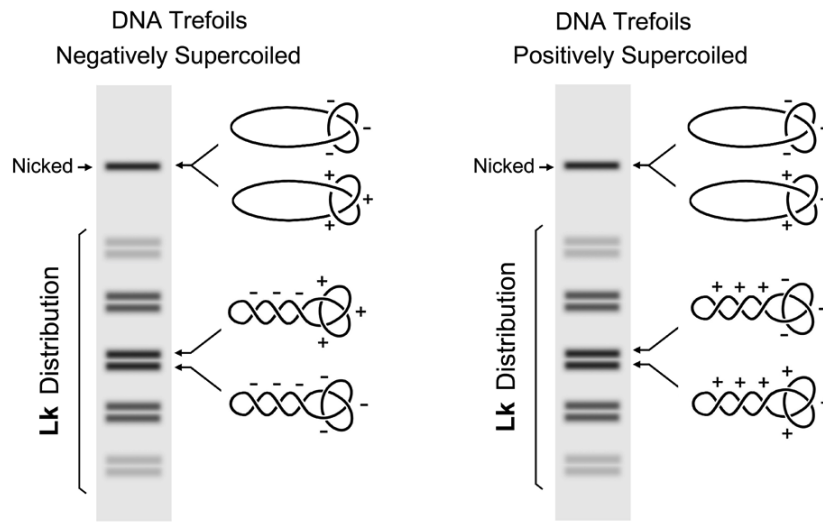


Figura R18. Movilidad electroforética de las dos formas quirales del nudo 3_1 en ADN superenrollado. El esquema ilustra las observaciones de Shaw y Wang (1997) sobre la movilidad electroforética de las dos formas quirales del nudo 3_1 con superenrollamiento negativo y positivo. Las moléculas de ADN superenrolladas forman una distribución de topoisómeros de ADN (Lk), en la cuál las dos formas quirales del nudo 3_1 se separan en un doblete para cada valor de Lk. Cuando el DNA está superenrollado negativamente durante la electroforesis (izquierda), el trébol negativo en cada doblete migra por delante del trébol positivo. Cuando el ADN está superenrollado positivamente (derecha) ocurre el efecto opuesto.

Para observar el doblete de las formas quirales del nudo 3_1 , Shaw y Wang purificaron primero en gran cantidad tréboles de ADN (producidos *in vitro* y con *nicks*) extrayéndolos de un gel. Después ajustaron el superenrollamiento del ADN y lo cargaron en la electroforesis. Si no se purificaran, las señales de los tréboles quedarían enmascaradas por las moléculas de ADN no anudadas y las formas de ADN lineal. Por tanto, este procedimiento no era aplicable a muestras biológicas que contienen cantidades pequeñas de moléculas anudadas, lo que imposibilita su purificación. Para superar este problema, consideramos la posibilidad de que las

distribuciones de Lk de anillos de ADN anudados y no anudados se pudieran separar entre sí mediante electroforesis bidimensional (2D) en presencia de cloroquina (Roca *et al.*, 1993). Esto era posible porque el desenrollamiento del ADN mediante intercalantes modifica la compactación molecular producida por el superenrollamiento (Hanai & Roca, 1996), pero no modifica la compactación producida por el anudamiento. Como resultado, estudios previos (Roca *et al.*, 1993) ya habían mostrado que los anillos de ADN que contienen un nudo forman un arco de topoisómeros Lk distinto al formado por los anillos no anudados. Según la complejidad del nudo, el arco de Lk se mueve más rápido en la primera y en la segunda dimensión de la electroforesis (Figura R19).

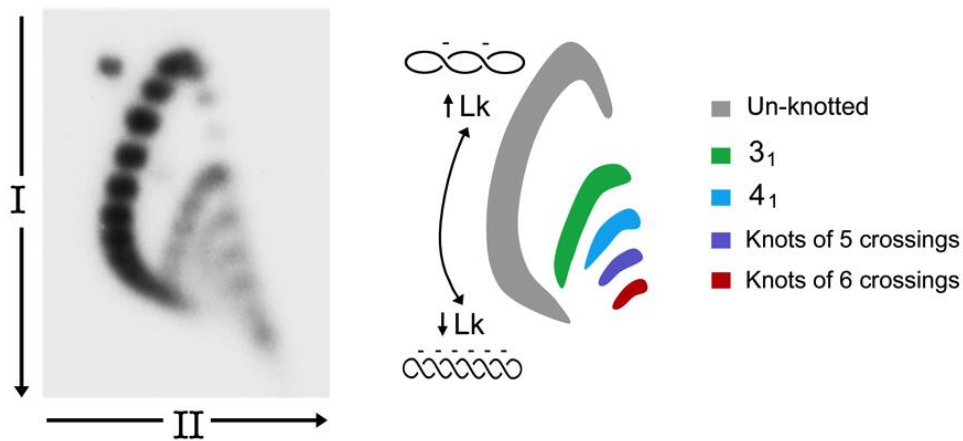


Figura R19. Separación de las distribuciones de Lk de ADN anudado y no anudado mediante electroforesis 2D. El Southern-blot del gel 2D muestra un plásmido negativamente superenrollado de 3.2 kb que se incubó con un exceso molar de topoisomerasa II para promover la formación de nudos de ADN como se describe en Material y Métodos. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1% en tampón TBE (100mM Tris-borato, pH 8.3, 2mM EDTA) más 0.2 y 2 µg/ml de difosfato de cloroquina respectivamente en la primera (de arriba abajo, 60V, 16h) y en la segunda dimensión (de izquierda a derecha, 60V, 8h). El esquema de colores indica la posición en el gel de la distribución de Lk del plásmido no anudado y de los plásmidos anudados que contienen nudos de 3, 4, 5 y 6 cruces irreducibles.

Combinando las observaciones anteriores de Shaw & Wang (1997) y Roca *et al.* (1993), se pensó en un método electroforético 2D capaz de resolver las dos formas quirales del nudo 3₁ sin necesidad de purificarlos. Para empezar, la superhelicidad de los anillos de ADN presentes en una muestra debería ajustarse, de tal manera que

formen una escalera de topoisómeros Lk superenrollados negativamente durante la primera dimensión de la electroforesis. Este ajuste podría lograrse modificando los valores de Lk del ADN con topoisomerasa I antes de la electroforesis ó incluyendo una concentración apropiada de cloroquina durante la primera dimensión del gel. Los topoisómeros Lk superenrollados negativamente deberían correr entonces en una larga primera dimensión de la electroforesis, de modo que las dos formas quirales del nudo 3_1 se resolvieran en un doblete para cada valor de Lk, tal como hicieron Shaw & Wang (1997). En este punto, los dobletes no serían visibles, ya que estarían tapados por formas no anudadas del ADN y fragmentos lineales, generalmente abundantes en las muestras biológicas. Se continuaría entonces con una segunda dimensión, que contendría una concentración de cloroquina que neutralice la compactación del ADN producida por los superenrollamientos negativos. Como resultado, los anillos anudados y no anudados con distintos valores de Lk que tenían una compactación similar en la primera dimensión, adquirirán una movilidad diferente en la segunda dimensión. El doblete de los nudos trébol de ADN debería entonces hacerse visible para la cuantificación (Figura R20).

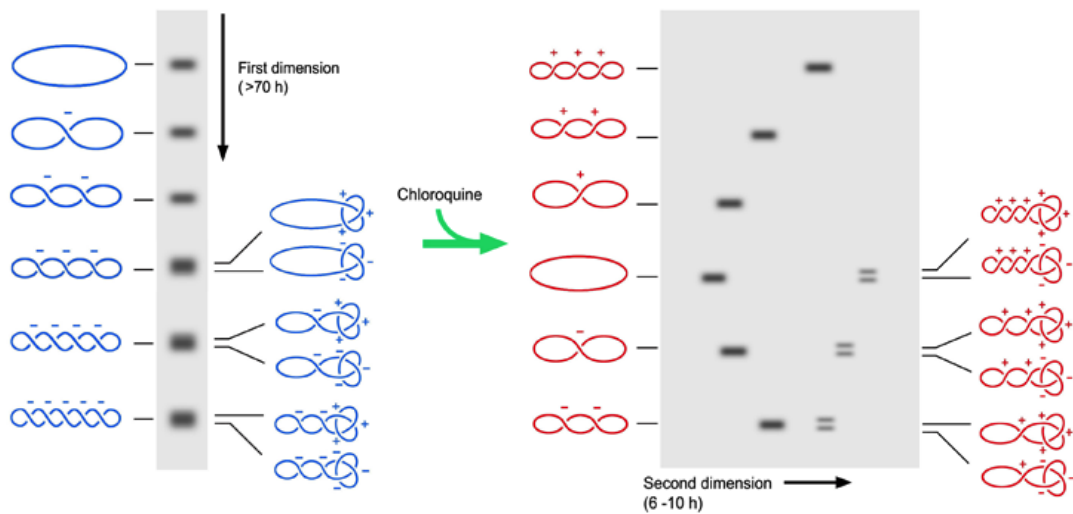


Figura R20. Estrategia para discernir la quiralidad de los nudos de trébol directamente mediante electroforesis a partir de muestras complejas de ADN. El esquema de la izquierda muestra como después de correr una larga primera dimensión en una electroforesis (>70h de arriba abajo), los topoisómeros negativamente superenrollados con un trébol negativo migran ligeramente por delante que los que poseen un trébol positivo (Shaw y Wang. 1997). Un doblete de formas quirales se resuelve con cada valor de Lk de los anillos de ADN. Sin embargo, este doblete está enmascarado por los topoisómeros Lk de las moléculas de ADN no anudadas. El esquema de la derecha muestra el resultado después de correr la

segunda dimensión (de izquierda a derecha) en presencia de una concentración adecuada de cloroquina. Debido a la intercalación de la cloroquina en el ADN, el paso de hélice del ADN (T_w) disminuye y el número de enrollamiento (W_r) aumenta (se hace menos negativo o más positivo). La conformación de moléculas de ADN durante la primera dimensión (moléculas azules) cambia de este modo durante la segunda dimensión (moléculas rojas). Como resultado, moléculas anudadas y no anudadas que tenían una compactación y movilidad similar en la primera dimensión, adquieren una velocidad diferente en la segunda. Los dobletes de las formas quirales del nudo de trébol deberían verse entonces para su análisis cuantitativo.

3.2. Quiralidad de los nudos de trébol de ADN generados *in vitro*.

Para probar el método descrito anteriormente, se examinó primero la pequeña fracción de nudos de trébol que se forman normalmente tras la circularización de moléculas de ADN lineales en solución libre como se detalla en Material y Métodos. Estudios previos habían demostrado que cuando el ADN en disolución libre se circulariza al azar produce cantidades equivalentes de las dos formas quirales de tréboles de ADN (Shaw y Wang, 1997). Tras la circularización de una molécula de ADN de 4.4kb con T4 ligasa, se obtuvo aproximadamente 0.85% de anillos conteniendo un nudo de trébol (Figura M5). Luego se incubó el ADN circularizado con topoisomerasa I en presencia de 250 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina para producir las escaleras de topoisómeros de Lk superenrollados negativamente y adecuadas para resolver las dos formas quirales del nudo de trébol superenrollado. En Material y Métodos se describe como se calibraron las concentraciones adecuadas de cloroquina (Figura M2).

La muestra de ADN circularizado y superrollado se analizó mediante electroforesis 2D en gel de agarosa usando los parámetros que deberían exponer el doblete de los tréboles de ADN (Figura R20). Como se muestra en el gel 2D de la Figura R21B, la mayoría de los anillos de ADN de 4.5kb mostraron una distribución gaussiana de topoisómeros Lk superenrollados negativamente en la primera dimensión del gel. Durante la segunda dimensión del gel en presencia de cloroquina, las moléculas anudadas y no anudadas adquirieron una movilidad diferente y, como de esperaba, se reveló un arco secundario más débil de topoisómeros Lk que contenían un nudo de trébol. Tal como se deseaba, los topoisómeros Lk del trébol aparecieron como dobletes. Ya que los dobletes tenían la misma intensidad, quedaba así demostrada la presencia de igual cantidad de las dos formas quirales mediante este nuevo método (Figura R21B).

