

TRABAJO FINAL DE CARRERA

(Licenciatura en Ciencias Biológicas - Plan 92)

Profundización en Biofísica

La teoría de nudos en biología. Exploración de una nueva representación matricial inspirada en un modelo de memorias asociativas

Santiago Bosch

Orientador: Andrés Pomi

Índice

Índice	2
Introducción	4
1 Introducción a la Teoría de Nudos	6
1.1 Definiciones básicas	6
1.2 Algunos invariantes básicos	10
1.2.1 Número de cruces y tricolorabilidad	10
1.2.2 Orientación de nudos y otros números	12
1.2.3 Invariantes polinomiales	14
1.3 Códigos y Diagramas de Gauss	19
1.4 Algunas clasificaciones típicas	23
1.5 Conclusión	27
2 Nudos y Biología	28
2.1 Preliminares	28
2.2 Nudos en el ADN	30
2.2.1 La existencia de nudos en el ADN, o: ¿y esto para qué sirve?	30
2.2.2 El problema de la replicación del ADN	31
El problema de Delbrück y la replicación semiconservativa	32
Supercoiling	34
La fórmula de White: definiciones y aplicaciones	38
Topoisomerasas I	48
El (nuevo) problema de la doble hélice	52
Topoisomerasas II	55
2.2.4 Mecanismo de acción de las recombinasas	60
Tangles y modelos de acción enzimática	62
La enzima Tn3 resolvasa	64
Tangente matemática: Nudos virtuales	69
2.3 Nudos en las proteínas	74
2.3.1 Cómo detectar nudos en cadenas abiertas	74
El método de Mansfield	75
El método de Taylor	77
Método de Millett-Dobay-Stasiak	79
Las proteínas vistas como nudos virtuales	80
2.3.2 Preguntas sobre las proteínas anudadas	83
¿Cómo se pliegan las proteínas?	84
Consideraciones iniciales	84
Algunos ejemplos	89
Consideraciones finales	93
¿Para qué sirven las proteínas anudadas?	94

Posibles funciones y ejemplos	95
Origen evolutivo y estructuras conservadas	97
Apéndice a la tangente matemática: Teorías alternativas de nudos	107
2.4 Nudos en el ARN	108
2.4.1 ¿ARN anudado?	108
2.4.2 Pseudonudos	109
2.4.3 Un polinomio para el ARN	110
2.5 Conclusión	114
3 Representación matricial de nudos	116
3.1 Memorias asociativas y sus modelos matriciales	116
3.2 La matriz de cruce (y cómo obtenerla)	119
3.3 Algunas propiedades iniciales de la matriz de cruce	123
3.4 Círculos de Seifert y una nueva clasificación de nudos	126
3.5 La matriz de cruce, generalizada	136
3.5.1 Perspectivas para el estudio de la matriz de Gauss	139
Invariantes de Vassiliev	141
Intuición	141
Relación con los diagramas de Gauss	142
3.6 Conclusiones	146
Bibliografía	147
Créditos por imágenes:	155

Introducción

La teoría de nudos es un área de la matemática que estudia, esencialmente, las curvas cerradas en el espacio que podrían construirse con cuerdas, a las que llamamos nudos. Que esta teoría abstracta tenga alguna relación con la biología no es *a priori* obvio, y aunque existen un gran número de revisiones bibliográficas sobre esta relación, suelen centrarse en aspectos muy particulares, y en general asumen un conocimiento matemático muy bajo o muy alto del lector, por lo que hace falta un texto que trate este tema de forma exhaustiva y que se ajuste a distintos niveles de conocimiento matemático. El presente trabajo tiene dos objetivos: **dar una introducción a la teoría de nudos, así como un recuento de una gran parte de sus aportes a la biología**, que espero pueda ser de interés para cualquier lector interesado en la teoría de nudos, o en la interacción entre las ciencias biológicas y las matemáticas en general; y, por otro lado, **presentar una exploración de una nueva representación matricial de los nudos**, inspirada por ciertos formalismos de la teoría de las redes neuronales.

El texto comienza con una introducción a la teoría de nudos, que intenta ser clara, comprensible (sin requerir mucho conocimiento matemático previo) y abarcativa. La teoría de nudos es un área con varios desarrollos interesantes, de los cuales muchos han sido aplicados a la biología. Lamentablemente, esto significa que una monografía comprensiva de las aplicaciones de la teoría de nudos a la biología (como intenta ser la presente) tiene que introducir varios temas distintos, si no se requiere conocimiento previo de la teoría por parte del lector. Para remediar esto, los temas se presentan de forma relativamente rápida, con **énfasis** en los *conceptos notables* y figuras que intentan aclarar el texto. Esta condición significa también que muchos conceptos básicos de nudos no se llegan a presentar, pues no son imprescindibles para los ejemplos biológicos del texto, por lo que la introducción, aunque abarcativa, se saltea varios temas básicos presentados usualmente por los libros de texto de la teoría de nudos.

La segunda parte de la tesis se centra en cómo la teoría de nudos ha encontrado aplicaciones en biología, sobretodo en el estudio de algunas de las moléculas biológicas más importantes, como son el ADN, las proteínas y el ARN. Se incluye un recuento histórico de la teoría y los experimentos que eventualmente llevaron a la aceptación del modelo de la doble hélice para el ADN, donde resultados de la teoría de nudos jugaron un papel fundamental. Se presenta también un formalismo que permite el estudio del mecanismo de distintas enzimas basándose en los cambios topológicos que catalizan. Luego se trata el tema de las proteínas anudadas, las ambigüedades que existen en ese campo, así como la importancia que tienen las proteínas anudadas para el problema de plegamiento de proteínas. Por este último punto se incluye una introducción a dicho problema, que constituye uno de los mayores problemas abiertos de la biología actual, así como a los modelos más usuales que intentan dar respuesta al problema, y cómo fallan en el caso de las proteínas anudadas. Finalmente, y a modo de nota mucho más breve que el visto para proteínas y ADN, la segunda sección presenta un reciente modelo basado en ciertas teorías *dentro de la teoría de nudos* que permiten estudiar la estructura tridimensional del ARN.

En la sección final de este trabajo se presenta una exploración de una nueva representación de un nudo, mediante la cual es posible representar cualquier nudo mediante una matriz. Esta parte del texto es la que le da su tema y que resulta su principal aporte original. La representación matricial en cuestión surge del formalismo matricial de las memorias asociativas contexto-dependientes, que nace de la teoría de las redes neuronales, y que permite escribir cualquier nudo como una matriz de ceros y unos. Exploramos sus propiedades y sus limitaciones, posteriormente presentando una ampliación de la misma que resuelve los problemas encontrados y que se relaciona con algunos temas actuales de gran importancia para la teoría de nudos. Finalmente se da un recuento corto sobre uno de estos temas, en el cual esperamos que pueda ser útil nuestra representación matricial.

Finalmente, una advertencia: cuán interesantes, cuán válidos y cuán valiosos sean los ejemplos tratados en el texto queda a la opinión del lector y, más aún, el autor no se responsabiliza si el tema suena inicialmente más interesante de lo que realmente termina siendo.

1 Introducción a la Teoría de Nudos

1.1 Definiciones básicas

En Matemática, un **nudo** es cualquier curva cerrada (sin extremos libres), simple (sin autointersecciones) en el espacio. Particularmente, suelen denominarse nudos solamente aquellas curvas que “se portan bien”, intuitivamente, a aquellos que se podrían construir en la realidad con un trozo de cuerda (Figs. 1.1:1, 1.1:2). A pesar de que un nudo matemático en teoría no tenga grosor (por ser una curva), es muy útil pensar en un nudo simplemente como un trozo de cuerda (de largo y grosor cualquiera) que uno anuda en el sentido usual, y cuyos extremos finalmente se unen para obtener una curva cerrada. Será útil definir también los **enlaces**, que son conjuntos de nudos en el espacio que no se intersectan entre sí, como pueden ser los enlaces de una cadena. A cada nudo que forma parte de un enlace se le llama un “componente” de dicho enlace.

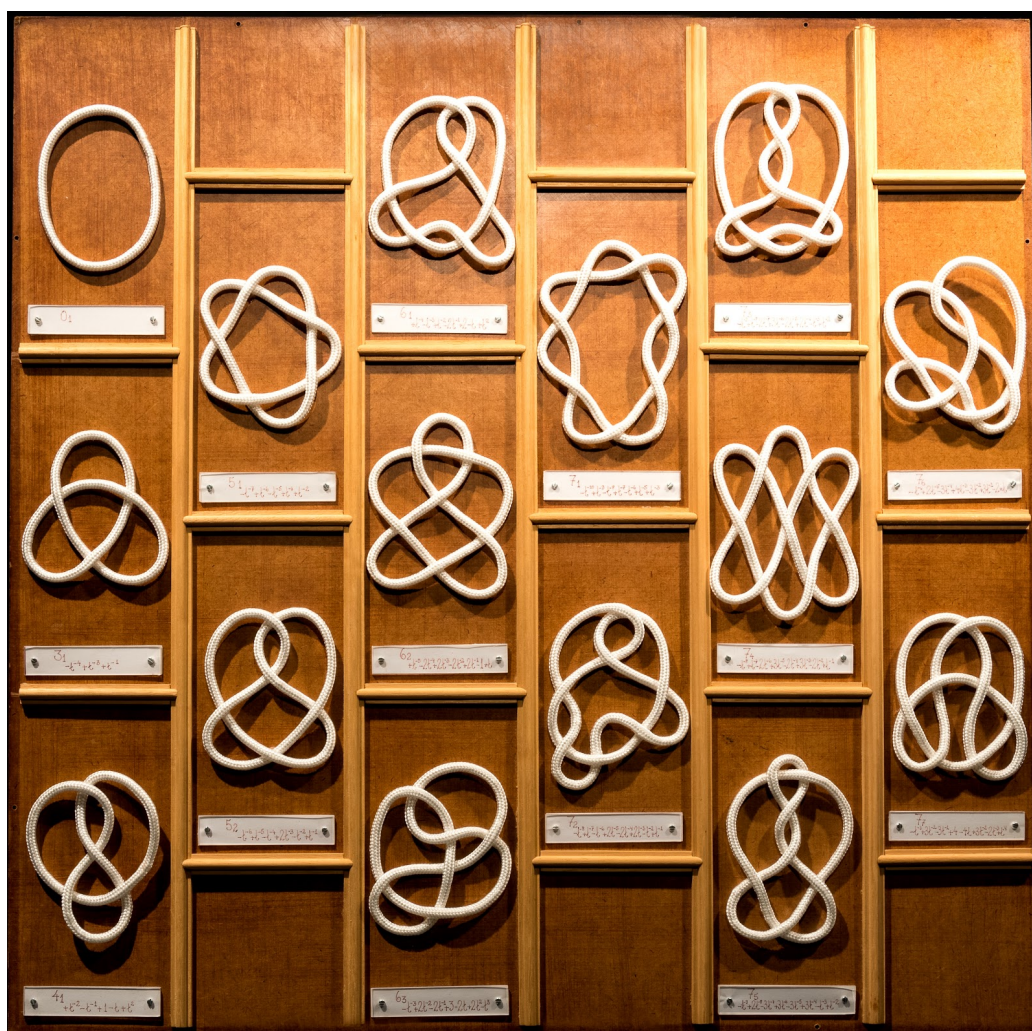


Fig. 1.1:1: Nudos de distinto tipo hechos de cuerda, expuestos en forma de “tabla de nudos”. La noción de “nudos de distinto tipo” se precisa más abajo. Esta tabla está presente en la “Matemática” del Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo. (Crédito: Matemática (IME/USP)/Rodrigo Tetsuo Argenton)

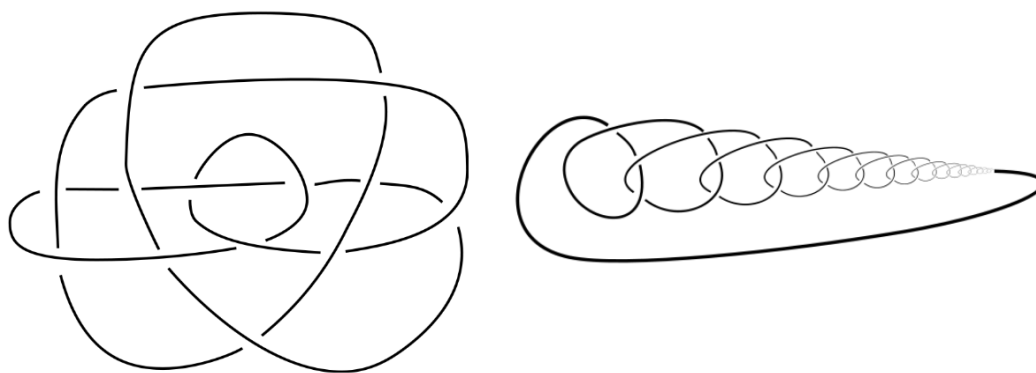


Fig. 1.1:2: Ejemplos de curvas cerradas simples. (Izquierda) Un nudo de apariencia compleja, pero que podría construirse con cuerda. (Derecha) Un “nudo salvaje”, que no consideraremos como un nudo. Obsérvese que la cantidad infinita de vueltas hace imposible su construcción en la vida real. (Crédito: Jkasd ; en:User:C)

En este contexto queda claro que si uno toma un nudo y lo deforma de cualquier forma posible sin cortarlo (enrollándolo muchas veces, por ejemplo) el nudo “*sigue siendo el mismo*”, es decir que por diferente que se vea, siempre es posible recuperar el nudo original deformándolo de nuevo de forma inversa. Lo mismo ocurre si suponemos que la cuerda es “muy elástica” y entonces se puede estirar o acortar a gusto. De esta forma, podemos decir en general que dos nudos *son iguales* si y solamente si se puede obtener uno a partir del otro *solamente deformando y estirando* la cuerda sin cortar. De aquí se obtiene un concepto de igualdad también para enlaces: decimos que dos enlaces son iguales si puedo deformar uno en el otro en el sentido anterior, incluyendo además la posibilidad de *desplazar sus componentes libremente en el espacio*¹, siempre y cuando no se “atravesen” en el proceso. La Teoría de nudos es entonces el área de la Matemática que se ocupa del estudio de los nudos y los enlaces (con estos concepto de igualdad) y sus propiedades.

La prohibición de cortar la cuerda puede parecer arbitraria, siendo que vamos a estar pensando los nudos como cuerdas “cortadas” (con extremos) que nosotros unimos, pero ¡¡justamente ahí es que está la gracia de los nudos! Si permitimos cortar y pegar, aunque sea una vez, todos los nudos serían iguales, porque todos se obtuvieron a partir de un trozo de cuerda de tamaño arbitrario, que podemos achicar o agrandar a gusto. Esto no genera una teoría muy interesante, por lo que nos interesa considerar el caso en el que cortar está prohibido, por que por lo menos nos da la posibilidad de que existan nudos que son distintos entre sí, en particular que exista algún nudo diferente del “nudo trivial”, el nudo más simple que puede existir (también llamado *unknot* en inglés, correspondiente a una curva cerrada “sin anudar”). De hecho, existen nudos “no triviales”, pero aunque sea muy intuitivo, no es obvio demostrarlo. Por ejemplo, en la Figura 1.1:3 todos los nudos son triviales (¿por qué?), así como lo es el nudo presentado en la Figura 1.1:2, lo que muestra que a simple vista no es fácil determinar si un nudo es trivial.

¹ Esto también podría incluirse en la igualdad de nudos propiamente dichos, pero como solo hay un componente y nada con qué comparar su posición relativa, ignoramos su posición en el espacio.



Fig. 1.1:3: Varios nudos contruidos a partir de la misma banda elástica, sin realizar cortes.

Por comodidad, definiremos a continuación lo que es un **diagrama de un nudo**. Si un nudo es una cuerda cerrada en el espacio, podemos considerar la “sombra” proyectada por el nudo sobre un plano cualquiera. De esta forma se obtiene una curva cerrada en el plano que llamaremos un diagrama de dicho nudo. Esta curva puede tener puntos de intersección (representando donde la cuerda cruza sobre sí misma), que se marcan con una línea continua o discontinua dependiendo de si la cuerda cruza por encima o por debajo al mirarlo desde donde se proyecta (Fig. 1.1:4).

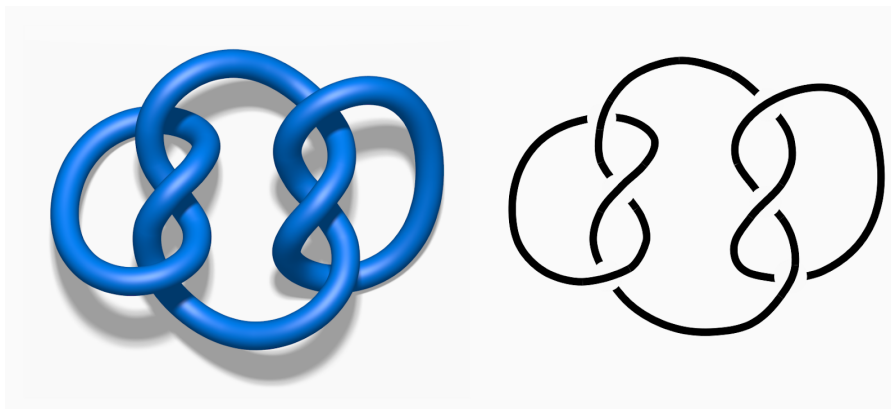


Fig. 1.1:4: (Izquierda) Un modelo tridimensional de un nudo puesto en *posición general*, proyectando una sombra sobre el fondo (Crédito: Jim.belk). (Derecha) Diagrama del nudo presente en la imagen. Esencialmente es una representación bidimensional del nudo tridimensional al ser visto desde un cierto ángulo (como lo es la imagen a la izquierda, de hecho).

Estrictamente hablando, para definir el diagrama de un nudo precisamos que el mismo se encuentre en *posición general*, lo que quiere decir que esté dispuesto en el espacio de tal forma que, desde algún ángulo, la cuerda solo se “intersecte” una cantidad finita de veces, y sólo en cruces (nunca hay dos pedazos de cuerda tangentes entre sí); y que en estos cruces solo hayan dos pedazos de cuerda involucrados. Pedimos esto para que el diagrama sea claro (así evitamos, por ejemplo, un diagrama con infinitas vueltas que se hagan cada vez más pequeñas), y no es una restricción importante porque se puede demostrar que todos los nudos que nos interesan pueden ponerse en posición general.

Los diagramas de nudo proveen una forma práctica de estudiar un nudo, reduciéndolo a un dibujo plano en vez de tener que estar pensando en cuerdas suspendidas en el espacio. Por supuesto, es claro que hay diferentes diagramas correspondientes al mismo nudo (eg: al “proyectar” desde diferentes ángulos, o deformándolo antes de

proyectar), así que ¿cómo puede uno darse cuenta si dos diagramas diferentes representan al mismo nudo?

Por suerte, Reidemeister (1932) demostró que la gran variedad de formas en las que puede deformarse un nudo pueden reducirse a unas pocas operaciones (llamados movimientos de Reidemeister) realizadas sobre el diagrama de un nudo, lo que nos provee de una forma de demostrar cuándo dos diagramas corresponden a nudos iguales, por más diferentes que se vean (Fig. 1.1:5).

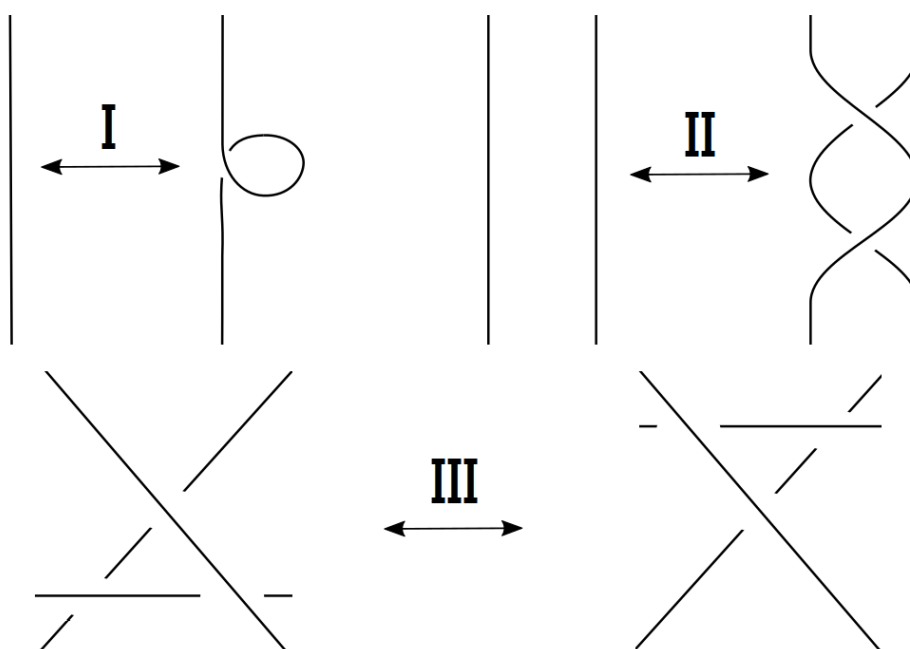


Fig. 1.1:5: Representación diagramática de los tres movimientos de Reidemeister. Nótese que la figura es bastante general y muestra solo algunas de las posibilidades, eg: en II puede pasarse cualquier cuerda por debajo de la otra, y en III la cuerda que se mueve puede estar por encima de las cuerdas fijas, en medio (como en la figura) o por debajo.

Hay que notar que, dados dos diagramas diferentes de un mismo nudo, siempre es posible encontrar una secuencia finita de movimientos de Reidemeister que conviertan uno en el otro, pero no se puede saber *a priori* cuántos movimientos se deben realizar, ni el orden en que se realizan. Esto quiere decir que uno (o una computadora) podría pasarse toda la vida realizando movimientos de Reidemeister y no llegar a decidir si dos diagramas corresponden al mismo nudo, ni siquiera teniendo una buena idea de "cuántos movimientos faltan". Se ha demostrado que existen límites superiores en general, pero a los efectos prácticos suelen ser inútiles por lo altos que son. Todo esto termina significando que, dados dos diagramas diferentes cualesquiera, intentar encontrar una serie de movimientos que convierta uno en el otro no es una buena estrategia.

De hecho, en la práctica es mucho más fácil demostrar que dos diagramas corresponden a nudos distintos. Por lo general para esto se usan **invariantes**, que pueden pensarse como las propiedades de un nudo particular. Más formalmente, un invariante de un nudo es una función que a cada nudo le asigna un objeto matemático (por ejemplo, un

número entero, o un polinomio) y que está *bien definida con respecto a la equivalencia de nudos*, es decir que si dos nudos son “iguales” en el sentido discutido más arriba, todo invariante les asigna los mismos objetos. De esta forma, la manera usual de demostrar que dos nudos *no son iguales* es encontrar algún invariante que sea diferente para ambos² (si fuesen iguales esto no podría ocurrir). Nótese que, sin embargo, dos nudos pueden tener algunos invariantes iguales, y sin embargo no ser equivalentes. Típicamente, en estos casos se busca otro invariante que sí permita diferenciarlos³.

Los diagramas de nudo, junto con los movimientos de Reidemeister, nos proveen de una primera y muy poderosa representación de los nudos, en tanto que nos permiten definir invariantes de nudos a partir de algún diagrama. Por ejemplo, tenemos una forma muy sencilla de demostrar que una cierta propiedad obtenida a partir de un diagrama es un invariante: basta con demostrar que esa propiedad se conserva al realizar cada uno de los movimientos de Reidemeister, pues esto ya nos dice que cualquier otro diagrama del mismo nudo cumplirá esta misma propiedad.

1.2 Algunos invariantes básicos

1.2.1 Número de cruces y tricolorabilidad

Un invariante obvio para un nudo dado K , que suele usarse para identificarlo es $c(K)$, **el mínimo número de cruces** presentes en cualquier proyección del mismo. Por un lado, es obvio que es un invariante, porque por definición es independiente del diagrama con que elijamos representar al nudo. Por otro lado, no es fácil calcular $c(K)$ para un nudo K cualquiera. Si conocemos un diagrama de K con N cruces, es claro que $c(K) \leq N$, lo cual puede no ser de mucha ayuda. Sin embargo, y a pesar de la dificultad de calcularlo, $c(K)$ nos permite definir para todo nudo K lo que se llama un **diagrama mínimo de K** , o sea, un diagrama del nudo K que tiene $c(K)$ cruces, y que suele ser la forma más usual de representar un nudo. Los diagramas mínimos suelen ordenarse en **tablas de nudos**, junto con un “nombre” para cada nudo, usualmente un par de números consistiendo del mínimo número de cruces y un subíndice para distinguirlo entre los otros nudos que puedan tener el mismo número mínimo de cruces (Hoste *et al.*, 1998)(Figs. 1.1:1, 1.2:1).

Otro invariante simple, que se define fácilmente a partir de un diagrama cualquiera de un nudo K es la **tricolorabilidad**. Definamos una forma de “colorear” un nudo, usando un número de colores cualesquiera, asignándole a cada “sección de cuerda” entre 2 cruces por debajo (*underpasses*) un color, tal que en cada cruce se junten o bien 3 colores distintos (1 por el segmento que cruza por arriba, 2 por cada lado del que cruza por abajo) o 3 iguales. Le decimos tricolorable a un nudo si una proyección cualquiera del mismo se puede colorear de esta forma usando 2 o 3 colores diferentes. Esto es equivalente a decir que *existe algún diagrama* de dicho nudo que se pueda colorear con 2 o 3 colores de esta forma, porque *los movimientos de Reidemeister preservan la tricolorabilidad* (Fig. 1.2:2). Debido a esto, queda

² Es decir, que les asigne distintos objetos al uno y al otro.

³ Se sabe que existen “invariantes completos”, es decir, invariantes que permiten distinguir dos nudos cualquiera entre sí. Sin embargo, no son fáciles de calcular, por lo que el estudio de invariantes y las diferentes formas de calcularlos continúa siendo un problema central en la teoría de nudos.

demostrado que la tricolorabilidad es un invariante de los nudos, y que teóricamente puede ser chequeada dada un diagrama cualquiera de un nudo. Es un ejercicio sencillo comprobar que el nudo trébol (3_1 en Fig. 1.2:1) es tricolorable, mientras que el nudo trivial no lo es, lo que demuestra que *existe un nudo no trivial*.

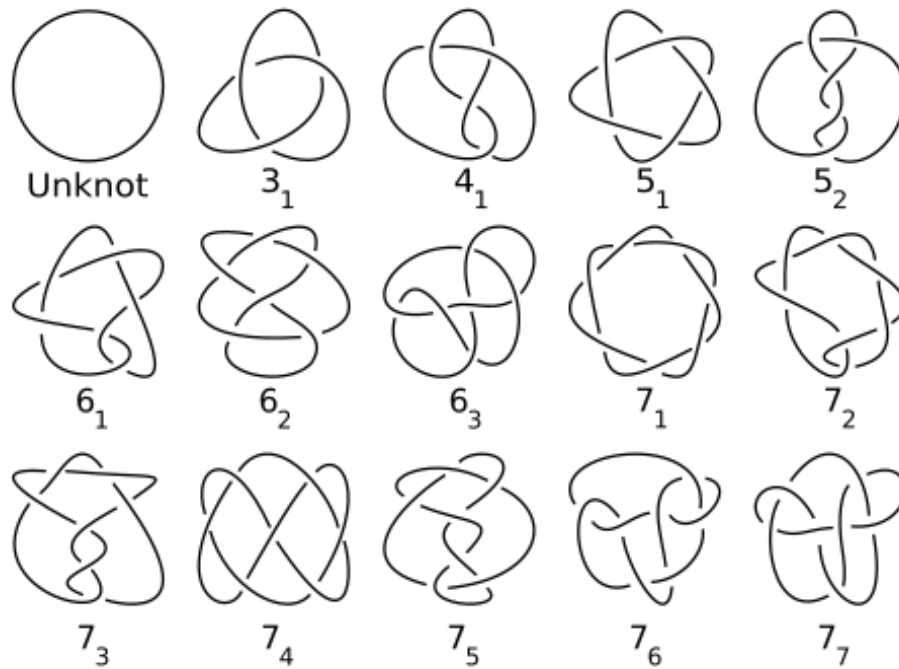


Fig. 1.2:1: Tabla de nudos mostrando los diagramas mínimos de varios nudos de 7 cruces o menos. Los mismos están identificados por 2 números: su mínimo número de cruce y un subíndice arbitrario para poder distinguirlo de otros (eg: 6_2 vs. 6_3). (Crédito: Jkasd).

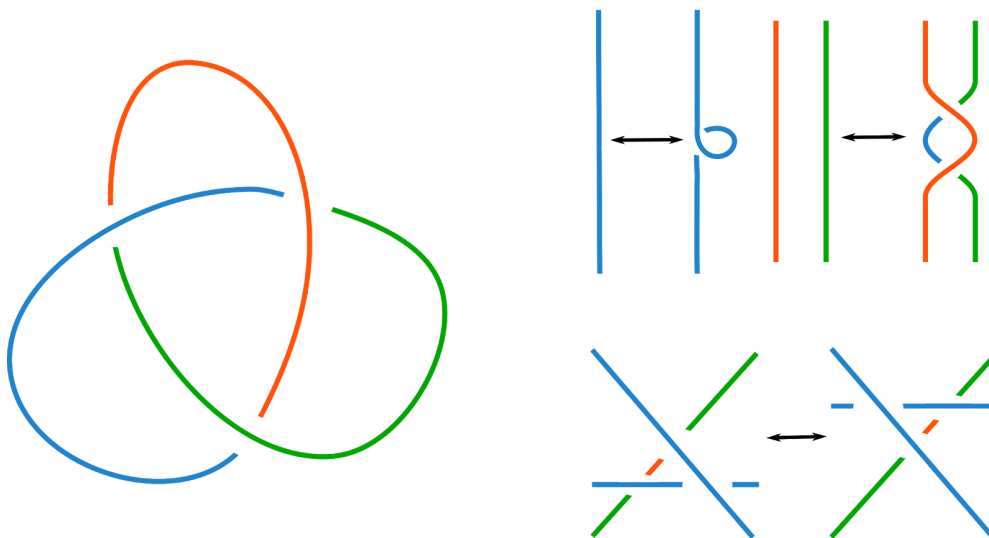


Fig. 1.2:2: (Izquierda) El nudo trébol, que aparece en la figura, es tricolorable porque puede colorearse tal que los segmentos de cuerda sin interrumpir estén pintados de uno de tres colores tal que solo “se encuentren” 3 colores distintos o iguales. **(Derecha)** La tricolorabilidad es un invariante. Para ver esto puede demostrarse que a partir de cualquier tricoloración se puede obtener una nueva luego de aplicar algún movimiento de Reidemeister. Nótese que en la figura se muestran solo algunas de las posibles configuraciones, sobre todo en el caso de los movimientos II y III, pero da una buena idea de como resolver el problema en general.

1.2.2 Orientación de nudos y otros números

Además del número de cruces, existen otros números (no necesariamente invariantes) que se le pueden asignar a un nudo, que son de gran importancia conceptual y que nos serán interesantes debido a su aparición en una importante ecuación de la teoría de nudos con aplicaciones a la biología. Para definirlos para un cierto nudo, solo nos falta introducir un poco más de información sobre el mismo en la forma de su **orientación**. Un nudo es una curva en el espacio, o sea que uno puede pensarlo como un **trayecto** recorrido, por ejemplo, por una abeja sin nada mejor que hacer. Se puede ver entonces al nudo como teniendo un sentido—el sentido en que se va moviendo la abeja— y así obtener un **nudo orientado**. En general no da lo mismo cuál orientación del nudo se elija, porque existen casos en que un mismo nudo orientado de dos formas distintas da lugar a dos nudos que **no son equivalentes**. Es bastante intuitivo que un nudo sólo puede orientarse de dos formas distintas, y que esta definición se puede extender para referirse a **enlaces orientados** (si le es útil, exhortamos al lector a pensar en muchas abejas ociosas realizando vuelos coreografiados de distinta complejidad, cada una orientada a su gusto).

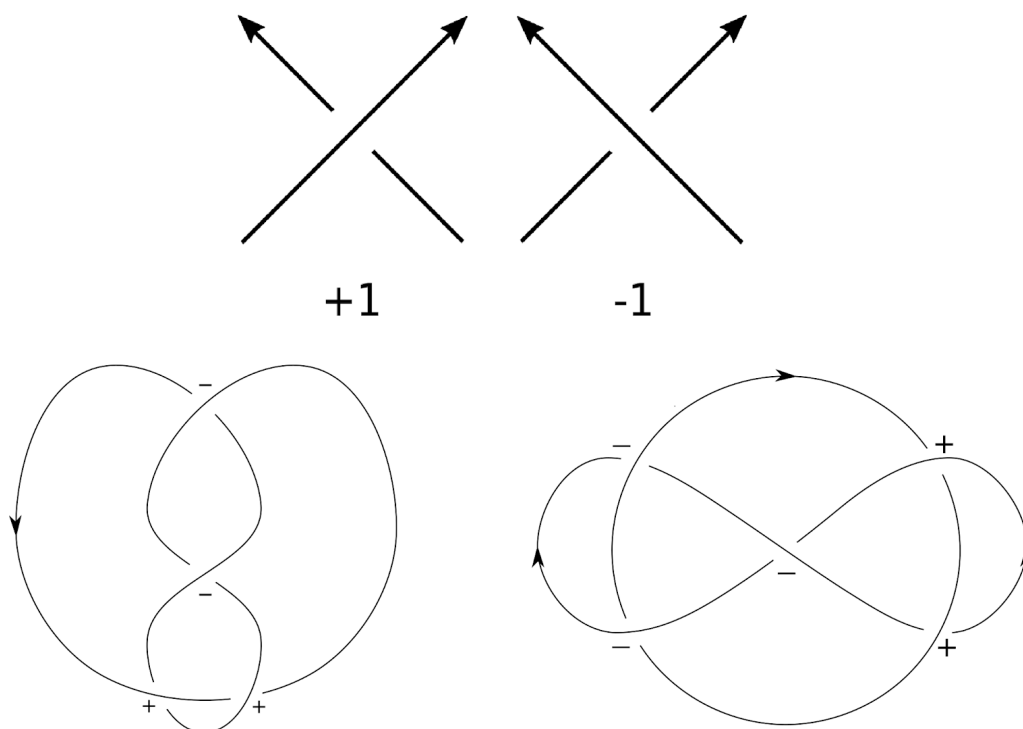


Fig. 1.2:3: (Arriba) Definición gráfica del signo de un cruce. **(Abajo)** Algunos ejemplos de orientación y signos en un nudo propiamente dicho y en un enlace de 2 componentes.

Antes de presentar estos números (motivo por el cual iniciamos el párrafo anterior) se debe definir el **signo de un cruce**. Esencialmente se hace con un diagrama (Fig. 1.2:3), pero puede pensarse de la siguiente forma: un cruce es positivo cuando, si uno se para sobre el cruce mirando en el sentido de la hebra superior, la hebra inferior apunta a la izquierda⁴; equivalentemente se puede pensar que la forma más corta de alinear ambas

⁴ JW Alexander, un importante topólogo de principios del S.XX que fue el primero en definir un invariante polinomial de los nudos, insistía en hablar de una hormiga recorriendo el camino y

hebras consiste en rotar la hebra superior en sentido anti-horario. Es notable que, si se trata de un nudo propiamente dicho (es decir, que tiene solo 1 componente), el signo no depende de la orientación, a pesar de que se use la misma para poder determinar el signo (ver esto último es fácil, si se invierte el sentido en ambas hebras en los diagramas de la Figura 1.2:3, el signo sigue siendo igual). Por lo tanto, en un nudo propiamente dicho, saber el signo de un cruce es equivalente a saber qué trozo de la curva va por arriba, y cuál por abajo.

Dicho esto, podemos definir dos cantidades importantes: Primero definimos **Wr(D)**, el número de “torsión” (del inglés *writhe*) de un diagrama D, que corresponde a la suma de los signos de todos los cruces en el diagrama (ver Fig. 1.2:4). Inmediatamente se ve que este número **no es un invariante de nudos**, pues realizar un movimiento de Reidemeister tipo I introduce un cruce nuevo del signo que uno quiera. Decimos que el writhe es una propiedad **geométrica** y no topológica, lo que quiere decir que depende de cómo se disponga el nudo en el espacio, no del nudo en sí (según la equivalencia de nudos usual).

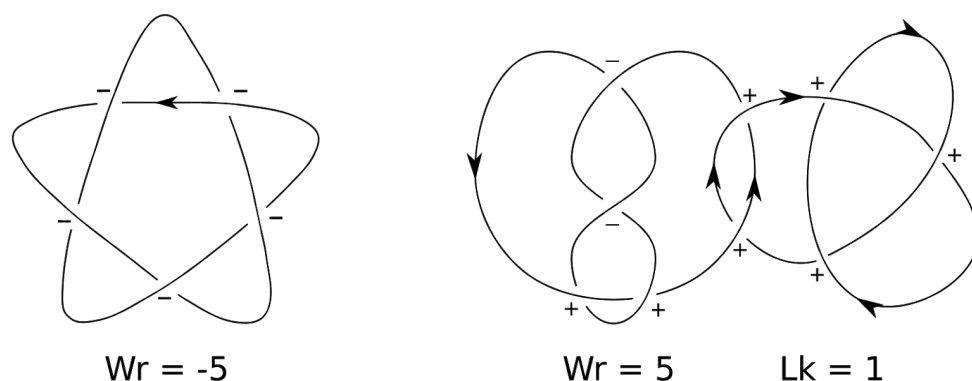


Fig. 1.2:4: Diagramas orientados, junto con su *writhe* y *linking number* en el caso del diagrama de enlace con dos componentes.

Acto seguido definimos **Lk(L)**, el **número de ligazón** (del inglés *linking number*), a partir de un diagrama de enlace L de dos componentes como la mitad de la suma de los signos de aquellos cruces que involucren dos componentes distintos. La suma siempre da un número par, así que se simplifica dividiendo entre 2 sin perder información. *A priori* esta definición suena muy parecida a la del writhe, pero en este caso el número de ligazón de un enlace L es independiente del diagrama que se use, es decir que es un **invariante de enlaces de dos componentes orientados** (cambiar la orientación de un componente cambia el signo de todos los cruces que se cuentan para el cálculo del *linking number*, como se ve en la figura 1.2:5, por lo que el valor absoluto de Lk es un invariante de los enlaces de dos componentes sin orientar).

marcando las orientaciones. A partir de este momento no se mencionarán más insectos para evitar que el lector llegue a pensar que el presente es un trabajo de Entomología.

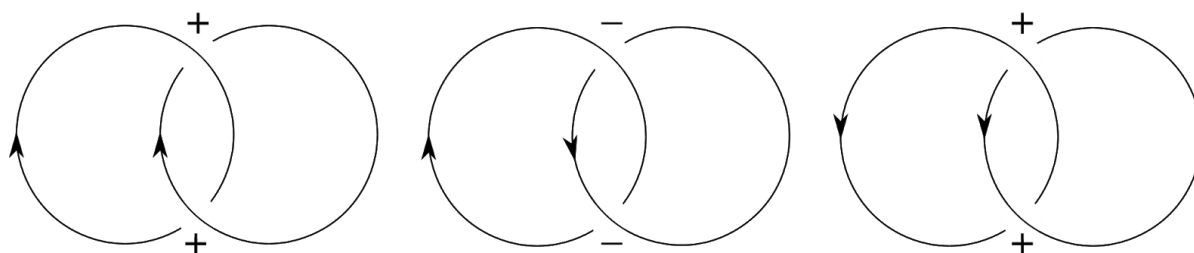


Fig. 1.2:5: El número de ligazón $Lk(L)$ es un invariante de los enlaces de dos componentes orientados, y no está definido para los enlaces sin orientar (aunque puede tomarse su valor absoluto para una orientación cualquiera en ese caso). En la figura se muestran tres posibles formas de orientar un mismo enlace, y cómo esto permite producir diferencias en el signo del *linking number*.

1.2.3 Invariantes polinomiales

Para finalizar esta introducción a los invariantes de la teoría de nudos, deberíamos hablar de algunos de los invariantes más conocidos a la hora de distinguir nudos: los **polinomios**⁵. Aunque el primer polinomio invariante de nudos apareció a principios del siglo XX, descubierto por Alexander (1928), el valor de estos invariantes pudo apreciarse mucho más a finales del mismo siglo, con la aparición del polinomio de Jones (1985) y el trabajo de Kauffman con respecto a una forma simple de calcular este polinomio a partir de un diagrama cualquiera (Kauffman, 1987), basado en un método de Conway que permite obtener el polinomio de Alexander. El desarrollo de este nuevo polinomio, así como una técnica algorítmica para obtenerlo, proveyeron de nuevas formas no solo para distinguir nudos, sino para calcular invariantes en general. En particular, Kauffman y otros autores han definido polinomios para nudos que no solo presentan cruces clásicos (como es el caso de los nudos virtuales y otros que veremos más adelante), mediante algoritmos similares a los usados para calcular el polinomio de Jones y Alexander.

El **polinomio de Jones** es un invariante muy usado, y aunque originalmente se calculaba de una forma muy diferente (Jones, 1985) y poco práctica, rápidamente se descubrió una forma mucho más simple de calcularlo a partir del llamado **bracket polynomial** (que podría traducirse como “polinomio paréntesis”) creado por Kauffman (1987). El *bracket polynomial* de Kauffman se calcula fácilmente a partir de un diagrama de nudo usando un método gráfico basado en el uso de las denominadas *skein relations* (relaciones de maraña/madeja) que describiremos a continuación:

Partimos de un diagrama (no orientado) de un nudo. Centrándonos en un cruce cualquiera, observamos que consiste de 4 “segmentos de cuerda” que llegan al centro, unidos 2 a 2 (los dos que van por arriba y los dos de abajo unidos entre sí, correspondientemente). Sin embargo, existen otras 2 formas de unir estos segmentos de cuerda, uniendo algún segmento de arriba con uno de abajo, produciendo dos cuerdas que **no se cruzan** (consideramos que solo estamos cortando y pegando una punta de cada segmento, y que no estamos agregando nuevos cruces, ver Fig. 1.2:6) Tenemos entonces tres “**versiones**” del cruce. Consideramos ahora el diagrama original, pero reemplazando

⁵ Estrictamente hablando, los invariantes polinomiales de nudos no son *polinomios* en el sentido clásico, porque tienen variables con exponentes negativos, sino que son sumas finitas de términos de la forma $a_k x^k$ con k un número cualquiera (en general números racionales).

el cruce anterior por los nuevos cruces, obteniéndose así 3 nuevos diagramas: Uno en que el cruce es igual al original y otros dos en los que el cruce se eliminó de diferentes formas.

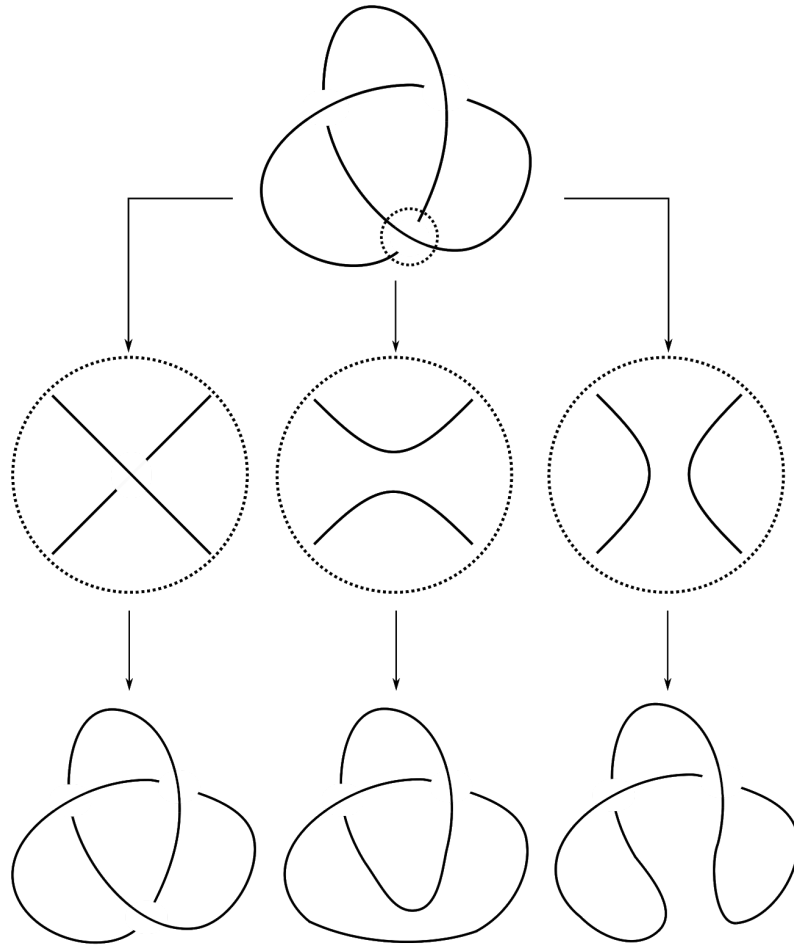


Fig. 1.2:6: Ejemplo de diferentes formas de un diagrama que se utilizan en el cálculo del *bracket polynomial*, en este caso del nudo trébol. En general importa el diagrama en sí, no solo el nudo. Nótese que el diagrama de la derecha es una proyección del nudo trivial, pero no por eso su valor se puede reemplazar por el valor del nudo trivial en cualquier momento.

$$\begin{aligned}
 \langle \bigcirc \rangle &= 1 \\
 \langle \bigcirc \times \bigcirc \rangle &= A \langle \bigcirc \rangle \langle \bigcirc \rangle + A^{-1} \langle \bigcirc \rangle \langle \bigcirc \rangle \\
 \langle \bigcirc \cup L \rangle &= (-A^2 - A^{-2}) \langle L \rangle
 \end{aligned}$$

Fig. 1.2:7: *Skein relations* para el cálculo del *bracket polynomial*. “ $\bigcirc \cup L$ ” hace referencia a un diagrama de un enlace compuesto por dos **componentes que no se cruzan**, uno de los cuales es un enlace llamado L y otro es el diagrama mínimo del nudo trivial.

Ahora que sabemos realizar esta operación, basta definir qué reglas nos permiten relacionar los nuevos nudos para poder calcular el *bracket polynomial* (de variable A) $\langle L \rangle$ para un cierto nudo L . Por suerte, basta con usar 3 reglas (Fig. 1.2:7).

$$\begin{aligned}
\langle \overline{\sigma} \rangle &= A \langle \overline{\sigma} \rangle + A^{-1} \langle \overline{\sigma} \rangle \\
&= A(-A^2 - A^{-2}) \langle \overline{\sigma} \rangle + A^{-1} \langle \overline{\sigma} \rangle \\
&= -A^3 \langle \overline{\sigma} \rangle \\
\\
\langle \overline{\sigma} \rangle &= A \langle \overline{\sigma} \rangle + A^{-1} \langle \overline{\sigma} \rangle \\
&= A \langle \overline{\sigma} \rangle + A^{-1}(-A^2 - A^{-2}) \langle \overline{\sigma} \rangle \\
&= -A^{-3} \langle \overline{\sigma} \rangle
\end{aligned}$$

Fig. 1.2:8: Efecto de los movimientos Reidemeister tipo I en el cálculo del *bracket polynomial*. Reproducido de Adams, 2004.

