



Informes Anticipando
NUCLEOMA 4D





Informe Anticipando coordinado por:

Marc A. Martí-Renom

Investigador de la Institución Catalana de Investigación y Estudios Avanzados (ICREA) en el Centro Nacional de Análisis Genómica. Centro de Regulación Genómica (CNAG-CRG).



Expertos colaboradores:

Jorge Ferrer

Coordinador del Programa Transversal de Genómica Médica y líder del Grupo de Regulación del genoma y diabetes del Centro de la Regulación Genómica (CRG). Profesor de Genética y Genómica en Imperial College de Londres.

Ana Losada

Directora del Grupo de Dinámica Cromosómica dentro del Programa de Oncología Molecular del Centro de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

Darío Lupiáñez

Jefe de grupo en el Berlin Institute for Medical Systems Biology (BIMSB) del Max Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC).



Comité Asesor del Observatorio de Tendencias en la Medicina del Futuro:

Joaquín Arenas

Director del Instituto de Investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre (i+12).

Ángel Carracedo

Director de la Fundación Pública Gallega de Medicina Genómica (Servicio Gallego de Salud) y Coordinador del Grupo de Medicina Genómica de la Universidad de Santiago de Compostela (CIBERER).

Pablo Lapunzina

Jefe de grupo de investigación del Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM) del IdiPaz y Director científico del CIBERER.

Fernando Martín-Sánchez

Profesor de Investigación en Salud Digital. Escuela Nacional de Sanidad. Instituto de Salud Carlos III.

Nº de depósito legal: M-23317-2022

ISBN edición online: 978-84-09-44167-9

©2022 del contenido: Fundación Instituto Roche. Se permite la reproducción parcial, sin fines lucrativos, indicando la fuente y la titularidad de la Fundación Instituto Roche sobre los derechos de la obra.

www.instituto-roche.es

Con la colaboración de Ascendo Sanidad&Farma.

Contenidos

PRESENTACIÓN	5
RESUMEN EJECUTIVO	7
INTRODUCCIÓN	9
Qué es el Nucleoma 4D: la genómica tridimensional (3D) y su dinámica (4D)..	9
Iniciativas para el estudio del Nucleoma 4D	11
TECNOLOGÍAS PARA EL ESTUDIO DEL NUCLEOMA 4D	13
Microscopia de luz para el estudio del Nucleoma 4D	13
<i>Chromosome Conformation Capture</i> : “microscopios” moleculares	14
AVANCES EN EL ESTUDIO DEL NUCLEOMA 4D Y APLICACIONES DERIVADAS EN LA MEDICINA DEL FUTURO	15
Investigación en el campo del Nucleoma 4D	15
Potenciales aplicaciones en la medicina del futuro.....	18
RETOS	19
Retos técnicos	19
Retos de implementación	20
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	21
Recomendaciones	21
BIBLIOGRAFÍA	23

NUCLEOMA 4D





PRESENTACIÓN

Los Informes Anticipando, elaborados en el marco del Observatorio de Tendencias en la Medicina del Futuro impulsado por la Fundación Instituto Roche, surgen con el objetivo de contribuir a la generación y difusión de los avances en áreas de conocimiento incipiente relacionadas con la Medicina Personalizada de Precisión y que formarán parte de la Medicina del Futuro.

El Observatorio cuenta con un Comité Asesor formado por el **Dr. Ángel Carracedo**, el **Dr. Joaquín Arenas**, el **Dr. Pablo Lapunzina** y el **Dr. Fernando Martín-Sánchez**, responsables de la selección de las temáticas y la identificación de los expertos que elaboran los contenidos de los informes, así como la revisión final de dichos documentos.

Este informe que versa sobre el Nucleoma 4D está coordinado por el **Dr. Marc A. Martí-Renom**. En su elaboración han participado como expertos el **Dr. Jorge Ferrer**, la **Dra. Ana Losada** y el **Dr. Darío Lupiáñez**.

El **Dr. Marc Martí-Renom**, es licenciado en biología y PhD en Biofísica Molecular por la Universidad Autónoma de Barcelona. Desde 2006, el Dr. Martí-Renom lidera el grupo de investigación en Genómica Estructural, primero en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) y posteriormente en el Centro Nacional de Análisis Genómico – Centro de Regulación Genómica (CNAG-CRG). Además, es profesor de investigación en la Institución Catalana de Investigación y Estudios Avanzados (ICREA). La misión de su grupo es desarrollar y utilizar enfoques experimentales y computacionales para caracterizar la regulación molecular de las células mediante el estudio de la estructura de las macromoléculas y sus complejos. En particular, estudian moléculas reguladoras como el ARN y la cromatina. Ha coordinado dos equipos internacionales financiados por la Unión Europea (UE): *Era-Net Pathogenómica Grant*, y el *Human Frontier Science Program-Research*

Grants Award. Además, ha participado en numerosos proyectos financiados por la UE, incluida la subvención *4DGenome* financiada por *European Research Council Synergy* (2014-2020). Actualmente, es co-Investigador Principal (co-PI) en *ChromDesign ETN*, el Centro de excelencia de PerMed y *3D’Omics*, proyectos financiados por el programa Horizonte 2020 de la Comisión Europea. También coordina y participa en subvenciones de fundaciones privadas como la Fundación “La Caixa” y “La Marató” de TV3 y la Fundación Lundbeck. Desde 2021 es co-PI del *Center for Genome Imaging*, un Centro de Excelencia en Ciencias Genómicas, del *National Human Genome Research Institute del National Institute of Health* en EE.UU.

El **Dr. Jorge Ferrer**, es coordinador del Programa Transversal de Genómica Médica y líder del Grupo de Regulación del genoma y diabetes del Centro para la Regulación Genómica (CRG). Se licenció en Medicina y realizó la residencia en Endocrinología en el Hospital Clínic de Barcelona. Posteriormente, se formó en genética y regulación transcripcional en la Universidad de Washington y la Universidad de Harvard antes de regresar al Institut d’Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer de Barcelona, y al CIBERDEM. Luego se trasladó al Imperial College de Londres, donde estableció un laboratorio con sede en el Centro Imperial de Medicina Traslacional y Experimental. Fue jefe de la Sección de Epigenómica y Enfermedades, jefe de Genética y Genómica en el Centro de Investigación Biomédica Imperial del NIHR e investigador senior de Wellcome Trust. Desde 2018, es jefe de grupo en el Centro de Regulación Genómica (CRG) de Barcelona y mantiene la posición de profesor de Genética y Genómica en Imperial College. La línea de investigación del profesor Ferrer está dirigida a comprender la regulación del genoma de las células beta pancreáticas y sus implicaciones para la diabetes humana. Su equipo combina sistemas de modelos genéticos y genómica avanzada

NUCLEOMA 4D

para abordar cuestiones clave en la biología, regeneración y enfermedad de las células beta humanas. Entre los trabajos recientes del equipo, destaca la generación de mapas 3D del genoma en islotes pancreáticos humanos que han permitido identificar mecanismos genéticos de esta enfermedad y posibles dianas terapéuticas.

La **Dra. Ana Losada**, es licenciada y doctora en Ciencias Químicas por la Universidad Autónoma de Madrid. Desde 2004, dirige el Grupo de Dinámica Cromosómica dentro del Programa de Oncología Molecular del Centro de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Durante su etapa postdoctoral trabajó con el Dr. Tatsuya Hirano en *Cold Spring Harbor Laboratory* (NY, USA) e identificó el primer complejo cohesina de vertebrados, contribuyendo de forma notable a la caracterización de su funcionamiento y regulación. Su investigación hoy en día se centra en el estudio de dicho complejo y en las consecuencias patológicas de su mutación, tanto en síndromes del desarrollo como en cáncer. En particular, el grupo explora la especificidad funcional de las diferentes versiones de cohesina que coexisten en las células de mamíferos y su participación en la organización 3D del genoma usando modelos celulares y modelos de ratón. Recientemente ha puesto en marcha un proyecto financiado por la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) para entender la contribución de las

mutaciones en el gen de cohesina STAG2 a la agresividad del Sarcoma de Ewing, un cáncer de hueso que afecta a niños y jóvenes.