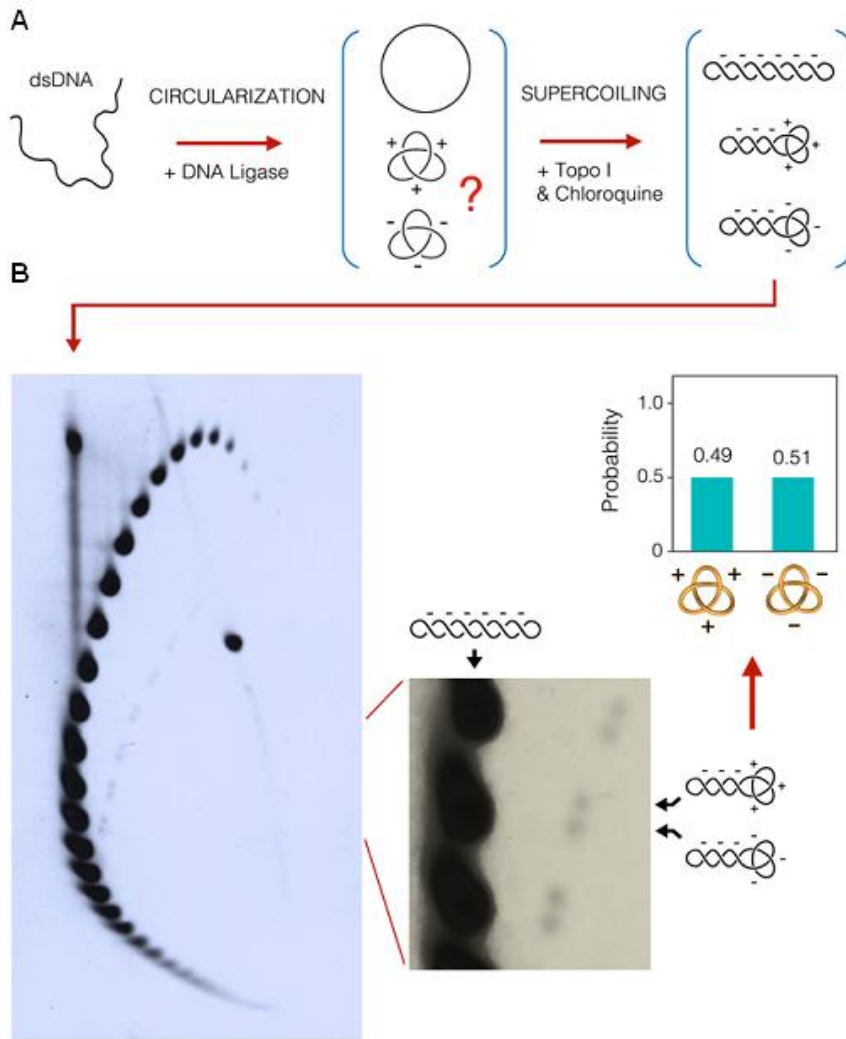


Figura R21. Quiralidad de los tréboles de ADN producidos *in vitro* mediante circularización de ADN lineal. (A) Esquema de la producción de moléculas de ADN negativamente superenrolladas que contienen fracciones iguales de las dos formas quirales del nudo de trébol. Tras la circularización de ADN lineal en solución libre con T4 ADN ligasa, se introdujeron superenrollamientos negativos incubando el ADN con topoisomerasa I en presencia de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloroquina. (B) Southern blot del gel 2D del plásmido YRp4 (4,5 kb) preparado como se describe en A. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa al 0,9% en tampón (Tris-borato 100 mM, pH 8,3, EDTA 2 mM). La primera dimensión del gel (de arriba a abajo) se llevó a cabo a 80 V durante 70 h. La segunda dimensión del gel (de izquierda a derecha) contenía 0,65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloroquina y se llevó a cabo a 120 V durante 10 h. En la ampliación del gel se puede ver el doblete con las dos formas quirales del nudo de trébol. La gráfica muestra la probabilidad de cada forma quiral del nudo de trébol.

Ya que los tréboles de ADN estaban superenrollados negativamente durante la primera dimensión, la banda más rápida de cada doblete según Shaw & Wang debería corresponderse con el trébol de cruces negativos. Para comprobar que esto era correcto se hizo otro experimento. Se incubó un plásmido de 4.5kb superenrollado negativamente con un exceso molar de topoisomerasa II y AMPPNP, tal como se detalla en Material y Métodos. En estas condiciones, la topoisomerasa interconecta las ramas plectonómicas del ADN superenrollado, lo que lleva a la formación de abundantes nudos de trébol con cruces negativos (Figura R22A). En este caso, ya que los nudos producidos ya estaban superenrollados negativamente, simplemente se añadió una pequeña concentración de cloroquina durante la primera dimensión de la electroforesis para resolverlos en una escalera de topoisómeros Lk. Como se muestra en el gel 2D de la Figura R22B, las moléculas que contienen un nudo de trébol formaron también un arco secundario de topoisómeros Lk. Sin embargo, en este caso, casi toda la señal se concentró en la banda más rápida de cada doblete, confirmando así que se trata de los tréboles de cruces negativos (Figura R22B).

Resultados

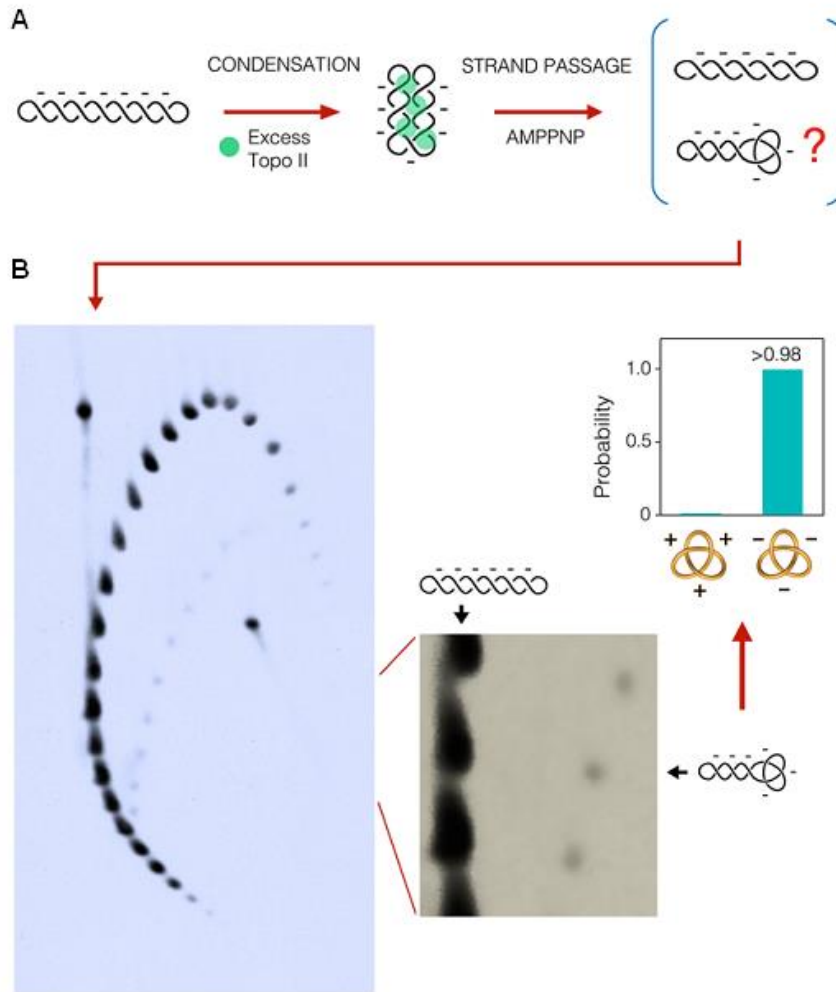


Figura R22. Quiralidad de los tréboles de ADN producidos *in vitro* mediante incubación de ADN superenrollado negativamente con exceso de topo II. (A) Tras incubación de ADN negativamente superenrollado con un exceso molar de topoisomerasa II, la adición de AMPPNP (análogo de ATP no hidrolizable) induce eventos de transporte de ADN en una sola etapa que enredan el ADN superenrollado. (B) Southern blot del gel 2D del plásmido YRp4 (4,5 kb) preparado como se describe en A. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa al 0,9% en tampón (Tris-borato 100 mM, pH 8,3, EDTA 2 mM). La primera dimensión del gel (de arriba a abajo) contenía 1 $\mu\text{g/mL}$ de cloroquina y se corrió a 80 V durante 70 h. La segunda dimensión del gel (de izquierda a derecha) contenía 5 $\mu\text{g/mL}$ de cloroquina y se corrió a 120 V durante 10 h. En la ampliación del gel se puede que casi toda la señal se concentró en la banda más rápida, que corresponde con los tréboles de cruces negativos. La gráfica muestra la probabilidad de cada forma quiral del nudo de trébol.

3.3. Quiralidad de los tréboles de ADN generados *in vivo*

Una vez validado el método, se utilizó para conocer la quiralidad de los nudos de ADN generados en células vivas. Al igual que lo demostrado en esta tesis con *S. cerevisiae*, estudios previos habían demostrado que plásmidos de ADN extraídos de células de *E. coli* también contienen pequeñas cantidades de nudos, mayoritariamente tréboles (Ishii *et al.*, 1991; Shishido *et al.*, 1987). En estos experimentos, los nudos se detectaron por electroforesis de círculos de ADN tras introducir *nicks* pero no se pudo determinar su quiralidad.

Por tanto, para esta tesis se transformaron células de *E. coli* y *S. cerevisiae* con el plásmido YRp4 (4.4 kb), el cual puede replicarse en ambos sistemas celulares. Se extrajo el ADN de las bacterias y levaduras como se describe en Material y Métodos, se realizó la electroforesis 2D y se hibridó con sonda del plásmido YRp4. Las Figuras R23 y R24 muestran los resultados. En ambos casos se puede observar un arco secundario de moléculas de ADN que contienen el nudo de trébol en forma de doblete. Sin embargo, en *E. coli* el 92% de los tréboles fueron negativos (Figura R23), mientras que el número de tréboles positivos y negativos fue más equilibrado en el caso de *S. cerevisiae* (Figura R24). Los resultados de *E. coli* indicaron un predominio de quiralidad negativa en la trayectoria del ADN *in vivo*, que muy probablemente es reflejo del superenrollamiento negativo no estabilizado que se mantiene habitualmente en la cromatina bacteriana. Por el contrario, los resultados de *S. cerevisiae* revelaron la ausencia de una quiralidad dominante en la trayectoria espacial del ADN en la fibra de cromatina, ya que la mayoría del superenrollamiento negativo se encuentra estabilizado por los nucleosomas.