Usando estas reglas uno puede ir sucesivamente reduciendo el número de cruces de un diagrama, obteniendo un cierto número de círculos que no se cruzan, a los que se les asigna un valor según la tercera regla. Es importante notar que este polinomio se calcula *sin modificar el diagrama más allá de las skein relations*. Por ejemplo, si uno obtiene dos círculos que se cruzan, pero que claramente pueden ser separados (es decir, dos círculos que no se cruzan en el espacio, pero que se cruzan en el diagrama), **no puede aplicar la regla III directamente**, pues siguen existiendo cruces en el diagrama. Una vez finalizado el cálculo, se obtiene el *bracket polynomial* $\langle L \rangle (A)$ que es invariante frente a los movimientos de Reidemeister de tipo II y III, pero **no frente a los movimientos de tipo I**, que lo multiplican por $-A^{\pm 3}$ (Fig. 1.2:8). Esto se debe a que cada movimiento de tipo I modifica el *writhe* del nudo $Wr(L)$ por ± 1 , por lo que podemos remediar esta situación normalizando por el *writhe* de alguna forma, en este caso multiplicando $\langle L \rangle$ por $(-A^3)^{-Wr(L)}$. De esta forma se obtiene un invariante de nudos en la variable A . Si hacemos el cambio de variable $A = t^{-1/4}$, obtenemos por fin el polinomio de Jones para el nudo L , anotado como $V(L)(t)$ (Fig 1.2:9).

$$\begin{aligned}
\langle \text{Trefoil} \rangle &= A \langle \text{Crossing} \rangle + A^{-1} \langle \text{Crossing} \rangle \\
&= A \left(A \langle \text{Crossing} \rangle + A^{-1} \langle \text{Crossing} \rangle \right) + A^{-1} \left(A \langle \text{Crossing} \rangle + A^{-1} \langle \text{Crossing} \rangle \right) \\
&= A \left(A(-A^2 - A^{-2}) \langle \text{Crossing} \rangle + A^{-1} \left(A \langle \text{Crossing} \rangle + A^{-1} \langle \text{Crossing} \rangle \right) \right) \\
&\quad + A^{-1} \left(A \left(A \langle \text{Crossing} \rangle + A^{-1} \langle \text{Crossing} \rangle \right) + A^{-1} \left(A \langle \text{Crossing} \rangle + A^{-1} \langle \text{Crossing} \rangle \right) \right) \\
&= A \left(A(-A^2 - A^{-2}) \left(A \langle \text{Crossing} \rangle + A^{-1} \langle \text{Crossing} \rangle \right) + A^{-1} \left(A(-A^2 - A^{-2}) \langle \text{Crossing} \rangle + A^{-1} \langle \text{Crossing} \rangle \right) \right) \\
&\quad + A^{-1} \left(A \left(A(-A^2 - A^{-2}) \langle \text{Crossing} \rangle + A^{-1} \langle \text{Crossing} \rangle \right) + A^{-1} \left(A \langle \text{Crossing} \rangle + A^{-1}(-A^2 - A^{-2}) \langle \text{Crossing} \rangle \right) \right) \\
&= A \left(A(-A^2 - A^{-2}) \left(A(-A^2 - A^{-2}) \langle \text{Crossing} \rangle + A^{-1} \langle \text{Crossing} \rangle \right) + A^{-1} \left(A(-A^2 - A^{-2}) \langle \text{Crossing} \rangle + A^{-1} \langle \text{Crossing} \rangle \right) \right) \\
&\quad + A^{-1} \left(A \left(A(-A^2 - A^{-2}) \langle \text{Crossing} \rangle + A^{-1} \langle \text{Crossing} \rangle \right) + A^{-1} \left(A \langle \text{Crossing} \rangle + A^{-1}(-A^2 - A^{-2}) \langle \text{Crossing} \rangle \right) \right) \\
&= A^7 - A^3 - A^{-5}
\end{aligned}$$

$$Wr(\text{Trefoil}) = -3 \quad (-A^3)^{-Wr(\text{Trefoil})} \langle \text{Trefoil} \rangle = -A^9 (A^7 - A^3 - A^{-5}) = -A^{16} + A^{12} + A^4$$

$$V(\text{Trefoil}) = -(t^{-1/4})^{16} + (t^{-1/4})^{12} + (t^{-1/4})^4 = -t^{-4} + t^{-3} + t^{-1}$$

Fig. 1.2:9: Ejemplo de cálculo del polinomio de Jones del trébol vía su *bracket polynomial*. Usando las *skein relations* se puede ir simplificando el nudo original hasta reducirlo a formas simples. En este caso se desarrolla el *bracket polynomial* hasta que sólo aparezcan diagramas triviales (de valor 1) y luego se simplifica. Sabiendo el *writhe* del diagrama original y reemplazando A por $t^{-1/4}$ se obtiene el valor de V , el polinomio de Jones.

El **polinomio de Alexander** puede calcularse de muchas maneras, y puede demostrarse su invariancia de distintas formas también. En el artículo original (Alexander, 1928), Alexander calculó el polinomio en base a una matriz que se construye a partir de un diagrama cualquiera de un nudo. Otra forma de calcularlo a través de una matriz, es mediante el uso de superficies de Seifert, que menciono solamente como curiosidad, y que no será presentada aquí. La forma más simple de calcularlo manualmente, sin embargo, proviene del trabajo de Conway (1970), en el que mostró una forma de calcularlo utilizando las *skein relations* a partir de un diagrama orientado cualquiera de un nudo, de forma similar a como lo hicimos para el polinomio de Jones.

Algo muy importante y notable de la forma en que están definidos estos polinomios es su sencillez operativa. Ambos pueden calcularse sencillamente a partir de un *diagrama cualquiera*, y ambos pueden definirse de una forma algorítmica *simple*. Esto parecería sugerir que pueden definirse muchos otros invariantes (polinomiales, al menos) asignándole diferentes reglas (ecuaciones) a las *skein relations*, de tal forma que el polinomio resultante sea invariante, lo cual es fácil de comprobar observando si el polinomio cambia al realizar los distintos movimientos de Reidemeister. De hecho, como volveré a mencionar más adelante en este trabajo, esta es una forma que ha demostrado ser efectiva para generar algún invariante nuevo cuando se quiere trabajar con nudos que presenten “cruces especiales” (diferentes de los usuales).

Por ejemplo, el polinomio de Alexander $\Delta(L)$ se calcula definiendo a partir de un nudo L nuevos nudos L_0 , L_+ y L_- (Fig.1.2:10) Y usando solamente dos reglas:

- 1) $\Delta(U) = 1$, siendo U el nudo trivial (*Unknot*)
- 2) $\Delta(L_+) - \Delta(L_-) = (t^{1/2} - t^{-1/2}) \Delta(L_0)$

Calcular $\Delta(L)$ en cada paso es **independiente del diagrama particular usado**, depende solo del nudo, por lo que, por ejemplo, si en un caso L_+ resulta ser una proyección del nudo trivial, ya se sabe que $\Delta(L_+) = 1$. Por aplicación sucesiva de estas reglas, puede calcularse el polinomio de Alexander para cualquier nudo (o enlace) L (eg: Fig. 1.2:11).

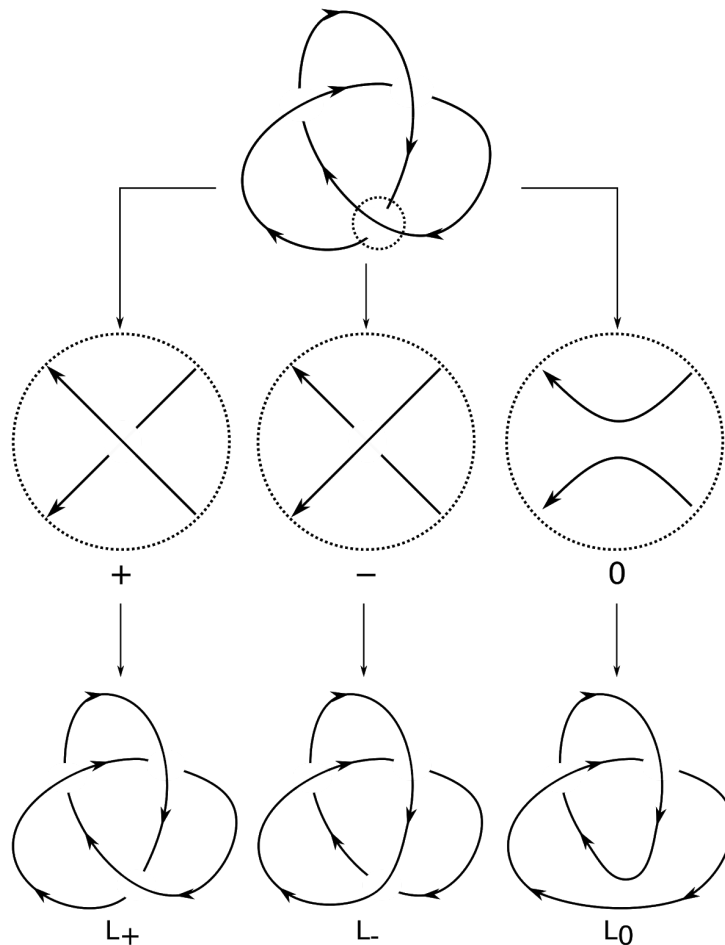


Fig. 1.2:10: Ejemplo de diferentes formas de un diagrama que se utilizan en el cálculo del polinomio de Alexander. En este caso importa el nudo, no el diagrama en sí, por lo que se puede reemplazar en este caso a L_- por el diagrama mínimo del nudo trivial.

Los invariantes polinomiales han resultado ser muy útiles y populares para la clasificación de diagramas arbitrarios de nudos debido en parte a la simplicidad del proceso para calcularlos en base a las *skein relations*. Sin embargo, esto no es suficiente para justificar la existencia de dos invariantes polinomiales distintos con métodos de cálculo prácticamente iguales. La verdadera razón por la cual existen varios invariantes de este tipo es porque **son capaces de distinguir distintos nudos entre sí**. Es decir, existen nudos diferentes con el mismo polinomio de Jones pero distinto polinomio de Alexander, y

viceversa⁶. Existe incluso otro invariante más complejo (el polinomio HOMFLY) que generaliza ambos polinomios, por lo que puede usarse para distinguir nudos que no pueden ser distinguidos por ninguno de los dos polinomios aquí presentados. La necesidad de tener estos distintos polinomios ya sugiere un resultado que es bien conocido: **los polinomios conocidos hasta ahora no son capaces de distinguir entre dos diagramas de nudo cualquiera**. Aún así, suelen ser suficientemente buenos en la práctica, lo que junto con la facilidad de computarlos hace que sigan teniendo un rol importante a la hora de clasificar diagramas de nudos.

$$\begin{aligned}
 \Delta(\text{trefoil}) - \Delta(\text{trefoil}) &= (t^{1/2} - t^{-1/2}) \Delta(\text{trefoil}) \\
 \Delta(L_-) &= \Delta(\text{trefoil}) = \Delta(\text{trefoil}) = \Delta(\text{circle}) = 1 \\
 \Delta(L_0) &= \Delta(\text{trefoil}) = (t^{1/2} - t^{-1/2}) \Delta(\text{trefoil}) + \Delta(\text{trefoil}) \\
 &= (t^{1/2} - t^{-1/2}) \Delta(\text{circle}) + \Delta(\text{circle}) \\
 &= (t^{1/2} - t^{-1/2}) \\
 \Delta(L_+) &= \Delta(\text{trefoil}) = 1 + (t^{1/2} - t^{-1/2})(t^{1/2} - t^{-1/2}) \\
 \Delta(\text{trefoil}) &= t - 1 - t^{-1}
 \end{aligned}$$

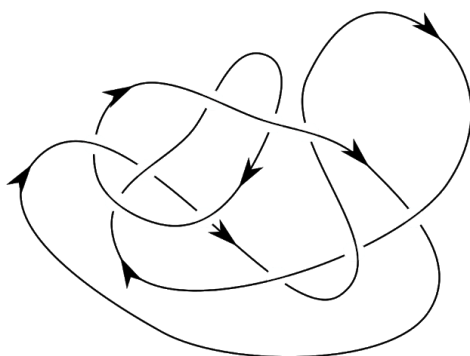
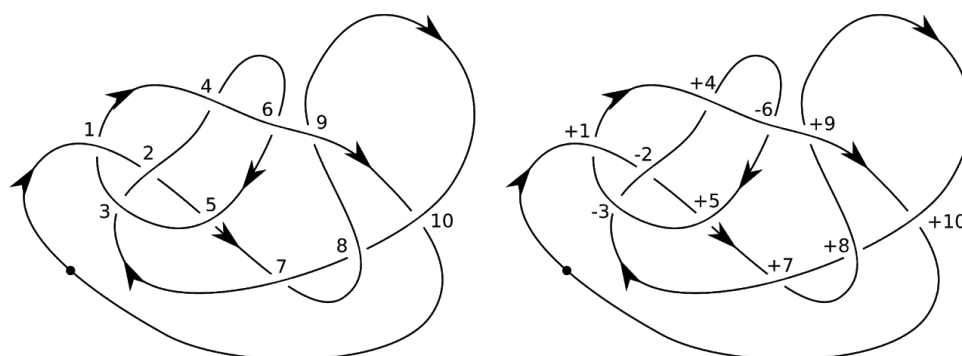
Fig. 1.2:11: Ejemplo de cálculo del polinomio de Alexander del trébol. Usando las *skein relations* se puede ir simplificando el nudo original hasta reducirlo a formas simples. Es fácil ver que el polinomio de Alexander de cualquier número de nudos triviales sin enlazar es 0, por lo que queda como ejercicio para el lector.

1.3 Códigos y Diagramas de Gauss

A pesar de que la representación por excelencia de la teoría de nudos es el diagrama de nudo, existen múltiples formas de representar un nudo, lo que nos permite tener diferentes perspectivas de los mismos. De particular importancia para este trabajo son las representaciones nombradas en honor al famoso matemático de finales del siglo XVIII e inicios del siglo XIX, Johann Carl Friedrich Gauss, que presentamos a continuación.

⁶ Este último caso es notablemente más común, por lo que se suele decir que el polinomio de Jones es un invariante más fuerte que el polinomio de Alexander.

Gauss, en sus estudios sobre curvas en el plano, describió una forma de representar nudos mediante una secuencia de símbolos, actualmente conocida como **código (o palabra) de Gauss**. Para obtener un código de Gauss de un nudo a partir de un diagrama orientado con N cruces, se le asigna primero un número entero de 1 a N a cada cruce y luego se elige un punto cualquiera en el diagrama. Hecho esto, se recorre el nudo a partir de dicho punto en la dirección dada por la orientación, y se va anotando en orden el número de cada cruce por el que se pasa, así como si se pasó por arriba (O, de *over*) o por abajo (U, de *under*). Una vez que se retornó al punto inicial, la secuencia de símbolos que anotada forma el código de Gauss para ese diagrama (Fig. 1.3:1). Si además del número y la condición *over* o *under*, se anota el signo de cada cruce, obtenemos el **código (o palabra) signada de Gauss**.

a**b****c**

O1 U2 U5 U7 O8 U9 O10 U8 O7 U3 O2 U4 U6 O5 O3 U1 O4 O6 O9 U10

O1⁺U2⁻U5⁺U7⁺O8⁺U9⁺O10⁺U8⁺O7⁺U3⁻O2⁻U4⁺U6⁻O5⁺O3⁻U1⁺O4⁺O6⁻O9⁺U10⁺

Fig. 1.3:1: Pasos para obtener el código de Gauss a partir de un diagrama. **(a)** Diagrama orientado de un nudo. **(b)** El mismo diagrama, ahora con sus cruces numerados del 1 al 10 y un punto de inicio marcado. Puede agregarse a este nuevo diagrama también el signo de los cruces. **(c)** Código de Gauss/código signado de Gauss obtenidos recorriendo el diagrama desde el punto inicial en la dirección dada por la orientación del mismo.

El código de Gauss es, entonces, una “palabra” formada por símbolos y números que da idea de como se puede dibujar un diagrama de nudo, y que podemos obtener para cualquier nudo. Pero entonces cabe preguntarse, ¿será que todas las palabras de letras y números son la palabra de Gauss de algún nudo?. La respuesta claramente es que no, pues rápidamente se observan algunas peculiaridades de estos códigos: las letras y los números van intercalados, cada número aparece exactamente 2 veces estando precedido por

diferentes letras cada vez. ¿Y ahora? ¿Con eso sí basta? A partir de aquí la respuesta es más sutil e interesante. Para los propósitos de este trabajo sólo mencionaré que se requieren más condiciones para que una palabra de este estilo corresponda a algún nudo, que estas condiciones son chequeables de forma algorítmica, y que considerar aquellas palabras que “no llegan a representar nudos” lleva a la **Teoría de nudos virtuales**, una idea fascinante y mucho más moderna que extiende los conceptos de la teoría de nudos “clásica” a una clase más amplia de nudos.

De hecho, desde hace relativamente pocos años, existen varias “teorías alternativas” de nudos en las que se permiten propiedades, cruces y movimientos diferentes de los que se han presentado en este texto. Además de presentar novedades formales, se pueden usar para modelar situaciones reales donde la teoría de nudos clásica no encaja bien, incluyendo ciertas situaciones biológicas. Es por ello que estas teorías alternativas se presentarán mejor más adelante, en las secciones más biológicas de este trabajo, con el fin de no sofocar al lector⁷.

Por comodidad, a lo largo del texto escribiremos códigos de Gauss de forma genérica como $y_1y_2\dots y_{2N}$, siendo y_i una símbolo cualquiera del código de Gauss, es decir, una letra (O o U) junto con un número entre 1 y N (el número de cruces). Cuando queramos hacer énfasis en la estructura de los cruces, anotaremos genéricamente los códigos de Gauss como secuencias de símbolos Ox_i o Ux_i siendo x_i un número entre 1 y N, por ejemplo: $Ox_1Ux_2Ox_3Ux_4Ox_5Ux_6$, que podría representar el código de Gauss del diagrama mínimo del trébol. Estos códigos genéricos serán de utilidad en la Sección 3 del presente texto para hablar de las propiedades de códigos de Gauss en general.

Del código de Gauss se puede derivar otra representación diagramática para un nudo, llamada **diagrama de Gauss**⁸. Estos diagramas consisten de un círculo orientado (usualmente en sentido antihorario) con ciertos puntos marcados, junto con flechas que unen pares de puntos. Los puntos corresponden a caracteres en la palabra de Gauss, y se colocan sobre la circunferencia externa de tal forma que, siguiendo el sentido con el que se orientó el círculo, se lea la palabra de Gauss. Luego las flechas se usan para unir los pares de puntos marcados con el mismo número, y apuntan hacia el carácter correspondiente al pasaje por debajo del cruce, es decir que apuntan “de arriba hacia abajo”. Si el código de Gauss tenía signos, se suele decorar con el signo correspondiente a cada cruce a su flecha correspondiente. Como último detalle, aclarar que, como los números que se asignan a los cruces son arbitrarios y el círculo externo se suele orientar en sentido antihorario, por lo general se omiten ambas cosas de los diagramas para simplificar (Fig. 1.3:2).

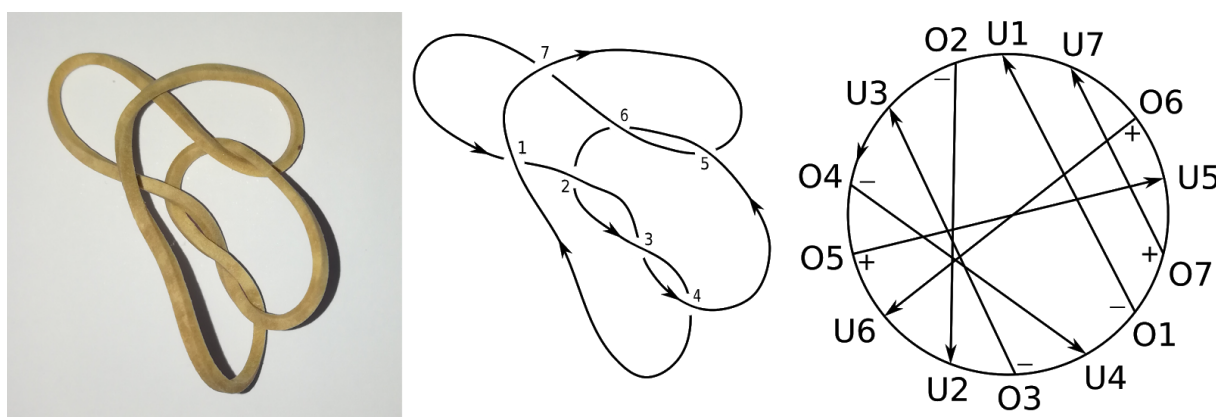
Una propiedad interesante de los diagramas de Gauss es que claramente, a todas las palabras de Gauss se les puede asignar un diagrama de Gauss, aunque no se les pueda asignar un diagrama de nudo. Entonces, los diagramas de Gauss nos dan una representación gráfica mucho más general que los diagramas usuales, pudiendo usarse para visualizar nudos de teorías más generales. Similarmente, aunque el código de Gauss

⁷ Una buena introducción a la gran diversidad presente en las teorías alternativas puede encontrarse en el libro de Dye (2016).

⁸ Aunque un diagrama de Gauss sea técnicamente un diagrama asignado a un nudo, se le suele llamar “diagrama de Gauss” (y no “diagrama de nudo”) para evitar confusiones.

incluye una cierta arbitrariedad al momento de numerar los cruces, lo cual podría dificultar darse cuenta rápidamente si dos códigos obtenidos a partir de un mismo diagrama son iguales, al remover esa información, se obtiene un diagrama que es *independiente de la numeración arbitraria*. De hecho, cualquier otro diagrama de Gauss obtenido a partir del mismo diagrama será igual a menos de una rotación o el ángulo entre flechas contiguas.

Sin embargo, esto no significa que el diagrama de Gauss (o si se quiere, su “forma”) sea un invariante de los nudos. Es fácil de ver que distintos diagramas de nudos producen distintos diagramas de Gauss (eg: adicionando un cruce mediante un movimiento de tipo I), pero tal como hicimos con el caso de un diagrama de nudo, existen movimientos del diagrama que nos permiten alterar el diagrama de Gauss sin cambiar la identidad del nudo, y permitiéndonos generar todos los posibles diagramas de Gauss correspondientes al mismo. Por analogía con los movimientos estudiados anteriormente, estos se llaman *movimientos de Reidemeister*, y se representan como aparece en la figura 1.3:3.



$$U1^- O2^- U3^- O4^- O5^+ U6^+ U2^- O3^- U4^- O1^- O7^+ U5^+ O6^+ U7^+$$

Fig. 1.3:2: Pasos para obtener el diagrama de Gauss a partir de un diagrama de nudo. (Izquierda) Imagen de un nudo real, equivalente al nudo trivial. (Centro) Diagrama orientado y con cruces numerados representando el nudo de la imagen. (Derecha) Diagrama de Gauss correspondiente a dicho diagrama. Por motivos ilustrativos, se ha incluido la orientación del círculo exterior así como la numeración de los cruces, aunque usualmente sean omitidas para enfatizar la *forma* del diagrama. (Abajo) Palabra signada de Gauss correspondiente al diagrama central, a partir de la cual se construyó el diagrama de Gauss.

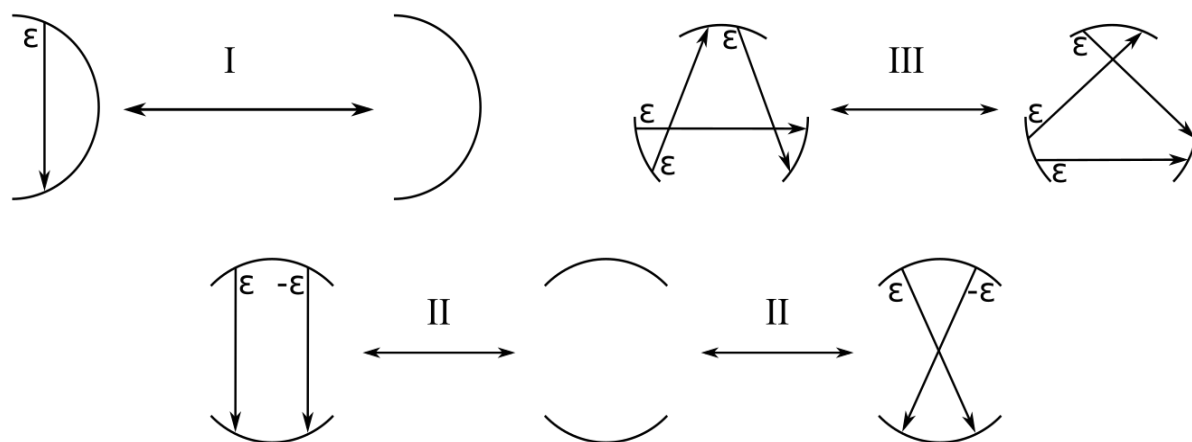


Fig. 1.3:3: Diagramas ilustrando los movimientos de Reidemeister vistos en un diagrama de Gauss. En las partes donde el círculo externo no está presente pueden entrar o salir cualquier número de flechas, lo importante es que, en los segmentos continuos del círculo externo, la forma debe ser como la que aparece en el diagrama. En este caso, la letra ε representa un signo cualquiera (+ o -) y $-\varepsilon$ representa su opuesto.

Contamos ahora con una nueva forma de representar un nudo dado, con versiones equivalentes de los movimientos de Reidemeister presentados anteriormente. Tener tantas representaciones distintas puede parecer innecesario, teniendo en cuenta que todas contienen la misma información. De hecho, obtuvimos nuestro diagrama de Gauss a partir de un diagrama de nudo, así que ¿por qué no trabajar solamente con estos? Más aún ¿para qué usar un diagrama si al fin y al cabo se “obtiene” a partir de un “nudo real”, es decir, una curva cerrada en el espacio (como se definió al inicio de la Introducción)?

Claramente, trabajar con un diagrama es más cómodo que pensar en una curva en el espacio, y de hecho, es precisamente visualizarlo como un diagrama plano que nos permite encontrar ciertas características importantes que no se nos hubieran ocurrido de otra manera (¿cómo se verían las *skein relations* sobre una curva en el espacio?). De la misma forma, hay ciertos invariantes que se visualizan mejor en códigos de Gauss o en diagramas de Gauss. Por lo tanto, aún cuando contienen la misma información, estos ejemplos muestran que puede ser provechoso investigar nuevas formas de representar nudos y enlaces, tal como se verá más adelante en esta tesis.

1.4 Algunas clasificaciones típicas

Hasta ahora hemos visto distintas propiedades y características de los nudos y sus representaciones, que pueden ser útiles a la hora de diferenciarlos. Sin embargo, sería inaceptable terminar esta introducción sin mencionar explícitamente algunas de las categorías clásicas en las que se suelen clasificar los nudos.

Una clasificación muy básica de los nudos los separa en *nudos alternantes* y *nudos no alternantes*. Se dice que un diagrama es alternante si, en el código de Gauss correspondiente, cada O es seguida por una U y viceversa (considerando que la primera letra del código “sigue” a la última). Otra forma de decirlo es que **un diagrama es alternante si, al recorrerlo, uno pasa por debajo y por arriba de cruces en forma alternante.**

Decimos que **un nudo es alternante si existe algún diagrama alternante del mismo**. Esta propiedad puede no parecer de mayor importancia, pero es una de las mayores distinciones entre nudos, y es una propiedad de los nudos simples que uno suele estudiar (eg: todos los nudos en la Fig. 1.1:1). La propiedad opuesta, la de ser un nudo no alternante, es mucho más difícil de comprobar, pues requiere demostrar que *no existe ningún diagrama alternante* correspondiente a un cierto nudo.

Cuando definimos el número de cruces de un diagrama definimos a su vez lo que es un **diagrama mínimo**. Típicamente, para obtener un diagrama mínimo pueden aplicarse los movimientos de Reidemeister para reducir el número de cruces. Más en general, se suelen definir otros movimientos que permiten eliminar cruces de una forma mucho más simple que si se usara una secuencia de movimientos de Reidemeister⁹. Tait, el primero en dedicarse al estudio y la clasificación de los nudos, definió un cruce como *nugatory crossing* (cruce ineficaz) si el diagrama en que está presente puede dividirse en dos subdiagramas unidos solamente por dicho cruce^{10,11}. Como se muestra en la figura 1.4:1, es fácil eliminar estos cruces usando un movimiento especial, también definido por Tait (Menasco, 2019). Podemos definir entonces que **un diagrama reducido es todo aquel que no tenga *nugatory crossings***. Estos diagramas claramente se verán *bastante* reducidos (es decir, no presentarán cruces que puedan ser fácilmente eliminados), pero en general no podemos saber si son diagramas mínimos, por ejemplo.

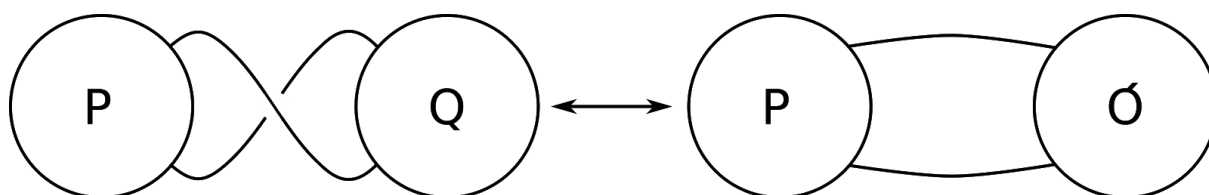


Fig. 1.4:1: Cómo eliminar un *nugatory crossing*. Se define un *nugatory crossing* por el diagrama de la izquierda, siendo P y Q diagramas de nudos con extremos libres compatibles con las líneas de la estructura. Obsérvese que al eliminar el *nugatory crossing* uno de los dos diagramas (en este caso Q) queda invertido con respecto al eje del *nugatory crossing*, y se invierten todos sus cruces (intuitivamente “se rota” el diagrama Q). Un diagrama sin *nugatory crossings* se llama **reducido**.

⁹ Recordar, sin embargo, que todas las equivalencias de diagramas pueden escribirse como secuencias de movimientos de Reidemeister. Esta es una cuestión puramente práctica.

¹⁰ Observar que el cruce de un pequeño bucle, como uno introducido por un movimiento de Reidemeister tipo I, es también un *nugatory crossing* (Q en este caso es simplemente una línea sin intersecciones).

¹¹ Otra definición de *nugatory crossing* (dada por Torisu, 1999) es que un cruce es *nugatory* si cambiar su signo (es decir, intercambiar la hebra de arriba con la de abajo y viceversa) no cambia la identidad del nudo.

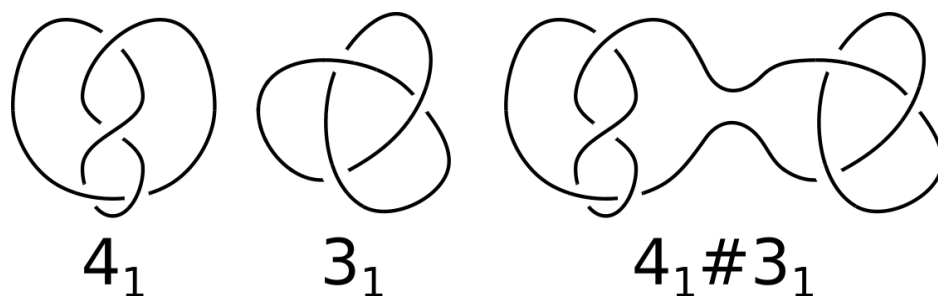


Fig. 1.4:2: Ejemplo de la suma de dos nudos. Dados dos diagramas de nudo (en este caso, los diagramas mínimos usuales de 4_1 y 3_1), puede obtenerse un diagrama de una de sus sumas eliminando una pequeña sección sin cruces de cada diagrama y uniendo los extremos libres que resultan, en este caso produciendo el nudo $4_1 \# 3_1$.

Otra clasificación de gran importancia aparece al definir la **suma de nudos**. Dados dos diagramas de nudos, se puede definir la suma de ambos como el diagrama que se obtiene eliminando una sección sin cruces de cada uno y uniendolas entre sí (ver Fig. 1.4:2). Esta suma no está totalmente bien definida, pues distintos diagramas del mismo nudo pueden unirse según este procedimiento de diferentes formas, por lo que **de la suma de los mismos dos nudos puede resultar más de un nudo**. Por otro lado, una propiedad interesante es que el nudo trivial (*unknot*) funciona como *elemento neutro* en esta operación: cualquier nudo, sumado al nudo trivial, da el primer nudo de nuevo. Una vez definida esta operación es fácil pensar en los nudos como divididos en dos categorías: aquellos que se pueden obtener como suma de otros nudos (eg: el *square knot* y *granny knot*, ambos obtenidos de la suma de dos nudos trébol) y aquellos que *no se pueden obtener como suma de nudos* (sin contar al nudo trivial), como el trébol¹² (Fig. 1.4:3). Típicamente a estos dos grupos se les llama **nudos compuestos** y **nudos primos**, respectivamente. Se conocen todas las formas de pegar nudos, por lo que el estudio de nudos puede reducirse al estudio de nudos primos (pues a partir de ellos pueden obtenerse todos los nudos), lo que hace que sean los nudos que más usualmente se estudian.

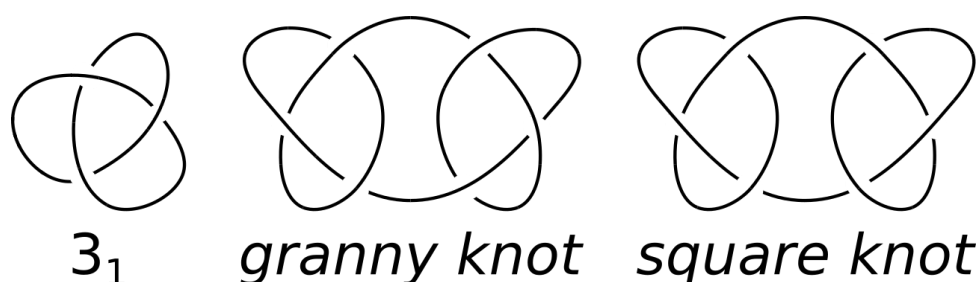


Fig. 1.4:3: Nudos primos y compuestos. El nudo trébol (3_1) es el nudo no trivial más simple y no puede escribirse como la suma de dos nudos, por lo que decimos que es *primo*. De la suma de nudos trébol pueden obtenerse dos tipos de nudos distintos: el *granny knot* y el *square knot*. Como se obtienen de la suma de dos nudos no triviales, decimos que estos últimos son *compuestos*.

¹² Esta propiedad no es obvia, pues podría ser que la suma de dos diagramas diera un diagrama complejo que pudiera ser reducido hasta un trébol.

Todas estas clasificaciones de los nudos están relacionadas. Durante su estudio de los nudos, Tait conjeturó que, aunque no podamos saber si un diagrama reducido de un nudo es mínimo o no, seguramente **un diagrama reducido y alternante de un nudo es mínimo**. Esta conjetura fue demostrada en 1987 independientemente por Jones, Murasugi y Thistlewaite usando el polinomio de Jones, por lo que podemos decir que un nudo es alternante si y sólo si tiene algún diagrama mínimo alternante¹³ (para una revisión sobre el tema, ver Menasco (2019)). Más aún, los nudos primos poseen una propiedad adicional: **un nudo primo es alternante si y sólo si cualquier diagrama mínimo del mismo es alternante** (lo cual no es necesariamente cierto para los nudos compuestos).

Estas tres características nos permiten dividir a los nudos en grandes clases, típicamente con propiedades teóricas interesantes. En general, las clasificaciones interactúan entre sí, a veces obteniéndose propiedades de gran utilidad como las mencionadas en el párrafo anterior. Un ejemplo de esta utilidad es que, si se sabe que un nudo es primo y se tiene un diagrama mínimo del mismo (dato que se obtiene de alguna forma) que es no alternante, eso demuestra que el nudo es no alternante, propiedad en general difícil de demostrar.

¹³ Es fácil ver que un diagrama alternante no reducido sigue siendo alternante luego de eliminar un *nugatory crossing*, por lo que cualquier diagrama alternante es equivalente a un diagrama reducido alternante, y por tanto a un diagrama mínimo alternante.

1.5 Conclusión

El lector debería tener una idea en este momento del concepto de nudo, así como de algunos de sus principales invariantes y formas de representación. Si es así, posee ahora los conocimientos básicos para comprender el resto de esta tesis, así como una noción de los distintos tipos de nudos y las formas de diferenciarlos. A lo largo del resto del texto se introducirán más nociones matemáticas a medida que sean necesarias, pero suelen ser imprescindibles para entender solo parte de los temas a explorar.

Como está dicho en la introducción, este texto está enfocado a lectores del área de la biología, por lo que, aunque hasta ahora todo se ha definido caso a caso, a partir de ahora asumiremos por simplicidad que el lector posee un cierto conocimiento de aspectos fundamentales de la biología molecular. Espero que el lector que no se encuentre familiarizado con estos temas sea capaz de realizar una búsqueda rápida para tener los conceptos básicos, que suelen ser los necesarios para los temas que se tratarán a continuación.

2 Nudos y Biología

2.1 Preliminares

Durante el siglo XX se descubrió que un gran número de moléculas de interés biológico estaban conformadas por largos polímeros lineales, como ocurre con los ácidos nucleicos y las proteínas. Si visualizamos estas cadenas de polímeros como curvas en el espacio, podemos pensar en su conformación tridimensional y las consecuencias que la misma pueda tener en su función biológica¹⁴. Esta perspectiva llevó a que durante la década del 60 surgiera el interés en la posibilidad de que existieran polímeros naturalmente anudados.

Intuitivamente, **parece improbable que existan moléculas biológicas naturalmente (o consistentemente) anudadas**. Todos los polímeros se sintetizan linealmente por lo que parece difícil que se puedan anudar durante su síntesis de una forma predeterminada, considerando que un nudo es una *propiedad global* de la cadena, y la síntesis un *proceso local*. Esto parecería descartar en gran medida la idea de polímeros anudados “a propósito”, y sería esperable que cualquier tipo de anudación que no sea favorecida por la selección natural terminaría generando complicaciones, dificultando quizás el funcionamiento del polímero, así como su empaquetamiento o su reconocimiento por parte de otras estructuras (frente a otras moléculas idénticas químicamente pero sin ningún tipo de anudación). Por esto, se esperaría que la selección purificadora los eliminase, tal como elimina aquellas proteínas plegadas de forma incorrecta.

En contra de esta intuición biológica, a principios de la década del '60, un artículo de Frisch y Wassermann (1961), así como un seminario de Delbrück (1962), presentaron una conjetura, a veces denominada la “Conjetura de Frisch-Wassermann-Delbrück” que puede expresarse de la siguiente forma:

“La probabilidad de que una curva cerrada aleatoria de longitud n en el espacio esté anudada tiende a 1 cuando n tiende a infinito” (Berger *et al.*, 2009).

En términos biológicos, esto querría decir que un polímero cualquiera (esencialmente una curva poligonal en el espacio, considerando los enlaces entre los monómeros como los lados), cuantas más subunidades tenga, tiene mayor probabilidad de estar anudado¹⁵. De ser cierta esta conjetura, esto significaría que, bajo neutralidad, y considerando el gran tamaño de los polímeros biológicos (desde decenas de subunidades en las proteínas más pequeñas hasta miles de millones en algunos cromosomas), debería ser esperable encontrar muchos ejemplos de polímeros anudados en la naturaleza. Otra consecuencia es

¹⁴ De hecho, hoy en día es bien sabido que la conformación tridimensional que adoptan los polímeros suele ser de gran importancia funcional para todos los procesos que los involucran.

¹⁵ Y seguramente, mayor probabilidad de presentar un nudo más complicado, por ejemplo con mayor número de cruces.

que, si efectivamente las moléculas anudadas son difíciles de encontrar, debe haber algún tipo de presión selectiva en contra de las mismas.

De hecho, la conjetura de Frisch-Wassermann-Delbrück ha sido demostrada para diferentes modelos de polímero cerrado (Sumners & Whittington, 1988; Jungreis, 1994; Diao, 1995; Diao *et al.*, 1994, 2001), tanto para la aparición de “anudación local” (que ocupa una longitud muy pequeña del polímero total) como de “anudación global” (que ocupa una gran porción de la longitud total del polímero), en algunos casos demostrándose también que, dado un cierto tipo de nudo, la probabilidad de que un polímero de largo n presente ese tipo de nudo tiende a 1 al aumentar n (Soteros *et al.*, 1992). De esta forma, las consecuencias mencionadas en el párrafo anterior parecerían ser verdaderas desde un punto de vista teórico.

En conclusión, a mediados del siglo XX se sabía que los nudos podrían llegar a tener importancia biológica en lo que refiere a la conformación tridimensional de polímeros importantes, y por tanto que la teoría de nudos podría llegar a tener aplicaciones en la biología molecular. Se tenía además la intuición de que no deberían existir los polímeros naturalmente anudados, idea contrastada por la conjetura de Fischer-Wasserman-Delbrück, que parecía indicar que los nudos deberían ser comunes entre el gran número de polímeros largos presentes en los sistemas biológicos. En cualquier caso, todas estas ideas no tienen mucho valor hasta que no sepamos si efectivamente los polímeros anudados existen naturalmente...

2.2 Nudos en el ADN

2.2.1 La existencia de nudos en el ADN, o: ¿y esto para qué sirve?

Que el lector esté leyendo este trabajo parece implicar que, efectivamente, existen problemas geométricos y topológicos en la biología, particularmente problemas relacionados con la teoría de nudos, los cuales le dan tema a esta monografía y hacen que la teoría de nudos “sirva para algo” en esta ciencia. Pero la pregunta subyacente continúa: “¿Dónde hay nudos en la biología?”

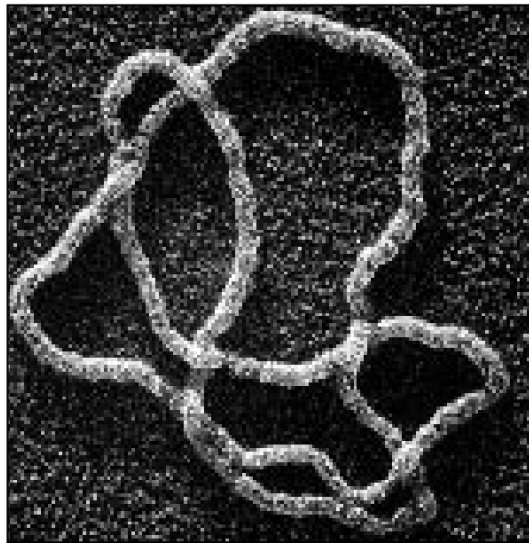


Fig. 2.2:1: Imagen de una molécula de ADN anudada bajo microscopía electrónica de barrido. Reproducida de Sumners (1995), donde aparece atribuida a N. R. Cozzarelli.

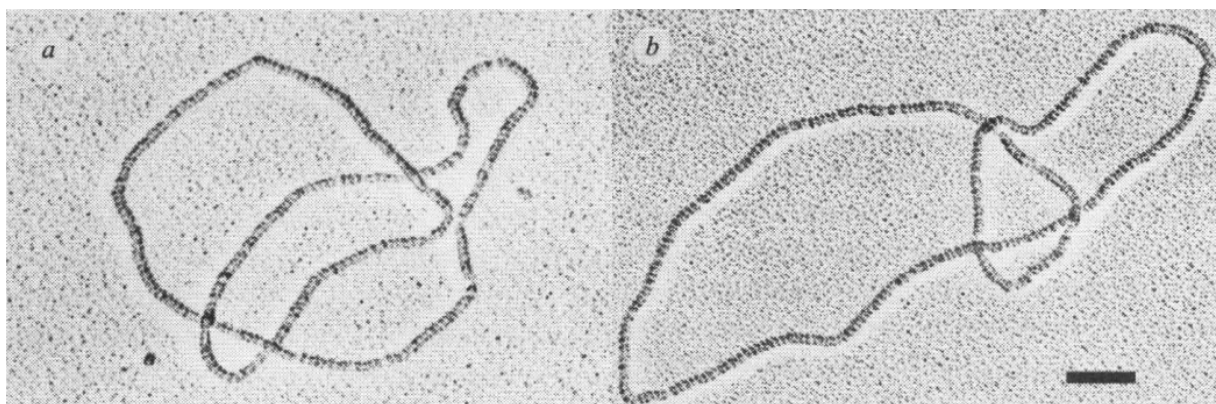


Fig. 2.2:2: Imágenes de moléculas de ADN anudadas en forma de nudo trébol (nudo 3₁) bajo microscopía electrónica de transmisión. Para poder visualizar correctamente el signo de cada cruce (equivalente a determinar cual segmento va por encima y cuál por debajo) se trataron las moléculas con la enzima RecA de *Escherichia coli*. Adaptado de Krasnow *et al.*, 1983. Barra de escala: 1000 Å.

Espero que las figuras 2.2:1 y 2.2:2 eliminen cualquier duda que alguien pueda tener acerca de la existencia de los polímeros biológicos anudados. Ahí están, moléculas de ADN cerradas, claramente anudadas en el sentido matemático. Y aunque hay que admitir que estas moléculas fueron tratadas con enzimas en el laboratorio para poder observar estos resultados, ¡estas enzimas están presentes en organismos vivos, donde actúan sobre el ADN! por tanto, estos son los esperados polímeros biológicos naturalmente anudados.

Ahora que *sabemos* que existen los nudos en los polímeros biológicos, podemos empezar a aplicar herramientas de la matemática. Para esto, primero vamos a alejarnos de (o más bien, acercarnos a) estas imágenes tan claras y empezaremos por *otro nivel de anudación* (porque **el ADN puede estar, y de hecho está, anudado a más de un nivel**).