El **Dr. Darío Lupiáñez**, se licenció en Farmacia en la Universidad de Granada, donde también obtuvo un doctorado en genética y evolución por su estudio de los procesos de determinación del sexo en mamíferos. Posteriormente, realizó un postdoctorado en el *Max Planck Institute for Molecular Genetics* de Berlín (Alemania) donde, fue de los primeros en demostrar la relevancia biológica de la estructura 3D del genoma y su implicación en enfermedad humana. Desde 2017, dirige el grupo de investigación “*Epigenetics & Sex Development*”, en el *Berlin Institute for Medical Systems Biology* (BIMSB) del Max Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC). Su investigación se centra en la combinación de técnicas ómicas y edición genética para el estudio de la regulación génica en 3D *in vivo*. Durante su carrera, ha recibido varios reconocimientos científicos, incluyendo un *European Research Council Consolidator Grant*, el *EMBO Young Investigator Award* o el *ESHG Young Investigator Award for Outstanding Science*, entre otros. En 2023, se incorporará como científico titular al Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).



RESUMEN EJECUTIVO

El genoma se encuentra altamente organizado para poder ser empaquetado en el núcleo de las células manteniendo su funcionalidad. Esta organización no sucede al azar, sino que se ha visto que regiones específicas del genoma ocupan espacios concretos dentro del núcleo. El estudio del Nucleoma 4D está dirigido a conocer la organización tridimensional del genoma dentro del núcleo y su dinámica, es decir, los cambios que se producen en dicha estructura tridimensional a lo largo del tiempo, con el objetivo de conocer las implicaciones y consecuencias que puede tener dicha organización sobre las funciones del genoma.

Los avances tecnológicos y computacionales y el estudio de series temporales han permitido conocer los diferentes niveles de organización, así como los cambios que se producen en dicha organización a lo largo del tiempo, poniendo de manifiesto la relevancia de la distribución tridimensional y la dinámica sobre la expresión génica y las funciones del genoma.

El estudio del Nucleoma 4D se está convirtiendo en un área de gran interés en investigación por el potencial del conocimiento generado para comprender los procesos fisiológicos y patológicos asociados a la estructura

tridimensional y los cambios temporales del genoma dentro del núcleo. Es relevante señalar que se trata de un área en fase de estudio y generación de evidencia, pero es posible vislumbrar el desarrollo de aplicaciones basadas en el estudio del Nucleoma 4D que podrían permitir la mejora de los grandes estudios de asociación genómica (GWAS), la predicción, diagnóstico y pronóstico de enfermedades, y el descubrimiento y desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos en el marco de la Medicina Personalizada de Precisión.

Así, es previsible que, con los avances tecnológicos, especialmente los métodos de mapeo del genoma completo, se puedan plantear posibles asociaciones entre la estructura 3D del genoma y su dinámica, con el desarrollo de enfermedades y su evolución. Sin embargo, existe todavía un camino que recorrer en el estudio y validación de la información obtenida mediante el estudio del Nucleoma 4D como, por ejemplo, la necesidad de realizar experimentos sobre células vivas. Por ello, se espera que los futuros avances y herramientas permitan conocer en mayor profundidad el Nucleoma 4D y desarrollar el potencial de sus aplicaciones en la Medicina Personalizada de Precisión.

NUCLEOMA 4D





INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se han producido grandes avances en el desarrollo de las ciencias ómicas. La genómica, que se centra en el estudio del conjunto de secuencias de ADN que hay en un organismo, fue la primera de estas ciencias en desarrollarse y ha permitido conocer, caracterizar y localizar las secuencias genéticas. Gracias a ello, ha sido posible obtener mapas genéticos de los organismos, determinar las funciones de los genes y los patrones de expresión génica, permitiendo profundizar en el conocimiento de determinadas patologías, especialmente las monogénicas. No obstante, la existencia de enfermedades multifactoriales y los avances acontecidos en otras áreas de conocimiento han puesto de manifiesto que el genoma aislado y su secuencia no son los únicos factores determinantes.

Ejemplo de ello es la epigenómica, entendida como la ciencia que estudia el conjunto de todas las modificaciones que se producen a lo largo del genoma de un individuo sin modificar la secuencia de ADN, pero que sí influyen en la expresión génica (para más información, ver [Informe Anticipando sobre "Epigenómica"](#)).¹ Algunas de estas modificaciones epigenéticas^a afectan a la estructura de la cromatina y condicionan la expresión génica, indicando que la disposición espacial del genoma tiene un rol funcional. En este contexto, surge el Nucleoma 4D como el estudio de la estructura tridimensional del genoma dentro del núcleo y cómo varía a lo largo del tiempo, que puede ser relevante para avanzar en la comprensión de los diferentes mecanismos que afectan a la expresión génica.

QUÉ ES EL NUCLEOMA 4D: LA GENÓMICA TRIDIMENSIONAL (3D) Y SU DINÁMICA (4D)

Históricamente, el estudio del genoma se ha centrado en su secuencia lineal para determinar sus principales

funciones, tales como la transcripción, replicación, reparación del ADN y de las mutaciones.¹ Sin embargo, en las últimas décadas, **el conocimiento del genoma y su función**, junto con **la aparición y desarrollo de técnicas de microscopía e imagen más sofisticadas**, ha permitido conocer en mayor profundidad la **organización del genoma dentro del espacio del núcleo**.^{2,3}

Cada célula del organismo contiene aproximadamente **2 metros de ADN dentro del núcleo**, cuyo tamaño es micrométrico. Para lograrlo, **el ADN** debe compactarse gracias a su asociación a diferentes **proteínas** formando la **cromatina**^b dentro de la estructura compleja del núcleo de las células.^{3,4} Así, en el núcleo existen elementos, como por ejemplo la lámina nuclear^c, el nucleolo^d o los "speckles" o gránulos nucleares^e, que influyen sobre la organización espacial de la cromatina e interfieren sobre las funciones del genoma.

Varios estudios sugieren que este empaquetamiento no se produce al azar, sino que existen diferentes niveles de organización del ADN dentro del núcleo. De hecho, **el plegamiento sigue unos patrones específicos e íntimamente relacionados con la expresión y la función de los genes**, dirigidos a facilitar las interacciones entre los genes y sus elementos reguladores generando la estructura 3D del genoma.⁵ De esta manera es posible distinguir una estructura jerárquica con los siguientes niveles de organización de mayor a menor escala (Figura 1):^{4,6-8}

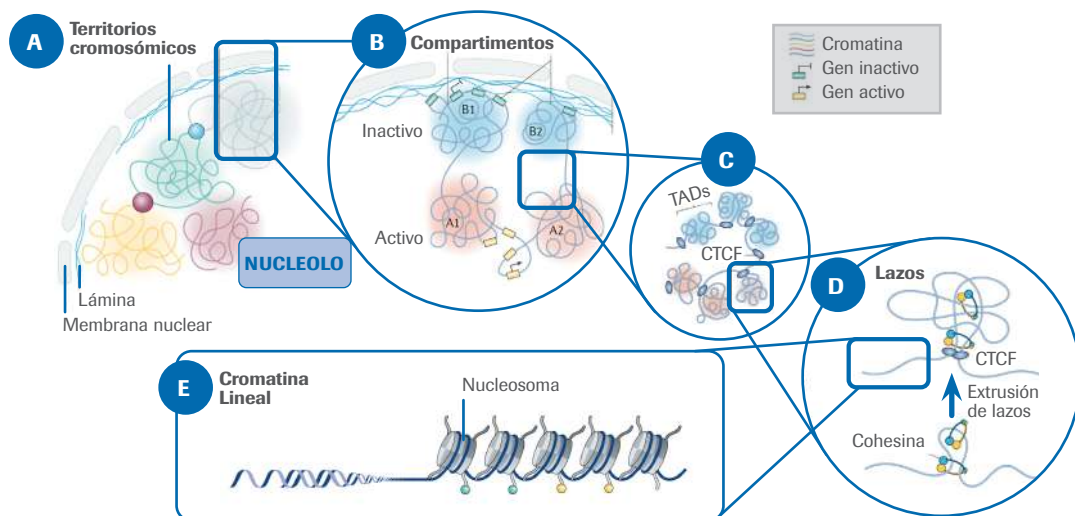
- **Territorios cromosómicos** (Figura 1a). Se trata de **estructuras que corresponden al lugar que ocupa cada cromosoma** como molécula individual **dentro del núcleo**. Se forman por un mecanismo físico cuando el cromosoma se descompacta y se expande en la interfase del ciclo celular^f, manteniéndose dentro de una localización concreta en el núcleo. Se ha observado que los **cromosomas de mayor tamaño** (generalmente menos activos) se sitúan en la **periferia del núcleo**, mientras que los de **menor tamaño** (generalmente más activos) se sitúan en el **interior**.