Resultados

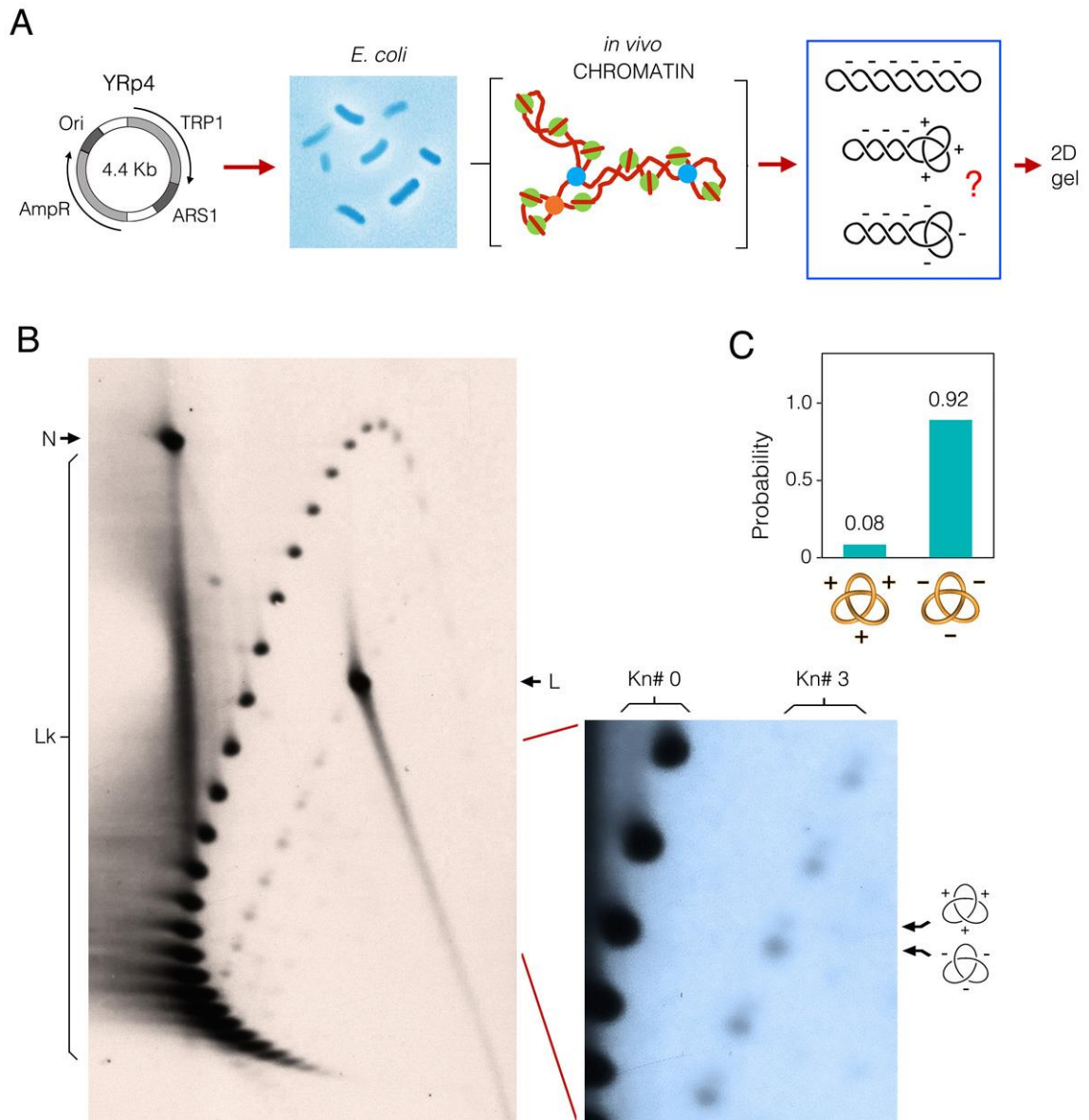


Figura R23. (A) Se recolectaron células de *E. coli* que contenían el plásmido YRp4 de 4.5 kb y se extrajo su DNA para análisis electroforético en gel de agarosa. (B) Southern blot del gel 2D. La primera dimensión del gel (de arriba abajo) contenía 1,5 $\mu\text{g/mL}$ de cloroquina y se corrió a 80 V durante 70 h. La segunda dimensión del gel (de izquierda a derecha) contenía 8 $\mu\text{g/mL}$ de cloroquina y se corrió a 120 V durante 10 h. En la ampliación del gel se puede ver el arco de las moléculas no anudadas Kn#0 y el arco con los dobletes de tréboles Kn#3. (C) La gráfica muestra la probabilidad de cada forma quiral del nudo de trébol.

Resultados

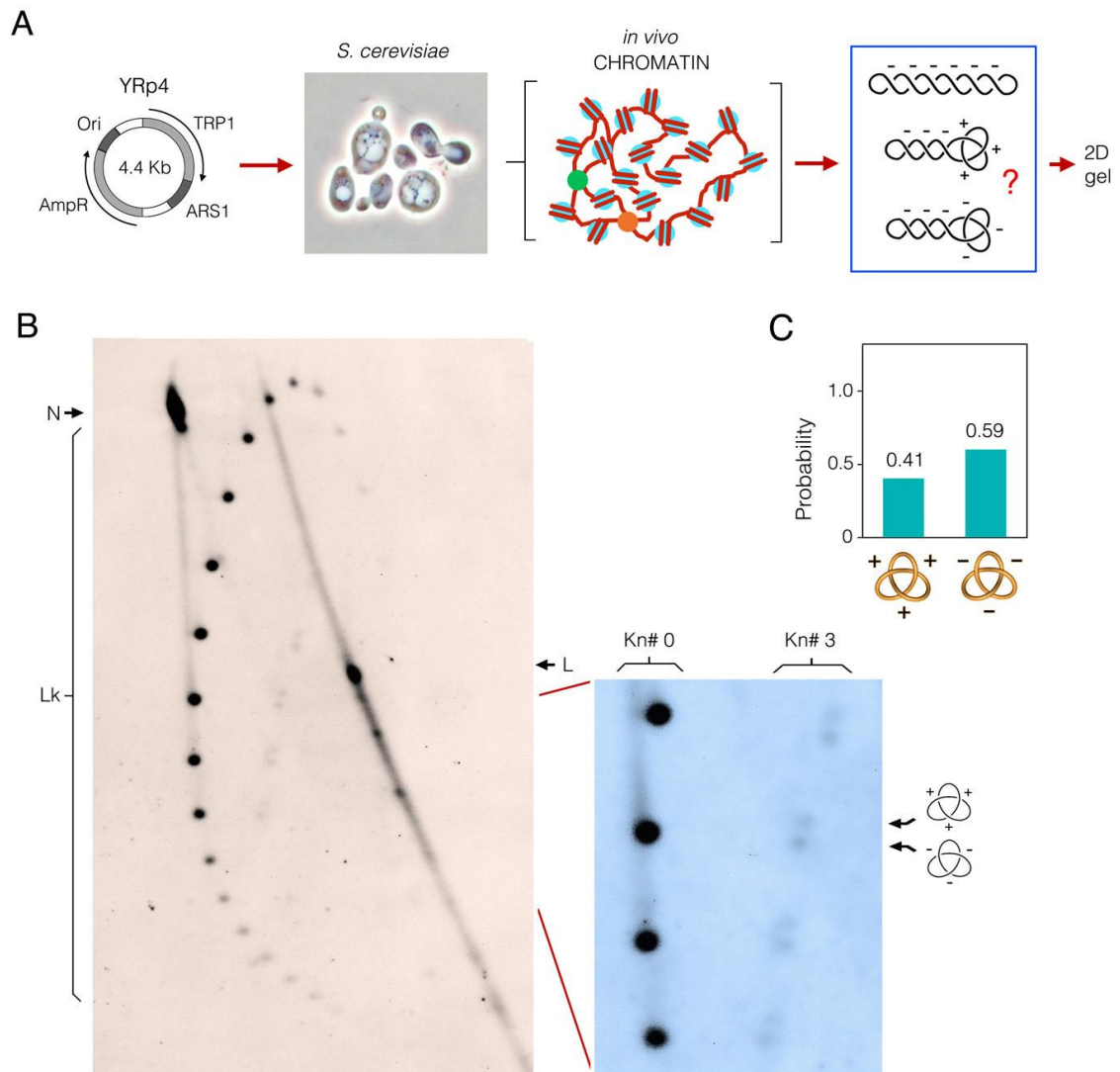


Figura R24. (A) Se recolectaron células de *S. cerevisiae* que contenían el mismo plásmido de 4.5 kb y se extrajo su DNA para análisis electroforético. (B) Southern blot del gel 2D. La primera dimensión del gel (de arriba abajo) contenía 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloroquina y se corrió a 80 V durante 70 h. La segunda dimensión del gel (de izquierda a derecha) contenía 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloroquina y se corrió a 120 V durante 10 h. En la ampliación del gel se puede ver el arco de las moléculas no anudadas Kn#0 y el arco con los dobletes de tréboles Kn#3. (C) La gráfica muestra la probabilidad de cada forma quiral del nudo de trébol.

Discusión

1. Nudos de ADN en la cromatina eucariótica

Esta tesis proporciona la primera evidencia de nudos de ADN en células eucarióticas. Los resultados muestran que pequeñas cantidades de nudos están presentes en el ADN intracelular independientemente de los elementos estructurales y funcionales de la cromatina. Los nudos se forman independientemente del estado de proliferación celular, aunque su abundancia se reduce transitoriamente durante la transcripción del ADN de los minicromosomas circulares. En conjunto, los resultados sugieren que hay una probabilidad generalizada de anudamiento del ADN de la cromatina y que es resultado de la actividad de la topo II. Este descubrimiento no es sorprendente cuando se considera la alta concentración de segmentos de ADN dentro de las fibras de cromatina y la abundancia de actividad de topo II que puede pasar unos segmentos a través de otros. Alternativamente, los nudos de ADN podrían ser causados por procesos de recombinación. Esta posibilidad es inverosímil ya que los nudos aparecerían entonces en secuencias homólogas del ADN, se asociarían inserciones o deleciones y se crearían tipos específicos de nudos (Wasserman *et al.*, 1985; Buck & Flapan, 2007; Deibler *et al.*, 2007).

Si los nudos producidos en el ADN intracelular son consecuencia de la actividad aleatoria de la topo II, estos nudos deberían reflejar propiedades biofísicas y conformacionales de la cromatina *in vivo*. En este sentido, una primera observación interesante es que la probabilidad de anudamiento del ADN en cromatina eucariótica (K^p_{CHR}) contrasta en varios aspectos con la probabilidad de anudamiento del ADN durante la circularización de moléculas lineales de ADN en solución libre (K^p_{DNA}) (Figura D1). El valor de K^p_{DNA} incrementa proporcionalmente con la longitud del ADN (Figura D1, línea naranja), y su pendiente depende de la flexibilidad y diámetro efectivo del ADN (Shaw & Wang, 1993; Rybenkov *et al.*, 1993). La flexibilidad del ADN desnudo viene dada por su longitud de persistencia (P_L), la cuál es de unos 50 nm (Hagerman, 1988). El diámetro efectivo del ADN (d_E) depende del ambiente iónico. En concentraciones de sal fisiológicas, d_E es de 5nm (Shaw & Wang, 1993; Rybenkov *et al.*, 1993). En esta tesis se muestra que hasta un tamaño de minicromosoma de 4-5 kb, K^p_{CHR} incrementa de modo lineal (Figura R7) pero con una pendiente más pronunciada que la del K^p_{DNA} (Figura D1, línea azul discontinua). Sin embargo, por encima de 4-5 kb, la pendiente de K^p_{CHR} se reduce de forma abrupta y es menor que la de K^p_{DNA} . Estas diferencias en las pendientes de K^p_{CHR} son más notables cuando, en vez de considerar simplemente la longitud del ADN (desnudo o cromatinizado), se

considera la longitud de contorno real de los minicromosomas, que es muchos más corta ya que depende sólo de los segmentos de ADN inter-nucleosomales (Figura D1, línea azul continua).

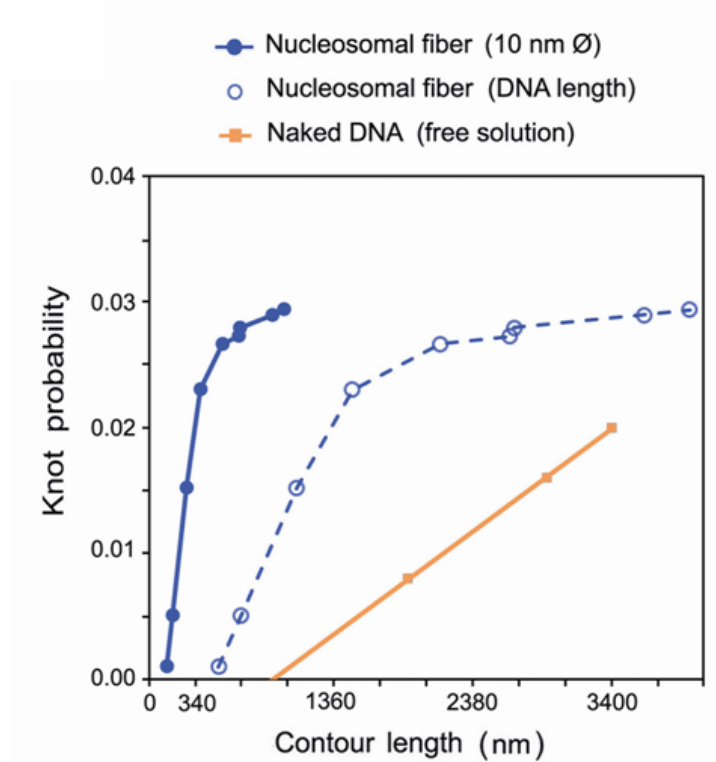


Figura D1. Comparación de la probabilidad de anudamiento del ADN desnudo en solución libre (línea naranja) con la de fibras de nucleosomas (línea azul continua) en función de su longitud de contorno (nm). La gráfica muestra los valores de cromatina contra la longitud total de ADN (línea azul discontinua) y contra la longitud de fibra de nucleosomas de 10 nm estirada (línea azul continua).

La explicación más simple para la pendiente inicial de valores de K_{CHR}^p ($< 4-5$ Kb) es que la yuxtaposición de los segmentos intramoleculares de ADN *in vivo* es mucho mayor que en el ADN en solución libre, y por consiguiente, la probabilidad de formación de nudos mediada por topo II. La mayor yuxtaposición de segmentos intramoleculares de ADN *in vivo* podría deberse a un superenrollamiento (positivo o negativo) del ADN. Sin embargo, la distribución de Lk de los minicromosomas analizados en cepas *TOP1 TOP2* no mostró evidencia de superenrollamiento no estabilizados que pudieran aumentar la yuxtaposición de segmentos del ADN (Figura

R1). La explicación más fácil es que la mayor yuxtaposición de los segmentos de ADN refleja simplemente la mayor flexibilidad de las fibras nucleosomales en comparación con el ADN desnudo. En este sentido, estudios *in vivo* de formación de pequeñas *loops* de ADN (Ringrose *et al.*, 1999) y experimentos *in vitro* con moléculas individuales (Hajjoul *et al.*, 2013) han demostrado la mayor flexibilidad de las fibras de nucleosomas, cuyo P_L sería 10-20 nm (mientras que P_L es 50 nm en el ADN desnudo).