2.2.2 El problema de la replicación del ADN

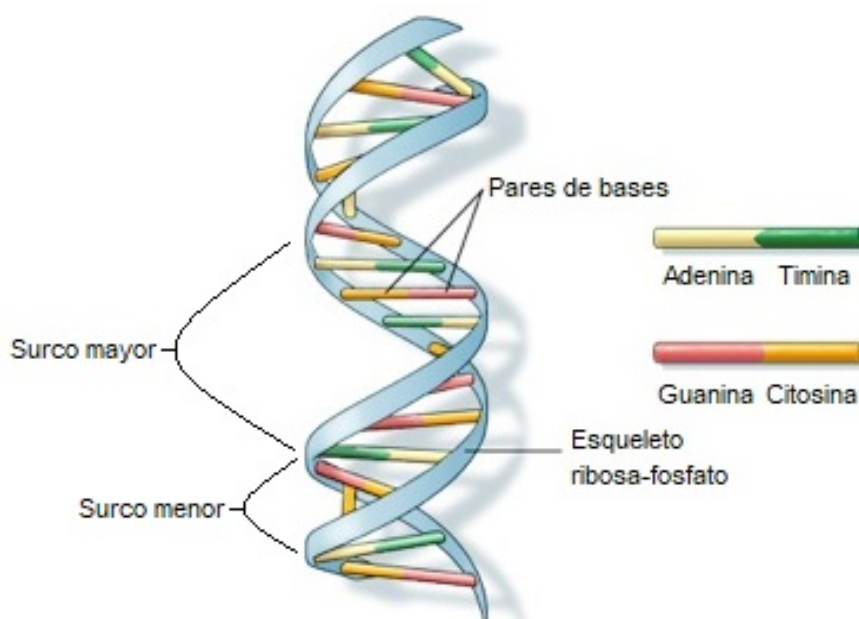


Fig. 2.2:3: Diagrama mostrando la estructura tridimensional del ADN en su forma B, como fue propuesta por James Watson y Francis Crick en 1953. Se distinguen las dos cadenas que forman el esqueleto ribosa-fosfato, envueltas entre sí formando una doble hélice, estructura que se mantiene unida gracias a la unión complementaria de distintos pares de bases. Esta estructura define a su vez dos surcos, uno “mayor” y otro “menor”, destacados en esta figura. Modificado a partir del original, Crédito: U.S. National Library of Medicine.

Los problemas geométricos y topológicos surgen ya en la década de 1950, con la publicación del par de artículos de Watson y Crick en 1953, en los que se propone la estructura de doble hélice para la molécula de ADN (Fig. 2.2:3) (Watson & Crick, 1953a), así como el mecanismo de replicación semiconservativa de la misma (Watson & Crick, 1953b). Inmediatamente, esto sugiere ciertos problemas: si la molécula es circular (sin extremos libres, formando una curva cerrada), como la molécula está formada por 2 hebras que se enroscan siempre en el mismo sentido, ¿la molécula es un enlace no trivial, con un número

de ligazón potencialmente muy alto!¹⁶ Pero entonces, ¿cómo hacen las moléculas hijas para separarse luego de replicarse? Al principio, esta pregunta no parecía muy difícil, pues se pensaba que las moléculas de ADN eran usualmente cortas y lineales, pero este problema se volvió importante cuando se descubrió que las moléculas de ADN efectivamente suelen ser muy largas (Pohl, 1980).

Vimos en la introducción que los componentes de un enlace no trivial no pueden separarse sin cortarlos, además de que simplemente desenrollar el enorme número de vueltas en cualquier cromosoma demoraría muchísimo tiempo. Lo que es más, este problema persiste aún en cromosomas lineales (que tienen extremos libres), porque en esos casos la molécula de ADN es localmente idéntica a una molécula circular. Como las vueltas son tan pequeñas comparadas con el tamaño de un cromosoma lineal (en la forma B del ADN, cada vuelta ocurre cada aproximadamente 35 Å, mientras que un cromosoma humano mide aproximadamente 5 cm, por lo que hay una diferencia de ¡7 órdenes de magnitud!), los problemas topológicos son los mismos, pragmáticamente.

El problema de Delbrück y la replicación semiconservativa

Ya en 1954 (antes de que se considerara la existencia de los cromosomas circulares (Wang & Liu, 1990)) Delbrück puso en duda el mecanismo de replicación semiconservativa del ADN propuesto por Watson y Crick. De acuerdo con Delbrück, el problema de la separación de las moléculas hijas surge precisamente debido a este mecanismo de replicación, y según su opinión, este problema solo puede ser solucionado de tres formas, una vez terminada la replicación:

1. Las moléculas hijas se deslizan longitudinalmente la una con respecto a la otra (recordemos que estaba considerando moléculas lineales).
2. Las moléculas hijas rotan la una con respecto a la otra hasta que ya no estén envueltas entre sí, por lo que quedan libres de ser separadas.
3. Las moléculas se rompen en algún punto y vuelven a unirse.

Las dos primeras formas fueron rechazadas por ser “muy poco elegantes” (sin mencionar que solo funcionan si se trata de moléculas lineales), y dentro de la tercera forma existen dos posibilidades para separar las hebras tirando lateralmente (fig. 2.2:4):

- a. Se corta una molécula y se deja a la otra pasar por el agujero recién creado (el ADN dañado se repara luego de que se hayan separado las dos moléculas hijas).
- b. Se cortan ambas moléculas y se pegan sus extremos al extremo complementario *de la otra molécula*, eliminando el cruce de esa forma.

¹⁶ Hay que notar que en este caso estamos considerando cada hebra de la molécula del ADN como una curva, y a la molécula entera como un enlace de dos componentes, a diferencia de lo que hicimos en las figuras 2.2:1 y 2.2:2 en las que consideramos a la molécula en sí como una curva, por lo que ¡ahora podemos ver al cromosoma como una estructura anudada que es un nudo en sí mismo!

Delbrück rechazó también estas dos posibilidades, diciendo que la primera “rompe la simetría” presente en la estructura, y la segunda porque une cadenas de polaridad opuesta, lo cual no es químicamente posible.

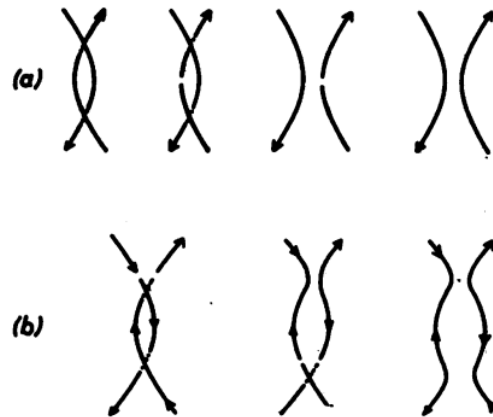


Fig. 2.2:4: Formas en las que se podrían separar dos moléculas de ADN luego del proceso de replicación, cortando y pegando moléculas de ADN para luego tirar lateralmente. Las letras usadas son las mismas que en el texto. Reproducido de Delbrück (1954).

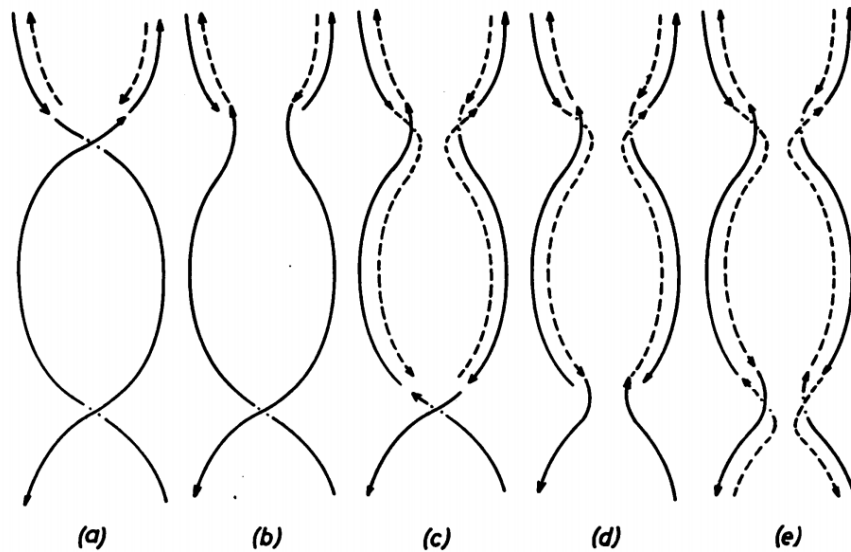


Fig. 2.2:5: (a-e) Secuencia de pasos en la resolución del entrelazamiento de las moléculas de ADN hijas durante la replicación mediante el corte y pegue de hebras de ADN. Las hebras viejas están en línea continua, mientras que las nuevas están en línea punteada. Reproducido de Delbrück (1954).

Por lo tanto, Delbrück concluyó que si existía algún mecanismo para separar las cadenas hijas, el mismo debía actuar *durante la replicación*, y propuso que, de hecho, lo que ocurría era que, durante la replicación (y una vez por cada vuelta de la doble hélice), se cortan ambas hebras viejas, y se *une cada hebra vieja a una hebra nueva* (Fig. 2.2:5). Al terminar la replicación, esto resulta en que cada molécula hija tenga **hebras mixtas**, es decir, que cada hebra tiene segmentos provenientes de una hebra vieja y segmentos de una hebra nueva. Como efecto secundario no menor, se tiene el resultado de que las cadenas sintetizadas de esta forma *no están entrelazadas entre sí*, por lo que nada les impide

separarse. Según Delbrück, incluso cabía la posibilidad de que este tipo de “corte y pegue” de cadenas no requiriese gasto de energía, siendo que una operación es la opuesta de la otra, y que en todo caso la energía de activación sería similar a la necesaria para agregar un nucleótido nuevo a una hebra.

Por supuesto, esta propuesta se podría refutar experimentalmente de forma similar a la propuesta de la replicación semiconservativa mediante experimentos de marcado del ADN, tal como se hizo en el famoso experimento de Meselson y Stahl en 1958, que demostró que la replicación del ADN efectivamente era semiconservativa, y por tanto permitió rechazar también la propuesta de Delbrück (Meselson & Stahl, 1958).

Supercoiling

En la introducción a esta sección mencionamos que el ADN puede considerarse anudado en distintos niveles, pero no aclaramos inmediatamente a qué nos referíamos. Recordamos que un nudo es esencialmente cualquier cuerda cerrada (sin extremos, o en su defecto tan larga que se puede pensar en sus extremos como en “el infinito”), por lo que hablar de nudos en el ADN *requiere que especifiquemos de qué cuerda estamos hablando*. Claramente, en las imágenes del principio de la introducción, la cuerda se corresponde a todo el cromosoma circular, que se observa por microscopía electrónica como una cuerda cerrada. También puede pensarse que cada una de las cadenas que forman la doble hélice del ADN en el modelo de Watson y Crick constituye una cuerda, obteniéndose así que un cromosoma circular puede ser visto también como un **enlace de dos componentes**. Nótese que un cromosoma de apariencia circular, aunque no esté anudado “a gran escala”, *siempre es un enlace no trivial “a pequeña escala”* según el modelo de Watson y Crick.

Aunque estos dos tipos de anudamiento puedan ser tan diferentes, hay que recordar que resultan de observar *la misma molécula* a diferente escala, por lo que no sería extraño pensar que deberían estar interrelacionados. Veremos que, aunque *topológicamente hablando* (es decir, **a menos de una deformación continua**) un cromosoma suele no estar anudado a gran escala y siempre estar anudado a pequeña escala de forma independiente, desde un punto de vista *geométrico* (es decir, **por cómo está realmente posicionado en el espacio**, sin permitir cualquier deformación)¹⁷ existe una relación entre ambos niveles que, de hecho, relaciona propiedades geométricas y topológicas (propias de *ambas escalas*) de la molécula.

Antes de estudiar esta relación, debemos presentar el fenómeno del **superenrollamiento** (*supercoiling*) del ADN. A mediados del siglo XX, durante el estudio de las distintas formas del ADN viral de Poliomavirus (llamadas I y II), se encontró que ambos tipos sedimentan a distintas velocidades, 20S y 16S respectivamente, por lo que el tipo I sedimenta más rápido que el II. El ADN tipo II se obtiene a partir del ADN tipo I (intacto, circular) mediante la adición de **ADNasas**, enzimas que pueden introducir cortes en el esqueleto ribosa-fosfato del ADN, o mediante la adición de **agentes reductores** (con

¹⁷ Estrictamente, estamos hablando por un lado de invariantes topológicos, o sea, propiedades que se mantienen constantes bajo homeomorfismos del ambiente (en el caso de nudos quedan definidos por los movimientos de Reidemeister), y por otro lado de invariantes geométricos, que se mantienen constantes bajo movimientos rígidos (traslaciones y rotaciones) y dilataciones, operaciones que no cambian la “forma” del objeto.

diferentes velocidades de conversión de la forma I a la II, y que se sabe pueden generar cortes en el esqueleto ribosa-fosfato). Originalmente las diferencias en velocidad de sedimentación habían sido explicadas sencillamente, razonando que debido a la acción de estos elementos, se habría linealizado el ADN (introduciendo dos cortes en cadenas opuestas, haciendo que la molécula se “abriera”). Intuitivamente uno espera que una molécula lineal sedimente a mayor velocidad que una molécula circular, debido a que la primera presenta una menor superficie de resistencia frente a un fluido que la segunda¹⁸. Sin embargo, cuando el grupo de Vinograd estudió ambas formas bajo microscopio electrónico de transmisión, observaron que ambas formas del ADN viral eran circulares (Vinograd *et al.*, 1965) (Fig 2.2:6).

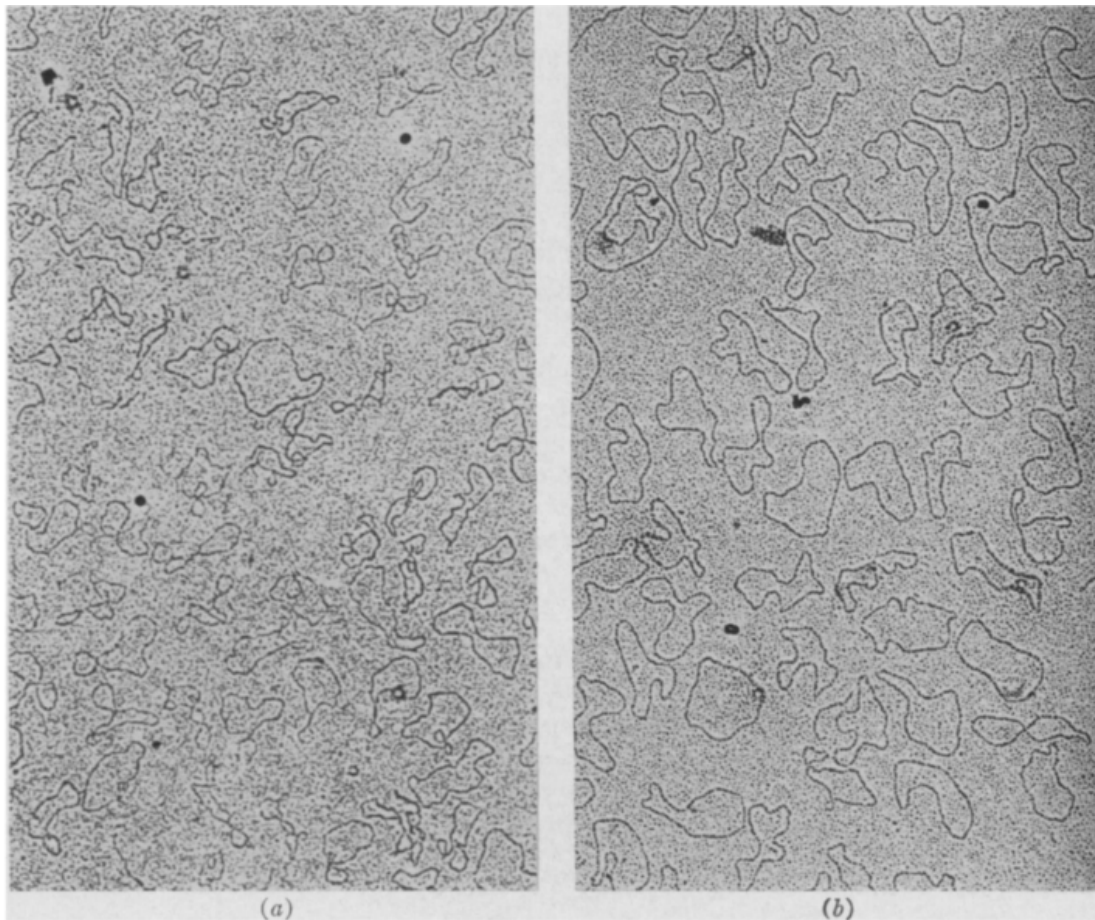


Fig. 2.2:6: Micrografías de ADN de Poliomavirus obtenidas por microscopía electrónica de transmisión. En ambos casos el ADN fue tratado con ADNasa pancreática, y fue separado de la mezcla con reactivos luego de haber ocurrido un cierto porcentaje de conversión entre las formas I y II. (a): ADN luego de 5% de conversión. (b) ADN luego de 95% de conversión. En ambos casos se observan sólo moléculas circulares, y en (a) las mismas suelen estar más enrolladas que en (b). Reproducido de Vinograd *et al.* (1965).

Esto generaba el nuevo problema de explicar cómo dos muestras de moléculas, todas circulares, podían sedimentar a diferentes velocidades. Una posibilidad era que

¹⁸ Técnicamente, una molécula de forma aproximadamente lineal tiene un menor *coeficiente de arrastre* que una molécula aproximadamente circular.

existiera una diferencia de masa, la cual se calculó que debería ser de aproximadamente 20% en caso de que no aumentara la fricción, diferencia que debería haberse perdido por escisión de fragmentos de ADN. Sin embargo, una cantidad tan importante de masa en forma de fragmentos pequeños de ADN no se había detectado nunca en estudios anteriores (Dulbecco & Vogt, 1963), y lo que es más, la densidad de flotación (*buoyant density*) de ambas formas era similar, por lo que una pérdida grande de masa resultaba muy improbable. La otra posibilidad propuesta por los investigadores, y apoyada por evidencia experimental, es que la diferencia entre ambas formas sea *geométrica*, es decir que aunque ambos tipos de moléculas sean esencialmente círculos, *la forma I se encuentre mucho más enrollada sobre sí misma que la forma II, que se encuentra en general desplegada*. Intuitivamente, una molécula muy enrollada es más compacta que una desplegada y por tanto, debería sedimentar con mayor velocidad, como efectivamente ocurre.

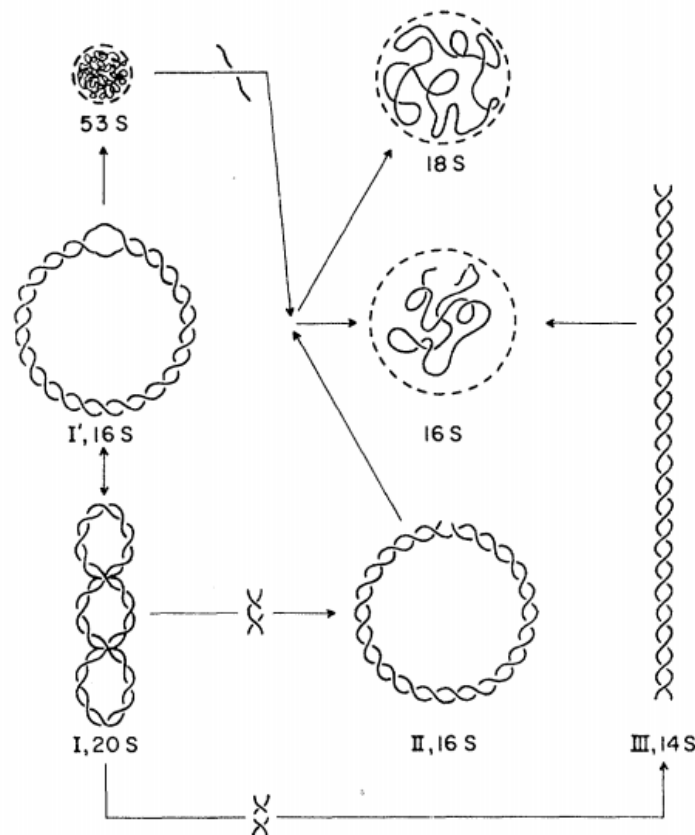


Fig. 2.2:7: Diagrama mostrando las distintas formas posibles del ADN del Poliomavirus, según el modelo planteado en el artículo de Vinograd *et al.* (1965), de donde se reproduce esta figura.

La evidencia para esta propuesta fue múltiple: (a) las micrografías que evidenciaban la forma circular de la forma II parecen mostrar que las moléculas en forma I suelen estar bastante más enrolladas sobre sí mismas que las de la forma II (ocupan menos espacio y presentan varios cruces, visibles como auto-intersecciones), en las que claramente se ve una forma circular desplegada (Fig. 2.2:6); (b) El patrón de sedimentación a diferentes valores de pH de la forma I presenta un mínimo en $\text{pH} \approx 11.6$, a partir del cual se porta igual que el de la forma II, que por su parte nunca decrece a medida que aumenta el pH y se va

desnaturalizando (un comportamiento mucho más normal según lo estudiado hasta aquel momento). La presencia de giros terciarios (enrollamientos) también puede explicar esto: al empezar el proceso de desnaturalización, es esperable que los giros dextrógiros *de la doble hélice* se relajen, lo que debe conllevar la aparición de giros terciarios dextrógiros de la molécula. Si la molécula originalmente presentaba giros terciarios levógiros, estos nuevos giros dextrógiros podrían contrarrestarlos y dejar a la molécula en una conformación desplegada como la de la forma II, lo que disminuiría su velocidad de sedimentación y explicaría este mínimo. Por último, (c) este modelo logra explicar por qué la generación de cortes en una sola cadena daría lugar a una conformación abierta: un corte en una hebra permite que la hélice rote sobre sí misma en este punto, relajando sus giros de forma similar a como lo hace la desnaturalización de la forma I, lo cual (según el razonamiento para (b)) resultaría en una forma abierta (Fig. 2.2:7). Toda esta evidencia permitió demostrar la existencia de lo que más adelante se llamaría **superenrollamiento del ADN**, es decir, la presencia de giros terciarios relativamente estables (por ejemplo, a pH y T constantes) en la disposición espacial del ADN.

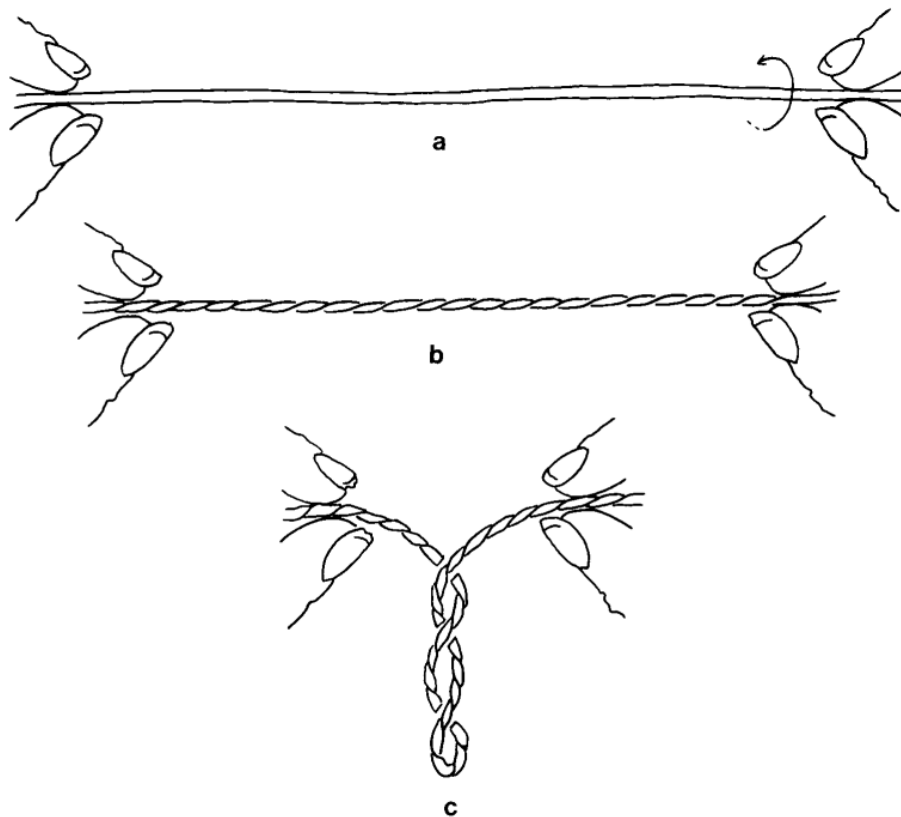


Fig. 2.2:8: Experimento para visualizar el fenómeno de superenrollamiento. Si se empieza a girar una tira de papel en un sentido (a), se obtiene una tira torcida y se siente una cierta tensión (b). Si se relaja esta tensión acercando los extremos de la tira, la misma se enrolla una cierta cantidad de veces en un sentido en función de cuánto (y en que dirección) se la haya torcido (c). Reproducido de Pohl (1980).

Ya en el artículo original, Vinograd *et al.* mencionan que, intuitivamente, una relajación de los giros de la doble hélice debería conllevar la aparición de nuevos giros terciarios para “compensar” alguna cantidad desconocida. Esta intuición no es nada

increíble, y de hecho es bastante fácil de mostrar en la realidad: si se toma una tira de papel (o una bandita elástica cortada, o una cuerda) con las dos manos y se empieza a dar vueltas en un sentido (por ejemplo girando hacia la derecha), se empieza a sentir tensión en la tira. Si uno acerca las manos para aliviar esta tensión, la tira se enrolla sobre sí misma en un cierto sentido (Fig. 2.2:8). Si se hubiese girado hacia la izquierda, la cuerda se habría enrollado en sentido opuesto. También es importante notar que cuanto más se haya torneado la tira originalmente, mayor será el número de vueltas que adoptará la cuerda al relajarla. Los autores de ese artículo lamentan que “es imposible en el presente estimar con confianza el número de giros terciarios” (traducido de Vinograd *et al.*, 1965) indicando que este fenómeno cualitativo e intuitivo no poseía ninguna contraparte cuantitativa para su estudio, cuestión que accidentalmente ya se estaba resolviendo en el campo de la Geometría Diferencial y que luego encontraría aplicaciones en el campo de la biología molecular: la llamada **fórmula de White**.

La fórmula de White: definiciones y aplicaciones

Supongamos que tenemos una cinta (*ribbon*) de cualquier material flexible. Supongamos además que esta cinta es cerrada y que tiene dos bordes distintos (es decir, que no es una banda de Möbius). Entonces podemos identificar distintas estructuras en la misma, de forma similar a como hicimos con los cromosomas: primero que nada tenemos una **cinta**, que es cerrada y tiene un cierto ancho que consideramos continuo; tenemos un **par de curvas** que constituyen los bordes de la cinta, que pueden estar enlazadas y que podemos orientar, y finalmente tenemos una **curva** dada por el eje central de la cinta, que también puede orientarse. Estas tres estructuras son matemáticamente distintas pero está claro que se relacionan entre sí. Podemos definir para cada una de estas estructuras una propiedad importante, que llamaremos **T**, **Lk** y **W**, respectivamente, y que describiremos a continuación para que se puedan entender.

El **número de ligazón**, *linking number* o **Lk** es un *invariante topológico* de cualquier par de curvas orientadas en el espacio que básicamente mide *cuán entrelazadas están entre sí*. De hecho, este invariante es *el mismo* que ya definimos para enlaces en la introducción matemática de este texto, y puede ser fácilmente calculado para cualquier enlace a partir de una proyección cualquiera del mismo como la suma de los signos de todos los cruces que involucran más de un componente, dividido 2. Recordamos la convención de signos para cruces en la Figura 2.2:9. Otra forma equivalente de definirla es que si tomamos un vector **O** yendo en la dirección del trozo de cuerda que cruza por arriba, un vector **U** que apunta en la dirección del trozo de cuerda que va por abajo y **N** un vector normal al dibujo que apunta hacia el lector (apuntando “para afuera de la página”), consideramos el cruce positivo si la terna **OUN** sigue la regla de la mano derecha y negativo en caso contrario. Esto nos permite a su vez asociar el signo de un cruce con el concepto de “derecha” (positivo) o “izquierda” (negativo), lo que será útil más adelante. **Lk** se calcula fácilmente a partir de un diagrama pero puede también calcularse para cualquier par de curvas utilizando una fórmula integral que no necesitamos considerar. Para nuestros propósitos basta entender que **si dos curvas cerradas se entrelazan un gran número de veces, todas en la misma dirección, el valor de Lk será un número entero grande, y no podrá ser modificado sin cortar alguna de las curvas**.

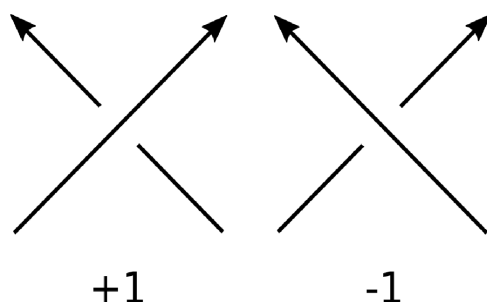


Fig. 2.2:9: Convención de signos para cruces en un diagrama de nudos y enlaces.

El **twist** o **T**, es un *invariante geométrico* de cualquier cinta dispuesta en el espacio, y esencialmente mide cuánto va rotando la cinta mientras la recorremos. Podemos visualizar a la cinta como su **eje central $X(t)$** , así como una **familia continua de vectores $U(t)$ que pasan perpendicularmente por el eje central y que unen los dos bordes**. Visualmente, si uno se para en el eje central y va avanzando (es decir, recorre la curva $X(t)$ yendo desde $t=0$ a $t=1$ continuamente), en cada punto uno podría ver un vector $U(t)$ perpendicular a X y que une un punto de cada curva del borde. Notar que si visualizáramos todos los $U(t)$ al mismo tiempo, veríamos la cinta completa, por lo que estos definen la superficie de la misma. Claramente, es posible que mientras avanzamos por X sin rotar, los vectores $U(t)$ vayan rotando alrededor nuestro (y por tanto de X). Cada “vuelta” se corresponde a una rotación de 2π radianes, por lo que nos gustaría medir cuánto varía el ángulo de U en total mientras recorremos X y dividirlo entre 2π para obtener el número de vueltas. La forma de hacer esto formalmente es la de *integrar la velocidad angular con la que $U(t)$ rota alrededor de $X(t)$* ¹⁹ y dividirlo por 2π , con lo que se logra definir T (por Fuller, en Crick, 1976). Para coincidir con la convención de signos, definimos que una rotación es en sentido positivo si es hacia la derecha. Por ejemplo, una cinta tiene $T = 1$ si en toda su longitud da una vuelta completa de 360° hacia la derecha.

Aunque matemáticamente esta cantidad no es muy difícil de definir, no es fácil de ilustrar. Por ejemplo, aunque *esencialmente* mide el número de veces que una cinta se tuerce sobre sí misma, T no tiene por qué ser un número entero, no se ve afectada por torceduras ni curvas en ningún sentido que no genere una rotación alrededor del eje central (Fig. 2.2:10) y visualizarla suele volverse una tarea relativamente compleja cuando el eje no yace sobre el plano (donde ya *no podemos pensarlo* como “el número de vuelta que la cinta da”). Como ejemplo particular para ayudar a la comprensión, si la cinta consiste en una hélice dextrógira apoyada sobre un cilindro dando N vueltas, se puede calcular que

$$T = N \operatorname{sen}(\alpha)$$

siendo α el ángulo de hélice (*pitch angle*) de la hélice con respecto al eje central del cilindro (Fig. 2.2:11a). Cuando el eje de la hélice *es el eje central del cilindro* y yace en el plano,

¹⁹ Para entender por qué esto es razonable, recordar que para encontrar la distancia total recorrida en un trayecto, se integra la velocidad de dicho trayecto en el tiempo. En este caso, integrar la velocidad angular nos da una medida de cuánto fue la rotación neta (incluyendo el número vueltas y su sentido) en radianes.

como en la figura 2.2:10c, $\alpha \approx \pi/2$ y $T \approx N$, el número de vueltas. En la figura 2.2:11 se presentan varios ejemplos de cintas de distintas formas junto con sus respectivos L_k y T .

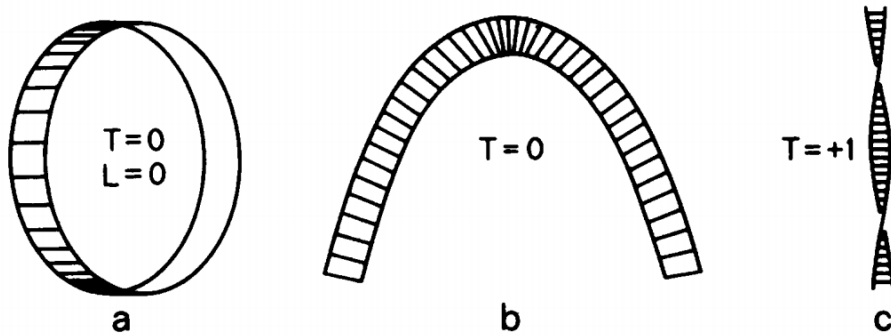


Fig. 2.2:10: Valor del *twist* o T para distintas cintas. (a) Una cinta doblada pero no torneada, cuyo eje central no yace en el plano del papel. (b) Una cinta doblada pero no torneada que yace en el plano del papel. (c) Una cinta torneada pero no doblada, cuyo eje central yace en el plano del papel. Reproducida de Crick (1976)

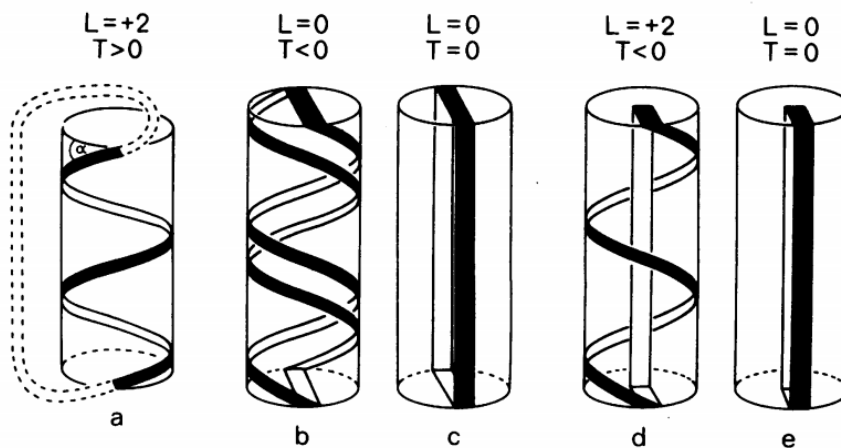


Fig. 2.2:11: Ejemplos de valores de L y T para cintas cortas posicionadas con respecto a un cilindro. Reproducido de Crick (1976).

El **writhe** o W es un *invariante geométrico* de cualquier curva, aún sin estar orientada. Aunque para calcularlo haya que elegir una orientación, el resultado es independiente de la misma y nos da una idea de que tan enrollada está la curva sobre sí misma. El lector atento quizás recuerde que ya definimos una propiedad llamada *writhe* para los nudos, que denominamos Wr . Aunque están relacionadas (y desafortunadamente, llevan el mismo nombre), estas dos cantidades son sutilmente distintas. Para un diagrama de un nudo cualquiera (particularmente, de un solo componente), definimos Wr como la suma de los signos de todos los cruces del mismo, obteniéndose así un número entero que podía ser modificado por movimientos de Reidemeister, por lo que no constituía un invariante topológico. Esta definición depende fuertemente de qué diagrama elijamos, y por

tanto, del ángulo desde el que se mira la curva en el espacio²⁰, por lo que no es una buena propiedad geométrica de una curva. Una cosa que podemos hacer para remediar esto, es considerar el *valor promedio de Wr para una curva visto desde todos los ángulos posibles* (Fuller, 1971; Pohl, 1980). Considerar todos los ángulos posibles es equivalente a posicionar nuestra curva dentro de una esfera de radio 1 (llamada S^2) y a cada punto z de la misma asignarle un valor $Wr(z)$ que se corresponda a la suma de los signos de todos los cruces del diagrama que se obtiene *desde ese punto de vista*²¹ (esta idea volverá a aparecer más adelante, cuando estudiemos los nudos en proteínas). Para calcular este promedio se integra el valor de $Wr(z)$ en toda la esfera y se normaliza dividiendo por el área total. Como la superficie de la esfera de radio 1 es 4π , la fórmula final para una curva es:

$$W = \frac{1}{4\pi} \int_{z \in S^2} Wr(z) dS$$

De esta forma, así como Wr nos indicaba cuán enrollada está una curva sobre sí misma desde un punto de vista, el valor de W nos da una medida de cuán enrollada está una curva independientemente de desde donde se la mire. Debemos notar también que, aunque Wr es siempre un número entero, W puede ser un número real cualquiera. Sin embargo, W sigue reteniendo algunas propiedades de Wr : si W tiene un valor absoluto alto, esto implica que la curva está muy enrollada sobre sí misma, y si este valor es positivo (negativo), significa que se enrolla en general hacia la derecha (izquierda).

Para evitar aún más confusión, y siguiendo el ejemplo de Crick (1976), resumimos las propiedades estos Lk , T y W en la Tabla 1.

Tabla 1

	Lk (<i>linking number</i>)	T (<i>twist</i>)	W (<i>writhe</i>)
Definido para:	Un par de curvas cerradas	Una cinta	Una curva cerrada
Propiedad de tipo:	topológica	geométrica	geométrica
Valor:	entero	real	real
Interpretación conceptual:	Cuán entrelazadas están dos curvas cerradas	Cuántas veces se tuerce una cinta sobre su eje	Cuánto se enrolla una curva sobre sí misma

²⁰ Notar que, aunque Lk también lo calculamos a partir de un diagrama, al ser un invariante del nudo, su valor es igual sin importar *cuál* diagrama (o punto de vista) elijamos.

²¹ Estrictamente hablando, una curva desde *cualquier* punto de vista, no siempre presenta un diagrama de nudo como lo definimos al principio de este texto. Sin embargo, siempre se puede perturbar un poco el “diagrama” obtenido para así convertirlo en un diagrama de nudo a partir del cual calcular Wr , sin modificar las propiedades geométricas de la curva.

En su artículo de 1969, White demostró una elegante fórmula que relaciona todas estas cantidades de forma simple, para cualquier cinta orientada en el espacio, con sus bordes y su eje central orientados acordemente, y siguiendo la convención de signos usada hasta aquí:

$$Lk = T + W \quad (1)$$

Esta fórmula tiene varias consecuencias importantes. Primero que nada, aunque T y W pueden ser cualquier número real, su suma **debe ser** un número entero, pues así lo es Lk . En segundo lugar, esta fórmula muestra que tanto T como W , que son propiedades geométricas, están restringidas por Lk , que es un invariante topológico, y que por tanto no puede ser modificado sin introducir cortes. Tercero, ¡es fácilmente aplicable a nuestro estudio del ADN, y particularmente del *supercoiling*! Si consideramos una molécula circular de ADN, podemos definir un modelo en forma de cinta tal que

1. **su eje central es el eje central de la doble hélice**
2. **la cinta está definida por los ejes de rotación pseudobinarios (*pseudodyad axes*)** y es en todo momento perpendicular al eje y a los surcos del ADN.

Este modelo no es muy intuitivo, pues uno intuitivamente preferiría tomar como cinta aquella cuyos bordes son las cadenas ribosa-fosfato y cuyo eje es el surco menor del ADN, pero esta definición nos permite tener un modelo que **refleja todas las propiedades de la molécula que nos interesan** (dando una vuelta exactamente cuando la doble hélice da una vuelta), **tiene un eje central fácilmente visualizable** (el eje central de la doble hélice en sí) y **respeto las simetrías de la molécula**. Es importante para el lector tener bien presente a *qué cinta nos estamos refiriendo cuando estudiamos el ADN*, y tener claro *cómo se visualizan sus propiedades Lk , T y W* . Por esto, dejamos explicitada la cinta del modelo en la figura 2.2:12.

De la definición de este modelo podemos ver que cada componente del borde de la cinta está siguiendo siempre la trayectoria de uno de los dos surcos (mayor y menor), por lo que Lk representará el *número total de vueltas de la doble hélice sobre su eje central*. Según el modelo de Watson y Crick, como cada vuelta tiene una longitud de aproximadamente 10 nucleótidos, la cinta asociada a una molécula relajada de ADN circular con 5000 pares de bases tendrá $Lk = +500$ (el signo viene dado porque la doble hélice es dextrógira). T viene dado como una medida de *cuántas veces la cinta se “torna” sobre sí misma*, como la consideramos en su definición. Recordamos que si el eje de una cinta torneada yace sobre el plano, su T vale igual al número de vueltas que da (en este caso además, por la ecuación (1), $Lk = T$, y es por eso que esta definición coincide con la intuición detrás de Lk). W es el más claro, pues representa *cuántas veces el eje central de la doble hélice se enrolla sobre sí mismo*, lo que coincide precisamente con nuestra intuición del superenrollamiento (una cinta $W = 0$ está desplegada o relajada, mientras que un W muy lejano de 0 implica mucho superenrollamiento). Para ilustrar las diferencias entre estas cantidades en diferentes situaciones, incluimos un par de ejemplos en la figura 2.2:13.

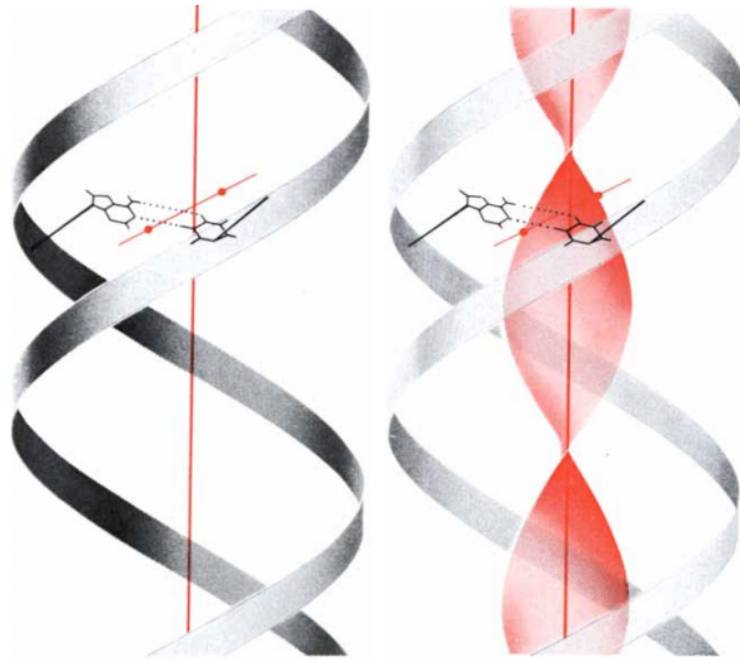


Fig. 2.2:12: Modelo para el estudio del ADN superenrollado, definido haciendo uso de dos características estructurales de la doble hélice. (Izquierda) El eje central de la hélice (línea roja gruesa) es la curva alrededor de la que se enrollan las cadenas ribosa-fosfato y los ejes pseudobinarios (línea roja con 2 puntos) son aquellos ejes de simetría binaria dados por el apareamiento de las pares de bases mediante puentes de hidrógeno (aquí se muestra un par, así como el eje que define). Por tanto, estos ejes son perpendiculares tanto al eje central como a los surcos de la hélice. (Derecha) El modelo construido a partir de estas estructuras es una cinta de ancho arbitrariamente chico cuyo eje central es el eje central de la doble hélice y cuya superficie yace siempre sobre el eje pseudobinario (es decir, perpendicular al eje del par de bases y por tanto, al surco menor). Esta cinta se dobla igual que el eje de la molécula original, y da vueltas a medida que las dos cadenas dan vueltas entre sí. Reproducido de Bauer *et al.* (1980).

Si volvemos a la intuición de Vinograd y sus colaboradores, podemos entender y predecir cuantitativamente el comportamiento de las distintas formas del ADN de Poliomavirus. En el ADN tipo I, la molécula tiene un cierto valor de Lk y un cierto valor de T y W . Cuando se introduce un corte en *una* de las cadenas, Lk puede variar libremente (y de hecho, deja de estar definido estrictamente hablando, pues una de las curvas ya no está cerrada) y se liberan las restricciones que relacionan W y T . Debido a esto, la hélice se tiende a relajar, lo que disminuye T y permite que W vaya a 0, con lo que se llega a una conformación abierta independientemente de su conformación inicial. Cuando se empieza a desnaturalizar el ADN tipo I ocurre algo muy parecido: se empieza a relajar la doble hélice por lo que disminuye T , pero como la molécula sigue intacta, Lk permanece constante y W debe aumentar para contrarrestar el descenso de T . Como vimos, aumentar W equivale a introducir pliegues de sentido positivo, por lo que la molécula se enrolla hacia la derecha. La única forma de que esto produzca una molécula similar a la forma II es que, originalmente, la misma hubiese tenido un W negativo, con lo cual este cambio podría finalmente llevarlo a

$W = 0$. De esto se desprende que naturalmente el ADN está superenrollado negativamente (*negatively supercoiled*), es decir que usualmente $W < 0$ ²².

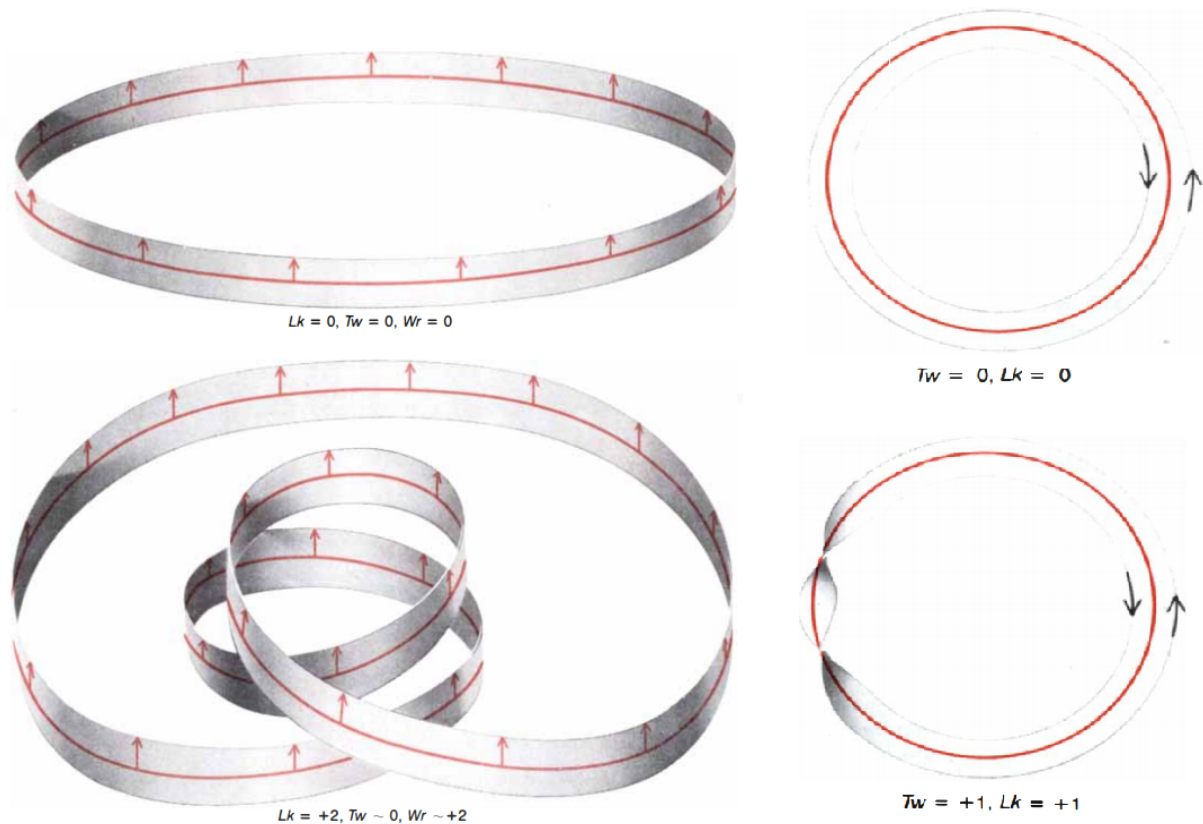


Fig. 2.2:13: Ejemplos de diferentes cintas presentando distintos valores de Lk , T (aquí Tw) y W (aquí Wr). (izquierda) Dos ejemplos de cintas con $T = 0$, demostrando la diferencia entre Lk y T cuando $W \neq 0$. Se muestra el eje central (en rojo, sin flechas) así como los distintos vectores perpendiculares usados para definir T . (Derecha) Dos ejemplos de cintas relajadas en el plano, lo que implica $W = 0$ y por tanto $Lk = T$. Por convención biológica, las curvas del borde se orientan antiparalelas entre sí, distinto a como lo definimos nosotros, pero la convención de signo fue modificada apropiadamente para que los resultados sean compatibles con los nuestros (es decir, los signos que aparecen en esta figura son los que obtendríamos según nuestra convención si los bordes se hubieran orientado paralelos entre sí). Reproducido de Bauer *et al.* (1980).