^aModificaciones químicas que ocurren en el entorno de la molécula de ADN que son heredables, pero que no suponen un cambio sobre la secuencia del ADN. Estas modificaciones juegan un papel fundamental en la regulación de la estructura de la cromatina y, por tanto, en la regulación de la expresión génica. ^bEstructura tridimensional altamente organizada y compleja en la que se presenta el genoma empaquetado dentro del núcleo. ^cRed entrelazada de filamentos compuestos por proteínas (laminina A, B y C) que se sitúa en la parte periférica del núcleo y está en contacto con la cara interna de la envoltura nuclear. ^dÁrea del núcleo compuesta principalmente por ARN y proteínas, donde se producen los ribosomas. ^eÁrea del núcleo enriquecida en factores y proteínas implicados en procesos de empalme o splicing del ADN que se visualizan como agrupaciones de gránulos. ^fProceso mediante el cual las células se dividen para dar lugar a dos células hijas. Este proceso consiste en una interfase, en la que se encuentra la célula la mayor parte del tiempo, durante la cual la célula se prepara para la división (fase G1), duplica su ADN (fase S), el ADN se condensa y se organiza (fase G2) para entrar en la fase de mitosis en la que se produce la división.

NUCLEOMA 4D

- **Compartimentos** (Figura 1b). Se trata de **regiones del genoma, que pueden encontrarse en un único cromosoma o en varios**, con una extensión de megabases (Mb)⁹ en las que la cromatina **presenta mayor o menor grado de condensación y se asocian moléculas de características similares**. Hasta el momento se han descrito dos tipos de compartimentos:
 - **Compartimento A o eucromatina:** regiones del genoma relacionadas con **transcripción activa y/o enriquecidas con modificaciones epigenéticas con efecto activador** como, por ejemplo, la acetilación de las histonas en H3K27. Además, tienden a interactuar con elementos del interior del núcleo que se asocian a la transcripción como por ejemplo los “*nuclear speckles*”.⁹
 - **Compartimento B o heterocromatina:** regiones con un **carácter transcripcionalmente inactivo y enriquecidas en marcas epigenéticas represivas** como, por ejemplo, la trimetilación H3K27 de las histonas. Por su parte, estas regiones tienden a asociarse con elementos de la periferia del núcleo que tienen un carácter represivo, como la lámina.⁹
- **Dominios asociados topológicamente (TADs, por sus siglas en inglés)** (Figura 1c). Se trata de **zonas de interacción entre regiones genómicas**, del orden de centenares de kilobases⁸ (Kb), que **contribuyen al control espacio-temporal de los genes**. Estos dominios **aislan las interacciones entre regiones del genoma**, de manera que las interacciones intra-dominios tienen una alta frecuencia mientras que las interacciones inter-dominios son menos frecuentes. Este nivel de organización del genoma permite que, por ejemplo, los *enhancers*¹ que modulan la expresión de un gen, pero que se encuentran distantes en la secuencia lineal del ADN, se acerquen físicamente a las regiones que regulan. De esta manera, los *enhancers* que se encuentran dentro de un

Figura 1. Niveles de organización dentro del espacio nuclear y elementos relacionados con el plegamiento.



A) Durante la interfase, cada cromosoma (representados por diferentes colores) ocupa una región nuclear concreta dentro del núcleo conocida como territorio cromosómico. B) A una escala menor, los cromosomas y las regiones genómicas se posicionan de forma radial en función de la actividad de los genes, de manera que las regiones más activas (A1 y A2 en la figura) se posicionan en el interior, interactuando con elementos activos, como el nucleolo, y formando el compartimento A y las regiones menos activas se sitúan en la periferia, interactuando con elementos menos activos como la lámina, y formando el compartimento B. C) La cromatina forma dominios que interactúan entre sí y que forman las unidades funcionales del genoma, conocidos como TADs. D) Los TADs están formados por lazos de cromatina que se construyen por la interacción de dos proteínas: cohesina y CTCF, a través de un proceso de extrusión de la fibra de cromatina. E) La fibra de cromatina está formada por la combinación del ADN lineal con las histonas que albergan modificaciones que participan en la regulación epigenética. Adaptado de (8).

⁹ Unidad de longitud para fragmentos de ADN que equivale a 1 millón de nucleótidos (aproximadamente 1 centimorgan, cM).

⁸ Unidad de longitud de los ácidos nucleicos que corresponde a 1000 nucleótidos. En DNA bicatenario sería 1000 pares de bases (Kbp).

¹ Región corta de ADN que puede unirse con proteínas para aumentar los niveles de transcripción de determinados genes.



TAD, tienden a regular genes dentro de dicho TAD. Estos TADs se encuentran **delimitados por *boundaries***, secuencias de ADN que suelen conservarse entre tipos celulares o tejidos y tienen una **función determinante sobre las interacciones entre los genes y sus elementos reguladores**.

- **Loops o lazos de cromatina.** Se trata de **estructuras que facilitan la interacción entre elementos reguladores y genes dentro de los TADs**. Existen varias hipótesis, pero la más extendida sostiene que se forman a partir de un proceso conocido como **extrusión del lazo**, en el que intervienen principalmente dos elementos: **la cohesina y el factor de unión a CCCTC (CTCF, por sus siglas en inglés)**. En el proceso de extrusión, la cohesina, una proteína que se pliega en forma de anillo, se coloca alrededor de la fibra de cromatina, provocando el deslizamiento de la fibra por su interior formando bucles de material genético (Figura 1d). Por otro lado, el CTCF se une a la cromatina ejerciendo de barrera física para detener el avance de la cohesina y, por tanto, delimitando los TADs.

Estos niveles de organización ponen de manifiesto la **relevancia de la distribución tridimensional del genoma sobre la expresión génica**. Además, se trata de un **proceso dinámico en el que la estructura del genoma dentro del núcleo varía en función del tiempo**. Por ello, el estudio de la organización del genoma en diferentes

espacios temporales puede aportar información relevante sobre las funciones del genoma, por lo que se está convirtiendo en un área muy activa de la investigación. En este contexto, **los avances tecnológicos y el desarrollo de nuevas técnicas se enfocan en observar series temporales** para así conocer la **dinámica** de la compleja estructura tridimensional del genoma, que constituye **la cuarta “D” del término “Nucleoma 4D”**.¹⁰

INICIATIVAS PARA EL ESTUDIO DEL NUCLEOMA 4D

Este término surge tras la secuenciación del genoma completo en el **Proyecto Genoma Humano**, y la caracterización de los elementos reguladores de iniciativas como el proyecto **ENCODE Roadmap Epigenome**, el **International Human Epigenome Consortium** o el **Proyecto FANTOM**. Con la información derivada de estas iniciativas, que facilitó la comprensión de la complejidad del genoma, se constituyó la **4D Nucleome Network**, una **red dirigida a determinar el papel del factor tiempo en la organización del genoma y la función celular**. Esto aportará una nueva perspectiva sobre la organización, el mantenimiento, la expresión y la replicación del genoma tanto en estados fisiológicos normales, como patológicos, con un previsible impacto sobre la medicina del futuro.^{5,10}

Tabla 1. Iniciativas que han permitido el estudio del Nucleoma 4D.

INICIATIVA	DESCRIPCIÓN
Proyecto Genoma Humano	Proyecto de investigación internacional nacido en los años 90 con el objetivo de mapear y entender todos los genes del ser humano desde el punto de vista funcional. Este proyecto concluyó en 2003 tras completar el mapa del genoma completo.
Proyecto FANTOM (Functional Annotation of the Mammalian Genome)	Consortio internacional nacido en el año 2000 para establecer las funcionalidades a la secuencia codificante del ADN. A partir de este proyecto se han ido publicando diferentes análisis funcionales sobre diferentes elementos del ADN.
ENCODE Roadmap Epigenome	Proyecto de investigación lanzado en 2003 por el Instituto de investigación del Genoma Humano de EE. UU (NHGRI) tras la conclusión del Proyecto Genoma Humano. Incorpora un consorcio mundial de grupos de investigación y sus datos son accesibles a través de bases de datos públicas. Su objetivo principal es determinar el papel de todos los elementos funcionales del genoma humano (por ejemplo, elementos reguladores y secuencias relacionadas con la estructura)
International Human Epigenome Consortium	Consortio científico fundado en 2010 que nace para coordinar todos los esfuerzos y diferentes iniciativas surgidas en el campo de la epigenómica con el objetivo de entender a qué nivel el epigenoma ha moldeado las poblaciones a lo largo del tiempo.
4D Nucleome Network	Consortio internacional, creado en 2014, que busca desarrollar nuevas tecnologías computacionales y experimentales y optimizar las actuales para conseguir mapear la estructura 3D y avanzar en el estudio de la dinámica del genoma para comprender las implicaciones funcionales que puede tener.