En esta tesis se han calculado los valores de P_L y d_E aparentes de la fibra nucleosomal *in vivo*. Para ello, los datos de anudamiento *in vivo* (K_{CHR}^p) se han comparado con los de simulaciones previas de formación de nudos en cadenas poliméricas aleatorias (Klein *et al.*, 1988; Rybenkov *et al.*, 1993). Considerando la complejidad de los nudos (Figura D2A) y la probabilidad del nudo 3_1 (Figura D2B), se encontró que la fibra de nucleosomas se anuda como una cadena polimérica aleatoria con un d_E de cero y una P_L de 14 nm. Valores mayores de P_L implicarían un valor de d_E negativos, como si los segmentos de ADN *linker* se atrajeran fuertemente en vez de repelerse por fuerzas electroestáticas. Por el contrario, valores de d_E cercanos al diámetro geométrico del ADN (2 nm) implicarían valores de P_L extremadamente bajos (< 3 nm), menos de una vuelta de la doble hélice.

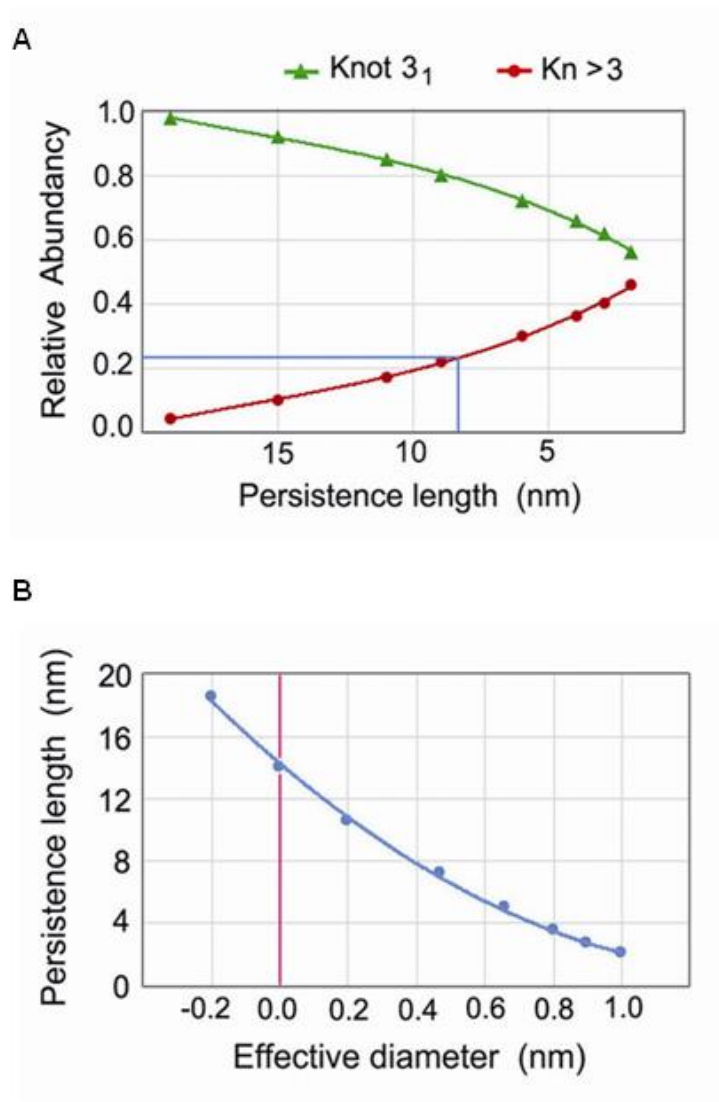


Figura D2. (A) Abundancia relativa del nudo 3₁ y de los nudos de más de tres cruces (Kn > 3) como una función de P_L de una cadena delgada con una longitud de contorno de 380 nm (igual que el minicromosoma YRp4). (B) Valores de P_L y d_E de una cadena simulada con una longitud de contorno de 380 nm que produciría el nudo 3₁ con una probabilidad de 0.017 (igual que el minicromosoma YRp4).

La alta flexibilidad y la capacidad de compactación de las fibras de nucleosomas se deben principalmente a la alta movilidad del ángulo entre los segmentos de entrada y salida del ADN nucleosomal (Bancaud *et al.*, 2006). En relación a esto, si los segmentos de ADN *linker* se comportaran como palos rígidos, otra forma de interpretar cualitativamente los datos de K^p_{CHR} es considerar el mínimo número de palos para formar un nudo (Huh & Oh, 2011). Este principio establece que para formar el nudo 3₁ se requieren un mínimo de seis palos (Figura D3A). Este

principio explicaría porque no se detectaron nudos en el minicromosomas YRp1 (1.4 kb) (Figura R7B), ya que tiene sólo siete nucleosomas y, por tanto, un número de palos (*linkers*) cercano al mínimo teórico. Sin embargo, el nudo 3_1 se formó claramente en el minicromosoma YRp2 (2 kb) ligeramente más grande y se produjeron nudos de hasta siete cruces en el YRp3 (3.2 kb) (Figura R7B). Por tanto, en términos de arquitectura de la cromatina, los datos de K^p_{CHR} apoyan los modelos de zig-zag ó plegamiento intrincado de la fibra de nucleosomas (Dorigo *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2014), en los cuales los segmentos de ADN *linker* se cruzan entre sí con mayor frecuencia que en los modelos de empaquetamiento solenoidal (Ghirlando & Felsenfeld, 2008) (Figura D3B).

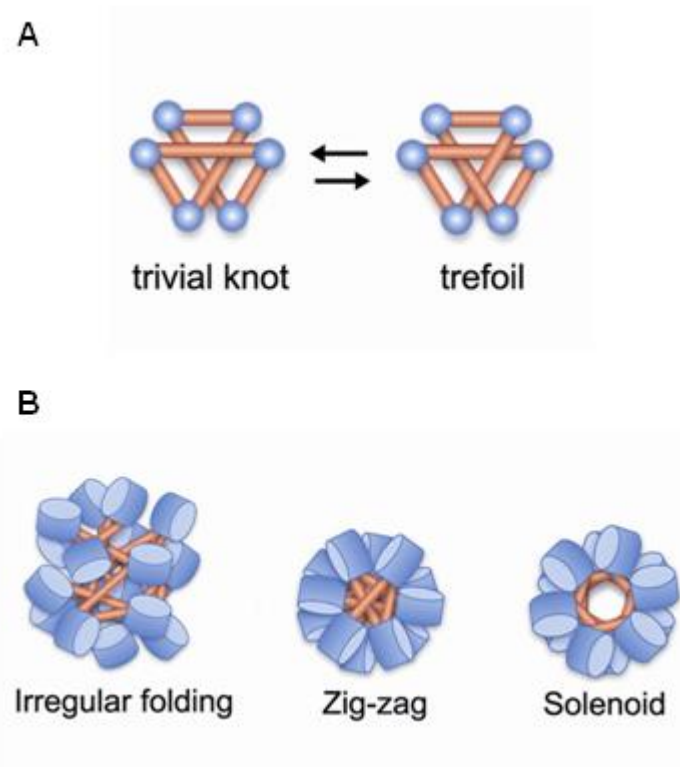


Figura D3. (A) Se requieren al menos seis palos para formar el nudo de trébol. (B) Yuxtaposición de segmentos de ADN *linker* en los modelos solenoidal, zig-zag y plegamiento irregular de las fibras de nucleosomas.

Finalmente, una pista adicional de que la formación de nudos de ADN está favorecida por el plegamiento intrincado de la fibra de nucleosomas es la disminución

de la fracción de nudos durante la transcripción de ADN en los minicromosomas circulares (Figura R5). En estas condiciones, la cromatina se despliega localmente (Konberg & Lorch, 1995) y los superenrollamientos positivo y negativo del ADN se cancelan en minicromosomas circulares. Como resultado, la yuxtaposición de segmentos de ADN debe reducirse y, por tanto, la probabilidad de anudamiento (Figura D4).

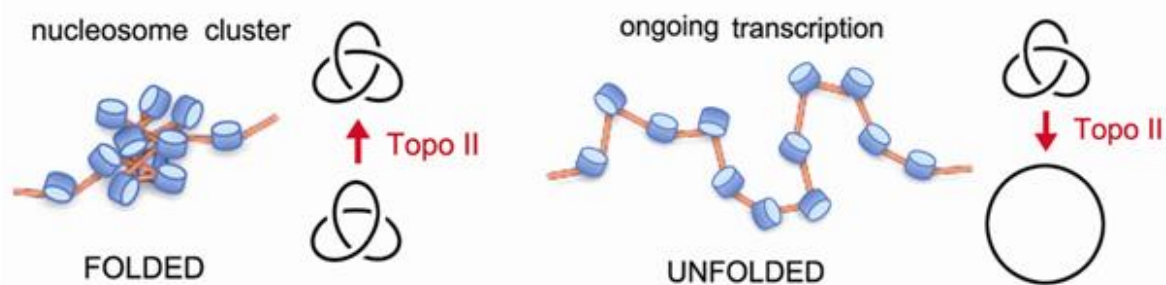


Figura D4. El plegamiento intrincado de los grupos de nucleosomas favorece el anudamiento mediado por la topo II intracelular. Las fracciones anudadas se reducen cuando los grupos de nucleosomas se despliegan durante la transcripción de ADN.

La drástica reducción de la pendiente de K^p_{CHR} cuando el tamaño de los minicromosomas supera las 4-5 kb (sobre 20 nucleosomas) fue llamativa y probablemente de relevancia biológica. Simulaciones computacionales (Kamenetskii *et al.*, 1975), circularización de moléculas lineales de ADN en solución libre (Rybenkov *et al.*, 1993; Shaw & Wang, 1993), y el anudamiento de plásmidos de ADN *in vitro* realizados en esta tesis con exceso de topo II (Figura R6) indican que la probabilidad de anudamiento del ADN aumenta proporcionalmente con su tamaño. Por lo tanto, algunos mecanismos deben evitar que K^p_{CHR} siga aumentando con el tamaño. De lo contrario, se produciría un enredo masivo del ADN intracelular. Una posibilidad es que esta inflexión se logre por la capacidad de la topo II para simplificar la topología del ADN por debajo del equilibrio termodinámico (Rybenkov *et al.*, 1997). En este sentido, estudios previos *in vitro* indicaron que la topo II es menos eficiente en la simplificación de la topología del ADN cuando la longitud de la molécula desnuda disminuye por debajo de 2 kb (Trigueros *et al.*, 2004). Una dependencia de longitud similar podría explicar porque la topo II intracelular desanuda (simplifica los nudos) con mayor

eficacia en los minicromosomas > 4-5 kb (cuya longitud de contorno equivale a 1-2 kb). La formación de nudos de ADN también podría minimizarse *in vivo* mediante otros mecanismos que regulan la actividad de la topo II. Estudios más recientes *in vivo* indican que la arquitectura de la cromatina (Fernandez *et al.*, 2014) y la actividad de condensinas (Sen *et al.*, 2016; Piskadlo *et al.*, 2017) podrían regular también la capacidad de la topo II para invertir unos cruces y no otros.

Un mecanismo diferente que podría explicar la inflexión de la pendiente de K^p_{CHR} descubierta en esta tesis es una transición en el modo de plegamiento de la fibra de nucleosomas dependiente de la longitud. La arquitectura de la fibra de nucleosomas es un tema muy debatido (Fussner *et al.*, 2011; Luguer *et al.*, 2012; Maeshima *et al.*, 2014). Además de los modelos clásicos de empaquetamiento regular y ordenado (Ghirlando & Felsenfeld, 2008; Felsenfeld, 2008; Dorigo *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2014) (Figura I16A), en los últimos años se han propuesto modelos de plegamiento irregular y otras estructuras heteromórficas que incorporan gran variabilidad en la longitud del ADN *linker* y en la orientación de los nucleosomas (Ricci *et al.*, 2015; Grigoryev *et al.*, 2016; Maeshima *et al.*, 2016) (Figura I16B). En esta tesis se proponen varias transiciones conformacionales que podrían reducir el anudamiento de ADN cuando un dominio topológico de cromatina alcanza una longitud de unos 20 nucleosomas (Figura D5). Una posibilidad es que, por debajo de esa longitud, los nucleosomas se agrupen en una estructura inestable y desordenada que puede ser anudada por la topo II. Por encima de esta longitud, los nucleosomas pueden adoptar una configuración más ordenada o compacta, que obstaculiza a la topo II para anudar el ADN. Sin embargo, no existen evidencias experimentales que apoyen la idea de este tipo de transición de plegamiento de las fibras de nucleosomas *in vitro* (Bancaud *et al.*, 2006; Maeshima *et al.*, 2014).