Posteriormente, Bauer y Vinograd estudiaron los efectos del uso ciertas sustancias usada para teñir el ADN llamadas tinciones intercalantes (*intercalating dyes*, eg: bromuro de etidio) en una serie de artículos (Bauer & Vinograd, 1968;1970) utilizando la fórmula de White. El nombre de estas tinciones viene dado por el hecho de que las moléculas de dichas sustancias se intercalan entre los pares de bases del ADN (y por ello permiten visualizarlo). Claramente, la intrusión de varios objetos en una hélice donde antes no los había conlleva un desenroscamiento (*untwisting*) local del ADN, lo cual disminuye el valor

²² Alternativamente, se suele decir que la molécula tiene una deficiencia en su *linking number* (Lk) con respecto a su forma relajada. Como Lk es menor de lo que sería en una forma relajada, esto implica que tienda a presentar superenrollamiento negativo naturalmente.

de T^{23} . A partir de esto, podemos predecir que cuanto más tinciones intercalantes se agreguen al ADN, menor será su T y por tanto, mayor será su W (pues Lk permanece constante). Usualmente el ADN tiene superenrollamiento negativo en su estado nativo, por lo que la adición de bromuro de etidio (por ejemplo) debería disminuir el superenrollamiento, llevándolo desde $W < 0$ hasta $W \approx 0$, desplegando la molécula, lo cual es comprobable experimentalmente debido a una *disminución* en la velocidad de sedimentación. Si se sigue agregando esta sustancia, sin embargo, W continúa aumentando hasta que $W > 0$ y la molécula presenta superenrollamiento positivo (lo cual se puede ver, una vez más, por un *aumento* en su velocidad de sedimentación) (Fig. 2.2:14). Estos cambios conformacionales pueden comprobarse además por microscopía electrónica, como hicieron Vinograd *et al.* (1965).

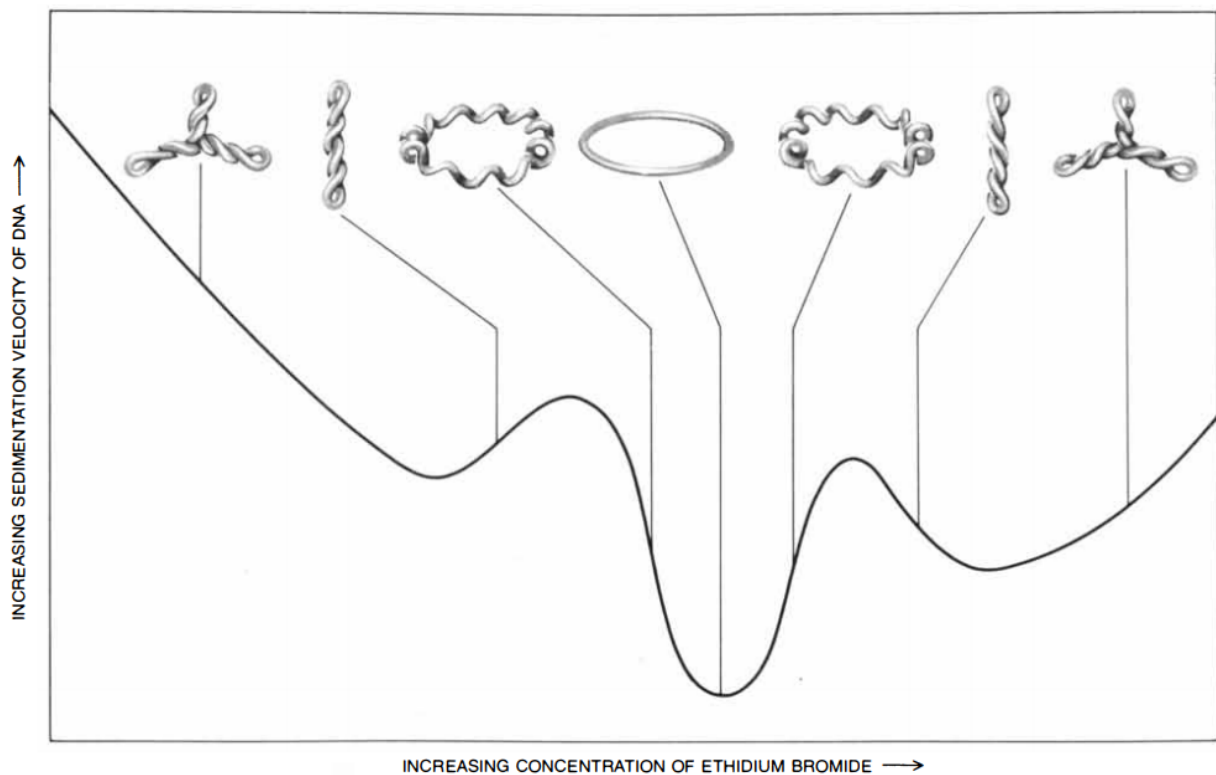


Fig. 2.2:14: Cambios conformacionales con repercusiones en la velocidad de sedimentación del ADN al aumentar la concentración de bromuro de etidio (una tinción intercalante), pasando desde una forma superenrollada negativamente a una relajada y finalmente a una conformación superenrollada en sentido positivo. Eje horizontal: Concentración de bromuro de etidio. Eje vertical: Velocidad de sedimentación del ADN. Los diagramas representan la conformación del ADN esperada en cada caso. Reproducido de Bauer *et al.* (1980).

Hasta el momento solo hemos mencionado consecuencias cualitativas de esta fórmula, cosa que ya podíamos hacer antes de tenerla. Para poder aplicar esta fórmula

²³ Si lo vemos según nuestro modelo de cinta, tener que acomodar más moléculas entre los pares de bases hace que, localmente, cada vuelta se estire y deba “ocupar un mayor largo de cadena”. Debido a que la cadena tiene un largo constante, esto debe conllevar una disminución en el número de vueltas. Visualizar esto en una cinta cuyo eje esté en el plano (como en la Fig. 2.2:13 (derecha inferior)) permite ver como T debería disminuir en este caso.

verdaderamente, precisamos una forma de cuantificar al menos uno de estos valores, ya sea L_k , T y/o W . Este privilegio lo tiene W , que por sus implicaciones para las propiedades hidrodinámicas del ADN, pudo ser medido directamente a raíz de los estudios del ADN por electroforesis, a diferencia de L_k y T .

Ya vimos qué ocurre cuando se trata una muestra de ADN con una **endonucleasa** como lo son las ADNasas de tipo I: una de las cadenas del ADN se corta, y es libre de rotar alrededor de la otra, liberando tensión. En esta situación, como señalamos antes, **no se cumple la fórmula de White** pues ya no podemos definir L_k . Sin embargo, ¿qué pasa si después de esta modificación se trata a la misma muestra usando proteínas que *cierren cortes en las cadenas* (como la enzima **ligasa**)? En ese caso se vuelve a obtener una cadena cerrada, y podemos volver a aplicar la fórmula de White. Pero ¿cuál será el valor de L_k para las nuevas cadenas cerradas? Como el corte por endonucleasas permitió que una cadena rotara libremente sobre la otra, uno podría pensar que $L_k = 0$. Sin embargo, a menos que se haya buscado desnaturalizar el ADN, las interacciones de los pares de bases mantienen unidas ambas cadenas, y lo hacen formando una espiral dextrógira, por lo que esperamos $L_k > 0$. Nuestra intuición es correcta en indicar que se espera que hayan ocurrido cambios en L_k (introducir cortes y cerrarlos es, de hecho, la única forma de hacerlo). Debemos recordar que cada molécula de ADN está sometida a los efectos de la agitación térmica²⁴, por lo que no esperamos ningún tipo de respuesta determinística a esta pregunta: si todos los cortes se cierran aproximadamente al mismo tiempo, habrá moléculas con distintos valores de L_k , por lo que esperamos encontrar una distribución de valores de L_k (una distribución discreta, porque L_k es siempre entero).

¿Cómo podríamos observar esta distribución? Cambios discretos en L_k deberían conllevar *cambios discretos en W* (suponiendo que la variación de los valores de T es tan rápida que los mismos son indistinguibles a lo largo de un período relativamente largo), lo que equivale a cambios en el grado de superenrollamiento, y por tanto, a *cambios discretos en las propiedades hidrodinámicas de las moléculas*. Hasta ahora sólo hemos considerado estos cambios por su efecto en la velocidad de sedimentación, pero la misma idea puede aplicarse a su velocidad de movimiento durante una **corrida electroforética**, como fue observado por Keller y Wendel (1974). El ADN es un ácido moderadamente fuerte, por lo que a un pH casi neutro (en particular a pH = 8.0) las moléculas están cargadas negativamente. Si se las somete a un campo eléctrico, las mismas migran hacia el polo positivo. En una electroforesis en gel se hace precisamente esto, colocando muestras de ADN en un extremo de un gel rectangular, aplicando un campo eléctrico uniforme y permitiendo que las moléculas migren. Finalmente, se puede eliminar el campo eléctrico y teñir el ADN usando tinciones intercalantes (eg: bromuro de etidio), donde se verá cómo distintas moléculas migraron distinta distancias, debido a que migraron con distinta velocidad.

Al realizar una electroforesis en gel de moléculas de ADN circulares de tamaño similar, previamente tratadas con DNAsas y ligasas, se produce un patrón de bandas discretas a distancias constantes (Fig. 2.2:15). Según nuestro razonamiento anterior, las diferentes bandas deben venir dadas por diferencias discretas en compactación, y por tanto,

²⁴ Particularmente, movimiento browniano y la agitación térmica de la molécula en sí.

diferencias discretas en W . Matemáticamente se interpreta que cada banda se corresponde a un conjunto de moléculas de ADN con un cierto W promedio, y que dicho *writhe* difiere del de las otras bandas en algún múltiplo de un número entero n . Tal como razonamos anteriormente, típicamente se asume que $n = 1$ y que este cambio refleja **exclusivamente** cambios en el valor de Lk (y no de T), que por su naturaleza siempre presenta valores enteros (y por tanto, diferencias discretas). Bajo esta interpretación, es claro que las diferentes bandas representan distintos posibles valores de Lk para moléculas de ADN que pueden considerarse químicamente idénticas (Depew & Wang, 1975). Más adelante explicaremos cómo el realizar este tipo de estudios en moléculas con distintas longitudes permite calcular diferencias de hasta 0.1 en el valor de W , lo que permite obtener medidas cuantitativas bastante exactas para el estudio del superenrollamiento.

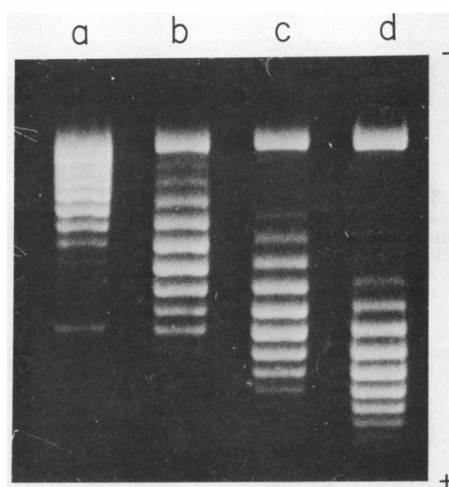


Fig. 2.2:15: Patrón de bandeo obtenido tras una electroforesis en gel de muestras de ADN circular que fueron tratadas con ADNasa tipo I y luego ligasas. El patrón de bandeo discreto se interpreta como una distribución de valores de Lk , tal que las bandas contiguas exhiban una diferencia de ± 1 . Las diferentes columnas se corresponden a las distintas temperaturas a las que se realizó la reacción de ligasa (a-d: 37, 29, 21, 14°C respectivamente). Los signos de + y - indican la polaridad del campo eléctrico utilizado en la corrida. Reproducido de Depew y Wang (1975).

Depew y Wang, además, observaron que *esta distribución se correspondía aproximadamente con una distribución normal centrada en un valor no entero, pero cercano al valor de Lk correspondiente a la banda de mayor intensidad* (donde hay un mayor número de ADN en ese estado) y que existía una dependencia entre la media de esta distribución (no así su forma) y la temperatura a la que se realizó el cierre de las cadenas por acción de la ligasa. Esta dependencia se debe a que el ángulo de rotación promedio de la doble hélice varía según la temperatura, una **mayor temperatura tiende a relajar la doble hélice**²⁵, por lo que si se cierra una molécula de ADN a mayor temperatura, su Lk tiende a ser menor. Esto es visible en las columnas c y d del gel en la figura 2.2:15, correspondientes a 21°C y 14°C, respectivamente. Allí se observa que *la distribución a menor temperatura es igual a la de mayor temperatura, aunque trasladada aproximadamente 5 bandas* (la forma de la

²⁵ En el caso extremo de la desnaturalización, someter el ADN a temperaturas suficientemente altas hace que se pierdan las interacciones entre ambas cadenas y se tiendan a separar (por supuesto, si son circulares y $Lk \neq 0$, esto es imposible).

distribución es idéntica, pero el promedio de Lk es mayor, por lo que W es mayor, y por tanto el ADN se desplaza más).

El fenómeno del superenrollamiento juega un papel importante para la función biológica del ADN (Wang, 1982), permitiendo su compactación, así como la regulación de la expresión de algunos genes. Es necesario en general relajar la doble hélice (por lo menos localmente) para tener acceso a la información genética contenida en ella, por lo que el estado topológico del ADN puede ser de gran importancia a la hora de regular qué información se está expresando en un momento dado (Baranello *et al.*, 2012). Vale mencionar que este tipo de cambios topológicos del ADN *no tienen por qué darse a raíz del tratamiento con ADNasas y ligasas*, aunque estos fueron los primeros métodos descubiertos para este proceso (a finales de los 60). Ciertamente, modificar las propiedades topológicas del ADN requiere el corte y posterior unión de las cadenas del esqueleto ribosa-fosfato, pero esta combinación de enzimas no es la encargada de llevar a cabo estas transformaciones, si no que *in vivo*, esta tarea queda a cargo de las **topoisomerasas**.

Topoisomerasas I

A principios de la década de 1970, James C. Wang logró purificar una proteína de la bacteria *Escherichia coli* a la que designó “**proteína ω** ”, y que poseía una propiedad particular: al incubar ADN superenrollado negativamente junto con ω (y en ausencia de fuentes de energía, como ATP), se observaba una reducción notable en el número de giros terciarios, corroborado por estudios de sedimentación, así como por micrografía electrónica. Es decir que ω tenía el efecto de relajar moléculas de ADN con deficiencias en su *linking number*²⁶ (Wang, 1971), disminuyendo efectivamente el valor absoluto de W. Este efecto no se observó al tratarse moléculas de ADN relajadas, o incluso superenrolladas positivamente. Más aún, el ADN tratado con esta proteína no presentaba más diferencias con respecto al ADN sin tratar, teniendo ambos tipos la misma densidad de flotación (lo que permite descartar modificaciones químicas permanentes) y el mismo espectro de absorción (indicando que no se modificaron los ángulos de rotación de la doble hélice, lo que alteraría el valor de T). Sabiendo que T no era alterado, la única explicación posible para la alteración observada en W sería que la **acción de la proteína ω fuera la de aumentar el valor de Lk**, introduciendo un corte en el esqueleto ribosa-fosfato, permitiendo que una hebra girase alrededor de la otra y luego cerrando dicho corte, aunque el mecanismo no estuviese claro en un principio. Por permitir que una hebra girara (*swivel*) alrededor de la otra, también se le denominó a esta proteína como *swivela* (aunque ese nombre no se use más).

A dos moléculas diferentes pero de igual composición química se les llama isómeros. Si estas diferencias son solamente topológicas (como lo es una diferencia en Lk), se les llama topoisómeros. Es por eso que más adelante, cuando se fueron descubriendo varias proteínas en casi todas las especies que, como ω , convertían moléculas de ADN en algún topoisómero, se les dió el original nombre de **topoisomerasas**. Por ser las primeras en ser

²⁶ Deberíamos aclarar que en aquel momento se observó que la proteína ω , aunque relajara las moléculas de ADN, no las dejaba completamente relajadas, sino que solamente reducía en gran medida el número de giros terciarios negativos presentes.

descubiertas, a las topoisomerasas con actividad similar a la proteína ω se las llamó **topoisomerasas de tipo I**.

Durante la década posterior a la publicación del artículo de Wang en 1971, en una serie de artículos se demostró que, efectivamente, la proteína ω producía cortes en una hebra del esqueleto del ADN, y finalmente se pudo comprobar que esta enzima formaba un complejo junto con el ADN, manteniéndose unida covalentemente al extremo 5' producido por dicho corte (Depew *et al.*, 1978). De esta forma, se obtuvo buena evidencia para un mecanismo propuesto por Wang: que la proteína cortaba una hebra, se unía covalentemente a uno de sus extremos *de forma reversible*, permitía el giro de una hebra con respecto a la otra y luego se separaba del ADN, volviendo a unir la hebra *sin haber gastado energía* (Wang, 1971). Aunque el mecanismo de las topoisomerasas I no pudo ser aclarado hasta varios años más tarde (Wang, 1982; Bugreev & Nevinskt, 2009), esta evidencia permitía explicar otras observaciones realizadas con respecto a la proteína ω , por ejemplo que **las cadenas cerradas simples de ADN (una sola hebra) cultivadas con ω terminaban anudadas** (Liu *et al.*, 1976).

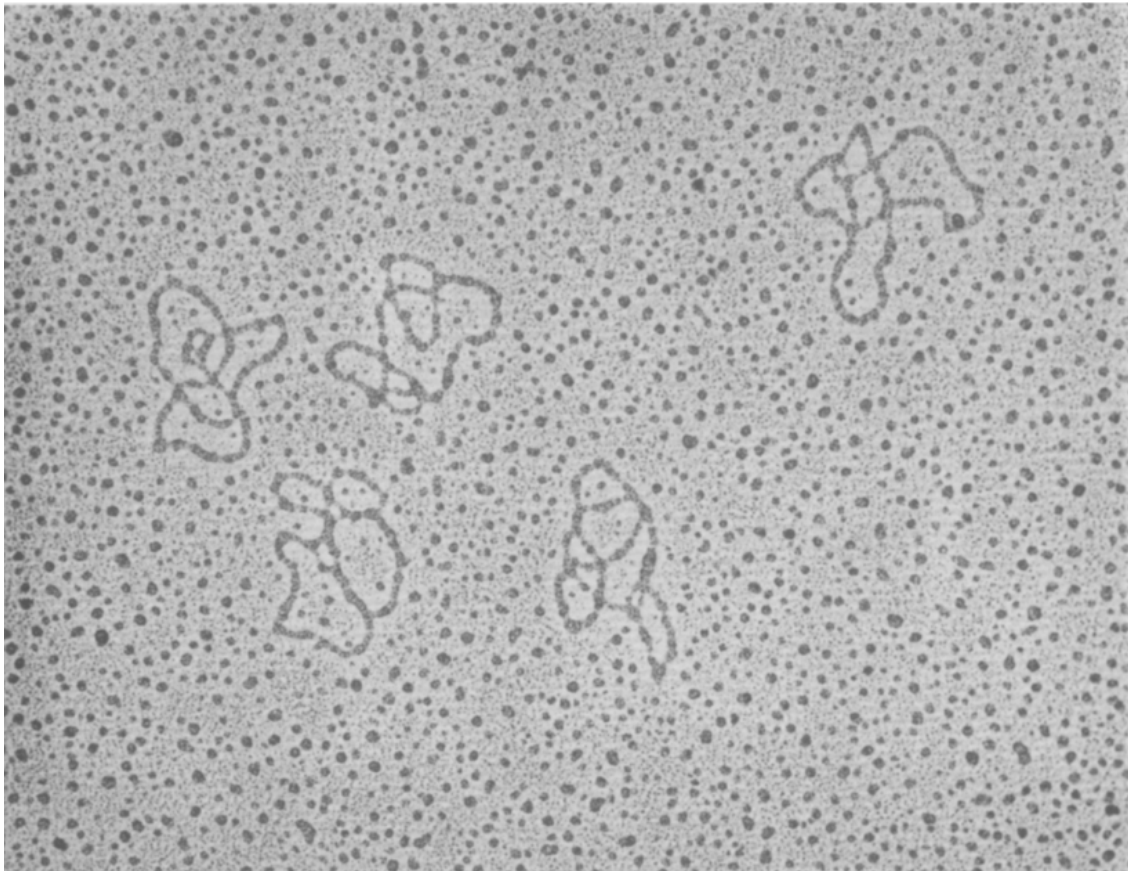


Fig. 2.2:16: Moléculas cerradas de ADN simple cadena incubadas con un extracto de proteína ω de *E.coli* en condiciones alcalinas (iguales a las usadas para estudiar su sedimentación), observada por microscopía electrónica de barrido. En estas mismas condiciones, las moléculas no tratadas suelen no presentar autointersecciones. Obsérvese que las cadenas se parecen a moléculas de doble hebra superenrolladas, pero en este caso, debido a la ausencia de una segunda cadena, no podemos justificarlo como ya lo hemos hecho. Reproducido de Liu *et al.* (1976).

A mitades de los 70's se empezó a observar un nuevo tipo de estructura topológica en el ADN, al realizar estudios sobre *moléculas de ADN de cadena simple*, como aquellas propias de ciertos virus de bacterias (*bacteriófagos*, o simplemente, *fagos*). Liu, Depew y Wang observaron que al ser tratado el ADN del fago fd de *E. coli* (una cadena de ADN simple y cerrada), con la proteína ω de *E. coli*, se obtenía un conjunto de moléculas que sedimentaba de 1.2 a 1.5 veces más rápido que la forma circular original en un medio alcalino (y, por supuesto, bastante más rápido que cualquier forma lineal abierta), indicando que estas moléculas se habían compactado, análogamente a como se venía observando en ADN de doble cadena. La unión de proteínas sostenida en el tiempo podría explicar la compactación, pero esto implicaría que esta diferencia en la sedimentación se mantendría en un medio neutro, mientras que esto no es lo que ocurre (en un medio neutro tanto las formas originales como las tratadas sedimentan igual). Que esta diferencia se mantuviese luego de la eliminación general de proteínas usando fenol y agentes digestivos, permitió demostrar que este no era el caso. Finalmente, la observación bajo microscopio electrónico de barrido permitió observar un gran número de “giros terciarios”, similar a como se observa el ADN superenrollado (Fig. 2.2:16).

Sería fácil descartar esta peculiaridad como un fenómeno ya estudiado y decir que, simplemente, “estas moléculas están superenrolladas”, pero esto *no tiene sentido de acuerdo a nuestras explicaciones anteriores*. El fenómeno del superenrollamiento se daba como una manifestación geométrica ($W \neq 0$) de una restricción topológica (Lk) propia de la existencia de **dos cadenas independientes de ADN**, restricción que está claramente ausente en este caso. De hecho, esperaríamos que las moléculas de ADN de cadena simple pudieran enrollarse y desenrollarse libremente, y de hecho se observa que las moléculas sin tratar aparecen como círculos abiertos (o con muy pocos cruces) bajo el microscopio electrónico de barrido en condiciones alcalinas. Pero entonces, ¿tiene que existir alguna restricción topológica!, de lo contrario no se observarían estas conformaciones en un polímero tan libre. Todo esto parecía apuntar a que estas moléculas de sedimentación rápida constituían un nuevo tipo de conformación espacial: **estaban anudadas**. La acción de estas enzimas es la de tomar una hebra, cortarla, rotarla alrededor de otra y finalmente volver a unirla, lo cual solo sirve para cambiar Lk en ADN de doble hebra, pero en ADN de simple cadena, una acción de este tipo que involucrase a dos trozos de la misma cadena espacialmente cercanos (eg: por compatibilidad de su secuencias) llevaría al “entrelazamiento” de una misma cadena, resultando en un nudo, especialmente si la molécula ya se encuentra compactada de alguna forma (Fig. 2.2:17)

Aunque este razonamiento pueda sonar convincente, la evidencia presentada hasta ahora no es completamente conclusiva, y efectivamente, los aparentes nudos en las cadenas simples vistas al microscopio electrónico de barrido *podrían* (aunque improbablemente) ser simplemente cadenas enrolladas, pues solo podemos distinguir *dónde están los cruces*, pero no *qué sección cruza sobre la otra*. Por suerte, el desarrollo de nuevas técnicas durante la década de 1980 permitió una mayor resolución de los puntos de cruce, confirmando sin dejar lugar a duda la existencia de nudos en la estructura a gran escala de las moléculas de ADN (Fig. 2.2:2)(Krasnow *et al.*, 1983)²⁷.

²⁷ Esta técnicas (recubrimiento con proteína RecA de *E. coli*, en particular) se plantearon para el estudio de nudos en ADN *de doble cadena*, donde era aún más difícil distinguir superenrollamiento de

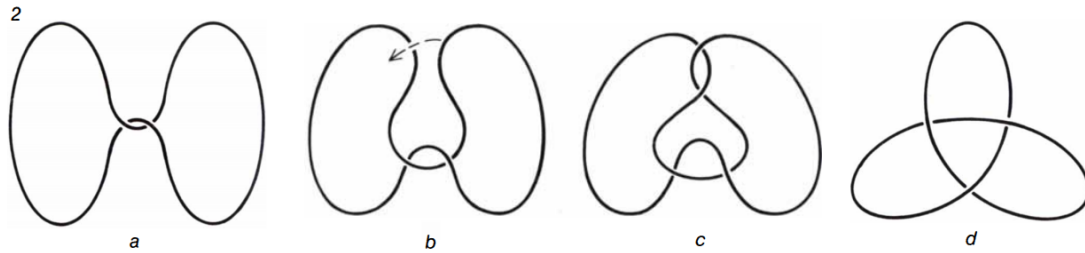


Fig. 2.2:17: Diagrama ilustrando cómo las topoisomerasas tipo I pueden anudar moléculas de ADN de cadena simple. Las figuras (a-d) forman una secuencia temporal. (a) La cadena de ADN, compactada en el espacio. (b) Una topoisomerasa de tipo I introduce un corte en una región de la cadena y la cruza sobre otra región cercana en el espacio. (c) Una vez reparado el corte, la molécula se encuentra anudada. Las cadenas en (c) y (d) representan el mismo nudo, es decir que son cadenas topológicamente equivalentes. Reproducido de Wang (1982).

En un trabajo con tantos nudos, vale la pena tomarse un tiempo para diferenciar **a qué nos referimos con los distintos nudos** que estamos describiendo. En particular, hasta ahora hemos visto dos tipos de nudos: un nudo “microscópico” que *es propio de la estructura del ADN doble cadena* y un nudo “macroscópico” que ocurre *por acción de enzimas sobre cadenas simples*. En el primer caso, el nudo es un enlace de dos componentes y presenta un gran número de intersecciones (de cientos a millones), mientras que en el segundo caso el nudo tiene solo un componente y suele ser relativamente simple, presentando unos pocos cruces (Figs. 2.2:1, 2.2:2, 2.2:16).

Cómo ya se dijo antes, aunque los nudos “microscópicos” se hayan conocido desde la publicación del modelo de la doble hélice y son totalmente ubicuos en la naturaleza, los nudos “macroscópicos” son mucho más escasos en la naturaleza. A pesar de esto, desde los 70s se han observado nudos de este tipo en el ADN de múltiples especies a lo largo de toda la escala evolutiva, incluyendo bacteriófagos (Liu et al., 1976, 1981; Krasnow et al., 1983), virus (Menissier et al., 1983), bacterias (Shishido et al., 1987) y recientemente en eucariotas (Valdés et al., 2017). Se ha mostrado además que, en el caso particular de los bacteriófagos icosaédricos con ADN de doble hebra, los nudos en el ADN dan información sobre la conformación global que adopta el material genético viral dentro de la cápside (Arsuaga et al., 2005).

Durante la década del 70, ya conociéndose la existencia de moléculas de ADN de gran longitud e incluso circulares, habiéndose confirmado que la replicación del ADN es semiconservativa y se sabía que el resultado final de la replicación eran dos moléculas *no enlazadas*, existía una teoría que parecía resolver el problema de separación de las moléculas hijas. Como el problema de la separación de las moléculas hijas era puramente una cuestión del *linking number* (dos curvas solo pueden separarse si $Lk = 0$, aunque el recíproco no siempre es cierto) y sabiendo que las topoisomerasas tipo I producían cambios en Lk , era razonable pensar que esta enzima fuera parte de la maquinaria de replicación del

anudación. Los nudos en el ADN de doble cadena pueden generarse de varias formas, entre ellas quizás la más sorpresiva sea a partir de moléculas del ADN que presentan pequeños cortes mediante el uso de proteína ω , que por un tiempo se pensó que solo servía para relajar ADN doble cadena (Dean et al., 1985).

ADN, posiblemente separando las hebras de la molécula madre antes de que se sinteticen las nuevas hebras, logrando que las moléculas hijas, una vez sintetizadas, se encuentren separadas. Esta teoría fue denominada “**teoría de las topoisomerasas**” (llamada “*swivelase theory*”, por el nombre dado a la proteína ω) por Pohl (1980) y aparentaba resolver todos los problemas topológicos presentes en el modelo de Watson y Crick.

El (nuevo) problema de la doble hélice

Sin embargo, esta explicación no es suficiente si consideramos que el *linking number* es una **propiedad global** de la molécula mientras que la actividad de la topoisomerasa es necesariamente **local**. Dicho de otra forma: si el rol de la topoisomerasa es llevar Lk desde su valor inicial hasta 0, ¿cómo “sabe” cuando tiene que parar? Hay que notar que, básicamente, la acción de la enzima sería la de “disminuir Lk por un cierto valor”, por lo que su acción indiscriminada eventualmente llevaría a que las cadenas estuvieran entrecruzadas de nuevo, pero ¡girando en sentido contrario! (con un Lk muy negativo) (Pohl & Roberts, 1978). Según una observación de Wang, aún si la actividad de esta enzima es la de llevar Lk a 0, debería observarse un problema entrópico: al final de la acción de la topoisomerasa, debería observarse una distribución de valores de Lk, no todos 0, lo cual contradice el hecho de que **es necesario que siempre Lk sea 0 al final de la replicación**.

Debido a estos problemas topológicos, durante la década de 1970 fueron propuestas varias estructuras alternativas a la de la doble hélice (Crick *et al.*, 1979) que trataban de resolverlos. Se propusieron algunas estructuras en que las dos hebras no estuvieran entrelazadas entre sí, pero estas son fácilmente descartables: al someter el ADN a altas temperaturas, las hebras del mismo se separan (se desnaturaliza el ADN), lo que significa que si las hebras de una molécula circular no están entrelazadas, deberían observarse dos hebras completamente independientes tras la desnaturalización, mientras que experimentalmente se observan **dos hebras entrelazadas**, lo cual implica que ya estaban entrelazadas antes, debido a que la desnaturalización *no altera sus propiedades topológicas*.

La propuesta de mayor credibilidad, quizás, fue la del grupo de Rodley, llamada “modelo SBS” (del inglés *Side-By-Side*, “lado a lado”) y apoyada por Pohl y Roberts debido a sus propiedades topológicas (Pohl & Roberts, 1978) (Fig. 2.2:18). En este modelo el ADN, en vez de ser una doble hélice dextrógira en que cada vuelta tiene un largo de aproximadamente 10 pares de bases, se considera como una especie de doble hélice que cambia de orientación cada medio giro. Es decir, la estructura gira hacia la derecha por 5 nucleótidos y luego a la izquierda por 5 nucleótidos y luego de nuevo a la derecha, de forma repetida, presentando “doblecetes” (*bends*) de dos tipos para generar ese cambio (Rodley *et al.*, 1976). Idealmente, esto significaría que localmente el ADN tendría la apariencia de una doble hélice, pero sin que las hebras estén entrelazadas. En realidad, debido a la mayor magnitud de rotación en el sentido derecho, las hebras de este modelo también están entrelazadas (con un giro hacia la derecha), aunque con un Lk mucho menor que en el modelo de doble hélice. Es notable que este entrelazamiento es lo que evita que el modelo SBS sea fácilmente descartado junto con los de hebras no entrelazadas. Los autores además señalaban que el patrón de difracción de rayos X predicho para esta estructura parecía corresponderse con los obtenidos experimentalmente con un ajuste igual o incluso

mejor que el predicho para la conformación B de Watson y Crick. Este punto resultaba particularmente fuerte, siendo que el buen ajuste a los patrones de difracción de rayos X observados había sido originalmente una de las principales evidencias a favor del modelo de la doble hélice.

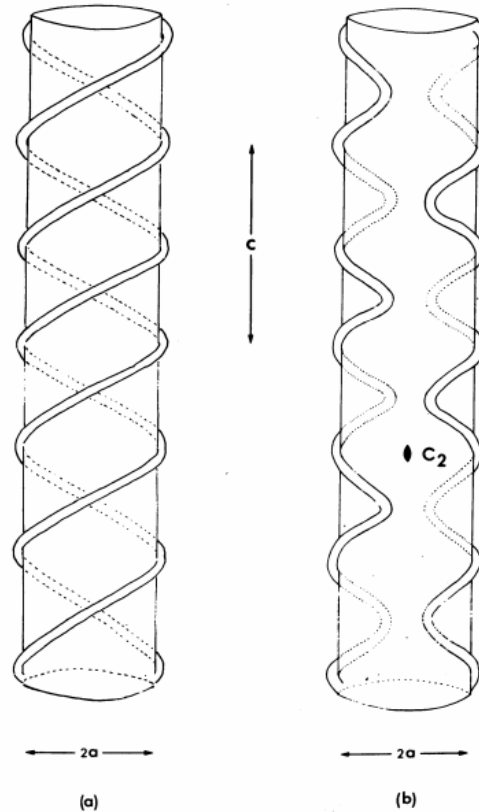


Fig. 2.2:18: Diagramas idealizados de diferentes propuestas sobre la estructura del ADN. (a) Modelo elemental de Watson y Crick. (b) Modelo SBS (*Side-By-Side*). c : longitud axial de la unidad repetida; a : radio aproximado de las hebras de fosfato; C_2 : eje de rotación binaria (180°), perpendicular a la figura y que relaciona los dos tipos de “dobles”. Reproducida de Rodley *et al.*, 1976.

Siendo que estas dos estructuras serían muy difíciles de diferenciar por sus patrones de difracción de rayos X, deben existir otros métodos experimentales para poder diferenciarlos. Por suerte, aunque Rodley *et al.* no propusieron métodos experimentales en el artículo original, Pohl y Roberts sí lo hicieron en el suyo, proponiendo una reinterpretación de ciertos resultados obtenidos durante la electroforesis de ADN que se ajustaba con su modelo, y explicando como, con ciertos experimentos (que se estaban realizando en aquel momento) se podría llegar a distinguir entre los dos modelos en términos de la fórmula de White.

Cómo se mencionó anteriormente, realizar una electroforesis en gel de moléculas de ADN circulares de tamaño similar (luego de tratadas con DNAsas y ligasas, o con topoisomerasa I) produce un patrón de bandas discretas a distancias constantes. Típicamente bajo el modelo de la doble hélice, se suele interpretar como que cada banda representa un valor (promedio) de W tal que la diferencia entre el W de bandas adyacentes (llamada n) sea 1, y que este cambio está dado solamente por cambios en Lk (que siempre

toma valores enteros, lo que hace que $n = 1$ sea bastante natural). Según Pohl y Roberts, sin embargo, este cambio en W vendría dado tanto por cambios en T como en Lk , llegándose a que la diferencia entre bandas correspondería a un múltiplo de un valor fijo, *no necesariamente entero*, lo que requeriría que *cada banda reflejara cambios tanto en Lk como T* . Basándose en el modelo SBS, ellos proponen que $n = 1/5$, considerando que cada base aporta $\pm 1/10$ al valor de T según los cálculos de Watson y Crick y Rodley *et al.*, y suponiendo que existe algún mecanismo (posiblemente enzimático) por el que se interconvierten las “bases dextrógiras” y “levógiras”. Sin embargo, en un artículo del siguiente año, Crick *et al.* (1979) señalan que aunque las moléculas circulares experimentan muchos cambios conformacionales y por tanto pueden estar en un gran número de estados (en cuanto a sus valores de T y W), el tiempo requerido para la electroforesis es tan largo (8-18hs según Depew & Wang, 1975) comparado con la velocidad de estos cambios, que durante la corrida, la molécula habría adoptado tantos estados (todos con el mismo Lk) que su “comportamiento electroforético” debería ser indistinguible al del estado promedio tomado sobre tiempo infinito, por lo que observar bandas distinguiendo entre valores de T sería imposible.

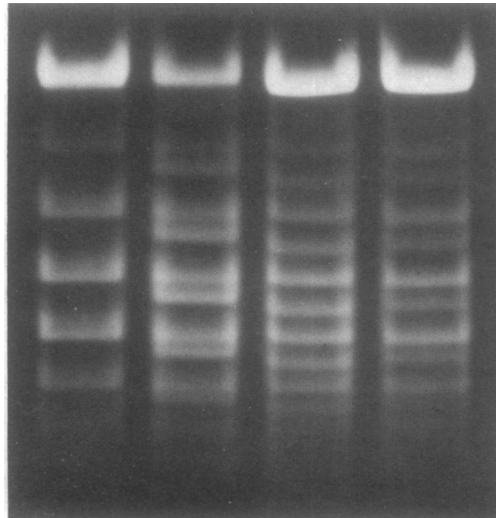


Fig. 2.2:19: Patrones de bandeo luego de realizada una electroforesis a distintas muestras de dos tipos de ADN con diferentes longitudes, tratadas con DNAasa I y luego con ligasa. Todas las muestras contienen plásmidos pTR182. La diferencia en el número de pares de bases con el segundo ADN de cada muestra es, de izquierda a derecha: 53, 27, 5 y 6 respectivamente. Comparando las distintas distancias entre bandas puede verse cómo las diferencias de longitud llevan a diferentes desfasajes en las bandas. Particularmente, una diferencia de 1 pb lleva a un desfasaje de 0.1 (es decir $1/10$ de la distancia entre bandas correspondientes a pTR182), lo que concuerda con las predicciones del modelo de Watson y Crick. Reproducido de Wang (1979).

Algunos autores (Depew & Wang, 1975) consideraron el caso en que se preparan moléculas de ADN circulares de distinto largo para electroforesis (como se describió más arriba). La inserción de un par de bases debería modificar W por $1/10$ (y no afectar la distribución de valores de Lk , considerando que $\pm 1/10$ no es suficiente para pasar al siguiente entero), lo que debería afectar ligeramente su desplazamiento por el gel. Si $n = 1/5$ como en la propuesta de Pohl y Roberts, esto significa que deberían aparecer el doble de bandas que

si se corrieran todas moléculas de igual largo (la diferencia entre las bandas de igual largo seguiría siendo un múltiplo de n , pero estarían intercaladas las bandas de las moléculas con un nucleótido adicional). Por este mismo razonamiento, si $n = 1$ como en el modelo de Watson y Crick, este cambio debería generar 10 bandas más²⁸. Esta diferencia notable debería ser suficiente para poder refutar alguno de estos modelos y apoyar al otro.

Efectivamente, un par de años después, Wang reportó una serie de experimentos de este estilo, utilizando cadenas circulares de ADN con diferencias desde 1 a 58 nucleótidos de largo, y concluyendo que los mismos apoyaban fuertemente el modelo de la doble hélice y rechazaban el modelo SDS (Fig.2.2:19)(Wang,1979).

Pero poder rechazar el modelo de Rodley *et al.* no resuelve el problema inicial: si el ADN es una doble hélice, debe ocurrir algo especial para que el resultado de la replicación no sean dos moléculas entrelazadas. Crick creía que, efectivamente, **si se puede dar esa situación en la naturaleza, algún mecanismo debería haber evolucionado cuya función fuera resolver este tipo de problemas**, afirmación que no sonaba totalmente convincente (sobre todo a Pohl, que lo consideraba como un intento desesperado de intentar rescatar el modelo de la doble hélice) hasta que se descubrió un grupo de enzimas que realizaban precisamente esa tarea, las llamadas **topoisomerasas tipo II** (Crick, 1989).

Topoisomerasas II

A mediados de los 70's, el grupo de investigadores liderado por Martin Gellert se encontraba estudiando la acción del fago λ , un virus que infecta a *Escherichia coli* y cuyo ADN (una molécula doble hebra circular), una vez dentro de la célula huésped, es capaz de **integrarse** al cromosoma bacteriano mediante una reacción catalizada por la enzima *integrasa*. Para lograr esto, se produce un corte en ambas cadenas del fago y en ambas cadenas del cromosoma bacteriano en ciertos sitios particulares, cortes que luego son cerrados de tal forma que las dos moléculas hayan sido combinadas para formar una sola (Wang, 1982). Durante el curso de las investigaciones sobre este fenómeno *in vitro*, se observó que el ADN viral **debía estar negativamente superenrollado** para poder integrarse sin aporte de energía. Por el contrario, si el ADN no estaba negativamente superenrollado, se requería un extracto celular de *E. coli*, iones Mg^{2+} y ATP como fuente de energía para que la integración se pudiese llevar a cabo (Gellert *et al.*, 1976a). Esto sugería que *E. coli* presentaba una enzima ATP-dependiente capaz de *inducir un superenrollamiento negativo a una molécula de ADN relajada*, una propiedad hasta entonces desconocida. El grupo de Gellert logró finalmente aislar esta enzima, que denominaron **ADN girasa** (*DNA gyrase*, o simplemente girasa) (Gellert *et al.*, 1976a).

En el mismo artículo donde se presentó esta nueva enzima, los autores demostraron que, efectivamente, la girasa tenía la capacidad de superenrollar moléculas relajadas de ADN, sin poder determinar correctamente si este cambio era siempre negativo o posiblemente positivo. No mucho después, Gellert *et al.* demostraron que la novobiocina (*novobiocin*) y la coumermicina (*coumermycin*), fármacos usados para inhibir la replicación

²⁸ Este hecho está relacionado con que originalmente se calculaba que la doble hélice daba una vuelta alrededor del eje central cada 10 pares de bases, luego calculado más exactamente (por el grupo de Wang, usando este tipo de experimentos) como 10.5 pares de bases por vuelta.

del ADN en *E. coli*, actuaban inhibiendo la acción de la enzima girasa y, si se usaba un mutante de la girasa inmune a estas drogas, las mismas no inhibían la replicación. De esta forma se demostró que **la girasa cumple un rol muy importante en el proceso de replicación del ADN circular** (Gellert *et al.* 1976b). Más aún, se observó que aquellas células sin girasa en general no presentaban ADN superenrollado negativamente (que, como ya mencionamos, sería la condición natural observada en casi todas las células), lo que parecería indicar que esta enzima se encarga también de **generar casi todo el superenrollamiento presente en las células**. Posteriormente se determinó que la ADN girasa disminuye el *writhe* de moléculas de ADN incluso cuando están superenrolladas positivamente, lo que quiere decir que su rol es el de “introducir *supercoiling* negativo” y que por lo tanto puede relajar ADN con *supercoiling* positivo (Cozzarelli, 1980).

¿Cómo hace esto la girasa? A grandes rasgos, esto ocurre por un **mecanismo de inversión de signo** en el cual la enzima se une a dos segmentos de ADN doble cadena, corta las dos hebras de uno de los mismos, pasa el otro segmento por este agujero y luego lo cierra (si fijamos el punto de vista, convierte el segmento de arriba en el de abajo, *cambiando el signo del cruce*) (Fig. 2.2:20)(Cozzarelli, 1980). Cada cruce del eje sobre si mismo se corresponde a 4 cruces: dos entre la misma hebra (que no contribuyen al valor de Lk) y dos entre las distintas hebras. Invertir el signo invierte el signo de todos estos cruces, en particular de *los dos que sí aportan a Lk* , que es la suma de todos estos signos; en este caso cada signo cambia por ± 2 (eg: de -1 a +1). **Esto genera un cambio en el linking number de ± 2 , a diferencia de las topoisomerasas I, que generan cambios de ± 1** , lo cual puede comprobarse mediante experimentos de electroforesis. Como mencionamos más arriba, cuando se hace una electroforesis en gel con moléculas circulares de ADN tratadas con topoisomerasas I, se obtiene un patrón discreto de bandas tal que las moléculas de cada banda tienen un mismo valor de Lk y bandas adyacentes tienen valores de Lk con diferencias de ± 1 , pero si se tratan con girasa se observa un patrón que coincide con el patrón anterior pero dejando una banda por medio, es decir que las moléculas de ADN de distintas bandas tienen valores de Lk que difieren por un múltiplo de 2 (Fig. 2.2:21).