NUCLEOMA 4D





TECNOLOGÍAS PARA EL ESTUDIO DEL NUCLEOMA 4D

Los avances computacionales y experimentales a lo largo de las últimas décadas han permitido obtener una mejor caracterización de la organización nuclear y son esenciales para determinar la arquitectura 3D y la dinámica (4D) del genoma. De hecho, dichos avances han permitido estudiar características estructurales a diferentes escalas, desde loci¹ específicos, cromosomas, hasta genomas enteros.

Para el estudio de la organización genómica se pueden distinguir dos metodologías, una basada en la observación indirecta a través de técnicas de biología molecular, y otra basada en la observación directa mediante el uso de microscopía. El uso de una u otra metodología, así como la selección de las técnicas y tecnologías, dependerá en gran medida de la escala que se estudie.

Para estudiar la estructura del empaquetamiento del ADN se emplean técnicas como la cristalografía^k, la resonancia magnética nuclear^l o la microscopía electrónica de congelación^m. Sin embargo, estas técnicas sólo permiten estudiar un número limitado de nucleótidos. Para el estudio de estructuras de mayor tamaño, como los territorios cromosómicos, se utiliza la microscopía de luz o las técnicas de *Chromosome Conformation Capture (3C)*.

MICROSCOPIA DE LUZ PARA EL ESTUDIO DEL NUCLEOMA 4D

La microscopía de luz permite obtener imágenes de loci específicos dentro de una célula. Además, su combinación con tinciones completas de cromosomas o con hibridación *in situ* fluorescente (FISHⁿ, por sus

siglas en inglés) permite el estudio de territorios cromosómicos completos a baja resolución. De esta manera, es posible determinar la situación espacial de las regiones genómicas, pero no la asociación física real entre diferentes regiones.¹¹⁻¹³

Los avances en microscopía, y en especial la microscopía de luz de alta resolución, están contribuyendo a mejorar la capacidad de estudio de la estructura del genoma, y con ello al avance del estudio del Nucleoma 4D. Estos avances se hacen desde dos aproximaciones que intentan, por una parte, visualizar cada vez más partes del genoma a baja resolución, y por otra parte visualizar a alta resolución un número limitado de regiones del genoma. Dos de las tecnologías recientes de cada aproximación serían:

- **OligoFISSEQ:** se basa en la combinación de la coloración mediante ordenador de nucleótidos de interés (*oligopainting*) con FISSEQ (*Fluorescence in situ sequencing*), una técnica que permite conocer la secuencia de ADN directamente en el tejido. Esta combinación permite detectar una gran cantidad de loci dependiendo de las rondas de secuenciación.¹⁴
- **OligoSTORM:** se trata de una técnica que combina el *oligopainting* con STORM (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*). Esta combinación ofrece una mayor resolución, mostrando la localización del oligonucleótido que se está estudiando y la forma que presenta. Sin embargo, esta mayor resolución que se consigue se acompaña de un incremento en los costes y en el tiempo de estudio, de manera que no es factible hoy en día obtener una imagen de todo el genoma.¹⁵

¹Lugares o localizaciones físicas que ocupan los genes de manera específica en los cromosomas. ^kTécnica que utiliza rayos X para el estudio de la estructura de las moléculas a través del patrón de difracción resultante de la desviación que producen los átomos de la molécula de los rayos X. ^lTécnica analítica para el estudio de la estructura molecular y composición química de una muestra, que analiza la interacción de los núcleos tras la aplicación de un campo magnético. ^mTécnica que combina la microscopía electrónica con la congelación de la muestra para evitar alteraciones en la estructura producidas por el procesamiento (la deshidratación) de las muestras. ⁿTécnica para detectar y localizar secuencias de ADN específicas en los cromosomas mediante el uso de sondas de ADN purificado, marcadas con una molécula fluorescente, que hibridan con la secuencia complementaria en la muestra.

NUCLEOMA 4D

En este sentido, el campo de la microscopía busca como objetivo fusionar estas aproximaciones para poder obtener una visión de todo el núcleo a alta resolución.

CHROMOSOME CONFORMATION CAPTURE: “MICROSCOPIOS” MOLECULARES

Respecto a otros métodos de estudio no basados en la microscopía, uno de los grandes hitos en el estudio de la organización tridimensional del genoma ha sido el desarrollo de la técnica de *Chromosome Conformation Capture (3C)*. Se trata de una metodología que permite el estudio de niveles de organización que hasta el momento no se podían estudiar generando una laguna de conocimiento o *resolution gap*.¹¹ La 3C se basa en un proceso de fijación, digestión y ligado de la cromatina, de manera que los fragmentos que interactúan quedan unidos y se pueden detectar mediante secuenciación (Figura 2).^{16,17}

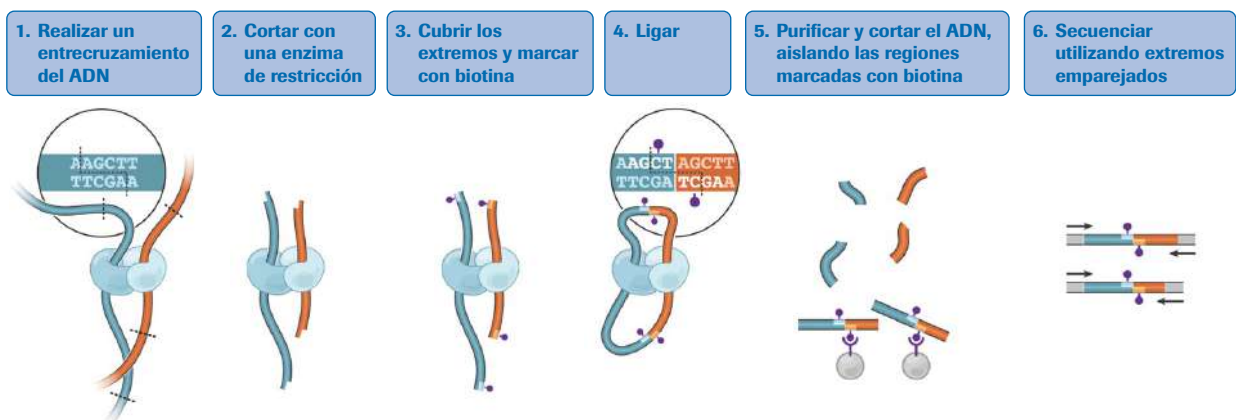
A partir de la aparición del 3C, han ido surgiendo variantes, cada vez más avanzadas basadas en esta metodología con el objetivo de crear mapas de frecuencias de contactos entre diferentes loci del genoma. Algunas de estas técnicas son:

- **4C** (*Circular Chromosome Conformation Capture*), que mide las frecuencias de interacciones entre un locus y diferentes loci.
- **5C** (*Chromosome Conformation Capture Carbon Copy*) que permite medir las frecuencias de interacción de muchos loci con diferentes loci.
- **Hi-C** (*Genome-wide Chromosome Conformation Capture*) que no se limitan a un único locus o grupo de loci, si no que generan matrices de frecuencias de interacción del genoma completo.



Concretamente, **Hi-C ha sido determinante a la hora de identificar estructuras como los compartimentos y los TADs**, y en el planteamiento del **modelo de extrusión de lazos** de cromatina.^{5,12}

El avance de las ómicas junto con el desarrollo computacional y la aparición de nuevas tecnologías es clave para el futuro estudio del Nucleoma 4D. En concreto, **las técnicas de imagen y los métodos de mapeo del genoma completo** han permitido conocer la relevancia de la estructura 3D del genoma y su dinámica sobre la función del mismo, y **permiten plantear posibles asociaciones al desarrollo de enfermedades y su evolución**. Por ello, se espera que los futuros avances y herramientas permitan conocer en mayor profundidad el Nucleoma 4D y desarrollar a partir de esta información aplicaciones en la Medicina Personalizada de Precisión.