Una segunda posibilidad que podría explicar la atenuación de formación de nudos podría ser la fractalización de la estructura de la cromatina. En este sentido, los resultados aquí presentados apoyan un modelo en el cual el modelo de “*beads on a string*” de la fibra de nucleosomas de 10 nm reitera en el siguiente nivel de organización, en el cual cada “*bead*” es un grupo de unos 20 nucleosomas (Figura D5). Curiosamente, esta configuración fractal está en línea con recientes análisis de *High-C*, que indican que la cromatina de levadura se pliega en dominios (*TADs*) de 10 a 50 nucleosomas (Hsieh *et al.*, 2015). Según esta arquitectura, los minicromosomas pequeños (< 4 kb) examinados en esta tesis comprenderían de un solo *TAD*, mientras que los más grandes comprendían dos o más *TADs*. Este modelo explicaría también la presencia de nudos compuestos (Figura I20) en los minicromosomas grandes. Si cada

TAD puede anudarse independientemente, los minicromosomas con dos TADs pueden tener dos nudos primos, tal como se observa in vivo (Figura R7A). Esta configuración fractal está también en línea con las visualizaciones más recientes de fibras de cromatina intracelular. Experimentos de nanoscopía de alta resolución mostraron que la fibras de cromatina están formados por grupos heterogéneos de nucleosomas (Ricci *et al.*, 2015). Mediante tomografía EM se reveló que la cromatina intracelular es una cadena granular desordenada de 5-24 nm de diámetro (Ou *et al.*, 2017). Por tanto, la atenuación de formación de nudos de ADN descrita en esta tesis sería coherente también con una arquitectura fractal de la cromatina intracelular.

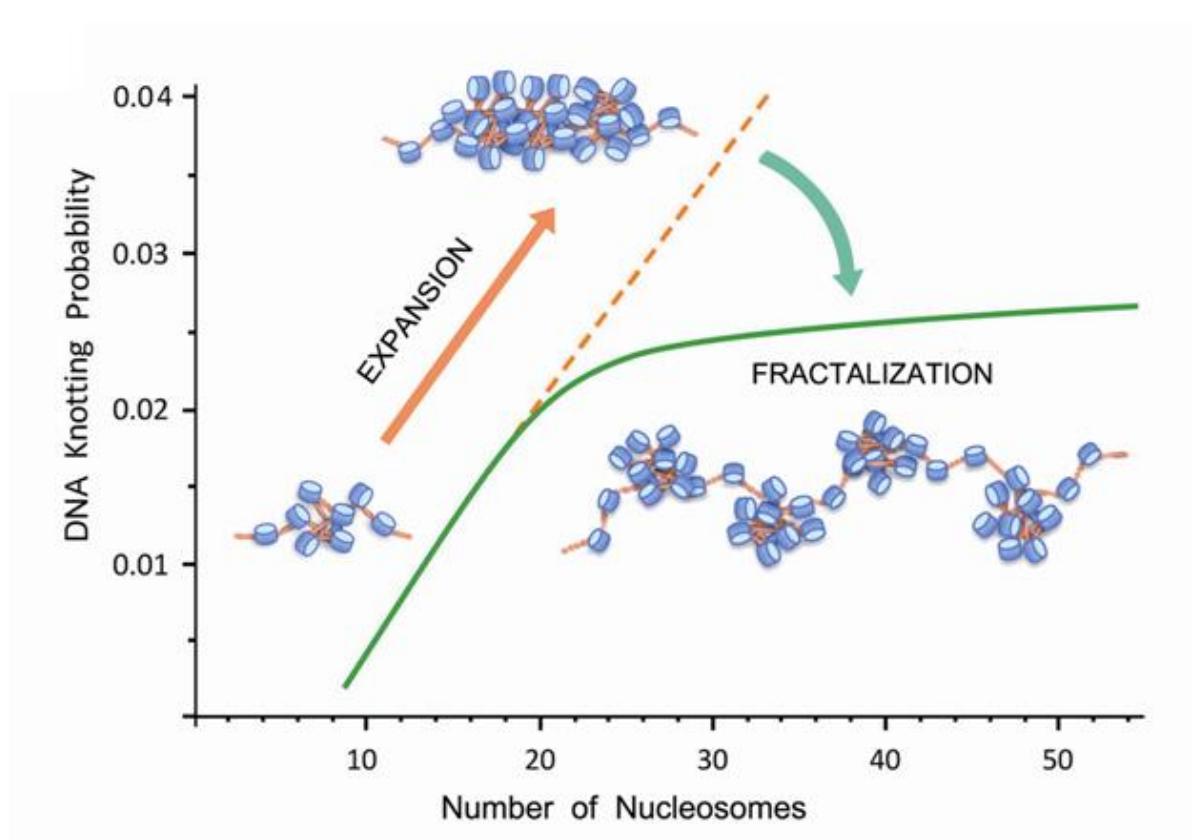


Figura D5. Modelo de arquitectura de la cromatina inferido a partir de la probabilidad de anudamiento del ADN. La atenuación de la pendiente de formación de nudos podría deberse a la fractalización de la estructura de la cromatina. Los resultados apoyan un modelo de “beads on a string” en el que cada “bead” es un grupo de 20 nucleosomas.

2. El superenrollamiento del ADN intracelular aumenta su probabilidad de anudamiento al compactarse la cromatina

Los resultados de esta tesis demuestran que el superenrollamiento positivo (S(+)) del ADN en la cromatina intracelular aumenta notablemente (10-25 veces) la probabilidad y complejidad de los nudos de ADN, mientras que tales efectos no ocurren con el superenrollamiento negativo (S(-)) (Figura R9 y R11). Este aumento en la formación de nudos no era predecible si se consideran modelos teóricos previos sobre la interrelación entre el superenrollamiento del ADN, el anudamiento y la actividad de la topoisomerasa. Simulaciones computacionales de cadenas poliméricas indican que el superenrollamiento del ADN puede apretar nudos preformados, lo que facilitaría su eliminación por las topoisomerasas de tipo 2 (Witz & Stasiak, 2009; Witz et al., 2011). Asimismo, otras simulaciones indicaron que los motores moleculares que se desplazan sobre el ADN (polimerasas, helicasas, complejos SMC) podrían empujar y confinar los nudos preformados en pequeños dominios para facilitar su eliminación (Witz et al., 2011). Por otro lado, como las topoisomerasas de tipo 2 tienen la capacidad de simplificar la topología del ADN hasta niveles por debajo de la conformación de equilibrio (Rybenkov et al., 1997) y esta capacidad se potenciaría en cruces de ADN en forma de gancho (Buck & Zechiedrich, 2004), el ADN superenrollado debería ser un sustrato ideal para favorecer el desanudamiento (Witz & Stasiak, 2009; Witz et al., 2011). Claramente, ninguno de estos mecanismos parece existir o ser efectivo para prevenir el aumento de la formación de nudos durante el superenrollamiento del ADN intracelular.

La explicación más simple para el aumento de nudos de ADN descubierto en esta tesis es que el superenrollamiento del ADN condensa la fibra de cromatina. En este caso, estudios *in vitro* han demostrado que el aumento de la yuxtaposición de segmentos de ADN intramoleculares, ya sea mediante superenrollamiento o mediante agentes de condensación del ADN, aumenta notablemente la formación de nudos de ADN por las topoisomerasas tipo 2 (Wasserman & Cozzarelli, 1991; Roca et al., 1993). Simulaciones computacionales de cadenas poliméricas aleatorias también demostraron que la condensación aumenta la probabilidad y complejidad de los nudos (Arsuaga et al., 2002; Micheletti et al., 2008). Por este motivo, en esta tesis se extendieron estas simulaciones de formación de nudos a un modelo simplificado de la fibra de cromatina. Los resultados de las simulaciones fueron sorprendentemente comparables a los obtenidos en los experimentos. Las simulaciones apoyan en primer

lugar la idea de que los nudos de ADN observados *in vivo* surgen de eventos aleatorios de inversiones de cruces de ADN mediados por la topo II. En segundo lugar, las simulaciones demuestran que el aumento tanto de la probabilidad como de la complejidad de los nudos inducida por S(+) puede generarse simplemente reduciendo 2-3 veces el radio de giro de un dominio de cromatina (Figura R15).

El aumento en la formación de nudos de ADN causado por la condensación de la cromatina explicaría también los efectos diferenciales de S(+) y S(-). Manipulaciones *in vitro* de fibras de nucleosomas han demostrado que el S(+) acorta más y más rápido la fibra de nucleosomas que el S(-) (Bancaud *et al.* 2006). En otras palabras, S(+) incrementa rápidamente la yuxtaposición de segmentos de ADN en fibras de cromatina, mientras que el S(-) produce conformaciones menos condensadas. Esta asimetría explica por qué la topo II relaja la cromatina con S(+) de manera más eficaz que con S(-) (Salceda *et al.* 2006; Fernández *et al.*, 2014). Los resultados de anudamiento del ADN de esta tesis corroboran que esta asimetría en la respuesta conformacional de la cromatina al S(+) y S(-) también ocurriría *in vivo*. Sin embargo, no se puede descartar que otros mecanismos contribuyan a favorecer la formación de nudos en la cromatina S(+). La actividad de las topoisomerasas tipo 2 puede ser sensible a la curvatura y a la geometría de los ángulos de las yuxtaposiciones de ADN (Corbett *et al.* 2005; McClendon *et al.* 2006). En ese sentido, estudios *in vitro* con ADN desnudo han demostrado que la topo II anuda con mayor frecuencia los plásmidos S(+) que los plásmidos S(-) (Roca, 2001). Una tendencia similar podría operar pues en el ADN intracelular.

La acumulación de S(+) y S(-) en los minicromosomas circulares de levadura usados en esta tesis se genera mediante la transcripción del ADN en cepas con actividad topoisomerasa alterada (Giaever & Wang, 1988; Gartenberg & Wang, 1992). En células normales *TOP1 TOP2*, S(+) y S(-) no se acumulan, ya que pueden ser relajados y, sobre todo, por que se cancelan recíprocamente en los minicromosomas circulares. Sin embargo, en los cromosomas celulares mucho mayores y lineales, S(+) y S(-) no se pueden cancelar. Si no son relajados inmediatamente por las topoisomerasas, S(+) y S(-) deben producir transitoriamente cambios importantes en la conformación de la cromatina. Las polimerasas de ARN eucariotas transcriben con velocidad de aproximadamente 100 pb/s, lo que significa que el ADN gira hasta 10 vueltas por segundo (Dundr *et al.*, 2002). Por lo tanto, el alto grado de S(+) alcanzado en los minicromosomas *in vivo* denota el límite inferior contra el cual la maquinaria de transcripción es capaz de trabajar (Salceda *et al.*, 2006). Al inducir S(+), los resultados indican que la probabilidad de anudamiento del ADN aumenta hasta 0.2 (unas 10

veces sobre el 0.02 que se encontró en cromatina relajada). Sin embargo, dado que la acumulación de S(+) requiere la inactivación de la topo II, la probabilidad real de formación de nudos de ADN inducida por S(+) podría ser cercana al 0.5 (unas 25 veces sobre el 0.02 que se encontró en cromatina relajada) si se calcula la fracción de nudos respecto a la fracción de moléculas con S(+) (Figura R12B).

Se puede proponer entonces que, en condiciones normales, las ondas de S(+) generadas frente a los complejos de transcripción condensan transitoriamente la cromatina, lo que produce un aumento de la formación de nudos de ADN a través de la actividad de la topo II. Tras la relajación del S(+) por medio de la actividad topo I y/o topo II, los nudos de ADN formados también se reducen por la actividad de la topo II y la transcripción puede continuar (Figura D6). Esta nueva visión del proceso es factible ya que explica una rara observación en el transcriptoma de la células de levadura, concretamente, que la inactivación de la topo II durante la transcripción de genes largos produce el bloqueo de las ARN polimerasas (*Joshi et al., 2012*). Este sorprendente resultado se atribuyó a una incapacidad de la topo I para relajar los niveles crecientes de S(+) generados frente a los complejos de transcripción. Ahora que sabemos que el S(+) dispara la formación de nudos, el resultado se interpreta de otra manera. Probablemente, la topo I si que fue capaz de relajar la cromatina S(+), pero no pudo eliminar los nudos que había producido la topo II y que bloqueaban la progresión de las ARN polimerasas.