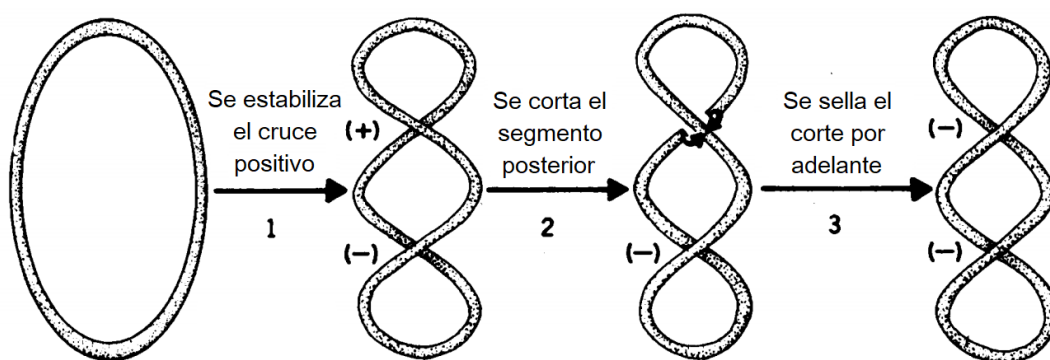


Fig. 2.2:20: Representación esquemática del mecanismo de inversión de signo de la ADN girasa. La curva en este caso representa una molécula de ADN doble cadena, el corte y sellado por lo tanto involucra ambas hebras de la misma. Adaptada de Cozzarelli (1980).

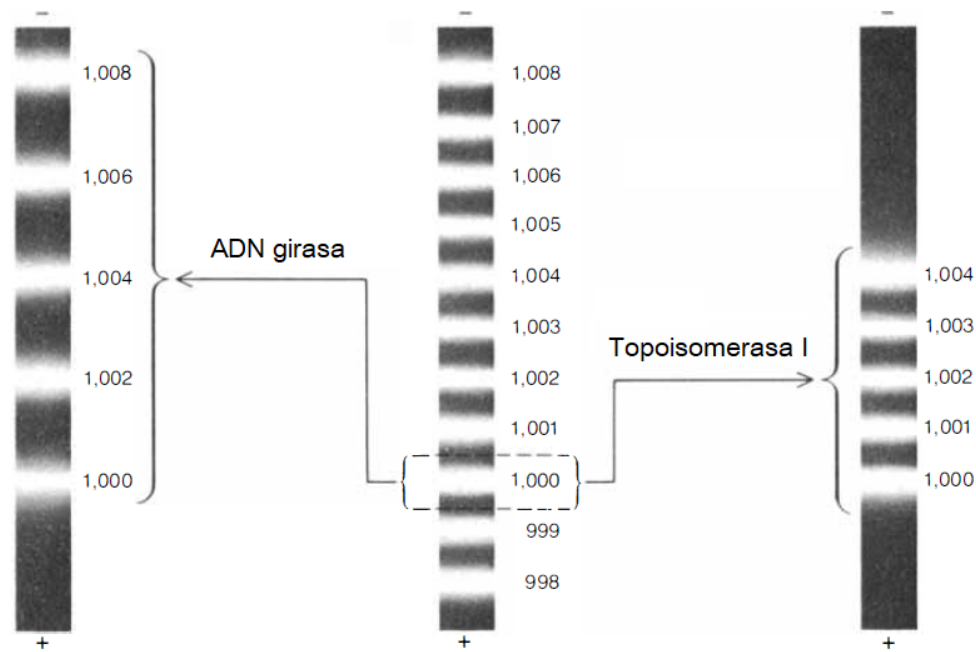


Fig. 2.2:21: Patrones de bandeo de moléculas de ADN tratadas con ADN girasa (Izquierda) y Topoisomerasa I (Derecha) obtenidas mediante electroforesis en gel. La banda central representa una corrida inicial de moléculas de ADN del mismo largo sin tratar, de dónde se tomó una población que, por pertenecer a la misma banda, tenían el mismo *linking number* (eg: 1000). Obsérvese que las bandas resultantes del tratamiento con ADN girasa se corresponden a cambios pares en el valor Lk, a diferencia de las tratadas con Topoisomerasa I. Adaptada de Wang (1982).

Recordemos que, al menos en bacterias, las topoisomerasas de tipo I servían para *relajar* el superenrollamiento negativo, teniendo en cierta forma el efecto inverso al de las topoisomerasas II. Es razonable deducir entonces que **ambos tipos de enzimas actúan en sentidos opuestos para regular el superenrollamiento del ADN presente en la célula** (Wang, 1991). Que las topoisomerasas tienen un rol esencial para la regulación del *supercoiling* se refleja en varias evidencias experimentales, por ejemplo el hecho de que existen mutantes de la girasa que compensan ciertas mutaciones letales de las topoisomerasas I (lo cual implica acciones opuestas). Otro hecho relacionado es que la expresión de girasa se corresponde al grado de superenrollamiento del ADN *in vivo*: la expresión de la ADN girasa puede aumentar hasta 10 veces con respecto a su valor usual si el ADN se encuentra muy superenrollado, un efecto que también se observó *in vitro* simplemente por la presencia de topoisomerasas I, lo que **sugiere que existe un equilibrio dinámico entre las dos clases de topoisomerasas**.

Otra posibilidad es que en vez de contrarrestar los efectos de la otra, las topoisomerasas actúen independientemente para mantener un cierto grado de superenrollamiento. Una situación en que esto podría ocurrir es en el caso de la transcripción del ADN: la ARN polimerasa recorre el eje de la molécula²⁹, y requiere para su

²⁹ Estrictamente este modelo asume que la molécula se mueve con respecto a la polimerasa, es decir que la misma no gira alrededor del ADN. Esto puede darse si la maquinaria transcripcional está aferrada a alguna estructura o si el medio es suficientemente viscoso como para impedir su giro (Liu & Wang, 1987).

acción que localmente la hélice esté “desenrollada”. De esta forma, al avanzar por la molécula, la maquinaria transcripcional va disminuyendo el T local de la doble hélice. Esto quiere decir que, luego de pasar la polimerasa (es decir, una vez “liberada la tensión”) la doble hélice intentará volver a su *writhe* original (en contra de la resistencia ofrecida por el medio), lo que significa que el *writhe* debe disminuir, por lo que **la región inmediatamente posterior a la ARNpol estará negativamente superenrollada. Similarmente, la región inmediatamente adelante de la polimerasa estará positivamente superenrollada** (Fig. 2.2:22). Esta situación puede ser remediada por la acción combinada de las topoisomerasas: **las de tipo I relajan el ADN negativamente superenrollado mientras que las de tipo II relajan el positivamente superenrollado** (Liu & Wang, 1987).

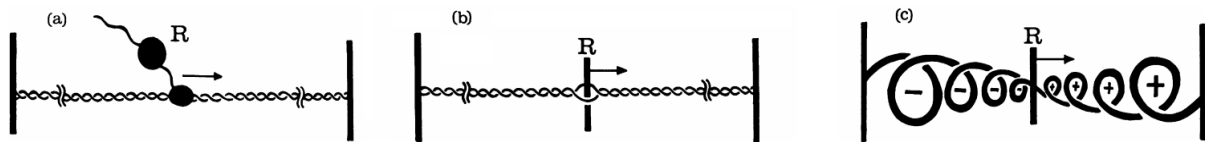


Fig. 2.2:22: Los efectos topológicos locales del mecanismo de transcripción del ADN. **a:** La maquinaria transcripcional “R” (junto con la nueva cadena de ARN) avanza sobre el eje del ADN en la dirección de la flecha. Los extremos del ADN se encuentran anclados a una estructura fija (eg: un segmento muy grande de ADN, tal que no se vea inmediatamente afectado por los cambios locales); **b:** La maquinaria transcripcional puede verse como un divisor entre dos partes del ADN (y puede ser modelado como el avance de una vara rígida por un surco de la doble hélice); **c:** Si R avanza sin rotar, la sección por delante del mismo presenta superenrollamiento positivo mientras que la sección por detrás está superenrollada negativamente. Reproducida de Liu y Wang (1987).

Por supuesto, estas dos funciones no tienen por qué ser exclusivas, y de hecho, ambas ocurren en la naturaleza. **Podríamos decir a *grosso modo* que las topoisomerasas, en su conjunto, se encargan de mantener al ADN en un estado topológico conveniente.** Como ya dijimos, una forma de hacer esto es relajando el ADN a medida que ocurre la transcripción, pero el mismo principio se aplica a cualquier proteína que recorra el ADN, como ocurre durante el proceso de replicación. La ocupación de mantener al ADN relajado negativamente (dentro de un cierto rango de valores de W) es de gran importancia también debido a que permite que la doble hélice se encuentre relativamente relajada, lo que a su vez permite la unión de diversas proteínas al ADN que regulan su expresión.

Es notable además el hecho de que, aunque hasta ahora solo hemos hablado de topoisomerasas en bacterias (pues así fueron las primeras investigaciones al respecto), con el paso de los años **se han encontrado topoisomerasas en todas las especies eucariotas investigadas, y como hemos descrito, se dividen en topoisomerasas de tipo I (que cortan una hebra) y tipo II (que cortan dos hebras)** (Bush *et al*, 2018). Aunque las topoisomerasas tipo I eucariotas no parecen guardar mucha relación con las procariotas, las topoisomerasas tipo II eucariotas son homólogas a la girasa de *E. coli*, por lo que comparten muchas propiedades de interés (Wang, 1985). Más allá de esto, que la célula

eucariota necesite topoisomerasas demuestra que experimenta problemas topológicos, a pesar de que su ADN sea lineal (como explicamos a inicios de la sección 2).

A pesar de las funciones vitales que ya hemos visto que cumplen, las topoisomerasas de tipo II fueron interesantes originalmente debido a que, por su capacidad de cortar ambas hebras de una molécula de ADN, **podrían ser capaces de separar moléculas de ADN concatenadas y así finalmente proveer una solución al problema de la replicación del ADN**. Una forma de demostrarlo en el caso de las levaduras es usando mutantes del gen *top2* (que codifica para la topoisomerasa II). En general una mutación de pérdida de función de este gen es letal, pero si se usan *mutantes sensibles a la temperatura*³⁰ puede verse que después de una ronda de replicación se acumulan plásmidos en forma de moléculas de ADN doble hebra entrelazadas (Wang, 1985). Aunque se hayan usado plásmidos para demostrar esto, en la década del 80' ya se había determinado que la separación de los productos de replicación era un problema también para los eucariotas, donde el gran tamaño de las moléculas no permite resolver estos problemas como si se tratase de una molécula lineal más corta (Wang, 1985).

Con el paso del tiempo se fueron descubriendo cada vez más tipos distintos de enzimas capaces de modificar la topología del ADN, y su importancia en todas las formas de vida se volvió imposible de ignorar. A partir de esta situación uno podría preguntarse **¿por qué hay tantas topoisomerasas?** Esta pregunta es (aproximadamente) el título de un artículo de 1991 escrito por James C. Wang, responsable del descubrimiento y de gran parte de la investigación sobre estas enzimas, y a quien hemos citado extensamente durante la sección 2.1. En dicho *review*, Wang llegó a la conclusión de que **todo es culpa de la organización del material genético, es decir, el hecho de que el ADN suele existir como fragmentos de gran tamaño con estructura de doble hélice**. Quizás esto resulte obvio para el lector, ya que todos los problemas presentados en este capítulo comienzan con la presentación del modelo de Watson y Crick y la evidencia experimental de la existencia de moléculas de ADN circulares y/o de gran largo, pero revela un problema más profundo: **¿Por qué se guarda la información genética en grandes moléculas de ADN?**

Todo esto podría evitarse si la información genética se almacenara en pequeños fragmentos de moléculas lineales, como son el ARN o incluso las proteínas (candidatos para esta función hasta mediados del S. XX (Avery *et al.*, 1944)), pero **es evidente que la naturaleza ha seleccionado a favor de grandes “paquetes” de información con una estructura topológicamente no trivial como son los cromosomas**, y es posible que las topoisomerasas hayan sido favorecidas originalmente solo por su rol en la replicación y luego hayan adoptado nuevos roles, como ser los arquitectos del superenrollamiento (Wang, 1991). Por supuesto, no es completamente misterioso por qué el ADN es un buen soporte para almacenar la información genética: es más químicamente estable que el ARN (Stryer *et al.*, 2019), es una forma fiel de almacenar información (aunque la información técnicamente esté en una hebra, siempre está su complemento como “respaldo”) y su capacidad para compactarse permite la correcta segregación de la información durante la mitosis, así como una sutil regulación de la expresión génica *in vivo* (ambas probablemente más fáciles debido

³⁰ Es decir, mutantes que producen una versión de la proteína que funciona normalmente dentro de un cierto rango de temperaturas pero que dejan de funcionar a temperaturas altas, por ejemplo.

a la presencia de unas pocas moléculas de ADN, versus los millones de proteínas en una célula (Milo & Phillips, 2015)).

Los problemas topológicos del ADN son, por lo tanto, consecuencia directa de la estructura del ADN, y es gracias a ellos que las topoisomerasas se han mantenido y diversificado a lo largo de la escala evolutiva. El estudio de las topoisomerasas que hemos relatado trajo confianza al modelo de la doble hélice, y parece haber frenado el surgimiento de nuevas teorías que tratan de evitar estos problemas “poco elegantes”. **Estas investigaciones dieron inicio al estudio de las aplicaciones de la teoría de nudos en la biología.** Particularmente en el ADN, la teoría de nudos no se aplica solamente al estudio de los cambios controlados por las topoisomerasas (es decir, cambios estructurales sin modificar la información de la molécula), sino que *también se ve involucrada en la acción de otros tipos de proteínas*, como veremos a continuación.

2.2.4 Mecanismo de acción de las recombinasas

Hasta ahora hemos hablado principalmente sobre cómo la teoría de nudos revela problemas en la biología. Hasta la mitad del siglo XX se pensaba que la teoría de nudos no tenía nada que aportar a la biología, pero como hemos visto, solamente el tema de la duplicación del ADN ya fue suficiente para el surgimiento de varios problemas conceptuales relacionados con la teoría de nudos. Junto con estos problemas vinieron propiedades interesantes obtenidas originalmente como resultados teóricos, como la fórmula de White. Aún más, quizás la existencia de las topoisomerasas no hubiera sido tan apreciada si se hubiesen ignorado los problemas topológicos que la estructura de la doble hélice presentaba, por lo que podemos pensar que la topología aportó también una comprensión más profunda de las complejidades asociadas a una de las moléculas más importantes para la vida. Sin embargo, hasta ahora no hemos relatado ningún caso en el que se *podieran resolver*³¹ *problemas de la biología usando la teoría de nudos*. Para remediar esta situación, daremos un breve recuento de algunas técnicas usadas en la **aproximación topológica a la enzimología** (*topological approach to enzymology*).

Las recombinasas son enzimas que catalizan el intercambio de secuencias cortas de ADN entre dos hebras más grandes de ADN (*The American Heritage® Medical Dictionary*, 2007), o sea que *promueve la recombinación genética*. Las particularidades de cada recombinasa pueden ser muchas, pero esencialmente podemos pensar que actúan en dos pasos:

1. La recombinasa se une a un par de secuencias particulares, que determinan los sitios de recombinación, y se forma el **complejo sináptico** (Fig. 2.2:23), con una cierta geometría particular.
2. Dentro de la región comprendida por el complejo sináptico, se cortan los sitios de recombinación y se vuelven a unir los extremos libres en una configuración distinta a la original.

Este segundo paso puede verse como una **operación local característica de cada recombinasa**, y es en tratar de modelarla que esta aproximación ha tenido buenos

³¹ En vez de simplemente plantear problemas.

resultados. Hay que notar que, debido al corte y pegado de las moléculas de ADN, las recombinasas son capaces de generar cambios topológicos en los cromosomas, tal como lo hacían las topoisomerasas, aunque generando distintos cambios topológicos (Fig. 2.2:24). A diferencia de las topoisomerasas, sin embargo, las recombinasas modifican la secuencia del ADN, por lo que cambian la información contenida en la misma. En general supondremos que todo corte es sobre la dos hebras de la doble hélice, por lo que podemos pensar en una molécula de ADN simplemente como su eje central.

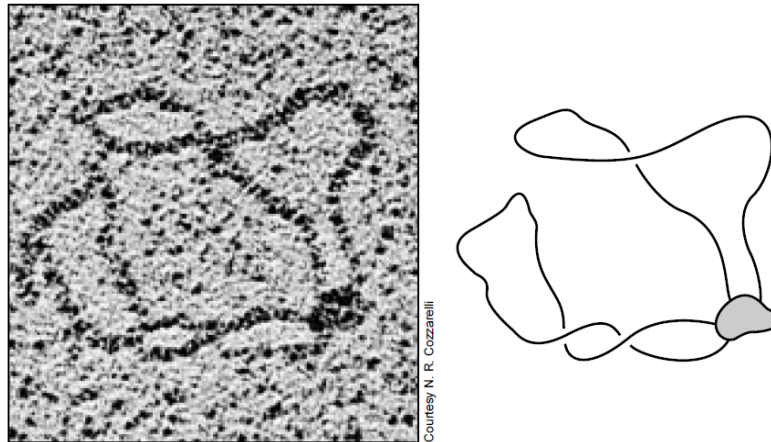


Fig. 2.2:23: El complejo sináptico. **(Izquierda):** Micrografía de una molécula circular de ADN unida a la recombinasa “Tn3 resolvasa”, que forma un complejo sináptico con 2 secciones del ADN. **(Derecha):** Diagrama representando la imagen de la izquierda, para aclarar lo que se ve. Reproducida de Sumners (1995).

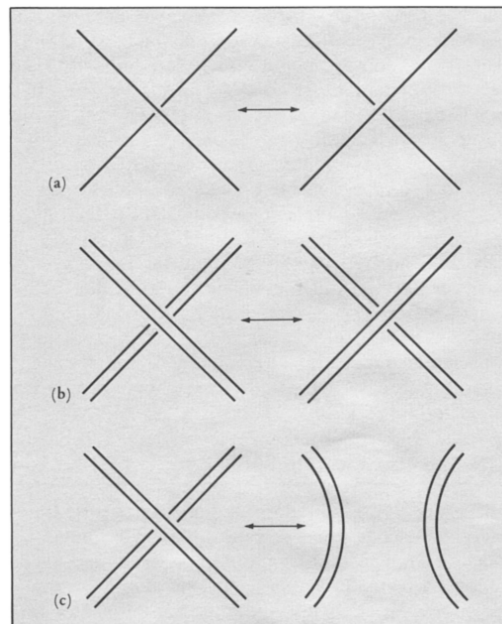


Fig. 2.2:24: Cambios topológicos en las moléculas de ADN causados por la acción de enzimas. **a:** Topoisomerasas I; **b:** Topoisomerasas 2; **c:** Recombinasas. En esta figura las líneas representan hebras de ADN, y se ignora la doble hélice por simplicidad. Reproducida de Sumners (1990).

Las recombinaciones suelen ocurrir entre dos moléculas distintas o entre dos secciones de una misma molécula, en general lineal. Una consecuencia de esto es que no quedan claros los cambios topológicos que estas enzimas introducen. Sabemos, por ejemplo, que una enzima permite unir dos moléculas circulares de ADN tal que formen una sola, pero *no tenemos ni idea cómo lo hace*. La aproximación topológica a la enzimología (o más en general, a la bioquímica) es un área que se inició con los estudios topológicos del ADN como los que ya hemos mencionado (Wasserman & Cozzarelli, 1986) y **se basa en el estudio de la acción de las enzimas a partir de los cambios topológicos que generan**. En el caso de las recombinasas, una forma de “atrapar” estos cambios topológicos es *usar una sola molécula circular de ADN* (con o sin superenrollamiento) *con varios* (por lo menos dos) *sitios de recombinación en su secuencia*. Suponiendo que la enzima opera localmente, no debería “saber diferenciar” entre dos sitios de recombinación en moléculas distintas y los mismos sitios en una misma molécula, por lo que **debería actuar como actúa normalmente**, lo que significa que cualquier cambio topológico inducido por la recombinasa será representativo de su mecanismo de acción. Recordemos que las moléculas de ADN pueden ser vistas por microscopía electrónica y que se puede identificar su tipo de nudo (como en las figuras 2.2:1 y 2.2:2), por lo que se pueden tomar moléculas sin anudar de ADN, tratarlas con la recombinasa que nos interesa, observar los nudos o enlaces resultantes y a partir de allí **construir modelos que nos permitan entender su mecanismo de acción**.

Tangles y modelos de acción enzimática

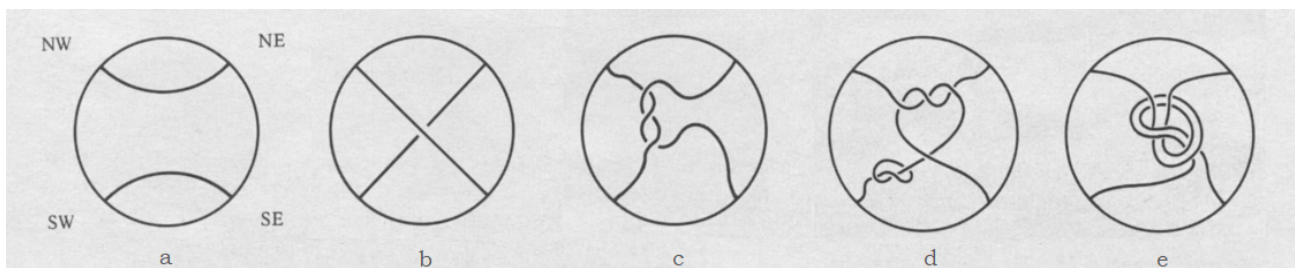


Fig. 2.2:25: Ejemplos de *tangles*. **a:** Un tangle trivial, con sus extremos identificados con los puntos cardinales NE, NW, SE y SW. **b:** Un tangle con un solo cruce, equivalente a “aislar” un cruce en un diagrama de nudo cualquiera. **c:** Un tangle racional, que puede ser desanudado rotando sus extremos. **d,e:** Ejemplos de tangles no racionales. Adaptado de Sumners (1990).

Para poder explicar cómo se construyen estos modelos, usaremos el formalismo de los **tangles** (marañas), creado en los años 60s por el matemático John H. Conway (1970). Un tangle es un diagrama compuesto por dos hebras abiertas, cuyos extremos yacen sobre un borde en cuatro posiciones distintas (que se suelen llamar NE, NW, SE y SW por comparación con los puntos cardinales)(Fig. 2.2:25). Podemos verlos como partes de un diagrama de nudo que separamos para estudiar localmente. Por ejemplo, la figura 2.2:25b podría representar un cruce de un diagrama de nudo (y de hecho hemos usado esta construcción al hablar de las *skein relations* en la sección 1.2). De esta comparación es claro que si dos tangles se diferencian en una cantidad finita de movimientos de

Reidemeister que no involucren sus extremos, los mismos son equivalentes. Intuitivamente, la equivalencia de tangles es la equivalencia de nudos, pero dejando los extremos fijos.

Aunque no entraremos en detalles, vale la pena distinguir un tipo de tangle particular, los **tangles racionales**. Estos **son aquellos tangles que pueden desanudarse** (es decir, hacerse equivalentes a un tangle trivial, como el de la figura 2.2:25a o su rotación en 90°) **solamente girando sus extremos**. Para visualizar esto, pensemos en un tangle como un par de curvas en el espacio, pero en vez de que sus extremos estén sobre un círculo, pensemos que están sobre la superficie de una esfera. Podemos entonces elegir un eje de dicha esfera y girar dos de los extremos alrededor del mismo, con lo que es posible desatar tangles como los de la figura 2.2:25b y c. Observar que esto no se puede hacer en el caso de las figuras 2.2:25d y e, lo que significa que no son racionales. Es importante mencionar que nuestra discusión se centrará en los tangles racionales pues poseen propiedades algebraicas (que no explicitaremos) que permiten resolver los problemas que plantearemos.

Para terminar nuestra presentación del formalismo de los tangles basta con presentar un par de operaciones que se pueden realizar sobre los mismos. Les llamaremos la **suma de tangles** y la **clausura de tangles**. Dados dos tangles A y B, la suma $A+B$ definirá un nuevo tangle uniendo los extremos NE y SE de A con los extremos NW y SW de B, respectivamente³². Por otro lado, la clausura $N(A)$ definirá un nudo uniendo el extremo NW al NE y el extremo SW al SE. Una definición gráfica de estas operaciones se da en la figura 2.2:26.

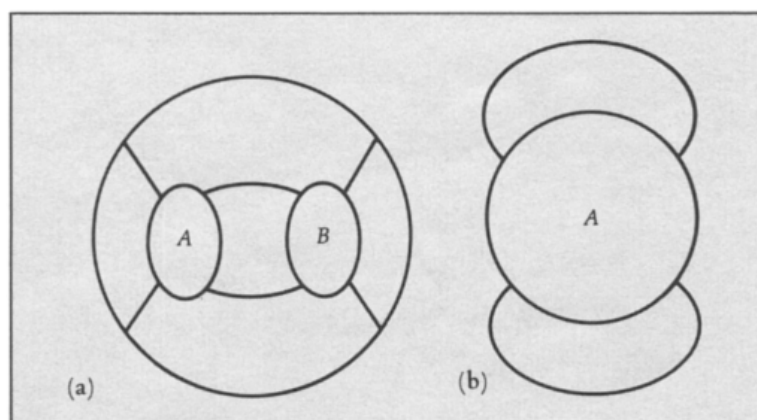


Fig. 2.2:26: Suma y clausura de tangles: definición gráfica. **a:** La suma de dos tangles $A+B$ es un tangle en que se han unido los extremos NE y SE de A con los extremos NW y SW de B, respectivamente. **b:** La clausura de un tangle $N(A)$ es un nudo en el que se han unido los extremos NW y NE por un lado y los extremos SW y SE por otro. Reproducido a partir de Sumners (1990).

Es importante notar que, si se toma un diagrama de nudo K y se separa una parte apropiada (con cuatro extremos) como un tangle A , el resto del nudo *se corresponde a un tangle complementario* B , que queda definido por el borde en común entre ambos tangles. **Si se definen de esta forma, ocurre que $K = N(A + B)$.** Usando este razonamiento podemos pensar en nuestra molécula cerrada de ADN como dividida en dos tangles: uno afectado por la recombinasa y el otro su complemento. La molécula antes del tratamiento

³² Observar que la suma de tangles no es, en general, conmutativa.

con la recombinasa es nuestro **sustrato** y la molécula después del tratamiento será nuestro **producto**. Como la única parte que cambia es el tangle afectado por la recombinasa, lo llamaremos **T** antes de la acción de la enzima y **R** después de la misma. Su complemento permanece constante y por tanto podemos asignarle la letra **S** tanto en el sustrato como en el producto. De esta forma, obtenemos las ecuaciones:

1. $N (S + T) = \text{sustrato}$
2. $N (S + R) = \text{producto}$

Nuestra suposición biológica es que la recombinasa que nos interesa actúa localmente y siempre de la misma forma, por lo que siempre toma una cierta sección (en este caso un tangle) y lo convierte siempre en otra misma forma. En términos matemáticos, **suponemos que R y T son constantes características de la enzima, independientes de la geometría del complemento S**. Un modelo para la acción de una enzima podría ser simplemente saber a que tangle se corresponden S, T y R. Como tenemos dos ecuaciones y tres incógnitas, esto requiere que tengamos distintos ejemplos de sustratos y productos para una misma enzima, lo que nos dará más ecuaciones de donde trataremos de despejar nuestros tangles incógnitos. Como mencionamos antes, este método se basa en las propiedades de los tangles racionales, por lo que *solo puede funcionar si todos los tangles involucrados son racionales*.

La enzima Tn3 resolvasa

La recombinasa Tn3 resolvasa es una enzima que participa en el proceso de transposición de los transposones de la familia Tn3. Los transposones de esta familia consisten en elementos transponibles que codifican para factores de resistencia frente a antibióticos como los antibióticos betalactámicos. Además de esto, codifican para dos enzimas: **una transposasa y una resolvasa**. Estas enzimas son importantes para la replicación y el movimiento de los transposones de esta familia, debido a su modo de replicación (Fig.2.2:27): A partir de dos moléculas circulares de ADN, una *donante* conteniendo el transposón³³ y una molécula *blanco* (sin esta secuencia), **la integrasa cataliza la formación de una sola molécula que resulta de la unión de las moléculas originales, que posee dos “medias copias” del transposón** (es decir, posee la secuencia entera del transposón, pero solo en una hebra). El mecanismo de replicación celular completa la hebra complementaria, por lo que se tiene una sola molécula (el “*cointegrado*”) con dos copias del transposón. Luego actúa la resolvasa, separando esta molécula en **dos moléculas iguales a las originales, salvo que la molécula blanco ahora contiene una copia del transposón** (Nicolas *et al.*, 2015). Es importante notar que, si suponemos que la acción de la resolvasa es solamente local, entonces el producto de esta resolución pueden ser *dos moléculas circulares enlazadas entre sí*³⁴, dependiendo del grado de superenrollamiento del cointegrado.

³³ Por ejemplo, un plásmido que aporta resistencia a antibióticos.

³⁴ Situación que ya hemos estudiado, y puede ser resuelta mediante la acción de las topoisomerasas de tipo II.

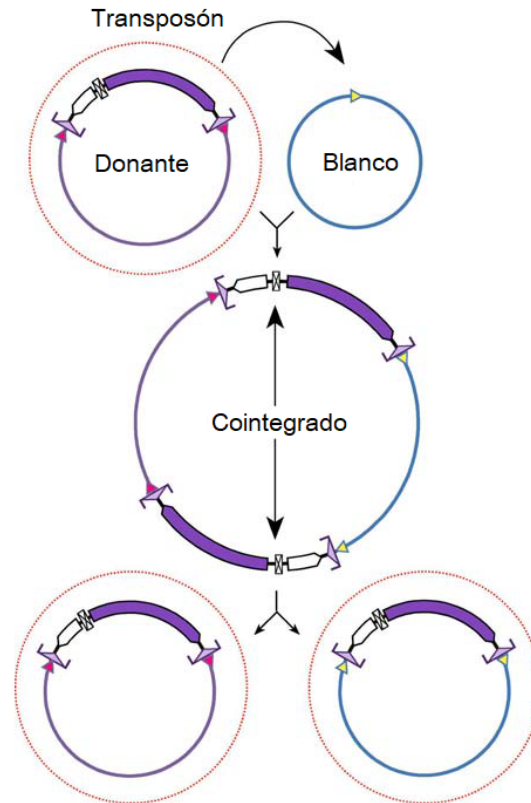


Fig. 2.2:27: Ciclo replicativo de los transposones de la familia Tn3. La integración de la molécula donante (violeta, con el transposón marcado diferente) y la molécula blanco (celeste) da como resultado un cointegrado que contiene la información de ambas moléculas, así como una copia extra del transposón. Este cointegrado se resuelve por acción de la Tn3 resolvasa en dos moléculas que incluyen al transposón en su secuencia. La línea roja alrededor de un plásmido indica que posee inmunidad frente a más inserciones. Adaptado de Nicolas *et al.* (2015).

Para estudiar el mecanismo de la enzima Tn3 resolvasa se usaron moléculas circulares de ADN presentando dos copias del transposón Tn3, que fueron tratadas con resolvasa *in vitro*. Se sabe que, en general, la resolvasa actúa *dispersamente*, lo que quiere decir que la enzima se une al ADN, cataliza un solo evento de recombinación, y después se separa del ADN, dejando dos moléculas independientes (pero posiblemente entrelazadas), con lo que cumple su rol esperado. A veces, sin embargo, la enzima actúa *procesivamente* y cataliza más de un evento de recombinación antes de separarse del ADN, lo que puede producir una o dos moléculas de ADN, anudadas y entrelazadas de diferentes formas (Sumners, 1990). **Luego de tratar con resolvasa una muestra de ADN circular sin anudar se obtendrán moléculas de diferentes topologías en distintas cantidades.** Suponiendo que la probabilidad de que se forme un cierto tipo de enlace disminuye con el número de eventos de recombinación necesarios (o sea que es más probable que se de un solo evento de recombinación que dos, más probable que ocurran dos que tres y así sucesivamente), podemos deducir que **la topología más común será la correspondiente a un solo evento de recombinación, la segunda más común a dos eventos de recombinación, etc.**

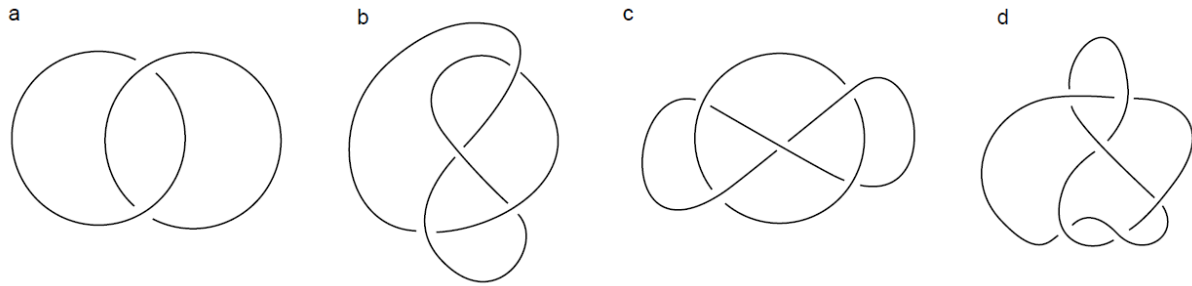


Fig. 2.2:28: Topologías generadas por la acción de la recombinasa Tn3 resolvasa. Estos diagramas representan la estructura simplificada de moléculas de ADN luego de sucesivos eventos de recombinación, y están ordenados según el número de eventos tras el cual se generan, o equivalentemente, según la probabilidad de que sean el producto de reacción de una molécula sin anudar luego del tratamiento con resolvasa. **a:** Enlace de Hopf; **b:** 4_1 ; **c:** Enlace de Whitehead; **d:** 6_2 . Reproducido de Sumners (1995).

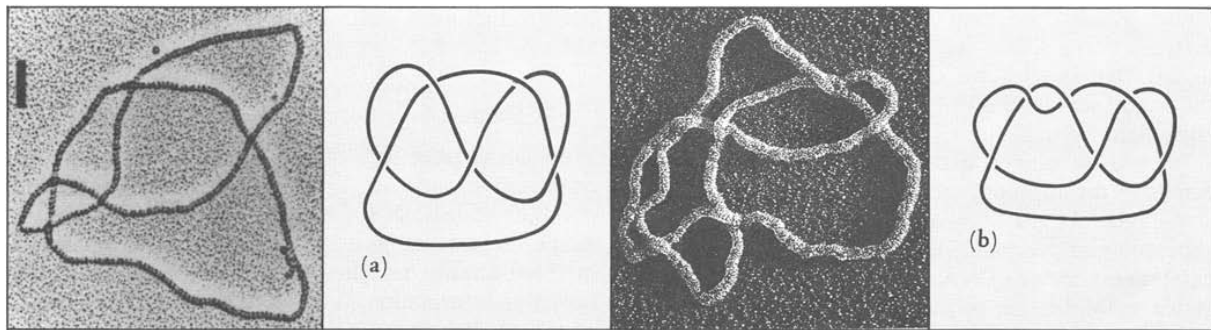


Fig. 2.2:29: Productos del tratamiento con Tn3 resolvasa. **a:** Moléculas de ADN formando el enlace de Whitehead, luego de 3 eventos de recombinación. **b:** Molécula de ADN formando el nudo 6_2 , luego de 4 eventos de recombinación. Las imágenes del ADN fueron obtenidas por microscopía electrónica usando técnicas para poder resolver bien la identidad del nudo (eg: recubrimiento con RecA). Reproducido de Sumners (1990).

Basándose en este razonamiento se determinó que, a partir de moléculas de ADN topológicamente triviales³⁵, eventos sucesivos de recombinación producían primero un enlace de Hopf, luego el nudo 4_1 , luego el enlace de Whitehead, y finalmente el nudo 6_2 (Figs. 2.2:28; 2.2:29). Volviendo a nuestras ecuaciones (1) y (2), tenemos que:

1. $N(S + T) = 0_1$
2. $N(S + R) = \text{Enlace de Hopf}$

y más aún, si suponemos que las rondas sucesivas de recombinación realizan la misma función que en la primera ronda sin interferir entre sí (es decir, la sección que fue modificada en la primera ronda no se ve afectada por la acción de la resolvasa en la segunda ronda, etc.), podemos plantear que cada ronda suma un tangle igual a R , con lo que tendríamos nuestro sistema de ecuaciones completo:

³⁵ Recordar que nos interesa el eje central de la molécula, por lo que una molécula puede ser topológicamente trivial (es decir, no anudada) y *estar superenrollada*.

1. $N(S + T) = 0_1$
2. $N(S + R) = \text{Enlace de Hopf}$
3. $N(S + R + R) = 4_1$
4. $N(S + R + R + R) = \text{Enlace de Whitehead}$
5. $N(S + R + R + R + R) = 6_2$

A partir de este sistema, sabiendo que S, T y R son todos tangles racionales (lo que se demuestra a partir de los nudos que componen) y usando técnicas de la teoría de nudos (en aquel momento recién descubiertas) puede determinarse que las ecuaciones 1-4 admiten **una sola solución para S y R (asumiendo T trivial)**³⁶, ilustrada en la figura 2.2:30. Más aún, esta solución permite predecir el resultado de la ecuación 5, lo que parece comprobar la veracidad de este modelo (Fig. 2.2:31). Que T sea trivial es una suposición biológica usual, y existen argumentos teóricos para apoyarla (Sumners, 1995). Antes de la obtención de este resultado se propusieron distintos modelos para el funcionamiento de esta enzima, que no lograban explicar ciertos resultados experimentales (Wasserman & Cozzarelli, 1986). En particular, el hecho de que S sea un tangle no trivial con 3 cruces negativos coincide perfectamente con la evidencia experimental de aquella época, según la cual, durante la formación del complejo sináptico, existía un superenrollamiento negativo con tres cruces entre los sitios de recombinación. Esto a su vez sugiere que el superenrollamiento negativo es necesario para que la reacción se de correctamente, lo cual fue luego demostrado experimentalmente (Yang, 2010).

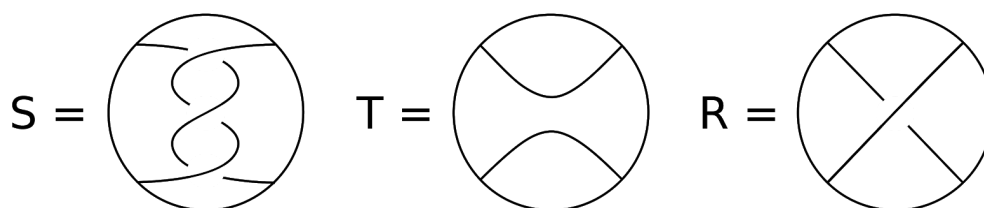


Fig. 2.2:30: Solución al modelo de acción de la Tn3 resolvasa. Los tangles racionales S y R son las únicas soluciones a las cuatro ecuaciones que se desprenden del modelo de acción de la resolvasa cuando se asume que T tiene esta forma, y además son solución también de la ecuación 5, como se muestra en la figura 2.2:31.

El método hasta aquí descrito fue de utilidad a la hora de determinar las características de la Tn3 resolvasa, y provee un marco teórico para estudiar el mecanismo de cualquier tipo de recombinasa, siempre y cuando uno sea capaz de hacer ciertas suposiciones biológicas. En particular, los mismos autores que determinaron el mecanismo de acción de la resolvasa (aparentemente en forma paralela) usaron esta técnica, junto con datos experimentales para poder determinar el mecanismo de otra recombinasa: la integrasa del bacteriófago λ ³⁷ y a partir de allí, el mecanismo de varias otras recombinasas, dilucidando ciertas características conservadas que antes no se tenían presentes (Crisona *et al.*, 1999). De esta forma, el desarrollo de esta técnica, y de la aproximación topológica a la bioquímica en general, sirven como un gran ejemplo de la influencia que el campo de la

³⁶ De hecho existen infinitas soluciones de tangles racionales para S y R, según el valor de T que se elija (con algunas restricciones).

³⁷ Que requiere ADN superenrollado negativamente, como se mencionó en nuestro estudio de las topoisomerasas II.

topología y la teoría de nudos ha tenido en el estudio del ADN. Aunque esta importancia se limite principalmente a la segunda mitad del siglo XX en el caso del ADN, la influencia de la teoría de nudos en otras moléculas de gran importancia biológica comenzó de forma más tardía y sigue en desarrollo hasta hoy en día, como veremos en el resto de la sección 2.

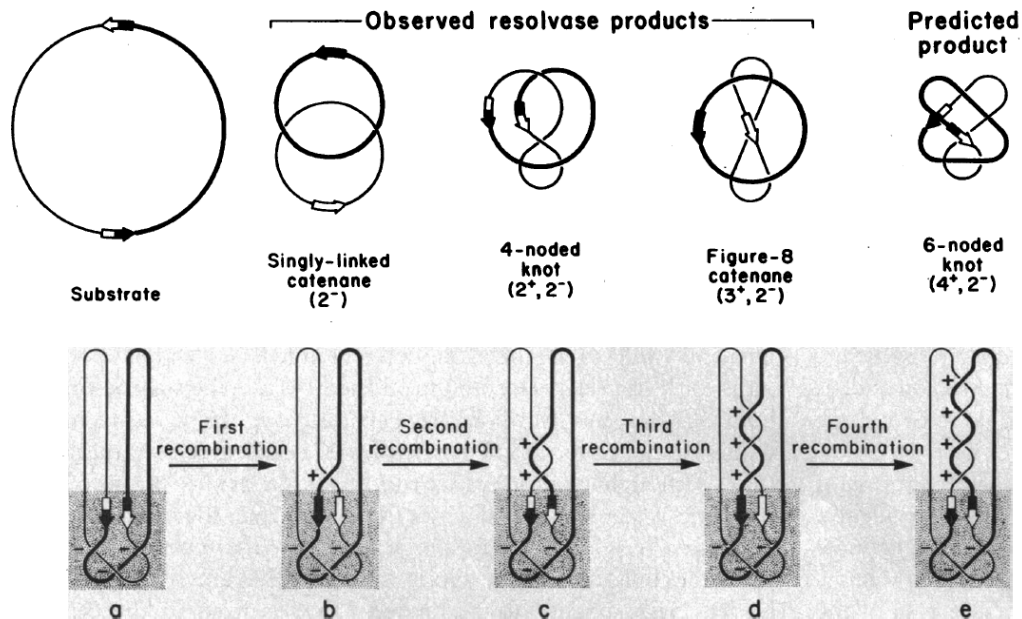


Fig. 2.2:31: Esquema para la recombinación por Tn3 resolvase. Los sitios de recombinación (flechas) dividen al sustrato en dos dominios (línea gruesa y fina). **(Arriba):** Diagramas de nudo representando de forma simplificada el ADN en cada ronda de replicación, ignorando el *supercoiling*. **(Abajo):** Diagramas representando las mismas moléculas mostrando la estructura del complejo sináptico (dentro del rectángulo más oscuro). Las sucesivas rondas de recombinación agregan un cruce de signo positivo que involucra ambos dominios. La notación en paréntesis debajo del nombre de cada nudo es una notación de *tangles* que no presentamos por simplicidad. Reproducido de Wasserman y Cozzarelli (1986).

Tangente matemática: Nudos virtuales

Como se prometió en la introducción del trabajo (y porque **se menciona en las secciones que siguen**), corresponde hablar un poco del tema de los **nudos virtuales** y las varias **teorías alternativas** de nudos que existen, y que recientemente se han aplicado a la biología. Recordemos que una palabra de Gauss es cualquier secuencia finita de pares letra-número (con dos letras: U y O) en la que cada número aparezca dos veces: una vez junto con la letra U y otra vez con la letra O. También es importante recordar que a partir de un diagrama de nudo cualquiera se puede encontrar una palabra de Gauss asociada a dicho diagrama (como se describió en la introducción).

Los nudos virtuales surgen de considerar la pregunta: “¿Si tomo una palabra de Gauss cualquiera, será la palabra de Gauss de algún diagrama de nudo?”. La respuesta es **no**, aunque no necesariamente sea obvio. (Queda como ejercicio del lector convencerse de que la palabra O1U2U1O2 no se corresponde con ningún diagrama de nudo de los que hemos considerado hasta ahora). Pero entonces, quizás podamos considerar diagramas de cosas que “no llegan a ser nudos” creando nuevos **cruces virtuales** para forzar a que nuestro diagrama tenga la palabra de Gauss deseada. La idea de estos cruces virtuales es que son “artefactos”, que en realidad no están allí donde los vemos, y que, sobretodo, no cuentan para la palabra de Gauss. A estos cruces los representamos como puntos de auto intersección marcados con un círculo, sin distinguir qué trozo “pasa por arriba” o por “abajo”, porque estos conceptos no son relevantes. A los “nudos” que pueden presentar cruces virtuales (además de los clásicos) se les llama “**nudos virtuales**”. (Figs. A1,A2)

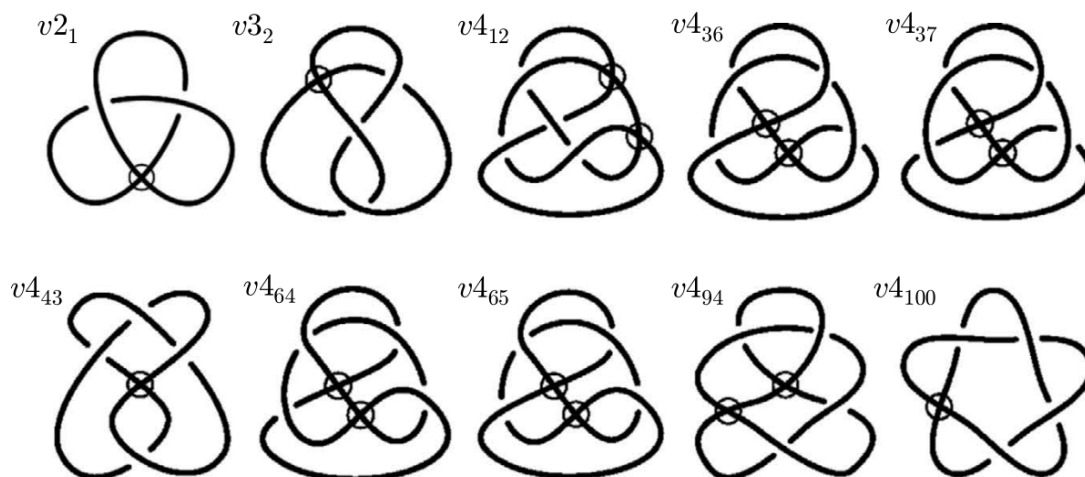


Fig. A1: Tabla con algunos nudos virtuales no clásicos, junto con su nombre. Esta tabla es análoga a las tablas de nudos clásicos, como la de la figura 1.2:1. La numeración para los nudos clásicos (vistos como un subconjunto de los nudos virtuales) es la usual, mientras que a los nudos virtuales no clásicos se enumeran usando la letra *v*, seguida por su mínimo número de cruces (clásicos) y un número como subíndice.