Figura 2. *Chromosome Conformation Capture* en su versión de alta cobertura conocida como Hi-C.



Las secuencias obtenidas se secuencian las veces que sea necesario para obtener matrices de interacciones del genoma. Adaptado de (17).



AVANCES EN EL ESTUDIO DEL NUCLEOMA 4D Y APLICACIONES DERIVADAS EN LA MEDICINA DEL FUTURO

Es importante señalar que, si bien el estudio de la estructura 3D del genoma y la descripción de los diferentes niveles de organización han contribuido a la comprensión de la regulación y función del genoma, el Nucleoma 4D se encuentra en una fase exploratoria y sus aplicaciones se encuentran en desarrollo. Por ello, es previsible que los avances tecnológicos permitan establecer relaciones entre la arquitectura del genoma y sus variaciones a lo largo del tiempo con condiciones de salud y/o enfermedad.³ Así, será posible el desarrollo de aplicaciones para la práctica clínica que contribuyan a ofrecer a los pacientes una Medicina Personalizada de Precisión.

INVESTIGACIÓN EN EL CAMPO DEL NUCLEOMA 4D

Las principales líneas de investigación del Nucleoma 4D con potencial para su traslación a la práctica clínica están dirigidas a comprender la conformación espacial de los cromosomas, las interacciones entre genes distantes en la secuencia y los cambios estructurales del genoma a lo largo del tiempo.¹³

En este contexto, el consorcio 4D Nucleome Network está impulsando el estudio del Nucleoma 4D de cara a mapear la estructura y la dinámica del genoma. Para ello, se está trabajando en la generación de modelos

cuantitativos sobre la organización del genoma en diferentes tipos celulares, tiempos y condiciones, cuyos datos puedan correlacionarse con su actividad biológica para que, una vez sean validados, puedan asociarse a estados fisiológicos y patológicos.⁵ En este sentido, la red ha definido 3 líneas de trabajo para avanzar en la aplicación del Nucleoma 4D en diferentes campos:

- Mapear el genoma mediante técnicas y tecnologías de genómica molecular e imagen. Concretamente, el mapeo de las estructuras del genoma permite obtener información sobre las características de la organización espacial y establecer los contactos e interacciones que se producen entre genes y elementos reguladores en cada célula en distintos momentos. El trabajo previo realizado por iniciativas dirigidas a abarcar el estudio del genoma completo (*genome-wide*), como el proyecto ENCODE, han permitido identificar un gran número de elementos regulatorios dispersos a lo largo del genoma, cuyas interacciones atienden a diferentes mecanismos.^{5,13} Este conocimiento junto al uso de técnicas basadas en microscopía de luz y 3C ha permitido conocer algunos de los mecanismos asociados al control genético relacionados con la estructura 3D del genoma. Por ejemplo, se sabe que la disposición espacial no es aleatoria dentro del núcleo, es decir, los cromosomas y determinados genes ocupan posiciones relativas con respecto al centro del núcleo.

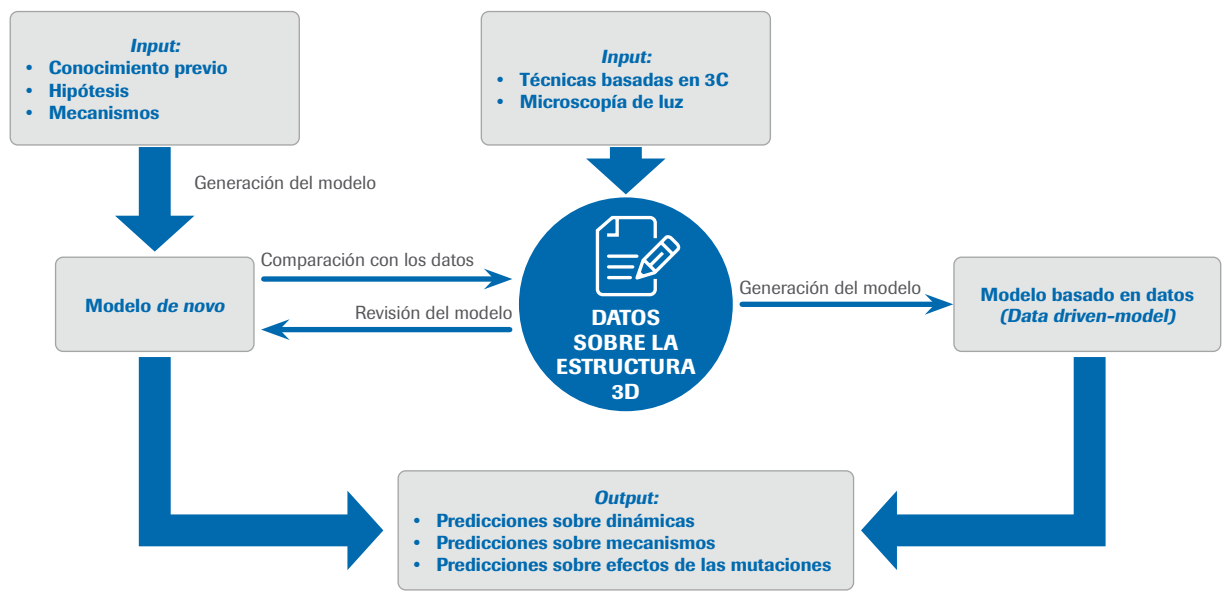
NUCLEOMA 4D

Dicha posición es específica del tipo celular o del tejido (por ejemplo, la posición radial del cromosoma X en las células hepáticas es más periférica que en las renales), y puede ser diferente entre el estado fisiológico y patológico de la célula (por ejemplo, en el cáncer de páncreas, el cromosoma 8 tiende a situarse en una localización más periférica).¹³

- **Generar modelos espaciales y dinámicos del núcleo.** Los modelos se generan a partir de técnicas computacionales que permiten interpretar las observaciones experimentales y los mapas para establecer hipótesis sobre las implicaciones sobre la estructura, el funcionamiento y actividad del genoma (Figura 3). Existen dos posibles aproximaciones para construir dichos modelos: *Data-driven modelling*, con el que se obtienen modelos a partir de los datos de mapas de Hi-C obtenidos en momentos diferentes; *De novo modelling*, con el que se obtienen modelos generados a partir del conocimiento de los mecanismos, con lo que se genera una hipótesis que justifica los cambios observados en los datos de Hi-C.5

- **Validar funcionalmente los modelos.** Para demostrar la eficacia de los modelos a la hora de establecer relaciones causa-efecto y evaluar las implicaciones funcionales que tiene la configuración tridimensional del genoma, se realizan experimentos que buscan alterar esta estructura. Estos experimentos utilizan herramientas de edición genómica, como el CRISPR/Cas9^o, para generar deleciones, inserciones o translocaciones^p en elementos involucrados en estructuras tridimensionales, y posteriormente analizar los efectos de estas perturbaciones. Por ejemplo, es posible inducir alteraciones con herramientas de edición génica en los TAD *boundaries* o en los lazos de cromatina para estudiar el papel de estas alteraciones en el plegamiento de la cromatina, en la expresión génica o en la replicación del ADN, que pueden conducir al desarrollo de enfermedades.^{5,18} Un ejemplo de experimento llevado a cabo en este sentido es la deleción de un TAD *boundary* en el locus *Epha4* de ratones transgénicos^q. Se ha visto que esta alteración puede resultar en contactos

Figura 3. Modelos espaciales y dinámicos del núcleo.



Existen dos posibles aproximaciones para construir dichos modelos: Data-driven modelling, con lo que se obtienen modelos a partir de los datos de mapas de Hi-C obtenidos en momentos diferentes; De novo modelling, con lo que se obtienen modelos generados a partir del conocimiento de los mecanismos, con lo que se genera una hipótesis que justifica los cambios observados en los datos de Hi-C. Adaptado de (5).

^o Técnica de edición génica basada en el uso de secuencias cortas repetitivas palindrómicas (CRISPR) para dirigir a una proteína endonucleasa (Cas9) a secuencias concretas del ADN e introducir cortes en la secuencia de ADN.

^p Alteraciones cromosómicas por la que se cambia la ubicación de un determinado material cromosómico.