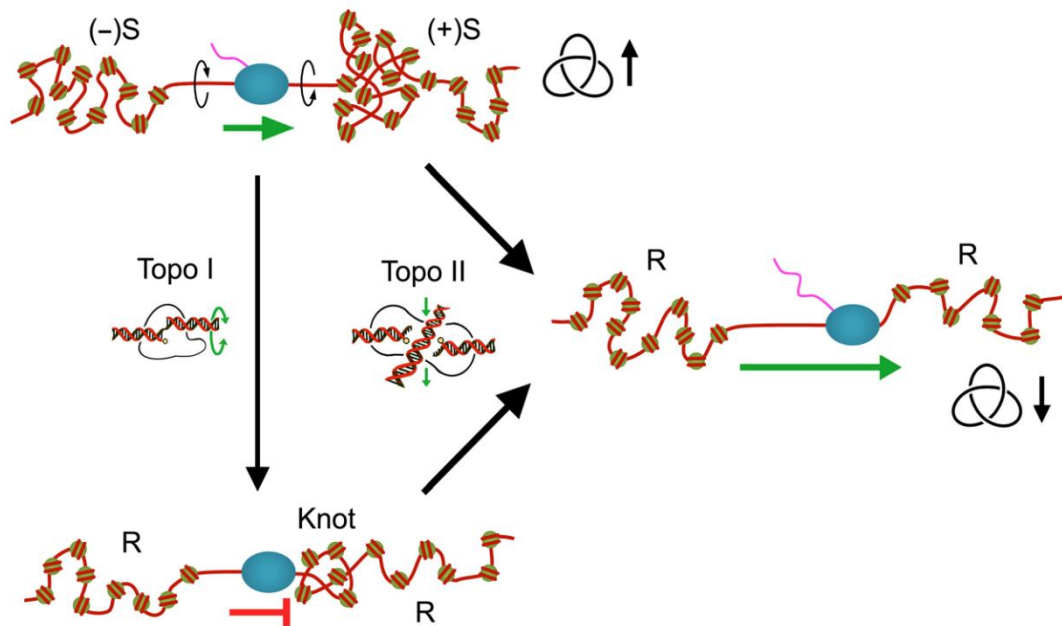


Figura D6. Anudamiento de ADN y funciones de las topoisomerasas durante la transcripción de genes. Las ondas de S(+) generadas durante la transcripción génica condensan la cromatina, lo que produce un aumento simultáneo de la probabilidad de anudamiento del ADN por delante de los complejos de transcripción. La relajación del S(+) ya sea por las actividades de la topo I o la topo II, reduce la compactación de la cromatina y, por tanto, la probabilidad de anudamiento del ADN. Sin embargo, dado que la topo I no puede eliminar los nudos de ADN, la inactivación de la topo II una vez formados los nudos de ADN detendrá la progresión de la ARN polimerasa incluso si el S(+) está relajado. La actividad de la topo II, es por tanto, esencial para ajustar el equilibrio de anudamiento/desanudamiento del ADN de diferentes estados conformacionales de la cromatina.

Los nudos de ADN producidos por S(+) durante la transcripción son transitorios y no tienen una función aparente, ya que surgen como un efecto secundario reversible de la actividad de la topo II. Sin embargo, estos resultados indican que cualquier evento de condensación de la cromatina, impulsado por superenrollamiento u otros mecanismos, puede promover el anudamiento del ADN mediado por la topo II. Por ejemplo, los cromosomas mitóticos además de compactarse, se ha propuesto que también sufren un acumulo de superenrollamiento positivo debido a la acción de las condensinas y la topo II (Kimura *et al.* 1998; Baxter *et al.*, 2011). Este escenario podría aumentar la probabilidad de formación de nudos en los cromosomas mitóticos. Curiosamente, estudios biofísicos han revelado que los cromosomas mitóticos están

estabilizados por topologías sensibles a topo II en lugar de por un esqueleto proteico continuo (Pope *et al.* 2006; Kawamura *et al.*, 2010). Luego, es tentador especular que estas topologías estabilizadoras de la cromatina condensada son nudos de ADN regulados por topo II.

3. Los nudos de ADN excluyen un plegamiento quiral de la fibra de nucleosomas *in vivo*

Los resultados de la primera parte de esta tesis reflejaban una posible transición en el modo de plegamiento de la fibra de nucleosomas dependiente de la longitud. En la introducción ya se ha hablado de las posibles arquitecturas de las "fibras de 30 nm de la cromatina" en base a los numerosos modelos que se han propuesto, tanto los modelos más clásicos que plantean un modo de empaquetamiento ordenado (Ghirlando & Felsenfeld, 2008; Felsenfeld, 2008; Dorigo *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2014) (Figura I16A), como los modelos de plegamiento irregular más actuales (Ricci *et al.*, 2015; Grigoryev *et al.*, 2016; Maeshima *et al.*, 2016) (Figura I16B).

Los nudos de ADN preservan la información topológica, su análisis ha sido útil para inferir la conformación espacial del ADN en conjuntos biológicos tales como complejos de condensina-ADN (Kimura *et al.*, 1999) y cápsides virales (Arsuaga *et al.*, 2005). Así que, con respecto a los múltiples modelos de la supuesta fibra de 30 nm, nos planteamos si un análisis más detallado de los nudos podría aclarar como se pliega la fibra de nucleosomas *in vivo*.

Los modelos regulares más clásicos de plegamiento de la fibra de nucleosomas, como los solenoidales o los modelos de superhélices en zig-zag, presentan quiralidad. En esos modelos la trayectoria espacial del ADN sólo tiene dos posibilidades: o es dextrógira (formando cruces positivos) o bien es levógira (formando cruces negativos). Teniendo en cuenta esto, los nudos producidos *in vivo* deberían capturar esa quiralidad produciendo, respectivamente, tréboles con cruces positivos o negativos. Por el contrario, si la cromatina estuviera plegada siguiendo un modelo irregular, al tratarse de una conformación aquiral, se observarían cantidades comparables de ambas formas quirales del trébol de ADN (Figura D7).

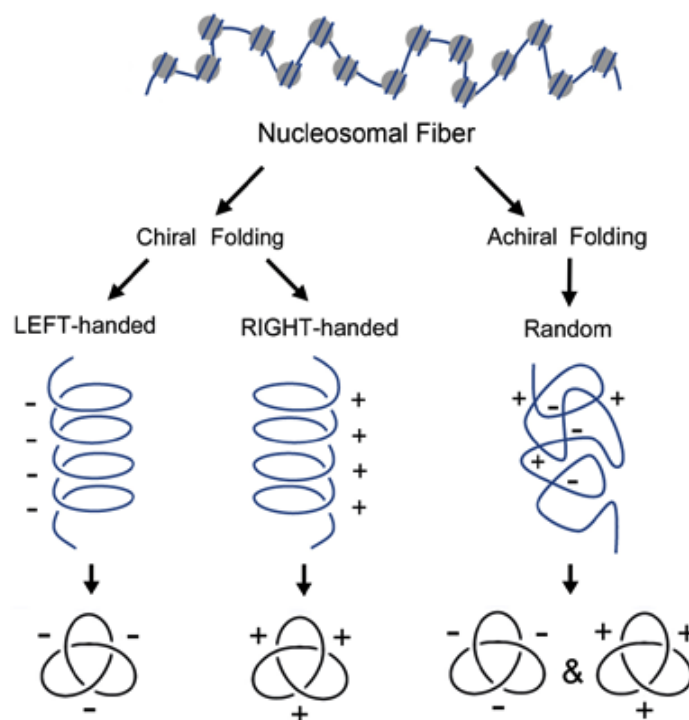


Figura D7. La quiralidad de los nudos de ADN puede capturar el modo de plegamiento de las fibras de nucleosomas *in vivo*.

Hasta ahora el método habitual para discernir la quiralidad de los nudos de ADN ha sido mediante microscopía electrónica. Este método requiere la purificación de los nudos de ADN, recubrir la molécula con proteína RecA y analizar la imagen microscópica de los nudos uno a uno para diferenciar la orientación de sus cruces y así determinar su quiralidad (Crisona *et al.*, 1994). Todo este proceso, además de ser técnicamente tedioso, requiere una gran abundancia de moléculas anudadas, lo que lo hace impracticable para muestras biológicas con una fracción pequeña de moléculas anudadas. Además, ya que hay que analizar los nudos uno a uno, el método no permite una cuantificación exacta de la quiralidad en una población general de moléculas.

En esta tesis se ha desarrollado un nuevo método basado en electroforesis bidimensional en gel de agarosa que permite la caracterización de la quiralidad de nudos de ADN formados tanto *in vitro* como *in vivo* (Figuras R21-R24).

Aplicando este nuevo método, esta tesis ha descubierto que en los minicromosomas circulares de *S. cerevisiae*, un 41% de tréboles son de quiralidad positiva y un 59% de quiralidad negativa (Figura R24). Estos valores pueden significar dos cosas. Primero,

podrían reflejar que hay dos tipos de arquitecturas ordenadas con diferente quiralidad y que coexisten dentro de la célula. Segundo, o lo que es más probable, que las fibras de nucleosomas se pliegan con una organización irregular y aquiral. Esta última posibilidad encaja más con los modelos más actuales y basados en nanoscopía de alta resolución (Ricci *et al.*, 2015) o tomografía electrónica de la cromatina (Ou *et al.*, 2017) que muestran que la fibra de cromatina *in vivo* puede estar formada por clusters o nanodominios heteromorfos de nucleosomas.

El método para discernir la quiralidad de los nudos de ADN en cualquier muestra biológica desarrollado en esta tesis amplía la posibilidad de estudiar cómo los elementos de la cromatina y las actividades enzimáticas alteran la trayectoria espacial del ADN intracelular. A diferencia de otros enfoques que inspeccionan la arquitectura de la cromatina intracelular, el análisis de la quiralidad de los nudos de ADN formados de forma natural *in vivo* está libre de artefactos y captura información en escalas de pocas kilobases. Algunas aplicaciones inmediatas del método incluyen la caracterización de nudos asociados con actividades de plegamiento del ADN (cohesinas, condensinas, remodeladores), elementos funcionales (centrómeros, orígenes de replicación, enhancers), y marcas epigenéticas que dan forma y dinamizan a la cromatina.

Conclusiones

Conclusiones

1. Existen nudos en el ADN intracelular. Distintos minicromosomas circulares de *S. cerevisiae* presentan nudos en su ADN con un 2-3% de probabilidad, independientemente de los elementos estructurales de la cromatina y del momento del ciclo celular.
2. La probabilidad de anudamiento del ADN intracelular es resultado de la actividad de la topoisomerasa II. El patrón y complejidad de los nudos formados sugiere una actividad aleatoria del enzima sobre los entrecruzamientos del ADN cromatinizado.
3. La probabilidad de anudamiento del ADN intracelular no es lineal con la longitud del ADN o fibra de cromatina. La probabilidad es máxima en dominios de 20-25 nucleosomas (4-5 kb) y tiende a atenuarse en dominios mayores. Esta inflexión puede reflejar una transición globular-fibrilar o una fractalización de la estructura de la cromatina.
4. Mientras la transcripción abre localmente la cromatina y reduce ligeramente la probabilidad de anudamiento del ADN, el acúmulo de superenrollamiento negativo por detrás del complejo de transcripción no altera significativamente el anudamiento del ADN. Por el contrario, el superenrollamiento positivo generado por delante del complejo de transcripción aumenta la probabilidad de anudamiento del ADN hasta 10-25 veces, así como la abundancia de nudos complejos.
5. El aumento en abundancia y la complejidad de los nudos inducida por superenrollamiento positivo del ADN indica una marcada condensación de la cromatina. Esta condensación y los nudos de ADN producidos explicarían por qué la actividad topo II permite evitar bloqueos de las polimerasas durante la transcripción.
6. El nuevo método de electroforesis bidimensional desarrollado en esta tesis permite el análisis cuantitativo de la quiralidad de pequeñas cantidades de tréboles de ADN presentes en muestras biológicas, sin necesidad de su purificación.
7. Los minicromosomas de *S.cerevisie* presentan cantidades comparable de tréboles de ADN con quiralidad positiva y negativa. Esta observación descartaría, por tanto, una organización quiral y regular de las fibras de nucleosomas nativas *in vivo*.