Para entender a qué me refiero con que “en realidad no están allí” es bueno pensar en que un diagrama de nudo es simplemente lo que se obtiene al aplastar un nudo contra un plano y después agregar información de los cruces. En este sentido, la palabra de Gauss es una enumeración ordenado de los puntos de auto intersección del nudo aplastado. Un cruce

virtual podría pensarse entonces como una parte del nudo que no pudo quedar aplastada, que “se sale del plano”, pero cuando lo vemos de arriba vemos algo así como un nuevo cruce.

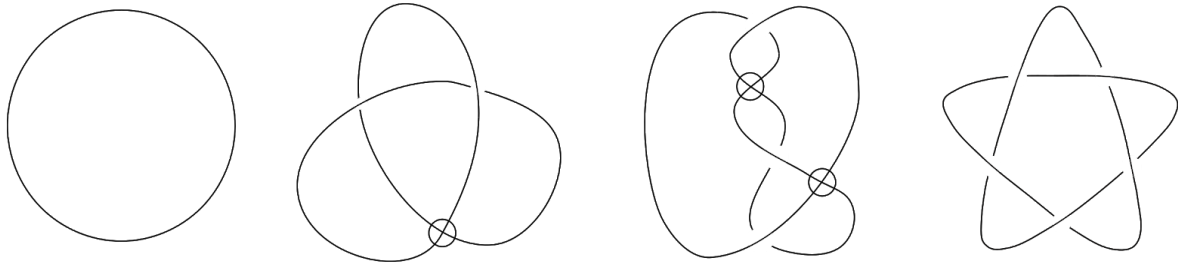


Figura A2: Ejemplos de nudos virtuales. Nótese que, según la definición dada en este texto (y que es, de hecho, la usual), los nudos clásicos también cuentan como nudos virtuales.

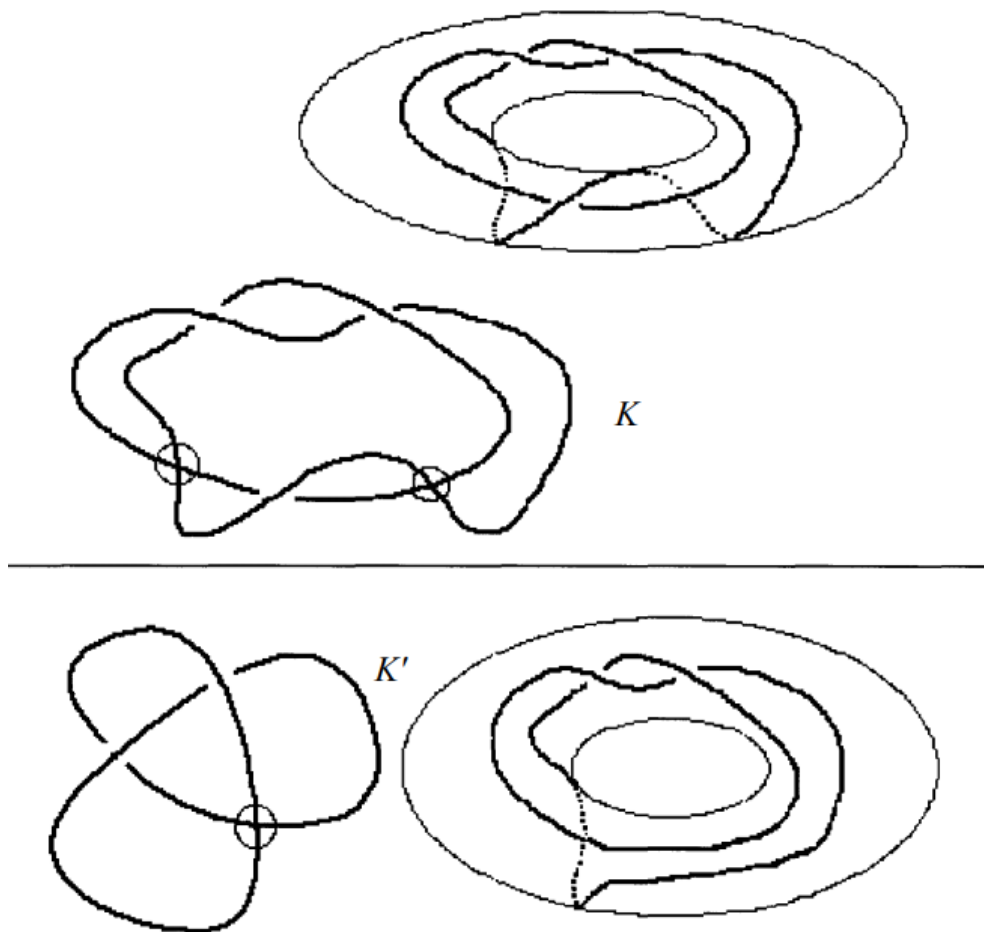


Figura A3: Ejemplos de nudos virtuales en un toro engrosado. Observar que el hecho de que haya cruces “por arriba” y “por abajo” indica que el toro es efectivamente una superficie engrosada (de lo contrario habría intersección), y que los cruces virtuales son artefactos, que aparecen al confundir los trozos del nudo que van por distintos lados del toro (línea continua y punteada, respectivamente). Reproducido de Kauffman (1999).

Otra forma quizás más formal de ver esto es decir que un nudo clásico (sin cruces virtuales) puede pensarse como que está metido en un plano engordado (desde arriba se ve como el diagrama, y el grosor permite separar las partes de abajo y arriba de cada cruce). Visto de esta forma, un cruce virtual es lo que ocurre cuando un trozo del nudo sale del plano engrosado a través de un *asa* (como un túnel) y vuelve a entrar al mismo por otro punto. Aquí queda claro que si nuestros cruces son aquellos que quedarían dentro del plano al aplastarlo, este trozo que se sale y vuelve a entrar no conforma ningún cruce, pero sin embargo, si lo veo desde arriba, parece como si lo hiciera (Fig A3). Técnicamente, se dice que los nudos virtuales son nudos en superficies engrosadas.

Por supuesto, como uno esperaría, existen movimientos similares a los movimientos de Reidemeister pero que hacen referencia a los cruces virtuales, que son consistentes con esta definición, y que nos permiten definir una equivalencia entre nudos virtuales, al considerar estos movimientos junto con los movimientos de Reidemeister clásicos de los que ya he hablado. Estos movimientos son varios, pero pueden resumirse en un solo “movimiento de redibujado”: Teniendo un diagrama de un nudo virtual cualquiera, **se puede reemplazar cualquier trozo de la curva que no contenga cruces clásicos por cualquier otra curva con los mismos extremos** (tal que el dibujo final siga siendo un diagrama de nudo), **agregando cruces virtuales en todos los puntos en que esta nueva curva se cruce con cualquier otra parte del nudo** (Fig. A4). Una vez definido este movimiento es claro a qué nos referimos con que los cruces virtuales “no están ahí”, pues podemos redibujarlos a gusto. Vale notar que este movimiento es razonable a partir de la idea de los nudos virtuales como inmersos en una superficie engrosada (para los más inclinados a la matemática: ¿Por qué es válido este movimiento, y por qué extiende bien la idea intuitiva que teníamos sobre “nudos equivalentes”?)

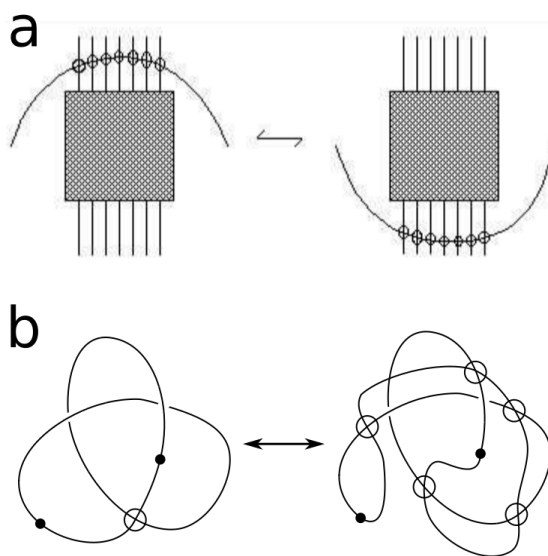


Fig. A4: El movimiento de redibujado virtual. **a:** Representación gráfica general de la operación. El bloque en gris representa cualquier sección de un diagrama de nudo; **b:** Ejemplo del movimiento aplicado al diagrama usual del nudo virtual $v2_1$. Los puntos negros delimitan el segmento (sin cruces clásicos) que se redibuja. **a** adaptada de Kauffman (1999)

Se pueden definir (como lo hizo Kauffman en su artículo original del 1999) invariantes de estos nuevos nudos, por ejemplo adaptando invariantes de nudos clásicos a los nuevos tipos de diagramas. En el caso del *bracket polynomial* (y de ahí, el polinomio de Jones), puede calcularse igual que para nudos clásicos, con la excepción de que se permite que los diagramas contengan cruces virtuales, efectivamente ignorándolos³⁸. Es fácil comprobar, a partir de esta definición (y usando los movimientos de Reidemeister virtuales) que esta construcción da un invariante de los nudos virtuales, de cálculo relativamente sencillo. Partiendo de esta base, podemos describir nuevas equivalencias en cuanto a los valores del polinomio de Jones para ciertas estructuras, como se muestra en la figura A5a. En esta se ve que, para el polinomio de Jones generalizado, un cruce clásico flanqueado por dos cruces virtuales (involucrando todas las dos mismas hebras) es equivalente a las mismas dos hebras sin ningún tipo de cruce. Es importante notar que *esto no significa que estas dos formas sean equivalentes en un diagrama de nudo*, pues esta equivalencia no se puede justificar según nuestro movimiento de redibujado. De hecho, se puede demostrar que el nudo virtual en la figura A5b no es trivial, pero usando la equivalencia de la figura A5a es fácil ver que su polinomio de Jones sí lo es.

a

$$\langle \text{diagrama con 2 cruces virtuales} \rangle = A \langle \text{diagrama con 1 cruce clásico} \rangle + A^{-1} \langle \text{diagrama con 2 cruces virtuales} \rangle =$$

$$A \langle \text{diagrama con 1 cruce clásico} \rangle + A^{-1} \langle \text{diagrama con 1 cruce clásico} \rangle \quad \langle \text{diagrama con 1 cruce clásico} \rangle = \langle \text{diagrama con 1 cruce clásico} \rangle$$

b

$$\langle \text{nudo virtual} \rangle = \langle \text{nudo trivial} \rangle = -A^3$$

Fig. A5: Algunos resultados obtenidos a partir del polinomio de Jones generalizado para nudos virtuales. **a:** A un diagrama como el de la izquierda superior, le corresponde el mismo *bracket polynomial* que al mismo diagrama con la estructura de la derecha inferior, lo cual resulta de ignorar los cruces virtuales. **b:** Debido a esta equivalencia, el nudo de la izquierda (que se puede demostrar que no es trivial) tiene un *bracket polynomial* igual al del nudo trivial, y por tanto, el mismo polinomio de Jones.

Otra forma de definir invariantes es crear una *skein relation* que haga una equivalencia entre cruces virtuales y cruces clásicos (recordar que una *skein relation* clásica era una ecuación que hacía una equivalencia entre cruces clásicos) y que sea invariante frente a los movimientos virtuales. Si se tiene una *skein relation* de ese tipo, se puede asociar a cada diagrama de un nudo virtual un diagrama de nudo clásico y a partir de allí calcular un invariante clásico. De esta forma, apenas creada la teoría de nudos virtuales,

³⁸ Por ejemplo, un diagrama con forma de 8 con un cruce clásico es equivalente al nudo trivial, pero no lo es durante el cálculo del *bracket polynomial*, pues el mismo se calcula *estrictamente* a partir de diagramas. Si este cruce fuera virtual, sin embargo, podemos tratarlo como si fuera el diagrama mínimo del nudo trivial.

existen muchos invariantes que pueden ser creados de forma relativamente rápida (pensar en *skein relations* invariantes frente a los movimientos virtuales no es nada trivial, por supuesto, pero no hay que inventar una nueva forma de calcular invariantes desde cero).

2.3 Nudos en las proteínas

2.3.1 Cómo detectar nudos en cadenas abiertas

Hasta ahora hemos tratado básicamente con nudos matemáticos clásicos. Es decir, curvas cerradas en el espacio sin “anomalías” (infinitas vueltas, secciones puntiagudas, etc.), lo cual se podría cumplir para los cromosomas, debido a que existen cromosomas circulares y que aquellos que no lo son (eg: los cromosomas eucarióticos) son de tal longitud que podemos asumir que los nudos son propiedades más o menos locales y que los extremos de la molécula están “en el infinito”. En fin, el estudio de los nudos en el ADN no requiere apartarse mucho de la teoría matemática original para ser útil, pero como veremos en nuestra revisión sobre el estudio de los nudos en las proteínas, y posteriormente en el ARN, a veces se requieren usar ciertas herramientas ya para saber *a qué nudos nos estamos refiriendo*.

Las proteínas, al igual que los cromosomas eucariotas, son polímeros lineales con extremos libres³⁹. Por supuesto, existen diferencias químicas entre ambos (fundamentalmente, un cromosoma es una secuencia de nucleótidos y una proteína es una secuencia de aminoácidos), lo que les da distinta funcionalidad y a grandes rasgos diferencia su estructura espacial (eg: el ADN suele estar presente como una doble hélice, mientras que las proteínas suelen adoptar estructuras regulares solamente por secciones de su secuencia, por lo que no es usual una proteína totalmente conformada como una hélice), pero para nuestros efectos, y los de la gran mayoría de investigadores que se han interesado por el tema de las proteínas anudadas, ambos tipos de moléculas pueden verse esencialmente como curvas abiertas en el espacio.

Aún en esta visión simplificada, permanecen un par de diferencias: primero que nada, las proteínas tienen un tamaño mucho menor que el de los cromosomas. En efecto, la proteína humana promedio tiene 375 aminoácidos, lo que se corresponde a aproximadamente 0.1 μm (Milo & Phillips, 2015; Stryer *et al.*, 2019), mientras que el cromosoma humano más pequeño mide aproximadamente 14 mm de largo⁴⁰. Aún más, las proteínas pasan por un proceso de plegamiento altamente regulado, en el cual suelen adoptar una configuración globular característica de cada una, y a partir del cual *no está muy claro cómo se podría llegar a una conformación anudada consistentemente*. Este proceso es importante pues **la conformación natural de una proteína es fundamental para su correcto funcionamiento**, y aquellas que adoptan conformaciones anómalas suelen ser eliminadas por la maquinaria celular. Todo esto contrasta con el ADN, cuya estructura es más comparable con marañas accidentales (Mallam, 2009), está siendo constantemente modificada por proteínas en gran medida conocidas y que, en el caso de

³⁹ En la estructura secundaria de las proteínas pueden haber puentes disulfuro o iones metálicos que “cierren” a la proteína. Estas características se consideraron inicialmente, pero la mayor parte del trabajo relacionado a las proteínas anudadas se basa en considerar a las proteínas como cadenas que van entre los carbonos α de los aminoácidos que la conforman. Revisitaremos la posibilidad de encontrar nudos en la estructura secundaria en la sección sobre el ARN, más adelante.

⁴⁰ El cromosoma 21 tiene aproximadamente 47 millones de pares de bases, cada una de largo aproximadamente 0.3 nm, según Ensembl 96 (Kersey *et al.*, 2018).

estar “mal plegado”, no podría ser eliminado (esto representaría un costo gigantesco para la célula).

Estas comparaciones a *grosso modo* nos permiten intuir que, a diferencia del ADN, no está claro qué tan probable es que una proteína esté anudada, y de hecho **el consenso era hasta el 2000 que no existían las proteínas anudadas**. Por si fuera poco, pueden haber verdaderos problemas a la hora de decir que una proteína está anudada: una definición intuitiva podría ser que una proteína está anudada si se mantiene anudada consistentemente en su conformación nativa⁴¹, o si su anudación es importante para su función, pero usualmente no contamos con este tipo de información, y la misma no puede obtenerse de una representación tridimensional de la misma⁴². Lo que es peor, desde cierto punto de vista, una misma cuerda en el espacio puede parecer distintos tipos de nudos ¡e incluso puede parecer no anudada! Por este motivo, para siquiera *considerar* la posibilidad de que existan proteínas anudadas, es necesario hablar sobre posibles métodos para identificarlas.

El método de Mansfield

Uno de los primeros en presentar un método para determinar si una curva abierta está anudada fue Marc Mansfield. Según él “Seremos incapaces de definir qué es un nudo en una curva abierta, pero sabemos que lo es cuando lo vemos”, mostrando ejemplos de curvas muy parecidas entre sí que pueden parecer anudadas o desanudadas dependiendo de unas simples deformaciones (Fig. 2.3:1)(Mansfield, 1994). Ya que la decisión de llamar a una curva abierta “anudada” o “no anudada” depende de un consenso entre “personas razonables”, el autor propone una respuesta de tipo estadística. Para esto, se considera una esfera centrada en el centro de masa de la proteína (pensada simplemente como una curva uniendo los carbonos α de sus aminoácidos) con radio tal que contenga totalmente a la proteína (en particular, el radio es el doble de la distancia máxima de un carbono α al centro de la esfera). Una vez construida la esfera, se eligen dos puntos al azar en la misma (con probabilidad uniforme) y se procede a *cerrar la curva* de la siguiente forma: se une al primero de los puntos elegidos con el extremo C de la proteína mediante un segmento de recta, luego se unen los dos puntos de la esfera con el arco más corto (perteneciente a la superficie de la esfera) que los una y, finalmente, se une el segundo punto elegido al extremo N de la proteína⁴³. De esta forma, se cuenta con una curva “cerrada al azar” que puede estar anudada o no⁴⁴. Se determina un **grado de desanudación** (*unknotting score*) como el número de veces que se obtiene una curva desanudada al repetir este proceso 100 veces (eligiendo cada vez nuevos punto al azar, por supuesto). Se espera, por supuesto, que una proteína *verdaderamente desanudada* tenga un grado de desanudación cercano a 0.

⁴¹ Es decir, si dicha proteína **suele parecer anudada** (signifique esto lo que signifique).

⁴² Más aún, el plegamiento de proteínas sigue siendo un problema abierto en Biología, por lo que no sería trivial estudiar si un nudo es “importante” o no para una proteína cualquiera.

⁴³ En el artículo solo se habla del “inicio” y “final” (*head and tail*) de la proteína, que identifiqué con el extremo C y N, respectivamente, aunque es indistinto.

⁴⁴ En el artículo, se determinó que una curva cerrada estaba anudada si su polinomio de Alexander era igual a 1. Aunque existen nudos no triviales con polinomios de Alexander triviales, este suele ser un buen criterio para nudos con número de cruces relativamente bajo.

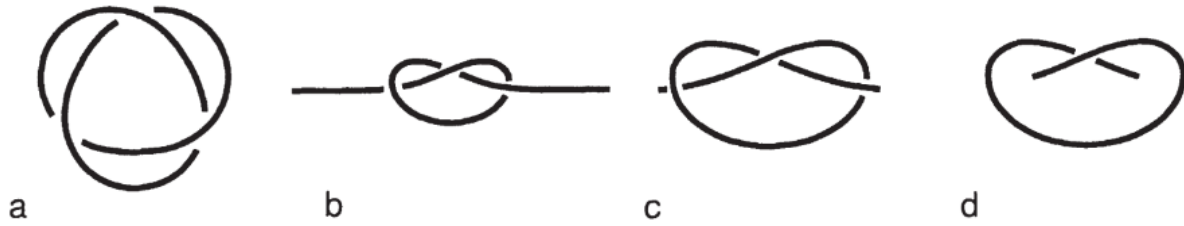


Fig. 2.3:1: Distintas curvas similares que aparentan distintos “grados” de anudación. **a:** Una curva cerrada en la que queda bien definido que está anudada en forma de un nudo trébol; **b:** Una curva abierta que se obtiene “cortando” uno de los segmentos de la curva **a**. **c,d:** curvas topológicamente idénticas a **b** pero cuyos extremos son más cortos, o equivalentemente, cuyo segmento anudado *ocupa una mayor parte de la curva*. Según Mansfield, la mayor parte de la gente estaría de acuerdo con que la curva **b** está anudada y que la curva **d** no lo está, pero el estado de la curva **c** es ambiguo. Reproducido de Mansfield (1994).

Siguiendo este procedimiento, Mansfield estudió la estructura de aproximadamente 400 proteínas diferentes, obteniendo solo tres con resultados menores a 50: anhidrasa carbónica humana, anhidrasa carbónica mutante y una neuraminidasa viral, con grado de desanudación de 22, 36 y 48, respectivamente. Luego, las mismas fueron examinadas por el autor para determinar si parecían estar, efectivamente anudadas. La que más se acercó a pasar esta prueba fue la anhidrasa carbónica (así como su mutante, de conformación casi idéntica), cuya estructura simplificada se muestra en la Figura 2.3:2. Como se ve en la figura, la anudación de la misma es ambigua, por lo que parece anudada superficialmente (*loosely knotted*) en forma de trébol. Un par de años después se reportó que la proteína adenosilmetionina sintetasa también poseía una estructura de nudo trébol superficialmente anudada (Takusagawa *et al.*, 1996; Takusagawa & Kamitori, 1996), confirmado (por Mansfield) según este método. Este método de clasificación se vuelve más robusto al observar que, en general, los extremos terminales de una proteína son hidrofílicos, y por lo tanto, suelen quedar en la periferia de la misma. Esto quiere decir que, en general, no debería haber ningún problema “cerrando la curva” de la proteína mediante cualquier curva que una ambos extremos y que pase por afuera de la proteína (como se hizo en este método) (Mansfield, 1997).

Sin embargo, como muestran los resultados del artículo de 1994, *diferentes formas de cerrar el nudo de esta forma llevan a diferentes interpretaciones sobre la identidad de un nudo*, por lo que no es tan sencillo como parece. Los resultados obtenidos según este análisis dependen, de todos modos, de un “observador razonable” para decidir si una curva efectivamente se trata de un nudo o no. Aún con estas limitaciones (y número relativamente bajo de elementos en la muestra), los trabajos de Mansfield dieron una primera demostración de lo que ya se sospechaba: más allá de la *posible* existencia de proteínas anudadas, a primera vista **no existían proteínas claramente anudadas en su conformación nativa**.

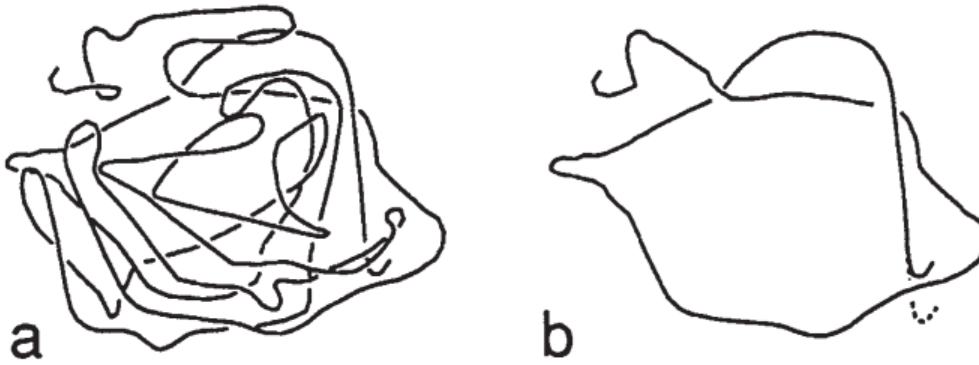


Fig. 2.3:2: Estructura esquemática de la anhidrasa carbónica humana. A pesar de su bajo grado de desanudamiento, no queda claro a simple vista si la proteína se encuentra anudada o no. **a:** Diagrama representando la cadena de carbonos α que determinan el “eje” de la proteína. **b:** Versión simplificada de la misma estructura, obtenida haciendo equivalencias topológicas simples pero manteniendo los extremos (y ciertas partes de la cadena) inmóviles. La línea punteada está simplemente para indicar que en los otros puntos de vista se observa que ese extremo efectivamente “se mete” por el arco más cercano, lo cual no se llega a apreciar de este punto de vista. Adaptada de Mansfield (1994)

El método de Taylor

Tratando de evitar el problema del “punto de vista” a la hora de determinar la identidad de una curva abierta presente en el método de Mansfield, Taylor propuso un algoritmo, supuestamente libre de arbitrariedades, que permite identificar si una curva abierta está anudada o no (Taylor, 2000). Según el autor “Tirar de los extremos de un trozo de cuerda usualmente determina si la misma está anudada o no”, lo cual parece coincidir con la intuición usual. Complementariamente, pueden mantenerse los extremos fijos y *achicar el resto de la curva*. El algoritmo básicamente consiste en, progresivamente, reemplazar la posición de cada uno de los carbonos α de la cadena (los vértices de la curva poligonal) por el promedio de las posiciones de sí mismo y los dos adyacentes (el carbono anterior y el siguiente). Para asegurarse que la cadena nunca se atravesara a sí misma, cada vez que ocurría un paso en el que esto pasaría, se salteaba el mismo y se continuaba con el resto del algoritmo. Finalmente, se obtiene una curva que se parece en gran medida a una recta uniendo los dos extremos (que quedan fijos). Si la misma no contenía nudos, será efectivamente una recta, pero si existen anudaciones, las mismas impedirán el avance del algoritmo tal que se bloquee el proceso (Fig. 2.3:3).

Para disminuir aún más el tiempo de ejecución, se asumió que cada enlace entre carbonos α tenía un cierto grosor impenetrable (inicialmente $1\text{\AA}$) y que si tres carbonos seguidos quedaban aproximadamente colineales, podía eliminarse el central sin alterar la estructura de la curva. De esta forma, no estar anudado equivale a que el proceso termine formando una curva de solo dos puntos (los extremos), mientras que cualquier curva anudada terminaría con un número mayor de carbonos en su versión final (Fig. 2.3:4). Luego de identificado un nudo, se empezaban a eliminar residuos desde los extremos hasta llegar a la mínima región que estaba anudada según este método, determinando la

profundidad del nudo (en cierta forma, una medida de qué tan “verdadero/ambiguo” es un nudo, como en la figura 2.3:1). Usando este método se determinó **la primera proteína “profundamente anudada”**, la acetohidroxiácido isomeroeductasa, con el código PDB (*Protein Data Bank* (Berman *et al.*, 2000)) 1yvel, así como un total de 9 proteínas anudadas después de un análisis de todas las proteínas disponibles en el PDB en aquel momento.

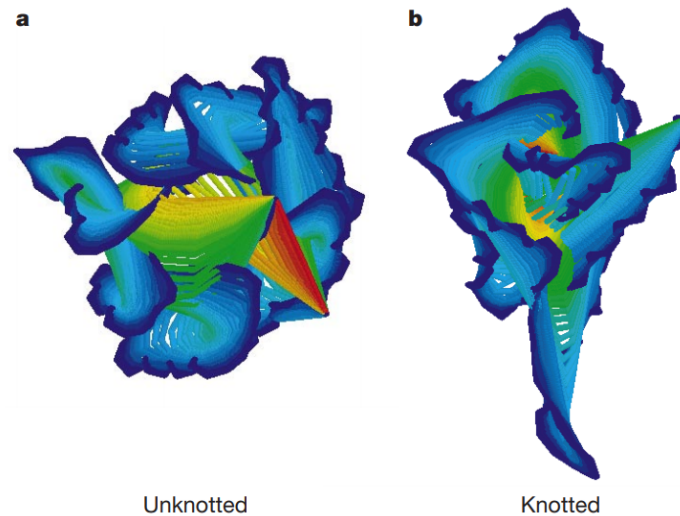


Fig. 2.3:3: Estructuras simplificadas de proteínas. Aplicando el algoritmo de Taylor se obtiene una secuencia de curvas (de azul a rojo) cada vez más simples. **a:** Algoritmo aplicado a una proteína desanudada, nótese que la curva final (en rojo) se corresponde a una recta simple entre los dos extremos originales; **b:** El mismo algoritmo aplicado a la proteína anudada acetohidroxiácido isomeroeductasa (1yvel), no se observa ninguna recta roja final, y los últimos pasos del algoritmo se encuentran “enterrados” en el centro de la proteína. Reproducido a partir de Taylor (2000).

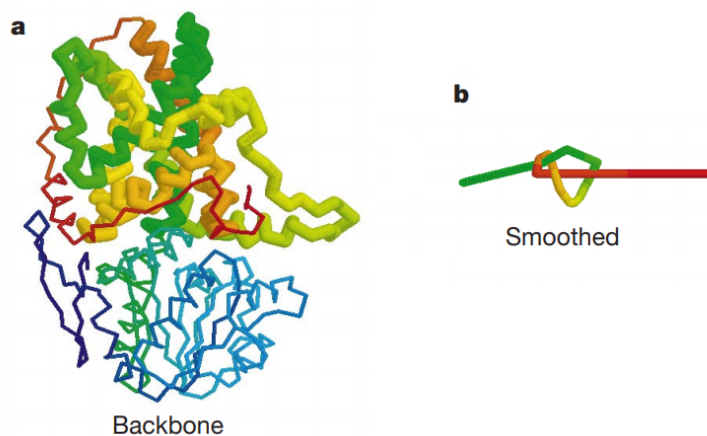


Fig. 2.3:4: El nudo en la proteína 1yvel. **a:** Representación tridimensional del esqueleto de la proteína (coloreado de azul a rojo en el sentido de la orientación de la proteína). Las partes engrosada son aquellas que conforman el nudo, las partes azules y verdes corresponden a un dominio de unión a nucleótidos y la parte roja forma un lazo que rodea el dominio anudado. **b:** El nudo en 1yvel obtenido a partir del algoritmo simplificado, con los mismos colores que se muestran en **a**, obtenido luego de 50 iteraciones. Se observa claramente un nudo *figure-of-eight* (el nudo de 4 cruces) en la misma. Adaptada de Taylor (2000).

A pesar de la aparente objetividad que provee este algoritmo, algunos autores han señalado que el resultado final depende de a partir de qué orden se inicie la simplificación. Más aún, si se avanza en un orden aleatorio, es posible obtener varios resultados diferentes (Millett *et al.*, 2013). En el caso de la proteína 1yvel, luego de 50 experimentos de este tipo se obtuvo siempre el mismo resultado, pero para otras proteínas como 3BJX (proteína Dehl) estos experimentos diagnosticaron una estructura anudada de nudo 6_1 la mitad de las veces y una estructura desanudada el resto del tiempo. Esto muestra que aun siendo efectivo para la identificación de ciertas proteínas, el método de Taylor sigue sin ser objetivo, y un estudio estadístico de los diferentes posibles resultados no permite aclarar la situación para algunas proteínas, como 3BJX, que podría incluso no estar anudada.

Método de Millett-Dobay-Stasiak

Preocupados por la dependencia del método de Taylor con respecto al orden en que se analiza una secuencia, Millett, Dobay y Stasiak propusieron un tercer método, bastante cercano al de Mansfield en teoría (Millett *et al.*, 2013). Mientras que el método de Mansfield es un método estocástico doble (*double stochastic*) pues se toman dos puntos de la esfera al azar en cada paso, el método de Millett, Dobay y Stasiak (MDS) es un método estocástico simple (*single stochastic*), en el cual se toma un punto al azar en la esfera (que se define de forma similar a la definida por Mansfield) y se unen ambos extremos del esqueleto proteico al mismo mediante segmentos de recta (Millett *et al.*, 2005). Esto define (en general⁴⁵) una curva cerrada que puede clasificarse según el uso de polinomios, por ejemplo. Repitiendo este procedimiento muchas veces, se puede aproximar una función localmente constante en casi todos los puntos de la esfera que *a cada punto le asigna un tipo de nudo* (Fig. 2.3:5).

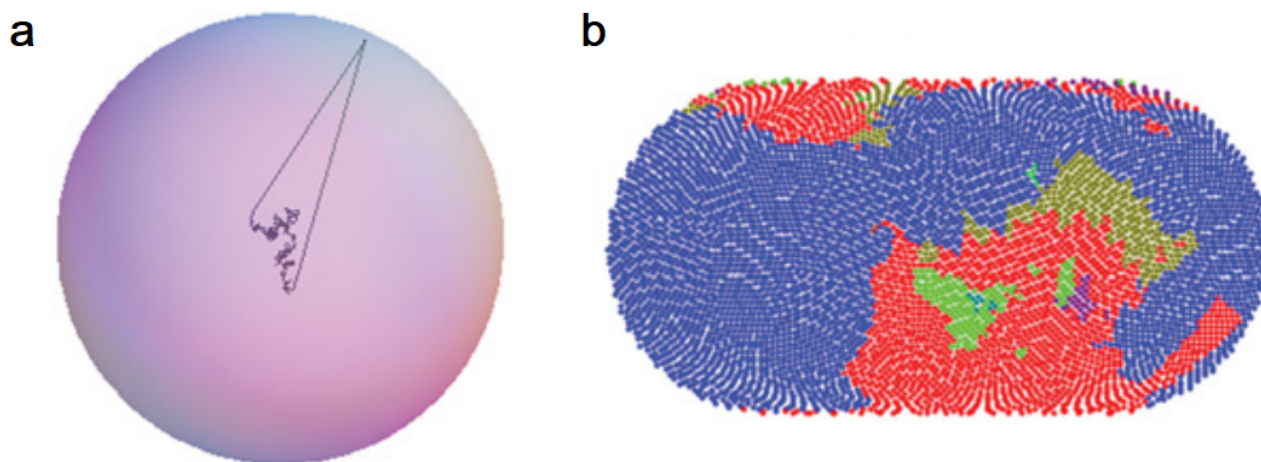


Fig. 2.3:5: Estudio de la proteína 3BJX bajo el método MDS. **a:** Ilustración del método MDS, un método estocástico simple en el cual se eligen puntos al azar de la superficie de una esfera de a uno, a partir de los cuales se cierra la curva determinada por el esqueleto de la proteína y se determina su identidad; **b:** Aproximación de la función que va desde la esfera al conjunto de los nudos después de 64000 iteraciones, representado en este caso en una proyección de la esfera de tipo Eckert IV. El azul (64% del área) representa el nudo 6_1 , rojo (27%) el nudo trivial, verde oscuro (6%) es 4_1 y verde claro (2.5%) es 3_1 , el trébol. Adaptado de Millett *et al.* (2013).

⁴⁵ Cabe la posibilidad de que los nuevos segmentos atraviesen segmentos ya existentes de la curva, pero el conjunto de puntos para el que ocurre esto tiene medida nula, por lo que es prácticamente imposible elegir uno de estos puntos al azar en la esfera.

Este método reconoce el problema originalmente reconocido por Mansfield: que la identidad de una curva abierta es una cuestión probabilística, y no puede ser determinada de forma única y objetiva. De esta forma, los autores proponen una definición estadística para la identidad de una curva abierta como “aquel nudo que se identifique en mayor proporción al realizar un número grande de este método”, o equivalentemente “aquel nudo cuya preimagen en la esfera ocupa más área” (Millett *et al*, 2013). Esta definición, como ya se dijo, no pretende representar una visión única de los nudos, y permite un análisis más simple que el del método de Mansfield (debido al uso de una sola variable aleatoria) que produce resultados similares⁴⁶. Por otro lado, cabe la posibilidad de que una curva se identifique en un 40% de los casos con el nudo trivial, en 30% con 3_1 y 30% 4_1 , en cuyo caso se diría que esta curva *no está anudada* a pesar de que está anudada en la mayor parte de los casos, lo cual parece ser una mala representación de la realidad (Alexander *et al.*, 2017).

Aún sin ser perfecto, este método tiene muchas cualidades positivas, lo cual lo ha convertido en un método estándar para este tipo de estudios (Jamroz *et al*, 2014; Alexander *et al*, 2017). Según este método, en un análisis del PDB se había encontrado (hasta Setiembre de 2016) que 946 del total de 159.518 proteínas estaban estadísticamente anudadas (Jamroz *et al*, 2014).

Las proteínas vistas como nudos virtuales

Otra técnica posible para identificar la estructura de una curva abierta fue presentada por Alexander, Taylor⁴⁷ y Dennis basándose en el uso de la **Teoría de nudos virtuales** (que fue presentada antes de la sección 2.3). De hecho, la misma es muy similar al método MDS, pero presenta ciertas características que parecerían reflejar mejor la topología de las curvas abiertas. En esta técnica se considera una esfera externa a la curva, que la englobe totalmente, y a cada punto se le asigna un nudo virtual (posiblemente clásico, por supuesto) que se obtiene mirando la curva “desde ese punto en la esfera”. Es decir, para cada punto de la esfera se toma la proyección del nudo en esa dirección (como si el observador estuviese parado en ese punto, mirando hacia el centro de la esfera). Se obtiene así una curva abierta que puede ser *cerrada virtualmente*, es decir, pueden unirse sus extremos con un segmento de curva *cualquiera*⁴⁸ tal que cada intersección de esta nueva curva con la curva original se corresponda con un *cruce virtual*. Se obtiene, como para MDS, un nudo (ahora virtual) para cada punto de la esfera, y se considera que aquel que ocupe una mayor cantidad de área es la identidad de la curva abierta original (Alexander *et al.*, 2017).

Recordamos que eliminar una sección de nudo virtual que *solo contenga cruces virtuales* y reemplazarla por cualquier otra sección con los mismos extremos que también solo contenga cruces virtuales es una operación que **no cambia la identidad del nudo**. Debido a esto, no hay ninguna ambigüedad a la hora de cerrar la curva correspondiente a

⁴⁶ Eg: el método de Mansfield, aplicado a la proteína 3BJX con 1000 repeticiones, produjo 22 posibles nudos, con porcentajes bastante similares a los obtenidos por el método MDS. Particularmente, 6_1 siguió siendo el preferido, apareciendo un 47.5% de las veces versus el nudo trivial, que apareció un 35% de las veces.

⁴⁷ No es la misma persona que describió el método de Taylor (por si algún lector siente curiosidad).

⁴⁸ Tal que la proyección final sea un diagrama de nudo, por lo que se deben observar las restricciones usuales.

cada punto: cualquier camino que se elige produce el mismo resultado⁴⁹. Esto no necesariamente elimina la ambigüedad de otros métodos (la forma de cerrar la curva sigue dependiendo del punto desde donde se vea), sigue ocurriendo que la curva se identifica de diferentes formas dependiendo del punto desde dónde se proyecta y, de hecho, ahora existen más nudos posibles para asignarle a una curva, pues existe la posibilidad de que una proteína se corresponda a nudos no clásicos desde ciertos puntos (Fig. 2.3:6). De hecho, los autores señalan este punto como una debilidad de este método, lo que aumenta la probabilidad de que se dé una situación como la mencionada anteriormente: que el nudo mayoritario sea el trivial, a pesar de que la mayor parte de las proyecciones sean de diferentes nudos no triviales. Para resolver esto, los autores proponen una nueva definición: una curva abierta está desanudada si y sólo si se corresponde al nudo trivial en por lo menos el 50% de las proyecciones, si no, está anudada (*aunque no se le pueda asignar un tipo de nudo concreto*).

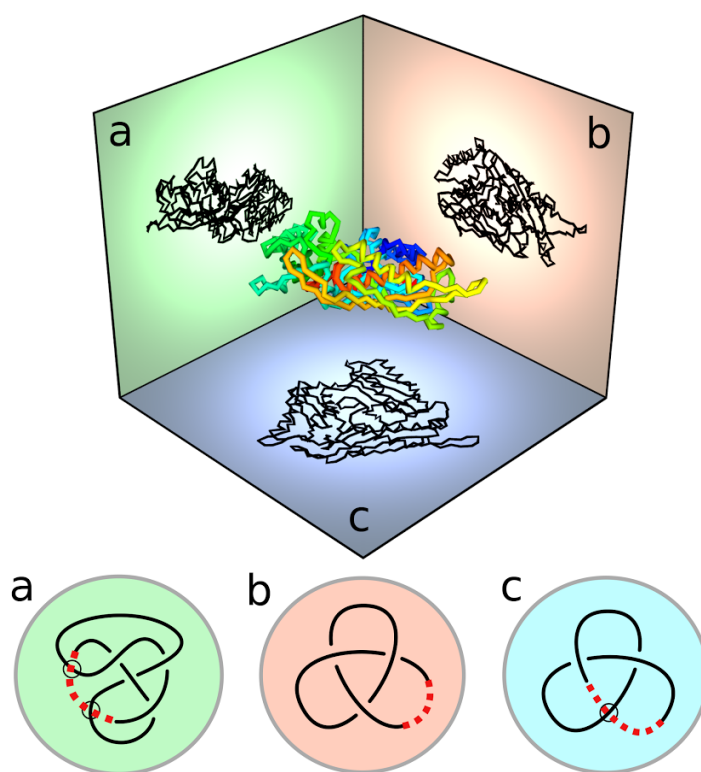


Fig. 2.3:6: Proyecciones de una molécula tridimensional en 3 planos diferentes. La proteína en cuestión puede proyectarse en infinitos planos, pero aquí se ilustran tres planos ortogonales entre sí, demostrando los distintos nudos que pueden identificarse de esta forma. (Arriba) Modelo tridimensional del esqueleto de una proteína, así como sus correspondientes “sombras” en cada uno de 3 planos perpendiculares entre sí; (Abajo) Diagramas mínimos de los nudos obtenidos a partir del “cerrado virtual” de sus correspondientes proyecciones. Obsérvese que dos de estas proyecciones (**a** y **c**) dan nudos virtuales no clásicos y una (**b**) da como resultado el nudo trébol clásico. Crédito: University of Bristol.

⁴⁹ Aún más, el nudo asignado a un punto es igual al asignado a su antípoda. Esto se debe a que los cruces virtuales que pueden haber sido introducidos no son “por arriba” ni “por abajo”, por lo que ver desde puntos opuestos de la esfera es equivalente a invertir todos los cruces del diagrama, lo que no altera el nudo. Observar que esto no siempre ocurre con el método MDS.

Por otro lado, este método permite identificar ciertas propiedades que permanecen “ocultas” según los otros métodos. Debido a la inclusión de todos los nudos virtuales, es posible que una proteína que antes era clasificada como un cierto nudo clásico ahora pueda ser mejor clasificada como un nudo no clásico, como es el caso de la proteína S-adenosilmetionina sintetasa de *Sulfolobus solfataricus* (PDB: 4K0B). Bajo el algoritmo MDS, un 59% de las direcciones le asignan 3_1 , 34% el nudo trivial y 7% nudos más complejos. Por otro lado, bajo este algoritmo, una gran parte del área asociada a 3_1 o al nudo trivial pasa a estar asociada al nudo $v2_1$ (Fig. 2.3:7). Esto denota el “fuerte carácter virtual” de dicha proteína (Alexander *et al.*, 2017), y su tipo de nudo virtual representa la ambigüedad entre el trébol y el nudo trivial presente en la curva abierta original.

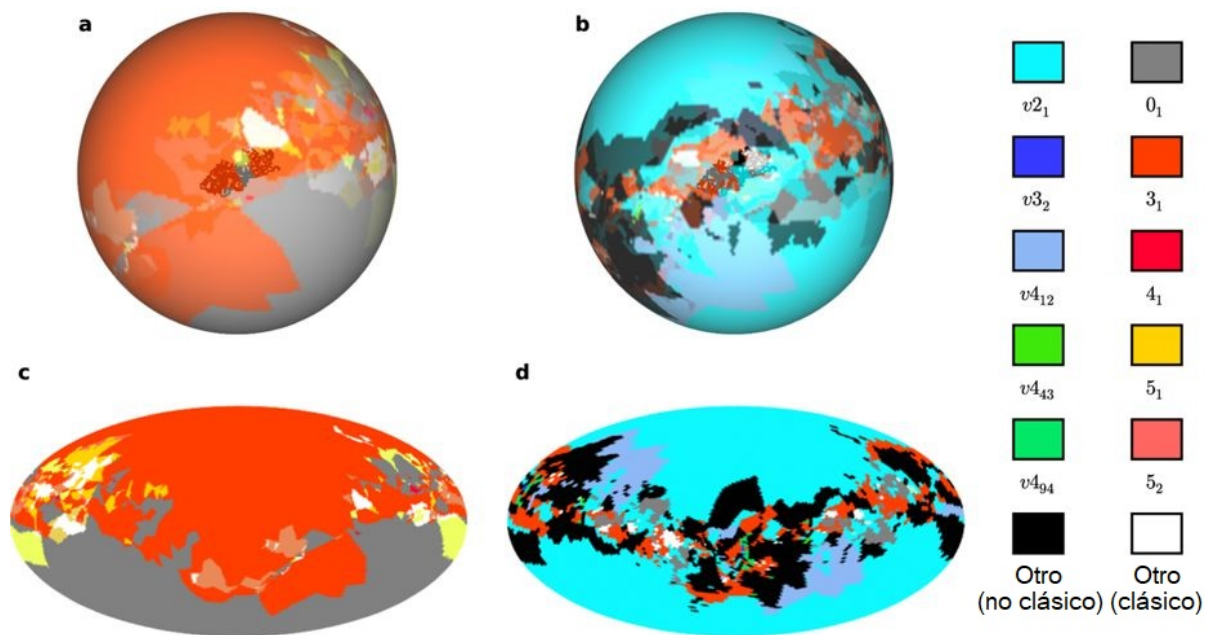


Fig. 2.3:7: Análisis de la proteína 4K0B según el método MDS y el método de cerrado virtual. **a:** Nudos clásicos obtenidos para cada punto en la esfera mediante MDS; **b:** Nudos virtuales obtenidos para cada punto en la esfera mediante el método de cerrado virtual; **c,d:** Proyección de Mollweide para **a** y **b**, respectivamente. Los colores indican a qué nudo le corresponde cada punto de la esfera. Se observa que bajo MDS, el nudo dominante es 3_1 , mientras que bajo cerrado virtual, el nudo dominante es $v2_1$. Adaptado de Alexander *et al.* (2017).

Usando esta técnica, los autores identificaron 1258 proteínas anudadas, divididas en clases según si están **fuertemente clásicamente/virtualmente anudadas** (hay un nudo que representa por lo menos el 50% de las proyecciones, y es clásico/no clásico) o **débilmente anudadas** (la mayor parte de las proyecciones están anudadas, pero no hay un tipo mayoritario). Si una curva está débilmente anudada y la suma de las áreas correspondientes a nudos clásicos (no clásicos) no triviales es mayor al 50%, entonces se dice que está débilmente clásicamente (virtualmente) anudada. Si una curva está débilmente anudada pero la suma de todos los nudos clásicos/no clásicos no triviales no llega al 50%, se dice que está débilmente totalmente anudada. Según esta clasificación, encontraron que la gran mayoría de proteínas anudadas estaban fuertemente clásicamente

anudadas, seguido por el conjunto de proteínas débilmente virtualmente anudadas, las débilmente totalmente anudadas, las fuertemente virtualmente anudadas y las débilmente clásicamente anudadas (Fig. 2.3.8). Todos los nudos fuertemente clásicamente anudados se clasifican como anudados según MDS.