^q El término transgénico se refiere a aquellas células u organismos que contienen, en su línea germinal, ADN exógeno introducido experimentalmente.



ectópicos entre *enhancers* y promotores, que provocan una expresión anormal de genes del desarrollo como el *Pax3*, *Wnt6* o *lhh*, dando lugar a malformaciones en las extremidades como la polidactilia.¹⁹

El avance en estas líneas es esencial para comprender cómo **mutaciones puntuales o a gran escala pueden alterar la expresión génica y tener consecuencias biológicas sobre el desarrollo de patologías**. Algunos **ejemplos de alteraciones relacionadas con la estructura** que pueden desencadenar patologías, y que pueden suponer una diana para el desarrollo de aplicaciones para la práctica clínica y una oportunidad para mejorar el abordaje de las mismas, se desarrollan a continuación.²⁰

- **Alteraciones en factores arquitectónicos del genoma.** En este sentido se han identificado **alteraciones en CTCF y cohesinopatías**, que como resultado modifican el proceso de extrusión del lazo de cromatina. Por ejemplo, se han identificado **mutaciones en las unidades que forman el CTCF** que afectan a la formación de los *boundaries*, provocando la **activación de genes de diferentes TADs que deberían estar silenciados**. Este tipo de alteraciones, en el que se produce la disrupción del *boundary* que aísla un oncogén, se ha detectado en casos de leucemia linfoblástica aguda de células T. En este caso, la alteración del *boundary* del TAD en el que se encuentra el oncogén *TAL1*, provoca la aproximación del promotor próximo del gen *STIL*, activando su expresión y transformando las células T en células cancerosas.^{20,21} De hecho, **el correcto funcionamiento de CTCF es vital para la viabilidad de los organismos**. Tanto es así que **la inactivación o eliminación de una de las copias del gen (haploinsuficiencia)**, y por lo tanto **la disminución de los niveles del factor, no son compatibles con la vida**. Se ha visto que, durante el desarrollo embrionario, la ausencia completa de CTCF en el cerebro es letal, y la reducción significativa de sus niveles se asocia a microcefalia.^{22,23} En cuanto a las **cohesinopatías**, se trata de situaciones patológicas producidas por **alteraciones de los componentes que forman el complejo de la cohesina**. De hecho, las mutaciones somáticas en las cohesinas se han relacionado con diversos tipos de cáncer. Se ha visto que las mutaciones en el gen *STAG2*, que codifica para una subunidad de la cohesina, se asocian a una pérdida de función de esta proteína. Estas

alteraciones se han detectado en algunos tipos de cáncer que presentan un fenotipo más agresivo, como el sarcoma de Ewing o el melanoma.^{24,25} Otro ejemplo de cohesinopatía es el Síndrome de Cornelia de Lange que en más del 65% de los casos se origina por mutaciones en el gen *NIPBL* que codifica para una proteína involucrada en la unión de la cohesina a la cromatina.²⁶ Estas mutaciones en *NIPBL* provocan que los lazos de cromatina no se formen correctamente, dando lugar a una desregulación de la expresión inespecífica de genes causando problemas de desarrollo y cognitivos.²⁶

- **Alteraciones en los factores que median en la compartimentalización nuclear.** En esta categoría se encuentran las alteraciones en proteínas asociadas a la lámina o **laminopatías**. Como se ha comentado anteriormente, **la lámina del núcleo y la disposición del genoma en sus proximidades juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica**. Por ello, **alteraciones** que afecten a esta relación tendrán **consecuencias graves para la salud**. Ejemplo de ello es el Síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford, en el que se produce un cambio en las dinámicas del ADN debido a alteraciones en el gen *LMNA*, que codifica para la lámina A. La pérdida de la lámina A hace que se pierda la arquitectura nuclear y, en consecuencia, la estructura de la cromatina. Esto da lugar a una expresión anormal de diferentes genes, desencadenando un aumento de la apoptosis y de la mitosis, y daños en el ADN.²⁷
- **Alteraciones a nivel de locus específicos**, tales como, **deleciones, duplicaciones, inversiones o traslocaciones**. Puede darse el caso de que estas variaciones afecten a los **sitios de unión de los factores arquitectónicos de la cromatina**, provocando **reorganizaciones del genoma** que pueden dar lugar a la **aparición de nuevos sitios de unión**. La enfermedad de Huntington, la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) o el síndrome de X frágil, son trastornos causados por la expansión de repeticiones en tándem de fragmentos de ADN (STRs, por sus siglas en inglés) en los que se puede producir una disrupción de la estructura 3D del genoma. De hecho, en pacientes con el síndrome de X frágil se han descrito casos en los que se han alterado *boundaries* de TADs por la expansión de STRs. Esto es así porque se produce

[†] Situación en la que una sola copia del gen normal es incapaz de producir proteína en cantidad o calidad suficiente para asegurar la función normal.

NUCLEOMA 4D

una extrusión masiva de la cromatina en células sanguíneas, cerebrales y en los fibroblastos, que se asocia con el silenciamiento del gen *FMR1*.²⁸ Otro ejemplo de este tipo de alteraciones es el caso del Síndrome de delección 22q11, asociado a múltiples problemas en el desarrollo neuronal y consecuencias neuropsicológicas. Este síndrome se produce por una delección heterocigótica de 3 millones de pares de bases en el locus 22q11, que provoca cambios en la estructura 3D y en las interacciones del genoma por la eliminación de *boundaries* o el aumento de contactos entre regiones de los flancos de la delección que antes se encontraban distantes.²⁸

En este contexto, es posible concluir que **el conocimiento sobre la estructura tridimensional del genoma permite descubrir las implicaciones sobre el desarrollo de determinadas condiciones patológicas**. Esto es muestra del potencial del conocimiento del Nucleoma 4D para el desarrollo de aplicaciones en el futuro para la mejora del abordaje de patologías en el marco de la Medicina Personalizada de Precisión.

POTENCIALES APLICACIONES EN LA MEDICINA DEL FUTURO

Todo el conocimiento y los avances en investigación básica y clínica en el marco de la genómica en general están permitiendo obtener una mayor cantidad de información sobre los genes y elementos regulatorios, así como, sus implicaciones sobre la salud. En este sentido, es previsible que **el conocimiento derivado del estudio del Nucleoma 4D permita complementar a la información proporcionada por ciencias como la genómica y la epigenómica sobre diferentes patologías**. A continuación, se exponen algunos ejemplos de potenciales aplicaciones del Nucleoma 4D en la medicina del futuro:

- **Mejora de los estudios de asociación del genoma completo o GWAS (*Genome-wide association studies*)**. La secuenciación del genoma completo ha permitido identificar numerosas **variantes genéticas asociadas a diferentes características, enfermedades y/o eventos clínicos**,²⁹ si bien sólo una pequeña parte de las patologías se deben a **variantes únicas que afectan a la secuencia de genes concretos**. De hecho, **la mayoría de las**

patologías son multifactoriales, lo que podría explicar las diferencias en cuanto a la susceptibilidad y a la variabilidad de fenotipos de enfermedad que existen, y dificulta conocer la manera en que contribuyen múltiples variantes simultáneamente al desarrollo de una enfermedad.^{29,30} En este sentido, **el Nucleoma 4D puede contribuir a identificar alteraciones estructurales que afecten a dichas variantes responsables de alteraciones biológicamente importantes**, por ejemplo, permitiendo localizar en el genoma diferentes mutaciones y variantes genéticas con potencial de dar lugar a enfermedades.