Bibliografía

Bibliografía

- Adrian, M., Ten Heggeler-Bordier, B., Wahli, W., Stasiak, A.Z., Stasiak, A. Dubochet, J. 1990, "Direct visualization of supercoiled DNA molecules in solution" *The EMBO J.* 9, 4551.
- Anderson, P., & Bauer, W. 1978, "Supercoiling in closed circular DNA: dependence upon ion type and concentration", *Biochemistry*, 17(4), 594-601.
- Arsuaga, J., Vazquez, M., McGuirk, P., Trigueros, S., Sumners, D. and Roca, J. 2005, "DNA knots reveal a chiral organization of DNA in phage capsids", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 9165–9169.
- Arsuaga, J., Vazquez, M., Trigueros, S., Sumners, D. and Roca, J. 2002, "Knotting probability of DNA molecules confined in restricted volumes: DNA knotting in phage capsids", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99, 5373-5377.
- Azaro, M.A. & Landy, A. 2002, "Lambda integrase and the lambda Int family" *Mobile DNA genetic elements II*. ASM Press, Washington, DC, pp 118-148.
- Bancaud, A., Conde e Silva, N., Barbi, M., Wagner, G., Allemand, J.F., Mozziconacci, J., Lavelle, C., Croquette, V., Victor, J.M., Prunell, A., Viovy J.L., 2006 "Structural plasticity of single chromatin fibers revealed by torsional manipulation" *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13, 444–450.
- Baxter J., Sen N., López Matínez V., Monturus De Carandini M. E., Schwartzman J. B., Diffley J. F. X., Aragon L. 2011, "Positive Supercoiling of Mitotic DNA Drives Decatenation by Topoisomerase II in Eukaryotes", *Science*, Vol. 331
- Bates, A.D. & Maxwell, A. 2005, "DNA topology" *New York: Oxford University Press*.
- Belmont A. S., Braunfeld M. B., Sedat J. W., Agard A. 1989, "Large-scale chromatin structural domains within mitotic and interphase chromosomes in vivo and in vitro", *Chromosoma*, 98, 129-143
- Belmont A. S., Bruce K. 1994, "Visualization of G1 chromosomes: A folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure", *J. Cell Biol.* 127, 287-302
- Benham C. J. 1979, "Torsional stress and local denaturation in supercoiled DNA", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76:3870-3874.
- Bojanowski, K., Maniotis, A. J., Plisov, S., Larsen, A. K., & Ingber, D. E. 1998, "DNA topoisomerase II can drive changes in higher order chromosome architecture without enzymatically modifying DNA", *Journal of cellular biochemistry*, 69(2), 127-142.
- Brown, P.O. & Cozzarelli, N.R. 1981, "Catenation and knotting of duplex DNA by type 1 topoisomerases: a mechanistic parallel with type 2 topoisomerases", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 31, 843-847.
- Brown, P.O. & Cozzarelli, N.R. 1981, "Catenation and knotting of duplex DNA by type 1 topoisomerases: a mechanistic parallel with type 2 topoisomerases", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 31, 843-847.
- Buck, D. 2009, "DNA topology. Applications of knot theory", *Proc. Sympos. Appl. Math.*, 66, *Amer. Math. Soc*, pp.47-79.

Bibliografía

- Buck,D. and Flapan,E. 2007, "Predicting knot or catenane type of site-specific recombination products", *J. Mol. Biol.*, 374, 1186–1199.
- Buck,G. R. and Zechiedrich,E. L. 2004 "DNA disentangling by type-2 topoisomerases", *J. Mol. Biol.*, 340, 933–939.
- Champoux, J.J. & Dulbecco, R. 1972, "An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA- a possible swivel for DNA replication", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1841-1845.
- Champoux, J.J. 2001, "DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 70, no. 1, pp. 369-413.
- Clarke, D.J. 2009, "DNA topoisomerases" *Methods in Mol. Biol.* 582, DOI 10.1007/978-1-60761-340-4.
- Corbett, K.D. & Berger, J.M. 2004, "Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases", *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.*, vol. 33, pp. 95-118.
- Corbett,K.D., Schoeffler,A.J., Thomsen,N.D. and Berger,J.M. 2005, "The structural basis for substrate specificity in DNA topoisomerase IV", *J. Mol. Biol.*, 351, 545–561.
- Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W., Richmond, T.J. 2002, "Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 a resolution", *J. Mol. Biol.* 319, 1097-1113.
- Deibler,R.W., Mann,J.K., Sumners de,W.L. and Zechiedrich,L. 2007, "Hin-mediated DNA knotting and recombining promote replicon dysfunction and mutation" *BMC Mol. Biol.*, 8, 44
- Delbrück M. 1954, "On the replication of deoxyribonucleic acid (DNA)", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 40, 783–788
- Deweese, J.E., Osheroﬀ, M.A., Osheroﬀ, N. 2009, "DNA topology and topoisomerases: teaching a "knotty" subject", *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 37, 2-10.
- Diaz-Ingelmo,O.,Martinez-Garcia,B., Segura,J., Valdes,A. and Roca,J. 2015, "DNA topology and global architecture of point centromeres", *Cell Rep.*, 13, 667–677.
- Dixon J.R., Selvaraj S., Yue F., Kim A., Li Y., Shen Y., Hu M., Liu J.S., Ren B. 2012, "Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions", *Nature*, 485, 376-380.
- Dong KC, Berger JM 2007, "Structural basis for gate-DNA recognition and bending by type IIA topoisomerases", *Nature*, 450:1201–1205.
- Dorigo,B., Schalch,T., Kulangara,A., Duda,S., Schroeder,R.R. and Richmond,T.J. 2004, "Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber", *Science*, 306, 1571–1573.

- Dundr, M., Hoffmann-Roher, U., Hu, Q., Grummt, I., Rothblum, L.I., Phair, R.D., Misteli, T., 2002, "A kinetic framework for mammalian RNA polymerase *in vivo*", *Science*, 298(5598):1623-6
- Eng, W.K., Pandit, S.D. & Sternglanz, R. 1989, "Mapping of the active site tyrosine of eukaryotic DNA topoisomerase I", *The Journal of biological chemistry*, vol. 264, no. 23, pp. 13373-13376.
- Fernández, X., Díaz-Ingelmo, O., Martínez-García, B. & Roca, J. 2014, "Chromatin regulates DNA torsional energy via topoisomerase II mediated relaxation of positive supercoils", *The EMBO journal*.
- Frank-Kamenetskii, M.D., Lukashin, A.V. and Vologodskii, A.V. 1975, "Statistical mechanics and topology of polymer chains", *Nature*, 258, 398–402.
- Fussner, E., Ching, R.W. and Bazett-Jones, D.P. 2011, "Living without 30nm chromatin fibers", *Trends Biochem. Sci.*, 36, 1–6.
- Gartenberg, M.R., Wang, J.C. 1992, "Positive supercoiling of DNA greatly diminishes mRNA synthesis in yeast", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89(23): 11461-65
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O’dea, M.H., Nash, H.A. 1976a, "DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3872-3876.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O’Dea, M.H. & Nash, H.A. 1976, "DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 73, no. 11, pp. 3872-3876.
- Ghirlando, R. and Felsenfeld, G. 2008, "Hydrodynamic studies on defined heterochromatin fragments support a 30-nm fiber having six nucleosomes per turn", *J. Mol. Biol.*, 376, 1417–1425.
- Ghirlando, R. and Felsenfeld, G. 2008, "Hydrodynamic studies on defined heterochromatin fragments support a 30-nm fiber having six nucleosomes per turn", *J. Mol. Biol.*, 376, 1417–1425.
- Giaever, G.N., & Wang, J.C. 1988, "Supercoiling of intracellular DNA can occur in eukaryotic cells", *Cell*, 55:849 – 856.
- Grigoryev, S.A., Bascom, G., Buckwalter, J.M., Schubert, M.B., Woodcock, C.L. and Schlick, T. 2016, "Hierarchical looping of zigzag nucleosome chains in metaphase chromosomes", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 113, 1238–1243.
- Hagerman, P.J. 1988, "Flexibility of DNA", *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 17, 265–286.
- Hajjoul, H., Mathon, J., Ranchon, H., Goiffon, I., Mozziconacci, J., Albert, B., Carrivain, P., Victor, J.M., Gadal, O., Bystricky, K., Bancaud, A. 2013, "High-throughput chromatin motion tracking in living yeast reveals the flexibility of the fiber throughout the genome" *Genome Res.*, 23, 1829–1838.
- Hanai, R., & Roca, J. 1999, "Two-dimensional agarose-gel electrophoresis of DNA topoisomers", *DNA Topoisomerase Protocols* (pp. 19-27). Humana Press.

Bibliografía

- Hansen A.S., Cattoglio C., Darzacq X., and Tjian R. 2018, "Recent evidence that TADs and chromatin loops are dynamic structures" *Nucleus*, 9, 20-32.
- Hershey, A.D., Burgi, E., Ingraham, L. 1963, "Cohesion of DNA molecules isolated from phage lambda", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 49, 748-755.
- Hsieh, T. 1990, "7 Mechanistic Aspects of Type-II DNA Topoisomerases", Cold Spring Harbor Monograph Archive, vol. 20, pp. 243-263.
- Huh, Y. and Oh, S. 2011, "An upper bound on stick number of knots", *J. Knot Theory Ram.* 5, 741-747.
- Hunt N. G., Hearst J. E. 1991, "Elastic model of DNA supercoiling in the infinite-length limit" *J Chem Phys*, 95:9329-9336.
- Ishii, S., Murakami, T. & Shishido, K. 1991, "Gyrase inhibitors increase the content of knotted DNA species of plasmid pBR322 in *Escherichia coli*", *J Bacteriol* 173, 5551-3
- Jiang, C. & Pugh, B.F. 2009, "Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics", *Nature Reviews Genetics*, vol. 10, no. 3, pp. 161-172.
- Jin F., Li Y., Dixon J.R., Selvaraj S., Ye Z., Lee A.Y., Yen C.A., Schmitt A.D., Espinoza C.A., Ren B. 2013, "A high-resolution map of the three-dimensional chromatin interactome in human cells" *Nature*, 503, 290-294
- Joshi, R.S. Piña, B., Roca, J., 2012, "Topoisomerase II is required for the production of long Pol II gene transcripts in yeast", *Nucleic Acids Research*, Vol. 40, No. 16, 7907-7915
- Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S. & Suzuki, H. 1990, "New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*", *Cell*, vol. 63, no. 2, pp. 393-404.
- Kawamura, R., Pope, L.H., Christensen, M.O., Sun, M., Terekhova, K., Boege, F., Mielke, C., Andersen, A.H., Marko, J.F. 2010, "Mitotic chromosomes are constrained by topoisomerase II-sensitive DNA entanglements", *J Cell Biol.*, 188(5):653:63
- Kikuchi, Y. & Nash, H.A. 1979, "Nicking-closing activity associated with bacteriophage lambda int gene product", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3760-3764.
- Kim, R.A. & Wang, J.C. 1992, "Identification of the yeast TOP3 gene product as a single strand-specific DNA topoisomerase", *J. Biol. Chem.* 267, 17178-17185.
- Kimura, K., Rybenkov, V.V., Crisona, N.J., Hirano, T. and Cozzarelli, N.R. 1999, "13S condensin actively reconfigures DNA by introducing global positive writhe: implications for chromosome condensation" *Cell*, 98, 239-248.
- Kirkegaard, K. & Wang, J.C. 1985, "Bacterial DNA topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single-stranded loop", *Journal of Molecular Biology*, vol. 185, no. 3, pp. 625-637.
- Kornberg, R.D. and Lorch, Y. 1995, "Interplay between chromatin structure and transcription", *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7, 371-375.