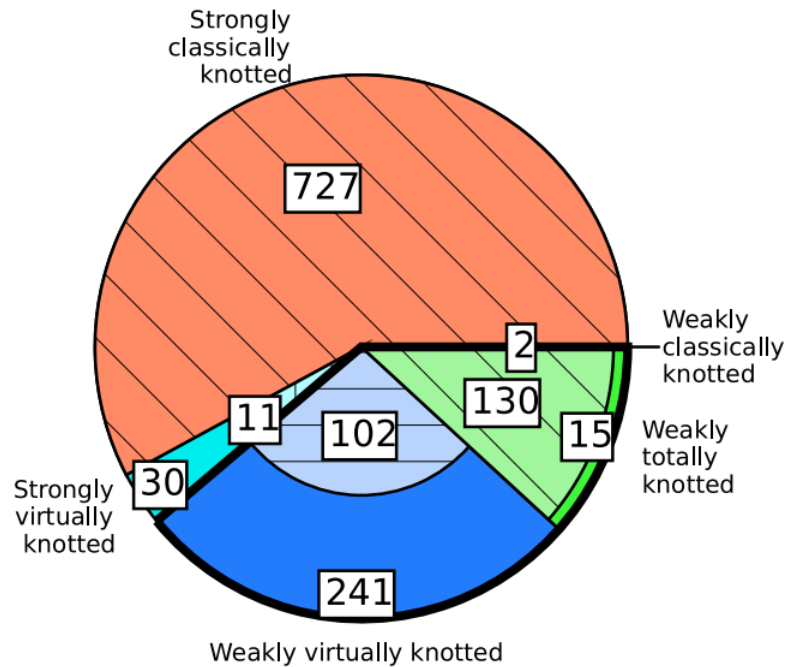


Fig. 2.3:8: Clasificación de nudos anudados según cerrado virtual. Los números indican el número de proteínas en esa clase. Las áreas rayadas representan aquellas proteínas que se consideran anudadas bajo el algoritmo MDS. Adaptada de Alexander *et al.* (2017).

Este método no busca reemplazar el de MDS, sino refinarlo, y permite observar propiedades típicamente ignoradas de las proteínas y su topología. Es particularmente útil en el estudio de proteínas “casi anudadas”, que presentan ambigüedades en la dicotomía anudado vs desanudado. Estas proteínas se representan por nudos virtuales muy simples, y permiten tener una clasificación más detallada de las proteínas en general, pudiendo servir como “puntos de transición”, por ejemplo en el pasaje de una proteína no anudada a una anudada o entre distintos tipos de nudos a lo largo de la evolución. Un análisis como el de MDS en este tipo de transiciones podría dar que una proteína pasa, por ejemplo, de 3_1 al nudo trivial a 4_1 , mientras que un análisis de cerrado virtual podría capturar la esencia transitoria de las formas intermedias. Una vez más, aunque este método no es perfecto ni da definiciones totalmente libres de ambigüedades, permite una exploración más profunda de los nudos en las proteínas y es, hasta donde he podido encontrar, el método más moderno para su estudio, por lo que se necesitará tiempo para poder observar su utilidad en la práctica.

2.3.2 Preguntas sobre las proteínas anudadas

Un par de cosas deben quedar claras de la sección 2.3.1. Primero, la tarea de estudiar los nudos en proteínas, así como la pregunta “¿Existen las proteínas anudadas?” y

similares, dependen de definiciones que dejan siempre algún tipo de ambigüedad. Segundo, que a pesar de estas ambigüedades, existe el consenso de que **existen las proteínas anudadas**, lo cual puede parecer sorpresivo (o no) tomando en cuenta lo mencionado en las secciones 2.1 y 2.2. Finalmente, y quizás más esperable, es que a pesar de que existen proteínas anudadas, son *muy poco comunes*, estimándose en 1 cada 160 según los métodos antes presentados (aproximadamente 0.6%). Este porcentaje es mucho menor que el que esperaríamos si las proteínas se plegaran al azar (Millett *et al.*, 2005)⁵⁰, lo que parece confirmar nuestra intuición de que **las proteínas anudadas están bajo selección negativa**, es decir que típicamente una proteína que tendiera a anudarse durante su proceso de plegamiento sería de “menor utilidad” que una proteína similar sin anudar. Esto podría darse, por ejemplo, si *el proceso de anudarse fuese demasiado largo*, haciéndolo ineficiente, o si anudarse fuese tan complicado que *las proteínas que lo hicieran tuvieran una probabilidad mucho mayor de doblarse incorrectamente* (comparadas con aquellas de topología trivial), generando así un gran número de proteínas mal plegadas y potencialmente dañinas.

Por el otro lado, sin embargo, esto implica que ese pequeño porcentaje de proteínas anudadas poseen alguna característica especial que hace que **los nudos hayan sobrevivido como parte fundamental de su estructura** a pesar de las complicaciones que esto puede introducir en el plegamiento. Debido a que **el plegamiento de proteínas** sigue siendo un problema abierto en la biología, entender qué movimientos llevan a la anudación de algunas proteínas y no de otras, así como estudiar el rol funcional de los nudos en las mismas hace que comprender a este pequeño grupo de macromoléculas sea de particular importancia para la biología moderna (Mallam, 2009).

En lo que queda de la sección 2.3, intentaremos revisar algunas de las características de las proteínas anudadas para que el lector tenga una mejor idea de las peculiaridades de este clase de macromoléculas, empezando por preguntarse ¿cómo llega a anudarse una proteína?

¿Cómo se pliegan las proteínas?

El motivo fundamental por el cuál nos parece intuitivo que las proteínas anudadas sean escasas se debe a que **una proteína anudada debería tener problemas para plegarse**. Esencialmente, estos problemas serían energéticos, cinéticos y simplemente debidos a los movimientos necesarios para atar un nudo, problemas que trataremos a continuación.

Consideraciones iniciales

Recordemos que las proteínas son sintetizadas como un polímero lineal de distintos aminoácidos en una secuencia específica (teóricamente) sin estructura tridimensional. Luego, y en relativamente poco tiempo (de milisegundos a unos pocos segundos (Lipman *et al.*, 2003)) este polímero *se pliega*, adoptando su conformación nativa. El problema del plegamiento de proteínas puede ser expresado en dos partes (Mallam, 2009):

⁵⁰ Por ejemplo, en ese trabajo Millett *et al.* obtienen, mediante experimentos computacionales, que la probabilidad de que una curva aleatoria de 300 segmentos de largo (similar al largo de una proteína promedio) es mayor al 60%.

1. ¿Cómo hace una secuencia de aminoácidos dada para especificar la estructura funcional final (nativa) de una proteína?
2. ¿Cómo llega la proteína a dicho estado final a partir de su estado inicial desplegado (desnaturalizado)?

Una observación inicial necesaria es la de la **paradoja de Levinthal** (1969): supongamos una proteína con solamente 60 aminoácidos, con 10 conformaciones posibles para cada uno (ie: posibles ángulos entre residuos adyacentes). En ese caso, existen 10^{60} conformaciones posibles para la proteína, y solo una es la nativa. Aún si asumimos que la proteína pasa por cada una cada 10^{-12} s (en el orden de los picosegundos), entonces se podrían necesitar 10^{48} s (en el orden de 10^{41} años) para que la proteína llegue a su estado final, si asumimos que todos los estados tienen igual probabilidad de ser “visitados”. Esto claramente nos indica que durante el plegamiento **no todos los estados tienen igual probabilidad**. Es decir, la proteína no puede recorrer el espacio de conformaciones de forma totalmente aleatoria, como lo haría una curva aleatoria⁵¹. por el contrario, debe haber alguna “dirección” en la que suele ir y que, a la larga, la lleva a su conformación nativa. A su vez, la conformación nativa debe tener alguna característica que la haga “atractiva” durante el proceso de plegamiento, así como que la haga “final”. Es de interés notar que esta es una característica que diferencia fundamentalmente a los modelos de polímeros aleatorios de las proteínas verdaderas, y seguramente esté relacionado con la poca abundancia de proteínas anudadas: una curva aleatoria puede adoptar cualquier conformación espacial, pero es posible que los nudos en general carezcan de esa condición “atractiva y final” propia de las conformaciones nativas.

Los modelos más usuales de plegamiento de proteínas suelen asumir que **la conformación nativa es la conformación que tiene menor energía**. Debido a esto, la proteína no puede salir de su estado nativo sin energía externa, lo que hace que sea una conformación estable. Más aún, una proteína en un estado cualquiera tiende a disminuir su energía, por lo que el camino que recorre en el espacio de conformaciones es siempre “en bajada” hasta llegar a un mínimo⁵². Siguiendo este proceso, se suele terminar en un mínimo de energía, que puede ser el estado nativo o *una trampa*, es decir, un estado no nativo del que es difícil salir. A las interacciones que ocurren entre los distintos aminoácidos en la conformación nativa se les llama **interacciones nativas**. Se suele decir que una conformación es “más nativa” que otras (o que tiene un “mayor grado de natividad”) si tiene un mayor número de interacciones nativas.

⁵¹ Puede modelarse el “plegamiento” de una curva aleatoria como el “colapso” de la curva, es decir, se puede obtener una curva aleatoria en el espacio y luego dejar que se comprima, llegando así a un “plegamiento aleatorio”.

⁵² Se asume que el movimiento entre conformaciones es aleatorio (debido a la agitación térmica), pero la proteína es más estable cuanto menor su energía, por lo que tiende a minimizarla.

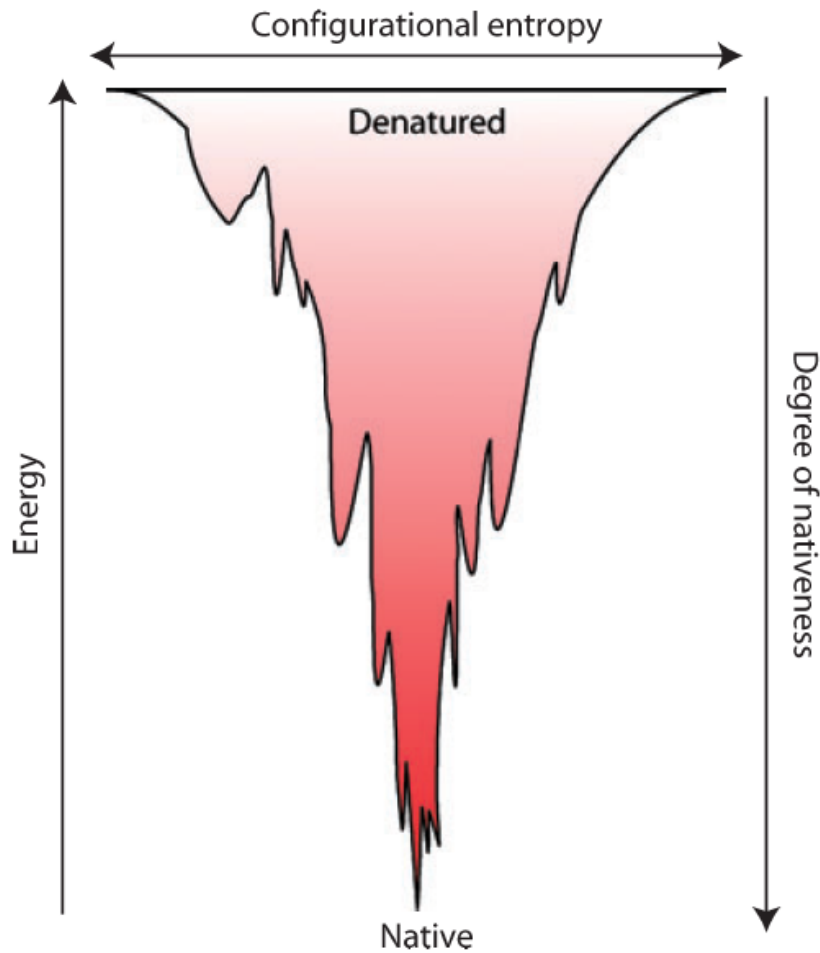


Fig. 2.3:9: Corte de un paisaje de energía que representa el plegamiento de una proteína desde su estado desnaturalizado inicial a su estado nativo final. En general se asume que este tipo de paisajes tiene forma de embudo, lo que permite que la proteína explore el espacio de conformaciones por relativamente poco tiempo antes de llegar a su conformación nativa. El eje y representa el nivel de energía de cada conformación o, alternativamente (en sentido contrario) el porcentaje de interacciones nativas de cada conformación. El ancho representa en este caso la “entropía conformacional” (número de conformaciones) para cada nivel de energía. Reproducido a partir de Mallam (2009).

Debido a la velocidad y eficiencia con la que el plegamiento ocurre en la naturaleza, se suele usar el **“Principio de mínima frustración”** (Best *et al.*, 2013), que propone que el paisaje de energía de las proteínas ha sido moldeado por la evolución de tal forma que la energía se encuentra correlacionada lo más posible con el grado de natividad. Por este motivo, se suele usar el modelo del **paisaje de energía en forma de embudo**⁵³ (Mallam, 2009), es decir que existe un mínimo absoluto de energía (la conformación nativa) y que el número de conformaciones disminuye cuanto menor es la energía (Fig. 2.3:9). De esta forma, si la proteína tiende a “descender”, va recorriendo configuraciones cada vez “más nativas” hasta llegar a la nativa propiamente dicha. Cuántos menos picos tenga este paisaje y cuanto más empinado sea, más rápido y eficiente será el plegamiento. Se cree que la

⁵³ A cada conformación (un punto en un espacio de muchas dimensiones) se le asigna una cierta energía (un número real) que puede ser vista como una “altura”, por lo que se puede visualizar a cada conformación junto con su energía como un “paisaje”.

mayoría de las proteínas han evolucionado hasta tener esta forma, por lo que durante el plegamiento no tienden a acumular conformaciones intermedias, que podrían tender a agregarse o plegarse incorrectamente (King *et al.*, 2010).

Conforme con el principio de mínima frustración, se asume que las proteínas se pliegan aumentando su grado de natividad con el tiempo, lo que significa que el plegamiento es simplemente una búsqueda de nuevas interacciones nativas (que se suponen las más estables). Esto significa que, en cierta forma, el estado final determina fundamentalmente el camino, y que el posible efecto de las interacciones “no nativas” que puedan ocurrir y que no tienen nada que ver con el estado final, es despreciable. Esto equivale a decir que **las contribuciones energéticas de las interacciones nativas son las únicas fuerzas que determinan el plegamiento de las proteínas**. Este principio puede usarse para modelar el proceso de plegamiento sin tener que considerar *todas las interacciones posibles entre todos los distintos átomos de una proteína*, lo que simplifica su estudio en gran medida. A este tipo de modelos computacionales se los llama **modelos de Go** (Ueda *et al.*, 1975), nombrados en honor a Nobuhiro Gō, que los propuso.

Los modelos de Go suelen ser usados para predecir la secuencia de conformaciones que adopta una proteína al plegarse, y recientemente se ha comprobado que sus predicciones suelen coincidir con modelos más complejos que toman en cuenta muchas más posibles interacciones entre átomos (Best *et al.*, 2013). Sin embargo, una tarea en la que han fallado en general es al *tratar de predecir cómo se pliegan las proteínas anudadas*, y más aún, *cuántas proteínas logran llegar a su conformación nativa anudada* (Jackson *et al.*, 2017). Por ejemplo, en el caso de las carbamoiltransferasas (nudo trébol), simulaciones usando modelos de Go no lograron encontrar ninguna tendencia a anudarse, mientras que modelos de Go modificados para tomar en cuenta algunas interacciones no nativas mostraron tendencias *muy bajas* (0.5%) a anudarse (Škrbić *et al.*, 2012). Similarmente, al usar este tipo de modelos para simular el plegamiento de Dehl (nudo 6₁) se obtuvieron resultados exitosos en solamente 0.6% de los casos (Bölinger *et al.*, 2010).

En el caso de YibK y YbeA (3₁) han habido distintos experimentos con modelos de Go, con diferentes grados de éxito. En un caso, estos modelos permitieron obtener conformaciones con un 80% de interacciones nativas como máximo, pero el estado anudado final pudo obtenerse *en todas las simulaciones* al **considerar interacciones no nativas entre el extremo C y la región media de la cadena** (Wallin *et al.*, 2007) por dos vías distintas posibles, una temprana y otra tardía (20% vs 80% de interacciones nativas, respectivamente). Otros estudios pudieron obtener conformaciones anudadas considerando *solamente* interacciones nativas, pero esto se logró a cambio de sacrificar la eficiencia del proceso (se llegaba al estado nativo en solo 1-2% de las simulaciones (Sułkowska *et al.*, 2009)) o la complejidad del estado nativo (en Prentiss *et al.* (2010) se asumió un nudo más superficial para calcular la velocidad máxima del proceso). Finalmente, un modelo de Go con una “definición laxa” de interacciones nativas (similar a la usada por Wallin *et al.* (2007)), tomando en cuenta **efectos co-traduccionales**, logró aumentar en gran medida el número de plegamientos exitosos, lo que se debe a un movimiento que ocurre mientras la cadena sigue unida al ribosoma, y que finalmente lleva al correcto anudamiento de la misma (Chwastyk & Cieplak, 2015a). Curiosamente, los mismos investigadores encontraron que un modelo de este estilo, que tomara en cuenta efectos co-traduccionales, permitía aumentar

en gran medida el porcentaje de plegamientos exitosos para MJ0366, la proteína anudada más pequeña conocida, para la cual se habían obtenido solamente un 1% de casos exitosos usando modelos atomísticos (sin basarse en contactos nativos) (Chwastyk & Cieplak, 2015b).

Estos experimentos sugieren que el plegamiento de proteínas anudadas no depende, en general, solamente de contactos nativos, como parece ser el caso del resto de las proteínas para las cuales los modelos Go son suficientemente apropiados⁵⁴. Esta observación es *contraria a lo que se suele suponer* para el resto de proteínas, y muestra por qué, **desde un punto de vista energético, las proteínas anudadas son intuitivamente improbables**. Aún más, los trabajos de Chwastyk y Cieplak sugieren un rol importante para el ribosoma a la hora del plegamiento de proteínas anudadas, lo que aleja a estas proteínas aún más de lo que se considera “normal”.

Esta última observación parece contradecir el hecho empírico de que muchas proteínas anudadas son capaces de volver a plegarse luego de ser desnaturalizadas *in vitro* (Jackson *et al.*, 2017). Hay que recordar, sin embargo, que bajas probabilidades de éxito al plegar no necesariamente indican baja producción de una cierta proteína, sino que pueden indicar un proceso de plegamiento mucho más lento, pero que aún así podría ser observado espontáneamente *in vitro*. Esta observación muestra otra dificultad que intuitivamente tienen las proteínas anudadas: **uno esperaría que su plegamiento no fuera eficiente, y por tanto, que demorara mucho tiempo**. Esto puede ser pensado desde otro punto de vista: si el proceso de anudación requiere de interacciones no nativas, esto implica una restricción importante sobre el conjunto de estados desnaturalizados que pueden llevar al estado anudado. Es decir, si es este el caso, no se puede proceder con igual velocidad desde cualquier estado inicial, lo que restringe aún más el paisaje energético y hace todavía más improbable que una proteína cuyo estado nativo está anudado sea capaz de plegarse eficientemente. Entonces, **no es solamente que una proteína anudada requiera interacciones diferentes a las usuales para su correcto plegamiento, sino que además tiene que plegarse a una tasa comparable a la del resto de las proteínas**. Esta última condición se da debido a que la maquinaria celular encargada de eliminar las proteínas mal dobladas no puede (*a priori*) diferenciar entre una proteína que está atrapada en una conformación incorrecta y una proteína que (a pesar de no estar necesariamente atrapada) demora demasiado tiempo en plegarse apropiadamente.

Por si no era suficientemente improbable, la formación de un nudo profundo claramente requiere algún evento de **enhebrado** (*threading*) durante el plegamiento. Es decir, eventualmente una sección de la cadena tendrá que pasar por dentro de un bucle formado por otra sección de la misma cadena. Este movimiento no parece ser usual en el plegamiento, prefiriéndose movimientos en los que la cadena se curva, tuerce y compacta (Alexander *et al.*, 2017) y fue incluso considerado imposible (usando como evidencia el hecho de que hasta el 2000 no se conocían proteínas profundamente anudadas),

⁵⁴ Las implementaciones computacionales de estos modelos, de hecho, suelen asumir que una proteína *no puede estar anudada* y, por lo tanto, descartan cualquier cambio de conformación que lo esté. Aunque no directamente relacionado, no es completamente inesperado que no sean capaces de predecir correctamente trayectorias anudadas, siendo que el esfuerzo en su desarrollo tradicionalmente ha sido contrario a ese propósito.

sugiriéndose por ejemplo algún tipo de “reptación” de un segmento sobre otro para que pudiera ocurrir (Mansfield, 1994). Nótese que este movimiento parece *requerir* que ocurran una serie de interacciones no nativas de gran importancia: si solo ocurriesen interacciones nativas, entonces no podría deslizarse una sección de la cadena con respecto a otra, pues las interacciones que llevan a esto estabilizarían progresivamente la conformación y no permitirían un deslizamiento (por ejemplo, un aminoácido pasando por un punto del bucle se quedaría allí, y por tanto no podría pasar al otro lado). Un movimiento de este estilo no debe ser fácil de ejecutar en un solo sentido, lo que hace que las conformaciones que lo requieran sean aún menos energéticamente favorables y por tanto, que se requiera en promedio más tiempo para llegar a ellas. Sobra decir que además de no parecer muy favorable, no puede ocurrir en cualquier momento del plegamiento: si la sección que debe enhebrarse es muy voluminosa, el pasaje a través del bucle puede verse totalmente impedido (eg: Tp0642 en Jarmolinska *et al.*, 2019), o seriamente enlentecido (eg: YibK y YbeA, como es descrito en Jackson *et al.*, 2017). Esta restricción ha sido importante en la evolución del plegamiento de nudos: **el atado del nudo puede darse en tan solo un paso**⁵⁵ (Jarmolinska *et al.*, 2019) y hasta ahora, todos las proteínas anudadas encontradas representan los ejemplos más simples de nudos que pueden ser atados o desatados mediante el enhebrado de una sola sección. Esto puede ser visto en que hay proteínas representando los nudos 3₁, 4₁, 5₂ y 6₁, pero hasta ahora no se ha encontrado ninguna proteína representando el nudo 5₁, más simple que 6₁, pero que requeriría más de un evento de enhebrado para poder anudarse.

Algunos ejemplos

Desde su descubrimiento, se han propuesto diferentes secuencias de plegamiento para distintas proteínas anudadas, en general **involucrando una serie de movimientos de plegamiento “normales”**⁵⁶ **y un movimiento correspondiente al enhebrado** necesario para la aparición de un nudo. En el artículo donde se identificó por primera vez una proteína profundamente anudada, el autor ya propuso una posible secuencia de movimientos basada en esta filosofía: la proteína acetohidroxiácido isomeroeductasa (1yvel) está anudada cerca de su extremo C, y el nudo está compuesto por un motivo de 3 α -hélices duplicado, con ambos motivos separados por un bucle largo (“L”) (es decir, la secuencia cerca de ese extremo es A1-A2-A3-L-B1-B2-B3, siendo A1 similar a B1, A2 a B2, etc.) (Fig. 2.3:10a). En la estructura nativa, las hélices A1 y B1 se encuentran muy cerca, mientras que el resto de las hélices se “enroscan” a su alrededor. Para lograr esto, se requiere solo un evento de enhebrado, que consiste en el pasaje del extremo C a través del bucle “L” que une la sección “A” con la “B” (Fig. 2.3:10b), luego del cual la conformación se estabilizaría por el efecto de las interacciones nativas (Taylor, 2000).

⁵⁵ Lo que logra minimizar el peso de este movimiento necesario, que parece ser un paso limitante en ciertos casos (Jackson *et al.*, 2017).

⁵⁶ Es decir, los movimientos más comunes en el plegamiento de proteínas, que no involucran cambios topológicos y parecen poder ser modelados mediante interacciones nativas. Algunos autores cuestionan la suposición de que los nudos son raros *debido* a que no se pueden formar con los “movimientos normales” y dicen que el caso contrario podría ser el correcto: **quizás estos movimientos son normales como resultado de presión selectiva en contra de la formación de nudos** (lo que favorecería aquellos movimientos que no resultan en topologías anudadas). (Lua & Grosberg, 2006)

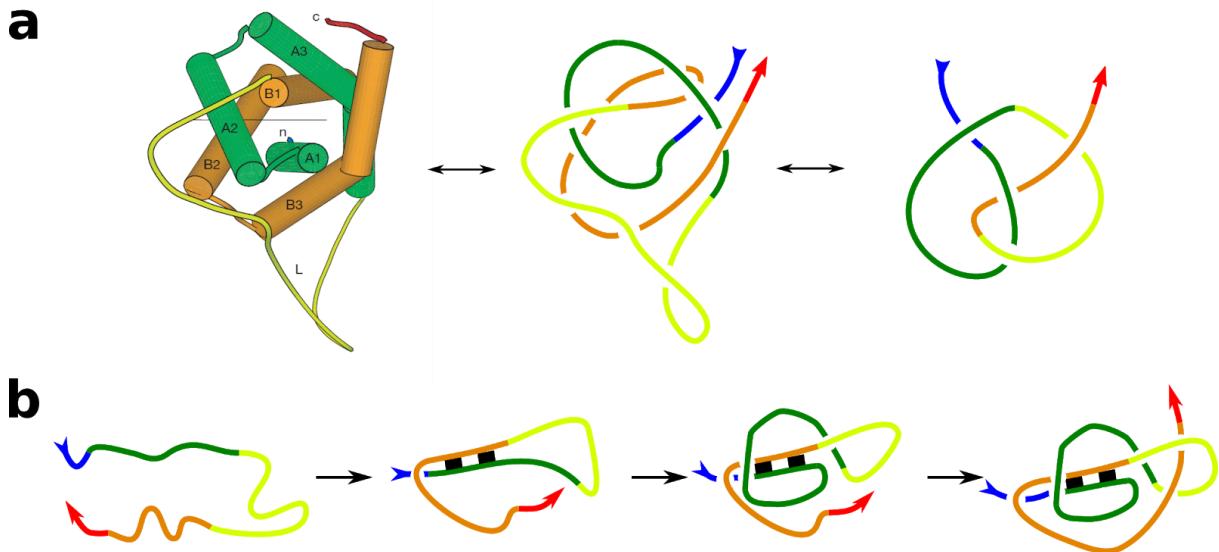


Fig. 2.3:10: Posible plegamiento de la enzima acetohidroxiácido-isomeroreductasa (PDB: 1yvel). **a:** Diagramas de la estructura anudada de la proteína, cerca del extremo C. **(Izquierda)** Estructura nativa de esta sección, en la que figura el motivo duplicado formado por tres partes. Se observa que la región A1 y B1 se encuentran cerca, formando el núcleo de esta zona, lo que se debe al efecto de interacciones nativas. Reproducido de Taylor (2000); **(Centro)** Diagrama del nudo equivalente. Los colores son los mismos que en la figura anterior. El extremo N se extiende “alejándose del lector” en la figura a la izquierda, por lo que aquí se representa como extendiéndose hacia afuera pasando por debajo del resto de la cadena para mejor representar su posición externa; **(Derecha)** Diagrama de nudo equivalente al diagrama central, que muestra que esta estructura se corresponde al nudo 4_1 . Para que no se modificara su identidad, se dejaron los extremos fijos (luego se rotó para que quedara más claro el tipo de nudo). **b:** Representación esquemática de una posible secuencia de plegado de la proteína 1yvel, desde una conformación desnaturalizada a una conformación equivalente a la nativa (eliminando dos *nugatory crossings*). Las barras negras representan los segmentos A1 y B1 compactados entre sí, que forman el núcleo alrededor del cual se “enroscan” el resto de los residuos. El enhebrado ocurre en el último paso, cuando el extremo C (rojo) pasa por dentro del bucle (amarillo).

Otro ejemplo de plegamiento interesante es el de las enzimas YibK de *Haemophilus influenzae* y YbeA de *Escherichia coli* (Fig 2.3:11). Ambas proteínas tienen estructuras similares (lo cuál se repetirá más adelante), y se pliegan de forma muy eficiente, pero curiosamente, parecen tener secuencias de plegado bastante distintas⁵⁷. Aunque aparentemente YbeA se pliega en básicamente dos etapas (de una conformación desnaturalizada se pasa a un intermediario monomérico y luego se forma el dímero), el mecanismo más consistente con la evidencia experimental sugiere que YibK puede plegarse de varias formas distintas. En particular, parece ser que a partir de conformaciones desnaturalizadas superficialmente anudadas, puede pasar a otras configuraciones por dos caminos paralelos, dando lugar ambos a un intermediario monomérico con conformación nativa y, eventualmente, al dímero final (Fig.2.3:12)(Mallam, 2009).

⁵⁷ También dimerizan de forma distinta, con YibK dimerizando en paralelo y YbeA dimerizando con sus subunidades antiparalelas entre sí.

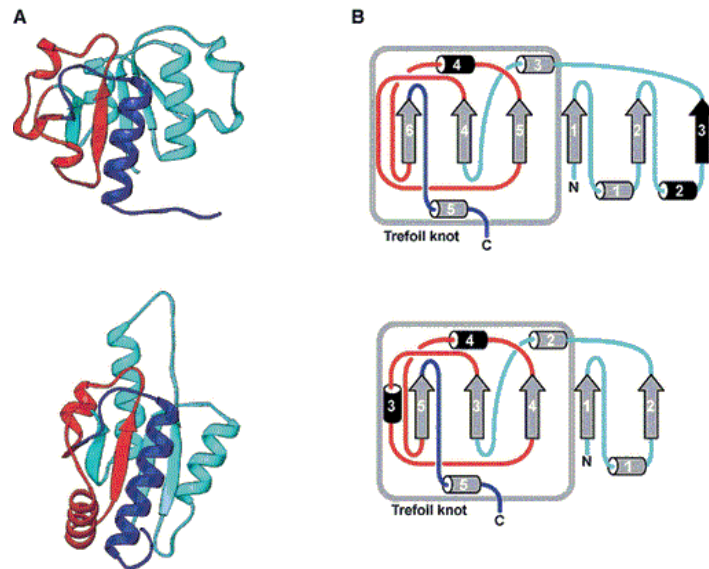


Fig. 2.3:11: Las proteínas anudadas YibK y YbeA. **a:** Estructura cristalina de la conformación nativa de una subunidad de YibK (arriba) y YbeA (abajo) obtenidas por rayos X. **b:** Diagrama que muestra las diferentes regiones de ambas proteínas (coloreadas igual que en a), en particular aquellas comunes a todos los miembros de la superfamilia α/β -anudadas de metiltransferasas (en gris). El recuadro gris indica cuáles secciones conforman el nudo trébol propio de estas enzimas. Adaptado de Mallam (2009).

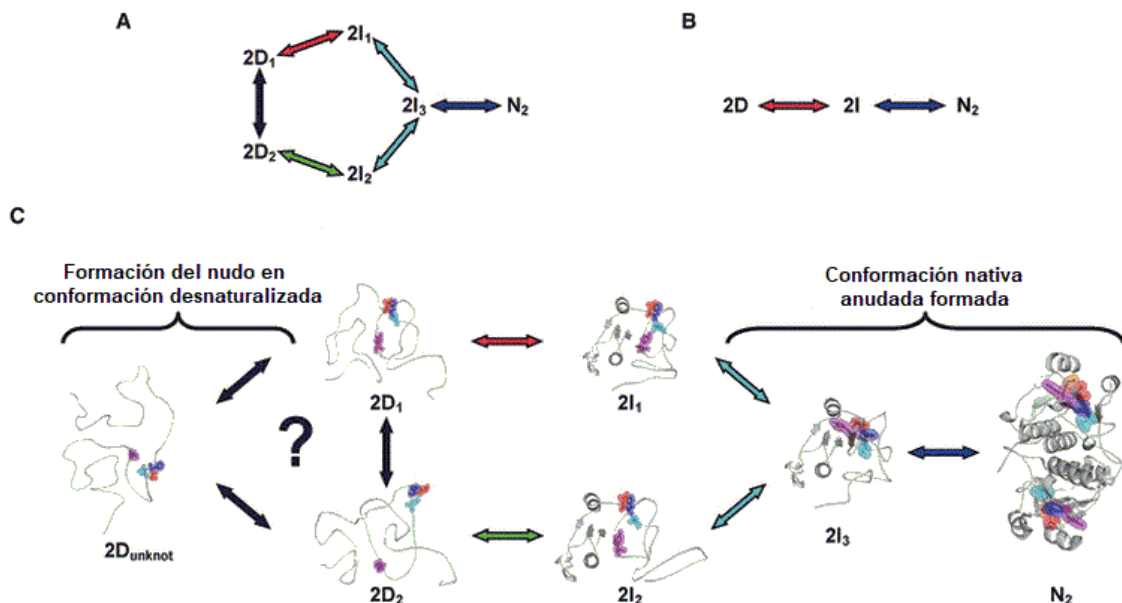


Fig. 2.3:12: Secuencias de plegado propuestas para las MTasas YibK y YbeA. **A:** Esquema de la secuencia propuesta para la formación de un dímero de YibK. **B:** Secuencia propuesta para la formación de un dímero de YbeA (N_2), comenzando con 2 cadenas desnaturalizadas (D), pasando por un intermediario monomérico (I). **C:** Un mecanismo para el correcto plegamiento de YibK basado en experimentos mutacionales. Algunos autores sugieren que el nudo se forma mientras la proteína está desnaturalizada, y que a partir de diferentes tipos de conformaciones desnaturalizadas superficialmente anudadas (D_1 y D_2) se puede pasar a dos intermediarios posibles distintos (I_1 e I_2), y a partir de cualquiera de los dos, obtener un intermediario de conformación nativa (I_3) que se estabiliza al dimerizar (N_2). Adaptado de Mallam (2009).

En un artículo reciente, el equipo de Aleksandra Jarmolinska reportó el descubrimiento de las dos primeras *proteínas mitocondriales anudadas*, y propusieron conjuntamente posibles mecanismos para su plegamiento. Una de estas proteínas forma parte del ribosoma mitocondrial en humanos y posee una topología muy compleja, no solo debido a su anudación en forma de trébol, sino también a la presencia de varios **nudos corredizos** (*slipknots*), es decir secciones del esqueleto proteico que *localmente parecen anudadas, pero que no lo están si tomamos en cuenta la proteína entera* (King *et al.*, 2007). Este tipo de sub-estructuras están presentes en varias proteínas anudadas (ver Fig. 2.3:14) y pueden ser importantes, modificando las interacciones a nivel local y complejizando aún más el proceso de plegado, además de tener un posible valor evolutivo, lo cual discutiremos más adelante. Basta decir que, en este caso, los autores proponen que a pesar de toda esta complejidad, la proteína podría plegarse en básicamente dos pasos: un enhebrado que diera lugar al nudo global y un pasaje de bucles por sobre/debajo otros bucles, agregando la complejidad faltante. La otra proteína mitocondrial identificada es el **factor mitocondrial inductor de apoptosis 1** (Aimf1), una flavoporteína unida a la membrana interna que tiene la particularidad de que solo puede ser importada a la mitocondria mientras se encuentra desnaturalizada, lo que implica que **debe anudarse en el espacio intermembrana, posiblemente con uno de sus extremos ya anclado a la membrana, y por tanto, inmovilizado**. Esta aparente dificultad podría ser, sin embargo, una ventaja a la hora del plegamiento, pues da rigidez y por lo tanto disminuye el número de posibles conformaciones por las que puede pasar la proteína en su búsqueda de la conformación nativa. En particular, parece ser que esta proteína puede anudarse de forma totalmente independiente al extremo N (que está anclado a la membrana) (Fig. 2.3:13), lo que favorece aún más la posibilidad de que esta proteína ingrese desanudada por la membrana mitocondrial externa y se anude por completo en el espacio intermembrana.

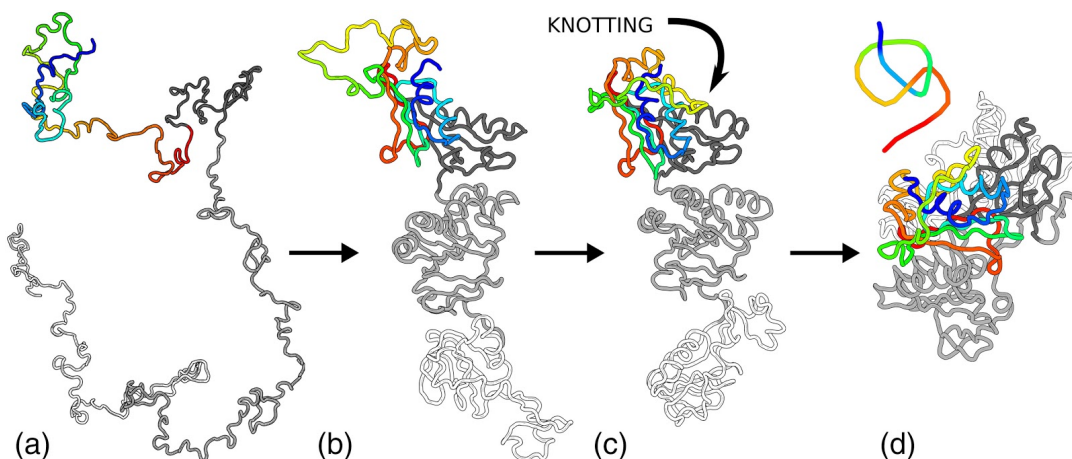


Fig. 2.3:13: Secuencia de plegado propuesta para el factor mitocondrial inductor de apoptosis 1. **a:** Basado en simulaciones de plegado, se puede dividir a la cadena en 3 regiones de topología trivial (en gris) y una región anudada (en colores) cerca del extremo C, las cuales se pliegan independientemente las unas de las otras. **b:** La región no trivial se compacta, dejando un bucle libre. **c:** el bucle cubre la región compactada, formando el nudo. **d:** Las distintas regiones, ya plegadas, se acercan para formar la conformación nativa. En la esquina superior izquierda hay un diagrama que muestra la estructura simplificada de la región anudada una vez que la proteína está en su conformación nativa. Reproducido de Jarmolinska *et al.* (2019).

Consideraciones finales

Como vimos al inicio de la sección 2, las simulaciones muestran que una cadena de suficiente largo (eg: 300 segmentos) distribuida aleatoriamente en el espacio tiene una probabilidad alta de estar anudada, como estaba planteado por la Conjetura de Delbrück. Cuando presentamos este resultado, lo hicimos por oposición a las ideas intuitivas de la biología, generando una especie de paradoja, sin prestar mucha atención a por qué debería haber alguna diferencia. En el caso de los cromosomas, esta comparación era relativamente buena, excepto por el hecho de que existen proteínas *cuya función* es regular la topología del ADN. En el caso de las proteínas, sin embargo, no existe una solución externa que nos resuelva la paradoja, y la solución viene del hecho fundamental de que *las proteínas no se parecen a polímeros aleatorios*. No son homogéneas, sus diferentes secciones interactúan entre sí, haciendo que ciertas conformaciones sean más energéticamente favorables y definiendo una característica fundamental de las proteínas que hace que la comparación con los polímeros aleatorios sea difícil: la existencia de la configuración nativa, a la que se *debe* llegar en un tiempo relativamente corto. Son estas diferencias las que hacen que la mayor parte de los polímeros aleatorios de más de 300 segmentos estén anudados, mientras que sólo unas pocas proteínas (de largo promedio cercano a 300 AA) llegan a estar anudadas en su estado nativo, debido a las particularidades energéticas, cinéticas y de movimiento involucradas⁵⁸. Curiosamente, los estados más parecidos a un polímero aleatorio (y por tanto, con mayor probabilidad de anudarse) son los estados desnaturalizados, lo que una vez más indica la importancia de las interacciones no-nativas en estos estados. Consecuentemente algunos autores sugieren que el atado del nudo se podría dar *antes* de que empiecen los movimientos usuales de plegado, momento a partir del cual podrían ser modelados por un modelo de Go (Mallam, 2009). Cómo se vio en los ejemplos, además, este tipo de proteínas suelen presentar conformaciones intermedias que, debido al paso limitante del enhebrado, pueden acumularse. Este tipo de situación es precisamente lo que se cree que la selección trata de eliminar, pues la acumulación de intermediarios no nativos puede llevar a su agregado o plegamiento incorrecto (King *et al.*, 2010), y **podría ser el motivo principal por el cual la selección parece haber actuado negativamente sobre la aparición de nuevas proteínas anudadas a lo largo de la evolución.**

Ahora que entendemos un poco mejor *por qué* es tan poco probable que una proteína tenga una conformación nativa anudada, la otra pregunta importante puede pasar al frente: ¿para qué sirven las proteínas anudadas?

⁵⁸Cabe mencionar que, si usamos el método de cerrado virtual, se observa una **diferencia en la probabilidad relativa de que una curva aleatoria esté anudada virtualmente**. En particular, es mucho más probable que una proteína anudada esté anudada virtualmente, que una curva aleatoria anudada esté anudada virtualmente. Esto puede ser explicado por los movimientos particulares del plegado de proteínas, que como consecuencia logran que cualquier proyección presente un gran número de cruces y los extremos terminen cerca de la superficie de la misma, características que las diferencian *aún más* de las curvas abiertas aleatorias (Alexander *et al.*, 2017).

¿Para qué sirven las proteínas anudadas?

Protein family	PDB code	Chain length	Knot (fingerprint)	Knotted core
Enzyme				
Methyltransferase (α/β knot)	1ns5A	153	3₁ +	71–119
tRNA methyltransferase	1uakA	243	3₁ +	87–130
rRNA methyltransferase	2egvA	229	3₁ +	161–205
protein methyltransferase	5h5fA	224	3₁ +	83–131
Carbonic anhydrase II	1lugA	259	3₁ +	27–256
SAM synthetase	1fugA	383	3₁ +	11–266
Transcarbamylase fold	1js1X	324	3₁ +	172–237
N-acetylglucosamine deacetylase	5bu6A	264	3₁ +	45–294
Pyridine synthase	5wa4A	310	3₁ +	168–350
CII Ketol acid reductoisomerase	1yveL	513	4₁(3₁ +)	320–525
Chromophore binding domain	2o9cA	319	4₁(4₁)	33–274
Ubiquitin C-terminal hydrolase	2etlA	223	5₂ – (3₁ –, 3₁ –)	5–219
α -Haloacid dehalogenase I	3bjxA	311	6₁ + (6₁ +, 4₁, 3₁ +)	63–276
(Mitochondrial apoptosis-inducing factor 1^a)	5fmhA	486	3₁ – (3₁ –)	509–580
DNA binding				
Zinc-finger fold	2k0aA	109	3₁ –	22–70
RHH superfamily				
MJO366	2efvA	82	3₁ –	16–81
VirC2	2rh3A	121	3₁ –	88–191
DndE	4lrvA	107	3₁ –	9–100
Unknown function				
Protein from <i>T. pallidum</i>	5jirA	413	3₁ +	202–313
Artificial proteins				
Artificially (designed) knotted protein	3mlgA	169	3₁ –	32–133
Single-chain TFIIA	5m4sA	209	3₁ +	50–172
Ribosome subunits				
Mitochondrial ribosomal protein	4v1aw	387	3₁ – (3₁ –, 3₁ –, 3₁ –)	226–289
Membrane proteins				
Calcium exchanger protein:				
NCX	5hwyA	300	3₁ +	44–230
CAX	4kppA	395	3₁ +	78–274

Fig. 2.3:14: Una lista comprensiva (sin redundancias) de proteínas anudadas, junto con estructuras representativas. Las proteínas en negrita representan proteínas anudadas recientemente identificadas. El tipo de nudo de la proteína aparece en negrita, mientras que los otros hacen referencia a nudos corredizos (*slipknots*) presentes en subsecciones de la cadena. Columnas (de izquierda a derecha): Familia/tipo de proteína, código identificador en la *Protein Data Bank*, Longitud de la proteína (en aminoácidos), Tipo de nudo, Localización (en la cadena) de la región anudada. Las proteínas fueron identificadas usando un método similar al de Mansfield. Reproducida de Jarmolinska *et al.* (2019).

Sucesivos análisis del *Protein Data Bank* revelan cada vez más proteínas anudadas, asociados al conocimiento de la estructura de cada vez más proteínas en general. Se sabe que, aunque raros, los nudos aparecen en especies de todos los reinos y tienden a ser conservadas a lo largo de la evolución (Jarmolinska *et al.*, 2019), por lo que evidentemente, para algo sirven, y nos gustaría pensar que sus particularidades topológicas están correlacionadas con su funcionalidad. Encontrar esta relación no es fácil, pues las proteínas anudadas presentan un gran rango de funcionalidad, estando distribuidas a lo largo de un gran número de familias (Potestio *et al.*, 2010; Jackson *et al.*, 2017; Jarmolinska *et al.*, 2019). Un hecho que parece apoyar esta relación es que en muchos casos, el sitio activo de una proteína anudada está cerca o *dentro de* la zona anudada. Este es el caso para las ubiquitina-carboxiterminal-hidrolasas, ARN metiltransferasas, carbamoiltransferasas y fitocromos bacterianos (Jackson *et al.*, 2017). Típicamente, las revisiones de este tema incluyen una tabla con todas las proteínas anudadas conocidas hasta el momento. Incluimos la más reciente que encontramos, debida al grupo de Aleksandra Jarmolinska para dar una

idea del conjunto de proteínas anudadas del que hasta ahora hemos hablado pero nunca mostrado en su totalidad (Fig. 2.3:14). Como se puede apreciar, la mayor parte de las proteínas anudadas son enzimas o proteínas de unión al ADN, pero no mucho más se sabe de sus funciones.

Posibles funciones y ejemplos

Una posibilidad es que **la estructura anudada le confiera mayor estabilidad a la proteína**, por ejemplo dificultando el proceso de desnaturalización. Las proteínas YibK y YbeA son pequeñas proteínas que exhiben una conformación de tipo trébol, y parece ser un buen ejemplo de esto: aunque se pliegan muy rápidamente, deben dejarse por *varias semanas* bajo condiciones altamente desnaturalizantes para que vuelvan a su estado totalmente desnaturalizado (Capraro & Jennings, 2016). Estas proteínas poseen además la extraordinaria capacidad de anudarse correctamente aún si se les agregan “tapones” proteicos a sus extremos⁵⁹, aunque en el caso de agregarse al extremo C, la velocidad del proceso es tres veces más lenta (Lim & Jackson, 2015). Otro ejemplo posible es el de las proteínas de la familia ubiquitina-carboxiterminal-hidrolasa (UCH), que presentan una conformación de tipo 5₂, cuyo sitio activo se encuentra dentro de la región anudada y cuya función es de *desconjugar* la ubiquitina que está marcando proteínas para ser degradadas, evitando así la degradación de este marcador. Debido a su asociación tan cercana con la ubiquitina, una proteína de este tipo estaría siempre bajo el riesgo de ser degradada por el proteasoma, pero se ha visto que el primer paso de esta degradación involucra un gasto de ATP para desplegar la proteína a degradar durante el pasaje por un poro del proteasoma. Debido a su estructura anudada compleja, sin embargo, es poco probable que este paso se pueda llevar a cabo para los miembros de la familia UCH (Virnau *et al.*, 2006; Jackson *et al.* 2017), que efectivamente “trancarían” el proteasoma, evitando su degradación.