- **Predicción de enfermedades, diagnóstico y pronóstico**. La información que se obtiene del estudio del Nucleoma 4D puede utilizarse para **clasificar segmentos del genoma según los efectos que tienen los cambios en su estructura 3D de cara al desarrollo de enfermedades**. Para ello se ha planteado la creación del ***Chromosome Conformation Signature***, colecciones de fragmentos de cromatina delimitados por puntos en los que se producen interacciones del ADN. Estos puntos se han asociado con patrones de expresión específicos, información que podría emplearse para la **elaboración de modelos de predicción de riesgo**, como los **basados en puntuaciones de riesgo poligénico (PRS)**, y **modelos de estratificación de pacientes**, haciéndolos más informativos y útiles para establecer estrategias de abordaje y prevención de enfermedades de manera individualizada.³¹
- **Descubrimiento de nuevos abordajes terapéuticos**. El hecho de comprender cómo afecta la estructura del genoma a los procesos de regulación de la expresión génica, puede contribuir a **identificar nuevas dianas para el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas**.²¹ En el marco de las terapias avanzadas, **las estrategias de edición del genoma pueden contribuir a este objetivo actuando sobre dianas terapéuticas constituidas por alteraciones en la estructura 3D del genoma**. En esta línea, se ha planteado la posibilidad de insertar **TAD boundaries** entre **enhancers** que actúen sobre oncogenes activados en células tumorales mediante CRISPR/Cas9, para lograr la inactivación del oncogén (para más información, ver **[Informe Anticipando sobre "Terapias Avanzadas: Terapia celular y Terapia génica"](#)**).³¹



RETOS

El potencial de la información derivada del estudio del Nucleoma 4D en la medicina del futuro para comprender los diferentes mecanismos que determinan los estados de salud o enfermedad resalta la **necesidad de profundizar en los conocimientos sobre la estructura y la dinámica del genoma**. Sin embargo, **la rápida evolución de las tecnologías y la generación de grandes cantidades de datos cada vez más complejos pueden generar ambigüedades y obstaculizar la traslación del conocimiento derivado del estudio del Nucleoma 4D a la práctica clínica**.¹⁰ En este sentido, el estudio del Nucleoma 4D se encuentra en una fase exploratoria y de generación de evidencia, en la que es necesario abordar retos de diferente naturaleza para su aplicación futura en el abordaje de patologías.

RETOS TÉCNICOS

En los últimos años se han producido múltiples avances tecnológicos y computacionales que han permitido estudiar la estructura tridimensional del genoma y explorar su dinámica. La aparición de nuevas tecnologías, así como los diferentes tipos de datos que se obtienen con ellas sugieren un mayor desarrollo y conocimiento en el campo del Nucleoma 4D en los próximos años. En este sentido, se han identificado **retos de carácter técnico que afectan principalmente a la generación de modelos espaciales y dinámicos del genoma**.

- **La dificultad para realizar experimentos *in vivo* para la obtención de información a tiempo real.** Actualmente, para estudiar la dinámica del genoma se fijan las células en diferentes momentos, de manera que se obtienen imágenes seriadas. Esto supone que hay transiciones de la estructura cromosómica que no se capturan, limitando los modelos generados.

- **La falta de integración de los avances tecnológicos y los datos obtenidos a partir de las diferentes tecnologías en modelos integrales de Nucleoma 4D.** Es necesario emplear de manera complementaria las diferentes técnicas y tecnologías para mejorar la obtención de modelos de calidad evitando errores asociados a los sesgos específicos de cada tecnología.
- **La ausencia de estudios en células individuales que permitan detectar la variabilidad entre diferentes tipos de células.** Hasta ahora, las técnicas que se utilizan no permiten estudiar la variabilidad y diferencias entre tipos celulares, ya que dichas técnicas abarcan grandes dominios genómicos e incluso el genoma completo, o en su caso permiten obtener datos de células individuales, pero a muy baja resolución.^{11,13}
- **La escasa representatividad de los estudios para la validación funcional de los modelos.** Actualmente, se suelen realizar estudios en líneas celulares creadas en los laboratorios por su sencillez y bajo coste. Sin embargo, esta estrategia no representa la heterogeneidad de lo que sucede *in vivo* en los pacientes. En este contexto, las técnicas que sí podrían ser más representativas, como los modelos animales, o los organoides y células madre pluripotentes inducidas, se realizan únicamente en centros de investigación con un cierto nivel de recursos.
- **La dificultad para obtener muestras de pacientes.** Actualmente, es necesario que un profesional clínico solicite muestras de los pacientes para el estudio de su nucleoma, por lo que la disponibilidad de muestras se limita al número de profesionales implicados en este campo de estudio. Además, no existen plataformas conjuntas que permitan compartir datos entre distintos grupos de investigación.

RETOS DE IMPLEMENTACIÓN

Además de los retos analíticos, existen una serie de retos y barreras para la implementación en la clínica, en parte, debido a que el Nucleoma 4D se encuentra en fase exploratoria y todavía queda mucha investigación por hacer.

- **La escasez de profesionales con perfil técnico, como físicos y biofísicos, para la optimización del uso de las tecnologías.** Generalmente, son pocos los profesionales de la física que están implicados en el estudio del Nucleoma 4D. Aunque existen instituciones como el ICFO (Instituto de Ciencias Fotónicas), en el que hay físicos dedicados al desarrollo de las tecnologías de las que se sirve el Nucleoma 4D, es necesario que este tipo de profesionales se involucren también en la interpretación de los datos obtenidos a través de estas técnicas.
- **La falta de recursos económicos para el desarrollo del Nucleoma 4D.** Se trata de un campo en una fase de desarrollo incipiente dirigida a generar evidencias, y por tanto, implica una necesidad de inversión importante para avanzar en su desarrollo. Además, en España, no hay empresas dedicadas al desarrollo de las tecnologías para el estudio del Nucleoma 4D, lo cual supone un mayor coste. Aproximadamente, un

experimento de Hi-C puede costar entre 5.000 y 10.000€ por paciente, sin embargo, al igual que ha ocurrido con las técnicas secuenciación masiva, se espera que vaya abaratándose progresivamente a medida que avanzan las técnicas.

- **La falta de conocimiento sobre las potenciales aplicaciones del estudio del Nucleoma 4D en clínica.** Se trata de un campo cuya investigación se encuentra muy desligada de la clínica en estos momentos. Al contrario que la genómica y la epigenómica que sí son impulsadas desde la clínica, la idea de que las interacciones que ocurren dentro del núcleo tienen un impacto sobre la regulación génica no es muy conocida por los clínicos. A esto se le une, en línea con el reto anterior, que la financiación en España no está dirigida a estudiar su aplicación clínica. En este sentido, cabe mencionar iniciativas como el *Lifetime*, un consorcio europeo masivo que busca agrupar e integrar clínicos, investigadores y expertos computacionales, integrar y almacenar toda la información que se genera (clínica, ómicas, imagen, etc.), y hacerla accesible.
- **La necesidad de explotar todos los datos obtenidos con las diferentes ciencias ómicas** incluyendo los datos obtenidos a partir del estudio del Nucleoma, para generar modelos integrales que tengan en cuenta el componente estructural del genoma.



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El **Nucleoma 4D** engloba una serie de tecnologías y experimentos que tienen como objetivo **el estudio del genoma en el espacio (3D) y el tiempo (4D)**. Se considera que **es la nueva frontera en genómica** y que **aportará gran valor tanto a la investigación del genoma como en aquellas facetas clínicas del mismo**. En este momento, el estado actual de la aplicación práctica del Nucleoma 4D en clínica se encuentra en un estado muy inicial, por ello, de cara a conseguir una aplicación generalizada de estas técnicas en la clínica y en concreto en la Medicina Personalizada de Precisión, se deben tener en cuenta una serie de consideraciones.

RECOMENDACIONES

- **Obtener mapas del nucleoma de diferentes tipos celulares en diferentes estadios de tiempo y diferenciación.** Esto permitiría abarcar la complejidad de los elementos reguladores, y así poder conocer su localización y actividad sobre la estructura tridimensional del genoma.
- **Fomentar el desarrollo de nuevos modelos biológicos.** Es necesario obtener nuevos modelos de laboratorio más representativos, tanto celulares como animales, para la experimentación en tiempo real de los cambios estructurales en el genoma. Estos modelos experimentales tendrían que ser con célula viva para poder capturar la dinámica del núcleo en tiempo real.
- **Disponer de más datos de célula única para el estudio de la variabilidad del Nucleoma 4D.** Uno de los aspectos principales de las tecnologías moleculares para el estudio del Nucleoma 4D es su aplicación a poblaciones de células. Se requiere de métodos más robustos y de aplicación masiva para estudiar la variabilidad poblacional de la estructura del genoma en el tiempo.
- **Disponer de modelos de Nucleoma 4D y métodos para la validación funcional.** La mayoría de los estudios de Nucleoma 4D son descriptivos y no permiten establecer relaciones causa y efecto. En este sentido, es necesario disponer de modelos y métodos que permitan perturbar la estructura del genoma. Estos experimentos permitirán realizar estudios funcionales para entender la relación de la estructura y función del genoma, ayudando a establecer la causa y efecto de las alteraciones estructurales del genoma que se observan en las diferentes enfermedades humanas.
- **Promover la creación de estándares de Nucleoma 4D en biobancos existentes.** Muchas de las tecnologías del Nucleoma 4D requieren que las muestras de pacientes estén extraídas y almacenadas de manera específica para que sean más precisas o simplemente se puedan realizar. Es necesaria una estandarización de los protocolos para que los biobancos existentes dispongan de muestras de pacientes aptas para el estudio del genoma en el espacio y el tiempo.
- **Promover el desarrollo de nuevos métodos computacionales de integración de datos.** La generación de datos ómicos sobre los modelos biológicos y su integración con el estudio del Nucleoma 4D serán

NUCLEOMA 4D

esenciales para la caracterización de la estructura y dinámica del núcleo en su aplicación clínica.