- Liu, L.F. & Wang, J.C. 1978, "*Micrococcus luteus* DNA gyrase: active components and a model for its supercoiling of DNA", *Proc. Acad. Sci. USA* 75, 2098-2102.
- Liu, L.F. & Wang, J.C. 1981b "DNA-DNA gyrase complex: the wrapping of the DNA duplex outside the enzyme", *Cell* 15, 979-984.
- Liu, L.F., Liu, C.C., Alberts, B.M. 1980, "Type II DNA topoisomerases: enzymes that can unknot a topologically knotted DNA molecule via a reversible double strand break", *Cell* 19, 697-707.
- Liu, L.F., Perkocha, L., Calendar, R., Wang, J.C. 1981a, "Knotted DNA from bacteriophage capsids", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5498-5502.
- Liu, Z., Deibler, R.W., Chan, H.S., Zechiedrich, L. 2009, "The why and how of DNA unlinking" *Nucleic Acids Res.* 37, 661-671.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. & Richmond, T.J. 1997, "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution", *Nature*, vol. 389, no. 6648, pp. 251-260.
- Lynn, R.M., Bjornsti, M.A., Caron, P.R. & Wang, J.C. 1989, "Peptide sequencing and site-directed mutagenesis identify tyrosine-727 as the active site tyrosine of *Saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase I", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 86, no. 10, pp. 3559-3563.
- Maeshima, K., Imai, R., Tamura, S. and Nozaki, T. 2014, "Chromatin as dynamic 10-nm fibers", *Chromosoma*, 123, 225–237.
- Maeshima, K., Rogge, R., Tamura, S., Joti, Y., Hikima, T., Szerlong, H., Krause, C., Herman, J., Seidel, E., DeLuca, J., Ishikawa, T., Hansen, J.C. (2016) Nucleosomal arrays self-assemble into supramolecular globular structures lacking 30-nm fibers. *EMBO J.*, 35, 1115–1132.
- Marccone B, Orlandini E, Stella AL, Zonta F. 2005, "What is the length of a knot in a polymer?" *J Phys A: Math Gen* 38:L15–L21.
- Martinez-Garcia, B., Fernandez, X., Diaz-Ingelmo, O., Rodriguez-Campos, A., Manichanh, C. & Roca, J. 2013, "Topoisomerase II minimizes DNA entanglements by proofreading DNA topology after DNA strand passage", *Nucleic acids research*, vol. 42, no. 3, pp. 1821-1830.
- McClendon, A.K., Dickey, J.S. and Osheroff, N. 2006, "Ability of viral topoisomerase II to discern the handedness of supercoiled DNA: bimodal recognition of DNA geometry by type II enzymes", *Biochemistry*, 45, 11674–11680.
- McCoubrey, W.K., Jr & Champoux, J.J. 1986, "The role of single-strand breaks in the catenation reaction catalyzed by the rat type I topoisomerase", *The Journal of biological chemistry*, vol. 261, no. 11, pp. 5130-5137.
- Micheletti, C. Marenduzzo, D. Orlandini, E. Sumners, DW. 2008, "Simulations of Knotting in confined circular DNA", *Biophys J.*, 95(8):3591-9.
- Mirkin, S.M. 2001, "DNA topology: fundamentals" *Encyclopedia of Life Sciences*, DOI: 10.1038/npg.els.0001038.

- Nitiss, J.L. 1998, "Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, vol. 1400, no. 1, pp. 63-81.
- Ou, H.D. et al. 2017, "ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells", *Science*, vol. 357
- Peck, L.J. & Wang, J.C. 1981, "Sequence dependence of the helical repeat of DNA in solution", *Nature*, vol. 292, no. 5821, pp. 375-378.
- Piskadlo, E., Tavares, A. and Oliveira, R.A. 2017, "Metaphase chromosome structure is dynamically maintained by condensing I-directed DNA (de)catenation", *Elife*, 6, e26120.
- Pope L. H., Xiong C., Marko J. F. 2006, "Proteolysis of Mitotic Chromosomes Induces Gradual and Anisotropic Decondensation Correlated with a Reduction of Elastic Modulus and Structural Sensitivity to Rarely Cutting Restriction Enzymes", *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 17, 104-113
- Ricci, M.A., Manzo, C., Garcia-Parajo, M.F., Lakadamyali, M. And Cosma, M.P. 2015, "Chromatin fibers are formed by heterogeneous groups of nucleosomes in vivo" *Cell*, 160, 1145–1158.
- Richmond, T. & Finch, J. 1984, "The structure of the nucleosome core particle", *Nature (London)*, vol. 311, pp. 532-537.
- Ringrose, L., Chabanis, S., Angrand, P.O., Woodroffe, C. and Stewart, A.F. 1999, "Quantitative comparison of DNA looping in vitro and in vivo: chromatin increases effective DNA flexibility at short distances", *EMBO J.*, 18, 6630–6641.
- Robinson P. J., Fairall L., Huynh V. A., Rhodes, D. 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, 6506-6511
- Roca, J. & Wang, J.C. 1992, "The capture of a DNA double helix by an ATP-dependent protein clamp: a key step in DNA transport by type II DNA topoisomerases", *Cell*, vol. 71, no. 5, pp. 833-840.
- Roca, J. & Wang, J.C. 1994, "DNA transport by a type II DNA topoisomerase: evidence in favor of a two-gate mechanism", *Cell*, vol. 77, no. 4, pp. 609-616.
- Roca, J. & Wang, J.C. 1996, "The probabilities of supercoil removal and decatenation by yeast DNA topoisomerase II", *Genes to Cells*, vol. 1, no. 1, pp. 17-27.
- Roca, J. 2011, "The torsional state of DNA within the chromosome", *Chromosoma*, vol. 120, no. 4, pp. 323-334.
- Roca, J., Berger, J.M., Harrison, S.C. & Wang, J.C. 1996, "DNA transport by a type II topoisomerase: direct evidence for a two-gate mechanism", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 93, no. 9, pp. 4057-4062.
- Roca, J., Berger, J.M. and Wang, J.C. 1993, "On the simultaneous binding of eukaryotic DNA topoisomerase II to a pair of double-stranded DNA helices", *J. Biol. Chem.*, 268, 14250–14255.

- Rothstein, R.J. 1983, "One-step gene disruption in yeast", *Methods in enzymology*, vol. 101, pp. 202-211.
- Rybenkov, V.V., Cozzarelli, N.R. and Vologodskii, A.V. 1993, "Probability of DNA knotting and the effective diameter of the DNA double helix", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90, 5307–5311.
- Rybenkov, V.V., Ullsperger, C., Vologodskii, A.V. and Cozzarelli, N.R. 1997, "Simplification of DNA topology below equilibrium values by type II topoisomerases", *Science*, 277(5326):690-3
- Saitoh, Y., & Laemmli, U. K. 1993, "From the chromosomal loops and the scaffold to the classic bands of metaphase chromosomes", *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, Vol. 58, pp. 755-765
- Salceda, J., Fernández, X. & Roca, J. 2006, "Topoisomerase II, not topoisomerase I, is the proficient relaxase of nucleosomal DNA", *The EMBO journal*, vol. 25, no. 11, pp. 2575-2583.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989, "Molecular cloning", *Cold spring harbor laboratory press New York*.
- Sanborn A.L., Rao S.S., Huang S.C., Durand N.C., Huntley M.H., Jewett A.I., Bochkov I.D., Chinnappan D., Cutkosky A., Li, J., et al. 2015, "Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 112, 6456-6465.
- Segura J., Joshi R.S., Díaz-Ingelmo O., Valdés A., Dyson S., Martínez-García B., Roca J. 2018, "Intracellular nucleosomes constrain a DNA linking number difference of -1.26 that reconciles the Lk paradox", *Nat Commun.*, Sep 28;9(1):3989
- Sen, N., Leonard, J., Torres, R., Garcia-Luis, J., Palou-Marin, G. and Aragon, L. 2016, "Physical proximity of sister chromatids promotes Top2-dependent intertwining" *Mol. Cell*, 64, 134–147.
- Shaw, S.Y. and Wang, J.C. 1993, "Knotting of a DNA chain during ring closure", *Science*, 260, 533–536.
- Shishido K., Komiyama N., Ikawa S. 1987, "Increased production of a knotted form of plasmid pBR322 DNA in *Escherichia coli* DNA topoisomerase mutants", *J. Mol. Biol.*, 195, 215-218
- Shuman, S. & Moss, B. 1987, "Identification of a vaccinia virus gene encoding a type I DNA topoisomerase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 84, no. 21, pp. 7478-7482.
- Simpson, R.T., Thoma, F. and Brubaker, J.M. 1985, "Chromatin reconstituted from tandemly repeated cloned DNA fragments and core histones: a model system for study of higher order structure", *Cell*, 42, 799–808.
- Sissi, C. & Palumbo, M. 2010, "In front of and behind the replication fork: bacterial type IIA topoisomerases", *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 2001-2004.

Bibliografía

- Song,F., Chen,P., Sun,D., Wang,M., Dong,L., Liang,D., Xu,R.M., Zhu,P. and Li,G. 2014, "Cryo-EM study of the chromatin fiber reveals a double helix twisted by tetranucleosomal units", *Science*, 344, 376–380.
- Spengler,S.J., Stasiak,A.,Cozzarelli,N.R. 1985, "The stereostructure of knots and catenanes produced by phage lambda integrative recombination: implications for mechanism and DNA structure", *Cell*, 42(1):325-34
- Stasiak,A., Katritch,V., Bednar,J., Michoud,D. and Dubochet,J. 1996, "Electrophoretic mobility of DNA knots [letter]", *Nature*, 384, 122.
- Thoma, F., Bergman, L.W., Simpson, R.T. 1984, "Nuclease digestion of circular TRP1ARS1 chromatin reveals positioned nucleosomes separated by nuclease-sensitive regions", *Journal of Molecular Biology*, vol. 177, no. 4, pp. 715-733.
- Travers, A. & Muskhelishvili, G. 2005, "Bacterial chromatin", *Current opinion in genetics & development*, vol. 15, no. 5, pp. 507-514.
- Trigueros,S., Arsuaga,J., Vazquez,M.E., Summers,D.W. and Roca,J. 2001, "Novel display of knotted DNA molecules by two-dimensional gel electrophoresis", *Nucleic Acids Res.*, 29, E67.
- Trigueros,S., Salceda,J., Bermudez,I., Fernandez,X. and Roca,J. 2004, "Asymmetric removal of supercoils suggests how topoisomerase II simplifies DNA topology", *J. Mol. Biol.*, 335, 723–731.
- Ullsperger C., Cozzarelli N.R. 1996, "Contrasting enzymatic activities of topoisomerase IV and DNA gyrase from *Escherichia coli*", *J Biol Chem*. 271(49): 31549-55
- Vinograd, J., Lebowitz, J., Radloff, R., Watson, R. & Laipis, P. 1965, "The twisted circular form of polyoma viral DNA", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 53, no. 5, pp. 1104-1111.
- Vologodskii, A. & Cozzarelli, N.R. 1996, "Effect of supercoiling on the juxtaposition and relative orientation of DNA sites" *Biophys. J.* 70, 2548-2556.
- Vologodskii, A. 1998, "Exploiting circular DNA", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(8), 4092–4093.
- Vologodskii A.V., Zhang W., Rybenkov V.V., Podtelezhnikov A.A., Subramanian D., Griffith J.D., R. Cozzarelli N.R. 2001, "Mechanism of topology simplification by type II DNA topoisomerases", *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3045–3049.
- Wallis, J.W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M., Rothstein, R. 1989, "A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase" *Cell*, 58, 409-419.
- Wang, J.C. 1969, "Variation of the average rotational angle of the DNA helix and the superhelical turns of covalently closed cyclic λ DNA", *J. Mol. Biol.* 43, 25-39.
- Wang, J.C. 1971, "Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein ω " *J. Mol. Biol.* 55, 523-533.

Bibliografía

- Wang, J.C. 1973, "In DNA Synthesis in Vitro", *R.D. Wells and R.B. Inman, eds* (Baltimore: University Park Press) pp 163-174.
- Wang, J.C. 1974^a, "The degree of unwinding of the DNA helix by ethidium: I. Titration of twisted PM2 DNA molecules in alkaline cesium chloride density gradients", *J. Mol. Biol.* 89, 783-801.
- Wang, J.C. 1979, "Helical repeat of DNA in solution" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 200-203.
- Wang, J.C. 1996, "DNA topoisomerases" *Annu. Rev. Biochem.* 65, 635-692.
- Wang, J.C. 1998, "Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine", *Quarterly reviews of biophysics*, vol. 31, no. 2, pp. 107-144.
- Wang, J.C. 2002, "Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective" *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 430-440.
- Wang, J.C. 2009, "A journey in the world of DNA rings and beyond" *Annu. Rev. Biochem.* 78, 31-54.
- Wasserman, S.A. & Cozzarelli, N.R. 1985, "Discovery of a predicted DNA knot substantiates a model for site-specific recombination", *Science*, 229, 171-174.
- Wasserman, S.A. & Cozzarelli, N.R. 1991, "Supercoiled DNA-directed knotting by T4 topoisomerase" *J. Biol. Chem.*, 266, 20567-20573.
- Watson, J.D. & Crick, F.H.C. 1953^a, "A structure for deoxyribose nucleic acid", *Nature* 171, 737-738.
- Watson, J.D. & Crick, F.H.C. 1953^b, "Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid", *Nature* 171, 964-967.
- Witz, G. & Stasiak, A. 2009, "DNA supercoiling and its role in DNA decatenation and unknotting", *Nucleic Acids Research*, vol. 38, No. 7
- Witz G., Dietler, G. Stasiak, A. 2011, "Tightening of DNA knots by supercoiling facilitates their unknotting by type II DNA topoisomerases", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 108, No. 9
- Yuan, G.C., Liu, Y.J., Dion, M.F., Slack, M.D., Wu, L.F., Altschuler, S.J. and Rando, O.J. 2005, "Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*" *Science*, 309, 626-630.