- **Promover la incorporación de nuevos perfiles en el campo del Nucleoma 4D.** El Nucleoma 4D es un campo multidisciplinar, sin embargo, es necesaria la incorporación de más perfiles profesionales en los grupos de investigación en este campo. Por un lado, es necesaria la participación de físicos, matemáticos y estadísticos en el estudio de la dinámica del núcleo. Por otro lado, más perfiles computacionales, para avanzar en el estudio e integración del Nucleoma 4D con otros datos ómicos. Finalmente, perfiles relacionados con la biología molecular, de cara a la futura traslación a la clínica.
- **Potenciar el conocimiento del Nucleoma 4D a otros sectores más allá del de la investigación básica.** Un mayor conocimiento de cómo la estructura del genoma puede impactar su regulación por parte de los investigadores clínicos permitiría integrar el conocimiento básico actual para aplicarlo en la práctica clínica. En general, un mayor conocimiento por parte de la clínica podría contribuir a impulsar el estudio del Nucleoma 4D y sus aplicaciones. Para ello, es necesario que los que investigan en este campo se coordinen con aquellos clínicos que podrían aplicarlo en el futuro.





BIBLIOGRAFÍA

1. Cavalli G, Misteli T. Functional implications of genome topology. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2013;20(3):290-299. doi:10.1038/nsmb.2474
2. di Stefano M, Paulsen J, Jost D, Marti-Renom MA. 4D nucleome modeling. *Current Opinion in Genetics and Development*. 2021;67:25-32. doi:10.1016/j.gde.2020.10.004
3. Bonev B, Cavalli G. Organization and function of the 3D genome. *Nature Reviews Genetics*. 2016;17(11):661-678. doi:10.1038/nrg.2016.112
4. Montoliu José L, Rada Iglesias Á. *Genome & Epigenetics*. Vol 3. Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 2021.
5. Dekker J, Belmont AS, Guttman M, et al. The 4D nucleome project. *Nature*. 2017;549(7671):219-226. doi:10.1038/nature23884
6. Pombo A, Dillon N. Three-dimensional genome architecture: Players and mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2015;16(4):245-257. doi:10.1038/nrm3965
7. Zheng H, Xie W. The role of 3D genome organization in development and cell differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019;20(9):535-550. doi:10.1038/s41580-019-0132-4
8. Wang H, Han M, Qi LS. Engineering 3D genome organization. *Nature Reviews Genetics*. 2021;22(6):343-360. doi:10.1038/s41576-020-00325-5
9. Hildebrand EM, Dekker J. Mechanisms and Functions of Chromosome Compartmentalization. *Trends in Biochemical Sciences*. 2020;45(5):385-396. doi:10.1016/j.tibs.2020.01.002
10. Marti-Renom MA, Almouzni G, Bickmore WA, et al. Challenges and guidelines toward 4D nucleome data and model standards. *Nature Genetics*. 2018;50(10):1352-1358. doi:10.1038/s41588-018-0236-3
11. Marti-Renom MA, Mirny LA. Bridging the resolution gap in structural modeling of 3D genome organization. *PLoS Computational Biology*. 2011;7(7). doi:10.1371/journal.pcbi.1002125
12. Jerković I, Cavalli G. Understanding 3D genome organization by multidisciplinary methods. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2021;22(8):511-528. doi:10.1038/s41580-021-00362-w
13. Dekker J, Misteli T. Long-range chromatin interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2015;7(10). doi:10.1101/cshperspect.a019356
14. Nguyen HQ, Chatteraj S, Castillo D, et al. 3D mapping and accelerated super-resolution imaging of the human genome using in situ sequencing. *Nature Methods*. 2020;17(8):822-832. doi:10.1038/s41592-020-0890-0
15. Nir G, Farabella I, Pérez Estrada C, et al. Walking along chromosomes with super-resolution imaging, contact maps, and integrative modeling. *PLoS Genetics*. 2018;14(12). doi:10.1371/journal.pgen.1007872
16. Dekker J, Marti-Renom MA, Mirny LA. Exploring the three-dimensional organization of genomes: Interpreting chromatin interaction data. *Nature Reviews Genetics*. 2013;14(6):390-403. doi:10.1038/nrg3454
17. Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, et al. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science (1979)*. 2009;326(5950):289-293. doi:10.1126/science.1181369
18. Lupiáñez DG, Spielmann M, Mundlos S. Breaking TADs: How Alterations of Chromatin Domains Result in Disease. *Trends in Genetics*. 2016;32(4):225-237. doi:10.1016/j.tig.2016.01.003
19. Lupiáñez DG, Kraft K, Heinrich V, et al. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell*. 2015;161(5):1012-1025. doi:10.1016/j.cell.2015.04.004
20. Fu Y, Tessneer KL, Li C, Gaffney PM. From association to mechanism in complex disease genetics: The role of the 3D genome. *Arthritis Research and Therapy*. 2018;20(1). doi:10.1186/s13075-018-1721-x
21. Hnisz D, Weintraub AS, Day DS, et al. Activation of proto-oncogenes by disruption of chromosome neighborhoods. *Science (1979)*. 2016;351(6280):1454-1457. doi:10.1126/science.aad2257

22. Arzate-Mejía RG, Recillas-Targa F, Corces VG. Developing in 3D: the role of CTCF in cell differentiation. *Development*. 2018;145(6). doi:10.1242/dev.137729
23. Watson LA, Wang X, Elbert A, Kernohan KD, Galjart N, Bérubé NG. Dual effect of CTCF loss on neuroprogenitor differentiation and survival. *Journal of Neuroscience*. 2014;34(8):2860-2870. doi:10.1523/JNEUROSCI.3769-13.2014
24. de Koninck M, Losada A. Cohesin mutations in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2016;6(12). doi:10.1101/cshperspect.a026476
25. Surdez D, Zaidi S, Grossetête S, et al. STAG2 mutations alter CTCF-anchored loop extrusion, reduce cis-regulatory interactions and EWSR1-FLI1 activity in Ewing sarcoma. *Cancer Cell*. 2021;39(6):810-826.e9. doi:10.1016/j.ccell.2021.04.001
26. Horsfield JA, Print CG, Mönnich M. Diverse developmental disorders from the one ring: Distinct molecular pathways underlie the cohesinopathies. *Frontiers in Genetics*. 2012;3(SEP). doi:10.3389/fgene.2012.00171
27. Ahmed MS, Ikram S, Bibi N, Mir A. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A Premature Aging Disease. *Molecular Neurobiology*. 2018;55(5):4417-4427. doi:10.1007/s12035-017-0610-7
28. Sun D, Weng J, Dong Y, Jiang Y. 3D genome organization in the central nervous system, implications for neuropsychological disorders. *Journal of Genetics and Genomics*. 2021;48(12):1045-1056. doi:10.1016/j.jgg.2021.06.017
29. Javierre BM, Sewitz S, Cairns J, et al. Lineage-Specific Genome Architecture Links Enhancers and Non-coding Disease Variants to Target Gene Promoters. *Cell*. 2016;167(5):1369-1384.e19. doi:10.1016/j.cell.2016.09.037
30. Xia JH, Wei GH. Enhancer dysfunction in 3d genome and disease. *Cells*. 2019;8(10). doi:10.3390/cells8101281
31. Crutchley JL, Wang XQD, Ferraiuolo MA, Dostie J. Chromatin conformation signatures: Ideal human disease biomarkers? *Biomarkers in Medicine*. 2010;4(4):611-629. doi:10.2217/bmm.10.68