La proteína UCH-L1, de la familia recién mencionada, es de interés por varios motivos. Primero que nada, **es de las proteínas anudadas de mayor complejidad topológica**, representando un nudo 5₂. Segundo (como ya se mencionó anteriormente), **su sitio activo se encuentra dentro de la región anudada**, lo que parece apuntar a una relación entre su función y su topología (además de la estabilidad de las que hablamos en el párrafo anterior). Tercero, **es una proteína relativamente común**, representando el 2-5% de las proteínas solubles en las neuronas humanas, lo que muestra que aunque las proteínas anudadas sean raras entre las proteínas, no son despreciables en cuanto a su presencia en la célula (Jackson *et al.*, 2017). Por último, esta proteína **parece ser de gran importancia médica** pues algunos de sus mutantes están asociados a la enfermedad de Parkinson (Andersson *et al.*, 2011).

Evidencia a favor de un rol funcional para la topología anudada puede ser encontrada al estudiar la proteínas N-acetilornitina carbamilasa (AOTCasa) y ornitina transcarbamilasa (OTCasa), ambas transcarbamilasas. La primera es esencial para la

⁵⁹ Es decir, si se alteran las secuencias originales, agregando una secuencia de la proteína ThiS (de plegamiento muy rápido) a uno o ambos extremos. Debido a la rapidez del plegado de la proteína ThiS, se espera que la proteína modificada deba llegar a su conformación nativa partiendo de una conformación aparentemente desnaturalizada, excepto por uno de sus extremos, que presenta una forma de “tapón” voluminoso.

síntesis del aminoácido arginina en varios patógenos importantes, mientras que la segunda procesa L-ornitina en algunas bacterias y en animales (incluyendo humanos). Lo curioso es que ambas proteínas son homólogas (en secuencia, y muy similares estructuralmente), pero la AOTCasa incluye un nudo trébol profundo, a diferencia de la OTCasa, que no está anudada (Fig. 2.3:15). Ambas proteínas tienen dos sitios activos, uno donde se une carbamilo fosfato y otro donde se une acetilornitina en AOTCasas y L-ornitina en OTCasas, lo que permite la reacción con el carbamilo fosfato para producir acetilcitrulina o citrulina, respectivamente. Como se ve en la figura 2.3:15, la diferencia topológica entre ambas enzimas radica precisamente en este segundo sitio activo, y se sabe que la presencia del nudo modifica la reacción que se lleva a cabo. Es interesante también que el nudo esté conformado básicamente por una región rígida en forma de bucle rica en residuos de prolina que es mucho más corta en la OTCasa, por lo que la AOTCasa podría haber surgido simplemente por una inserción que aumentara un poco la longitud de dicha región y, consecuentemente, modificara el proceso de plegado. Estas dos enzimas presentan un caso claro de **cómo una diferencia topológica (posiblemente generada a partir de una mutación no muy grande) puede llevar a una diferencia funcional notable**.

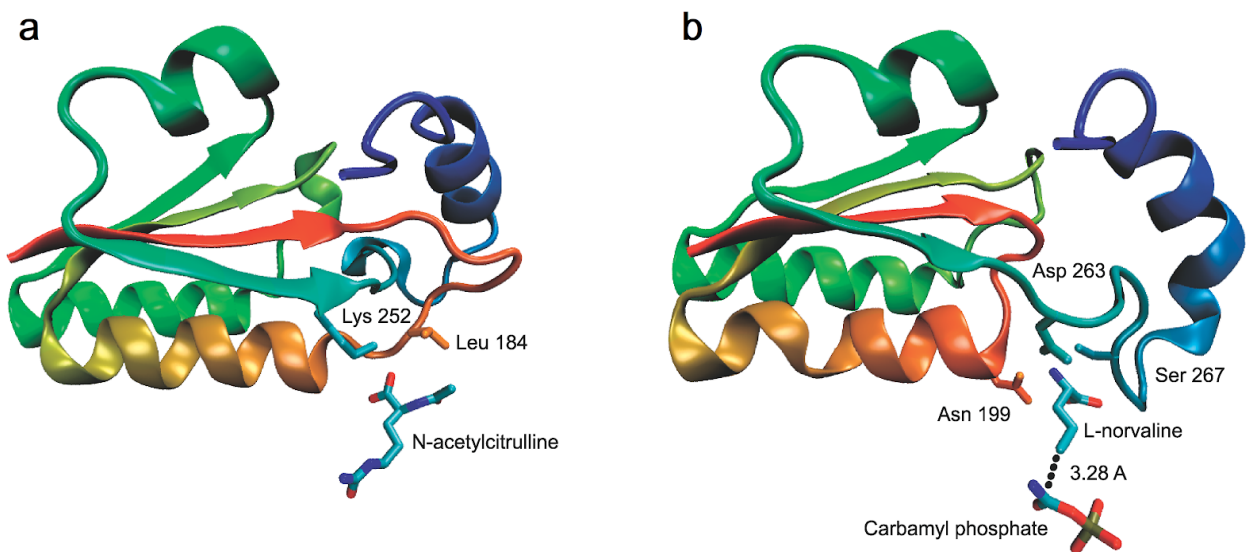


Fig. 2.3:15: Estructura comparada de proteínas homólogas con distinta topología. **a:** Sección anudada de la estructura de la AOTCasa de *Xanthomonas campestris*, que presenta un nudo 3₁, junto con N-acetilcitrulina, el producto de la reacción que cataliza; **b:** Sección equivalente de la estructura de la OTCasa humana, una proteína sin anudar, junto con el inhibidor L-norvalina y carbamilo fosfato. Ambas proteínas tienen una similitud de secuencia del 29%. Adaptada de Virnau *et al.* (2006).

Existe un conjunto de más de 15 proteínas de la superfamilia α/β (es decir, que su estructura secundaria consiste de una serie de hojas β paralelas entre sí, intercaladas con α -hélices (Levitt & Chothia, 1976)) las cuales **están todas anudadas similarmente**, presentando un nudo 3₁ profundo. Todas estas proteínas parecen funcionar como metiltransferasas (MTasas), es decir que son enzimas involucradas en la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosilmetionina a proteínas, moléculas de ADN, ARN y otras moléculas pequeñas (Cai *et al.*, 2016), lo cual parece estar relacionado con su topología

pues el nudo forma parte del sitio de unión se la S-adenosilmetionina. Además, todas estas proteínas forman dímeros en solución, y su región anudada forma parte de la interfaz entre ambos monómeros. Debido a todas estas características, a este grupo se le llama la **superfamilia α/β -anudadas de metlitransferasas (α/β -knot MTases)**(Mallam, 2009). Las proteínas YibK y YbeA , ya mencionadas por la aparente estabilidad de su plegamiento, son de las proteínas más pequeñas (y más estudiadas) de esta superfamilia.

Un ejemplo reciente de una proteína anudada es la flavoproteína **factor mitocondrial inductor de la apoptosis 1** (Aimf1), que ya mencionamos en nuestro estudio de las secuencias de plegado. Luego de que se induce la muerte celular, esta proteína se cliva y viaja hasta el núcleo, donde participa en la cromatinólisis. La región anudada es de gran importancia para esta función, pues el dominio CTD (que está anudado) posee dos motivos de unión al ADN, así como una región rica en prolina. Se sabe que estas características son fundamentales pues mutantes en esta región son incapaces de completar el proceso de apoptosis. Se ha sugerido además que la topología de esta región puede ser importante para estabilizar la conformación del complejo Aimf1-cromatina y permitir así el correcto alineado de los componentes fundamentales para que el proceso pueda continuar correctamente (Jarmolinska *et al.*, 2019).

Origen evolutivo y estructuras conservadas

Una discusión de las características interesantes de este grupo de macromoléculas no podría estar completa, sobre todo tomando en cuenta nuestra intuición sobre la selección en contra de las mismas, sin preguntarnos **cuál es el origen evolutivo de las proteínas anudadas**. Ya hablamos un poco de esto con el ejemplo de la AOTCasa y la OTCasa, cuando especulamos que las diferencias entre estas proteínas homólogas en los diferentes linajes pueden haberse originado simplemente debido al alargamiento de una región con forma de bucle (posiblemente debido a una inserción), alterando así tanto el plegamiento como la conformación final, llevando a las diferencias funcionales apreciables hoy en día.

Recordamos que la función de una proteína queda definida por su conformación nativa, pero para ser *útil*⁶⁰ una proteína debe poder llegar a esa conformación de forma eficiente. Esto nos muestra que en las proteínas anudadas, la selección debe haber favorecido tanto las características que se desprenden de poseer una topología anudada así como los mecanismos de plegamiento que permiten llegar a las mismas en un tiempo comparable al resto de las proteínas. Ya mencionamos algunas de estos mecanismos, como el hecho de que en general parece ser que el proceso de anudación puede darse en un único paso durante el plegamiento, lo que permite minimizar las dificultades del mismo. Parece ser claro también que, a mayor complejidad topológica, mayores serán las complejidades del plegamiento y por tanto será difícil encontrar una secuencia adecuada para llegar a la conformación nativa. Evidencia de esto es que, aún en la minoría integrada por las proteínas anudadas, dominan las formas más simples, siendo la gran mayoría nudos trébol (ver Fig. 2.3:14). Aún más, y como se dijo antes, todos los nudos hasta ahora

⁶⁰ Pensando en *utilidad* como el aporte de una proteína al *fitness* de aquel individuo que la exprese. Una proteína solo es útil si efectivamente aumenta el *fitness* de quien la exprese en mayor medida que sus posibles alternativas (eg: isoformas).

identificados pueden ser atados o desatados en un solo movimiento. **Dicho de otra forma, la naturaleza prefiere las topologías simples.**

Debido a esta relación evolutiva intrínseca entre la conformación nativa y los mecanismos de plegado, **lograr comprender el plegamiento (y su evolución) de estas proteínas nos permitirá comprender mejor la evolución de este grupo.** En este campo, no se ha tenido tanto éxito (relativo) como el que se ha tenido con las proteínas de topología trivial, pero sin embargo, existe evidencia que nos permite estudiar la relación entre las proteínas anudadas y sus contrapartes no anudadas más parecidas, así como indagar en los **posibles orígenes evolutivos de la topología anudada** (King *et al.*, 2010; Potestio *et al.* 2010; Sulkowska *et al.* 2012). Revisaremos estos estudios a continuación.

En el artículo de Taylor del 2000, se menciona (luego de una posible secuencia de plegado) un posible origen para la proteína 1yvel. Recordemos que la región anudada de la misma está compuesta por un motivo de tres partes que se repite dos veces. Cada motivo se “enrolla” sobre si mismo, y en la conformación nativa, debido a la cercanía entre las secciones iniciales de ambos motivos, ocurre que estas se enrollan entre sí, formando una estructura anudada simétrica (ver Fig.2.3:10a). Basándose en esta notable simetría, Taylor sugiere que esto puede haberse dado por un “intercambio” en las posiciones de las dos hélices cercanas, lo que permitiría pasar de una proteína desanudada con dos motivos enrollados sobre si mismos a una proteína anudada. Curiosamente, en este artículo este tipo de explicación podría usarse tanto para explicar este caso (un nudo 4₁) como el de un nudo trébol en la proteína 1fugA.

Taylor nunca cuestiona el origen de este motivo doble, solo su aparente simetría. Sin embargo, habiendo notado esta misma simetría, el grupo de Neil King (2010) propuso un origen diferente: podría ser que, a partir de monómeros de una proteína cuya conformación final fuera un oligómero presentando algún tipo de simetría, *ocurriera una duplicación y fusión de genes*, tal que se lograra **una nueva proteína compuesta básicamente de dos monómeros sin anudar unidos por una cierta región.** Esta nueva proteína podría presentar una topología anudada, y tendría una cierta simetría interna entre dos regiones altamente similares. Convenientemente, *existe un ejemplo* de una proteína monomérica anudada y su posible ancestro dimérico no anudado: la proteína VirC2 de *Agrobacterium tumefaciens* consiste en la unión de dos dominios de unión al ADN con la misma estructura cuya conformación final es casi idéntica a la del dímero represor de Arc (*Arc repressor*) (Fig. 2.3:16).

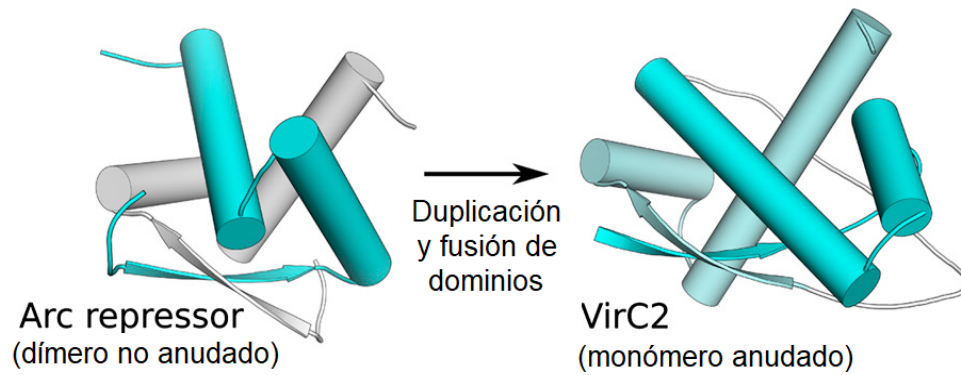


Fig. 2.3:16: Ejemplo natural en el cual la duplicación y fusión de un dímero entrelazado (represor de Arc) ha llevado a la formación de una proteína anudada (VirC2). Adaptado de King *et al.* (2010).

Para estudiar las características que tendría una proteína de este estilo inicialmente (es decir, al surgir, antes de que su plegamiento sea “refinado” por la selección natural), decidieron construir una proteína con estas características a partir de una proteína desanudada dimérica: la proteína HP0242 de *Helicobacter pylori*⁶¹, que se denominó **2ouf-wt** (wt = *wild type*). A partir de la misma se creó una proteína uniendo ambos monómeros con una región de 9 aminoácidos rica en glicina⁶², que se llamó **2ouf-knot**. Finalmente, como control, se construyó una proteína llamada **2ouf-ds** en la que ambos monómeros de 2ouf-wt estaban unidos por un puente disulfuro, lo que hace que no se genere un nudo (recordar que los métodos para determinar si una proteína está anudada no toman en cuenta los enlaces disulfuro) pero agrega una cierta rigidez al dímero, haciendo que se comporte como un monómero (King *et al.*, 2010).

Estas proteínas fueron expresadas por recombinación en *Escherichia coli* y luego purificadas para estudiar sus propiedades. Se obtuvieron sus estructuras nativas y se compararon entre sí. Primero que nada, se comprobó que **2ouf-knot estaba anudada**, lo que da más evidencia a favor de este tipo de eventos como origen para proteínas anudadas. Más aún, se observó que las tres proteínas tenían conformaciones nativas muy similares (lo que indica que la rigidez extra en 2ouf-ds y 2ouf-knot no impuso mayores dificultades en el plegamiento de cada región) y que, experimentalmente, las tres podían plegarse reversiblemente *in vitro* sin la presencia de otras proteínas (eg: chaperoninas). Se comprobó además la acumulación de una conformación intermedia en 2ouf-knot y 2ouf-ds, siendo la energía necesaria para pasar de esta a la conformación final mucho mayor en el caso de 2ouf-knot, lo que sugiere que este pasaje se debe al evento de enhebrado. Interesantemente, todas estas proteínas se pliegan en tiempos comparables, por debajo del tiempo muerto del instrumento de medida usado (aprox. 15ms), aunque por otros medios es evidente que 2ouf-knot se pliega aproximadamente 20 veces más lento que 2ouf-wt o 2ouf-ds, como era de esperarse.

⁶¹ Al momento de escribir el artículo, no se conocía la función de esta proteína, por lo que no se pudieron estudiar los posibles cambios funcionales que este cambio topológico pudiera conllevar.

⁶² Los segmentos ricos en glicina tienen mucha más libertad de movimiento, y por tanto son más flexibles que el resto de los segmentos, una característica que consideraremos más adelante.

Como ya sabemos, tanto la acumulación de intermediarios como la lentitud del plegamiento son características que parecen ser seleccionadas negativamente, pero hay que tener en cuenta un par de cosas. Primero: aunque su plegamiento sea lento en relación al de sus contrapartes no anudadas, 2ouf-knot se pliega más rápido que algunas proteínas pequeñas con cinéticas simples (Jackson, 1998), por lo que este efecto no tiene por qué ser biológicamente desastroso. Segundo: estamos ignorando totalmente las características funcionales de esta nueva proteína anudada. Incluso si asumimos que son idénticas a las de 2ouf-wt (pues sus conformaciones nativas parecen ser casi idénticas), 2ouf-knot puede ser más estable que 2ouf-wt, precisamente debido a su estructura anudada (y por estar formada por una sola secuencia ininterrumpida). Considerando estas características junto con el hecho de que no parece haber una diferencia gigantesca en sus tiempos de plegado, **no parece haber muchos motivos por los que 2ouf-knot debería experimentar una fuerte selección negativa**. Incluso sería esperable que con el tiempo la selección natural actuara sobre su proceso de plegado, y este se modificara hasta hacer de la misma una proteína más favorable. Todo esto parece apoyar la idea de una duplicación + fusión de genes como origen para ciertas proteínas anudadas simétricas.

Otra posibilidad es que las proteínas anudadas surjan a partir de proteínas ancestrales no anudadas debido a pequeñas modificaciones internas, sin cambiar el número de subunidades de la conformación final. Un origen de este tipo fue propuesto por Virnau *et al.* (2006) al comparar las proteínas homólogas AOTCasa de *Xanthomonas campestris* (anudada) y la OTCasa de *Pyrococcus furiosus* (secuencias 41% idénticas) u *Homo sapiens* (29% idénticas). Los autores de dicho trabajo propusieron que **las diferencias topológicas podían deberse a la presencia de una región rica en prolina en forma de bucle** presente en AOTCasa y ausente en sus contrapartes no anudadas.

Años más tarde, Raffaello Potestio y sus colaboradores, parcialmente inspirados por este resultado, realizaron una búsqueda más general en la PDB para tratar de encontrar qué relación existía entre las proteínas anudadas conocidas hasta el momento y las proteínas no anudadas más similares, para así encontrar cómo estas diferencias llevan a las diferencias topológicas observadas (Potestio *et al.*, 2010). Luego de una búsqueda por BLAST inicial se determinó que solo tres secuencias representativas de proteínas anudadas tenían secuencias homólogas en la PDB, y para peor, solo una de ellas tenía alguna secuencia homóloga no anudada, la succinil-ornitina transcarbamilasa (SOTCasa), homóloga a la AOTCasa estudiada por Virnau *et al.*. Al hacer un análisis filogenético se observó que todas las secuencias correspondientes a proteínas anudadas formaban parte de dos ramas con una raíz común, con cada rama teniendo una identidad de secuencia mayor al 90% y estando compuesta solamente por proteínas anudadas en forma de trébol (Fig. 2.3:17a). Esto indica que, en esta familia de proteínas, la topología anudada se originó una única vez (lo que apoya el hecho de que este sea un evento raro) y luego fue conservada durante la evolución, produciendo una variedad de proteínas homólogas con la misma topología (lo que indica algún rol beneficioso para la misma) y un promedio de identidad de secuencia del 40%.

Además, pueden alinearse todas las proteínas del árbol, mostrando un “núcleo común” de aproximadamente 200 aminoácidos de largo (un número alto, considerando que el largo promedio de estas proteínas es de 310 aminoácidos), que muestra una gran

similitud estructural, aunque no necesariamente secuencial, dentro de esta familia (Fig. 2.3:17b). En general, las proteínas de esta familia se diferencian en pequeños bucles que no tienen importancia para la topología global, **excepto en el caso de la SOTCasa**, que se diferencia de las proteínas no anudadas en general por dos bucles cercanos al sitio activo (uno *rico en prolina*) que se encuentran concatenados y que, si son eliminados⁶³, producen un cambio en la topología, desanudando la estructura.

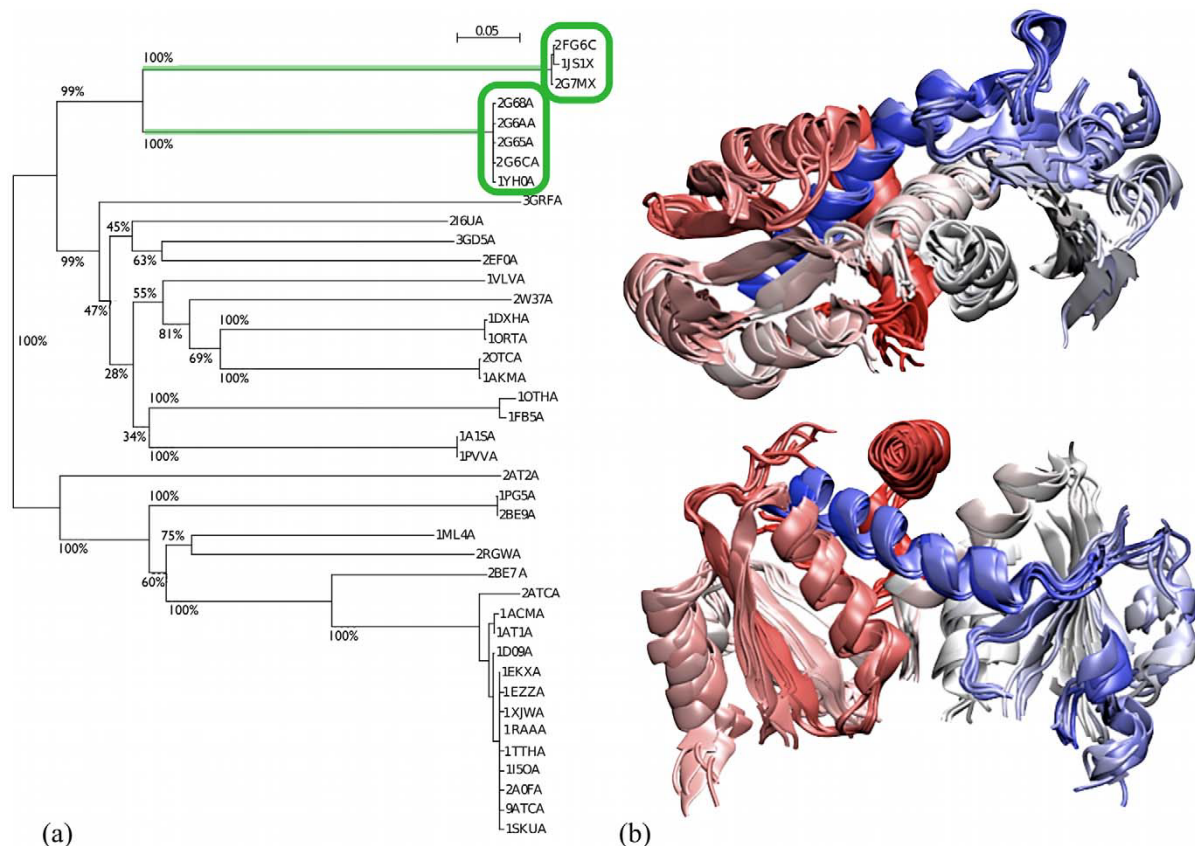


Fig. 2.3:17: Árbol filogenético y alineamiento de la SOTCasa y secuencias homólogas.

a: Árbol filogenético obtenido alineando las secuencias homólogas encontradas por BLAST usando CLUSTALW. La longitud de las ramas es proporcional al porcentaje de diferencia en las secuencias (referencia de 5% en la parte superior). Los números en los nodos, obtenidos por bootstrap, representan qué tan robusta es la separación en las dos ramas correspondientes. Las ramas donde se ubican las secuencias de proteínas anudadas se encuentran señaladas en verde (y las correspondiente secuencias están encuadradas en el mismo color). **b:** Superposición de la conformación nativa de 6 representantes de la familia de la SOTCasa, vista desde dos puntos de vista ortogonales. Las seis secuencias son 2fg6C (anudada), 2i6uA, 2g68A, 2at2A, 1pg5A y 1ortA. La secuencia rojo-blanco-azul sigue el orden del extremo N al C. Reproducido a partir de Postestio *et al.* (2010).

A partir de este resultado, los autores proponen la existencia de **bucles promotores de nudos** (*knot-promoting loops*), regiones con extremos relativamente cercanos en forma

⁶³ En este caso, si se reemplaza cada segmento por un segmento de recta que une sus extremos. Este procedimiento es razonable sólo para segmentos cortos, pues de otro modo sería muy esperable que este tipo de operación produjera cambios topológicos importantes.

de bucle cuya eliminación lleva a la desanudación de la proteína en cuestión. Cómo ya se mencionó antes, la presencia de prolina en grandes proporciones podría ser una característica propia de este tipo de estructuras. Usando criterios de homología más laxos, los autores encontraron un par de ejemplos que parecían diferenciarse de proteínas sin anudar, principalmente debido a la presencia de ciertos bucles en la región anudada, siendo los mismos la proteína TARBP1-MTd (*methyltransferase domain of the human TAR RNA binding protein*) y PaBphP (*photosensory core module of Pseudomonas aeruginosa bacteriophytochrome*). Nótese, sin embargo, que **esta definición es puramente estructural**, y no hace referencia a la existencia de proteínas homólogas, por lo que los autores decidieron buscar bucles promotores de nudos en proteínas anudadas *sin homólogos no anudados*. Es decir, se buscaron proteínas no anudadas con regiones que se alinearan bien estructuralmente con proteínas anudadas, y encontraron buenas comparaciones para la UCH de código 2etlA y la subunidad α de la S-adenosilmetionina sintetasa humana, de código 2p02A. Aunque no se encontraron bucles promotores de nudos en estas comparaciones, es interesante notar la similitud estructural que puede haber entre ciertas regiones anudadas y no anudadas de distintas proteínas (Fig. 2.3:18).

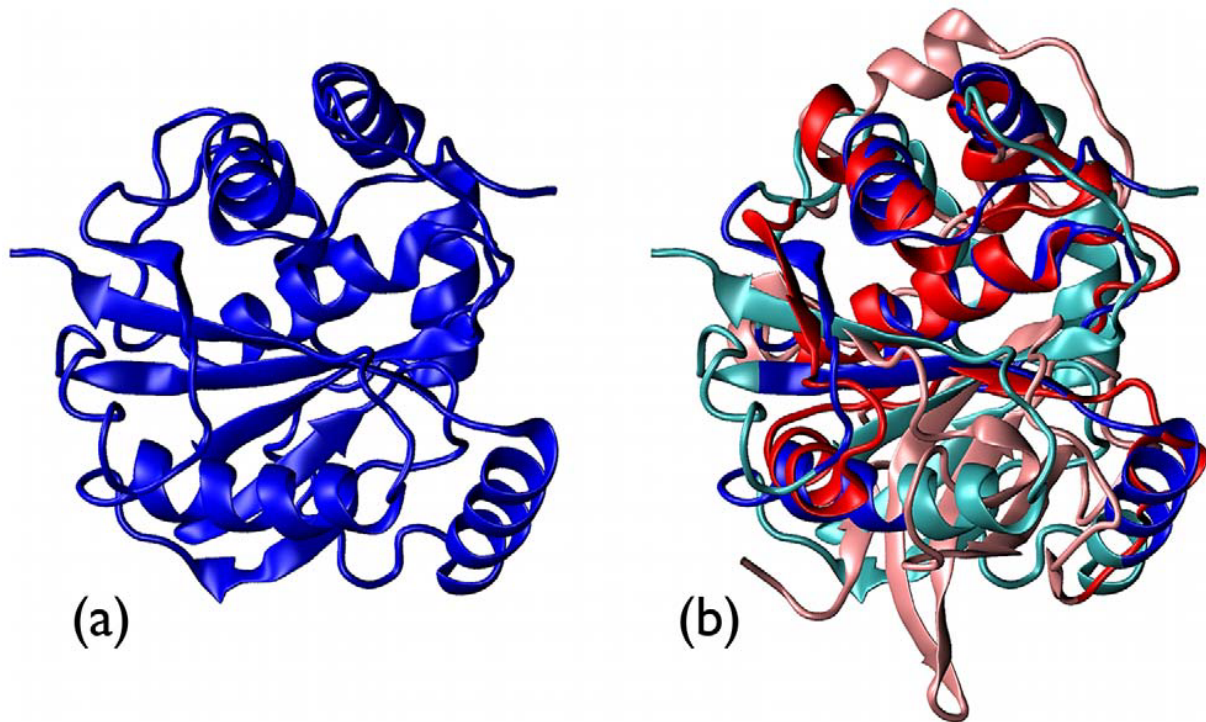


Fig. 2.3:18: Una proteína UCH (2etlA), con estructura 5₂, alineada con una proteína no anudada (1aecA). **a:** Conformación nativa de la proteína 2etlA. **b:** Ambas proteínas alineadas. Los residuos bien alineados de las proteínas anudada y desanudada están en azul y rojo, respectivamente, mientras que los residuos que no se alinean correctamente están en rosado y celeste, respectivamente. Aunque esta superposición no de un buen alineamiento para toda la estructura, destaca una correspondencia particularmente buena de ciertos elementos de la estructura secundaria y terciaria. Reproducida de Potestio *et al.* (2010).

El interés por estas comparaciones locales podría sugerirnos que quizás la topología global no sea la única característica topológica importante. Efectivamente, las regiones de

una proteína interactúan entre sí y con ligandos mediante interacciones (especialmente) locales, por lo que la topología local (ie: “vista desde cerca”) tiene un rol de gran importancia en la función y utilidad de una proteína. Al discutir el problema del plegamiento de proteínas, mencionamos la existencia de estructuras *localmente anudadas*, los nudos corredizos, o **slipknots**. Estas estructuras se corresponden a secciones del esqueleto proteico que, consideradas por si mismas, están anudadas, pero que no aportan a la anudación de la proteína cuando se considera *globalmente* como un todo (King *et al.*, 2007) (Fig. 2.3:19). Equivalentemente, **una sección es un nudo corredizo si, al eliminar residuos desde los extremos, podríamos terminar con una proteína anudada**. Este tipo de estructuras no son tampoco muy comunes y son particularmente difíciles de detectar, pues además de identificar nudos en las secuencias de la PDB usando los algoritmos ya presentados, se debe hacer lo mismo para *toda subsecuencia continua de las mismas*. Por otro lado, pueden ser interesantes ya que están presentes tanto en proteínas anudadas (con regiones que presentan slipknots) como en proteínas no anudadas.

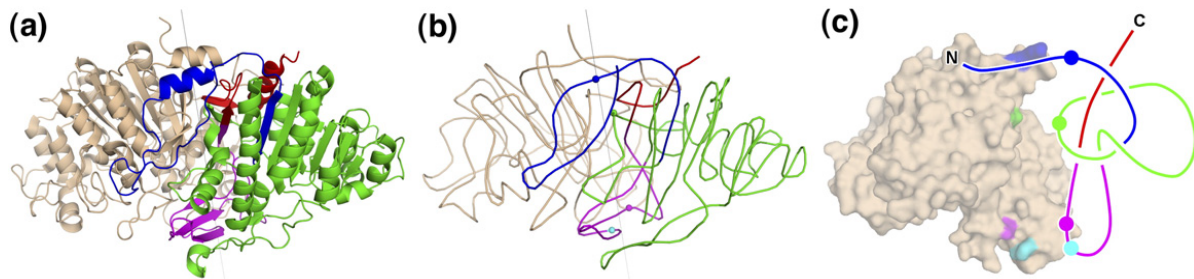


Fig. 2.3:19: Ejemplo de una proteína no anudada con un **nudo corredizo**. **a:** Conformación nativa de la proteína fosfatasa alcalina (*alkaline phosphatase*) en forma de dímero, mostrando estructuras secundarias. El extremo C está en rojo, la región del nudo en verde, un lazo que sale (y efectivamente desata el nudo) en violeta y el extremo N en azul. **b:** Representación simplificada de la conformación nativa, coloreada igual que en **a**. **c:** Representación altamente simplificada de la subunidad A con un nudo corredizo, contrastada con una representación superficial de la subunidad B. Observar que el “nudo corredizo” de la subunidad A estaría anudado si eliminamos las regiones roja y violeta, pero efectivamente puede ser desanudado si consideramos toda la secuencia. Reproducido de King *et al.* (2007).

Los nudos corredizos no han recibido tanta atención como los nudos *propriadamente dichos*, pero podemos destacar el trabajo del equipo de Joanna Sułkowska por haber hecho un estudio comprensivo de los nudos y slipknots presentes en la PDB (Sułkowska *et al.* 2012). A partir de esto construyeron la “huella dactilar” (*fingerprint*) de las distintas proteínas, representada en forma de una matriz simétrica que representa no solo la topología de cada proteína, sino también la presencia, identidad y ubicación de cualquier nudo corredizo que pueda contener. A grandes rasgos, los autores hallaron que más que el tipo de nudo, **es la huella dactilar la que tiende a conservarse a lo largo de la evolución**. Por ejemplo, en el caso de las proteínas UCH, la huella está casi perfectamente conservada al comparar proteínas homólogas de humanos, levaduras y protozoos del género *Plasmodium*, a pesar de la baja conservación de secuencia (eg: 25% de similitud entre humanos y *Plasmodium*). Quizás esto no sea tan sorprendente cuando hablamos de proteínas anudadas: ya hemos dejado claro que la evolución parece desfavorecer este tipo de conformaciones, y que, por tanto, deben poseer propiedades muy particulares para ser conservadas a lo largo de la

evolución, aunque es notable que la huella dactilar pueda usarse, por ejemplo, para dividir en clases bien definidas a los distintos nudos asociados al mismo nudo (hasta ahora, solamente 3_1). Este razonamiento para su conservación podría usarse también para hablar de nudos corredizos, por lo menos en el caso de las proteínas anudadas, pero casos más interesantes aparecen cuando consideramos la **huella dactilar en familias de proteínas no anudadas**.

Fuera de ser completamente triviales, las huellas dactilares de proteínas no anudadas pueden llegar a ser complejas y altamente conservadas. El motivo de un nudo corredizo 4_1 acoplado a un 3_1 (en ciertas posiciones particulares), está presente en un gran número de proteínas transmembrana con funciones de transporte (particularmente LeuT(Aa) y BetP), pertenecientes a diferentes familias y provenientes de un amplio rango de microbios. Estas proteínas no están anudadas, pero al eliminar su extremo C se convierten en nudos 4_1 y, alternativamente, al eliminar su extremo N se obtienen nudos 3_1 (Fig. 2.3:20). Más aún, todas estas proteínas son de cotransporte y presentan un motivo de repetición invertida de cinco hélices, haciéndolas parte de una de las clases más grandes de transportadores activos secundarios. Lo que es más interesante es que esta huella está altamente conservada dentro de un conjunto de secuencias que no llegan a tener ni 23% de identidad de secuencia en el mejor de los casos⁶⁴. Que estructuras topológicas locales se mantengan tan conservadas a pesar de la amplia divergencia de secuencias **demuestra que este patrón debe representar alguna ventaja evolutiva importante**. Una posible ventaja puede ser que los lazos que conforman estos nudos corredizos mantengan unidas más cercanamente las hélices del canal, dándole mayor estabilidad (con respecto a configuraciones sin nudos locales).

⁶⁴Como caso extremo, la proteína SSF de *Vibrio parahaemolyticus* y la AA-permeasa de *Salmonella*, solamente tienen un 6% de secuencia en común.

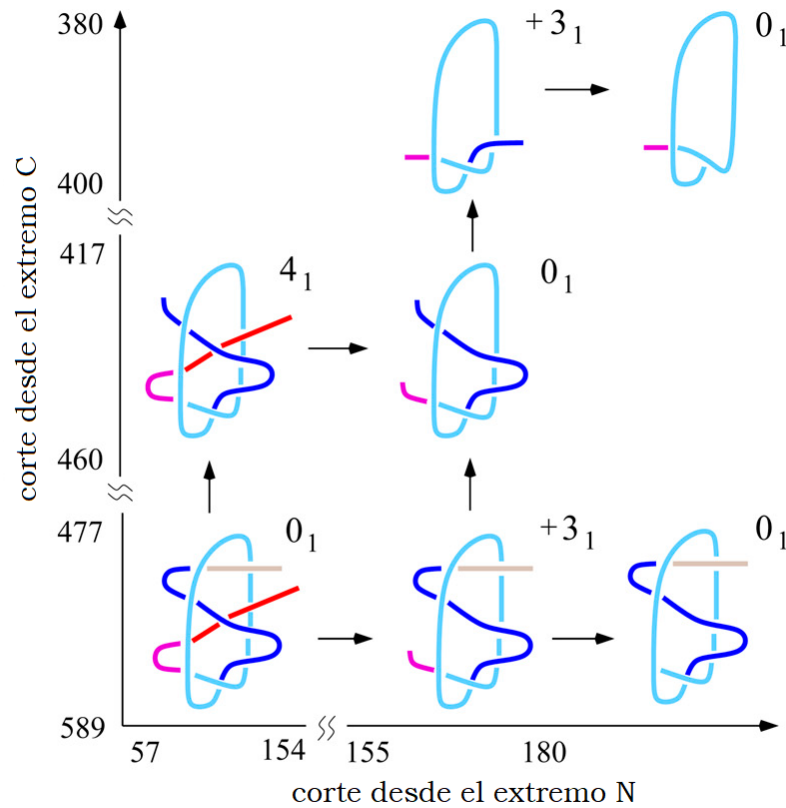


Fig. 2.3:20: Dibujo esquemático que representa el motivo “ 4_1 acoplado a 3_1 ” presente en las proteínas LeuT(Aa) y BetP. Los ejes x e y representan el número de aminoácidos cortados desde el extremo N y C (respectivamente) para obtener los distintos tipos de nudos. Que se puedan obtener distintos nudos no triviales con este procedimiento indica, precisamente, que estas proteínas presentan nudos corredizos. Adaptado de Sulkowska *et al.* (2012).

Una curiosidad evolutiva que surge al estudiar la formación de proteínas anudadas y con nudos corredizos es la conservación de secuencias ricas en glicina, que sirven como bisagras (*hinge points*) durante el plegamiento debido a su mayor flexibilidad y libertad de movimiento frente a otras secuencias. Es curioso porque, en general, se sabe que las regiones que sirven como bisagras suelen tener una gran variabilidad y por tanto no se suelen conservar (Flores *et al.*, 2007). Que todo lo contrario ocurra en aquellas proteínas con topología (local y global) compleja indica que las consecuentes complejidades del plegamiento *requieren* ciertas propiedades de flexibilidad muy particulares para su eficiente plegamiento, lo que favorece la conservación de **regiones bisagra ricas en prolina como una característica típica de este tipo de proteínas**.

El trabajo de Sulkowska *et al.* nos permite intuir, en mi opinión, varias posibilidades interesantes sobre la evolución de la topología de las proteínas. Primero que nada, **resalta la importancia que pueden tener** (y creo que tienen) **las diferencias en la topología local**, características en general ignoradas en favor de estudiar la topología global de una proteína. Segundo, la existencia de nudos corredizos en proteínas desanudadas **podría ofrecer un nuevo mecanismo de origen de proteínas anudadas**: si un extremo no es esencial desde el punto de vista funcional, podría perderse como consecuencia de una

delección y que la proteína resultante estuviese anudada, habiendo surgido de un nudo corredizo que pudo “ser realizado”. Hasta ahora sólo hemos hablado de posibles orígenes de las proteínas anudadas a partir de proteínas sin anudar, pero al considerar los nudos corredizos se abre otra posibilidad: tal como podría anudarse una proteína al extender una sección de bucle, **podría desanudarse una proteína al extenderse una sección terminal**. No queda muy claro, por ejemplo, cuál es la diferencia (desde el punto de vista de la complejidad) entre una proteína anudada en forma de 3_1 y una proteína desanudada con un nudo corredizo del mismo tipo. ¿Cuál es más favorable cinéticamente? ¿Qué diferencias funcionales puede haber? ¿Nos parecen intuitivamente igual de improbables? Y a partir de esto ¿habría alguna ventaja evolutiva en que el nudo de una proteína pasara a ser un nudo corredizo y viceversa?⁶⁵ Supongo que este tipo de preguntas podrían resolverse aumentando/disminuyendo artificialmente el largo de las regiones terminales y luego estudiando las diferencias, como en el trabajo de King *et al.* (2010), aunque no he podido encontrar trabajos al respecto.

Finalmente, la notable conservación de estructuras de nudos corredizos a lo largo de la evolución en grupos relativamente amplios de proteínas, revela **una nueva capa de complejidad estructural cuyos efectos pueden ser sutiles, y sobre los cuales puede actuar la selección natural de formas aún más complejas de las que hemos visto**. Claramente, una solución al problema del plegamiento de proteínas deberá ser capaz de dar cuenta de todas estas complejidades, y seguramente incluya en sus hipótesis algún modelo para la evolución de las proteínas en general⁶⁶.

⁶⁵ Si una proteína anudada útil surge a partir de una proteína no anudada debido a la delección de sus extremos, cabe preguntarse si podría haber surgido sin esos segmentos originalmente. Podría ocurrir que no, que las isoformas ancestrales necesarias para producir esta proteína anudada solo hubiesen sido útiles formando parte de un *slipknot*. En ese caso, podríamos pensar que nuestra proteína anudada improbable se habría “escondido” como un nudo corredizo dentro de una proteína de topología (global) trivial. Este “descubrimiento de una nueva proteína escondida” podría pensarse como lo opuesto a la propuesta de duplicación+fusión en King *et al.* (2010).

⁶⁶ Tal como las teorías basadas en contactos nativos suelen asumir que las proteínas evolucionan para plegarse independientemente de sus contactos no nativos, lo cual conlleva la improbabilidad de las proteínas anudadas (global o localmente).

Apéndice a la tangente matemática: Teorías alternativas de nudos

Antes de empezar con el último tema de esta sección, debemos hacer nuevas consideraciones. Sabiendo que existen los nudos virtuales, ¿por qué no pensar qué pasaría si agregáramos *otros tipos nuevos de cruces*? Es claro que si **definimos un nuevo cruce y creamos nuevos “movimientos de Reidemeister”** alternativos que expliquen cómo tratar a estos nuevos cruces, se tiene potencialmente una **nueva teoría de nudos** en la cual los nudos pueden presentar (además de cruces clásicos) un nuevo tipo de cruce, al que uno le puede dar una significación especial, y que se puede beneficiar del conocimiento propio de otras teorías de nudos (particularmente, la clásica). Más aún, se pueden definir invariantes para estos nuevos tipos de nudos de forma muy similar a cómo se obtuvieron para la teoría de nudos virtuales. Esta nueva teoría que uno creara podría llegar a ser trivial⁶⁷, pero si no lo es y uno definió los nuevos tipos de cruces por algún motivo (por ejemplo, para modelar una situación biológica, como veremos más adelante), uno poseería rápidamente herramientas que permiten trabajar con esta nueva teoría.

Aunque en la siguiente sección mencionaremos una teoría de este tipo inspirada por la biología, es interesante presentar un ejemplo que ha recibido considerable estudio. Para esto presentamos la **teoría de los nudos singulares**, que mencionaremos en la sección 3 de este trabajo. Un diagrama de nudo singular es aquel que posee cruces clásicos, virtuales y además *cruces singulares*, que se marcan con un punto (Fig. A6a). La idea de los cruces singulares es que en ese punto las dos secciones del nudo se intersectan en el espacio, por lo que no pueden ser separadas, y podría pensarse como que los nudos singulares son aquellas curvas que “no llegan a ser nudos” porque no cumplen la propiedad de no tener autointersecciones. Por supuesto, estos nudos vienen con sus propios movimientos de equivalencia, que consisten en los movimientos de Reidemeister clásicos, los movimientos virtuales y los **movimientos singulares** (Fig. A6b), que son los únicos que hacen referencia a los cruces singulares en sí.

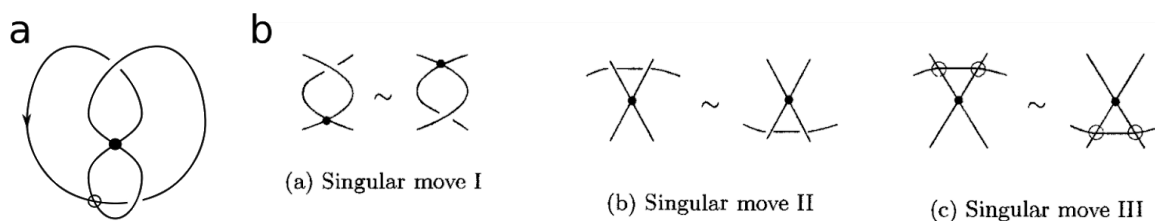


Fig. A6: La teoría de los nudos singulares. **a:** Ejemplo de un diagrama de nudo singular, presentando cruces clásicos, virtuales y singulares; **b:** Los movimientos singulares.

El libro “An Invitation to Knot Theory: Virtual and Classical” de Heather Dye (2016) incluye una presentación muy interesante de varias teorías alternativas de nudos, así como la intuición detrás de cada una de ellas, y se recomienda a cualquier lector interesado en este tema.

⁶⁷ Es decir, que se reduzca a la teoría de nudos clásica sin aportar nada, o que las nuevas equivalencias hagan que todos los nudos sean equivalentes al nudo trivial.

2.4 Nudos en el ARN

2.4.1 ¿ARN anudado?

Como hemos visto, la presencia de nudos en proteínas y moléculas de ADN muestra que *efectivamente existen nudos en los polímeros biológicos, aunque no sean tan abundantes como se esperaría por azar*. Esto sugiere la posibilidad de que puedan existir algunas (aunque sean pocas) moléculas de ARN anudadas. Esta posibilidad se ve amplificada por el descubrimiento de moléculas circulares de ARN en 2013, en forma independiente, por tres grupos de investigadores diferentes (Jeck *et al.*, 2013; Memczak *et al.*, 2013; Hansen *et al.*, 2013). Siendo que estas moléculas se sintetizan en forma lineal y después se cierran, sería esperable que cualquier conformación espacial anudada quede “atrapada” al cerrarse la cadena, similarmente a como pasaba con en el ADN bacteriano. Por si solo esto puedo no parecer muy probable, pero estos grupos mostraron que las moléculas de ARN circular constituyen un grupo abundante y con potentes funciones reguladoras, por lo que los nudos en el ARN podrían formar un conjunto relativamente común, asociado a funciones particulares (y por tanto, favorecido por la selección).

Sin embargo, a pesar de la constante búsqueda de estructuras de ARN anudadas, hasta el día de hoy no se han encontrado ejemplos, eliminando las posibilidades que intuimos en el párrafo anterior⁶⁸. De hecho, hasta el 2015, una búsqueda sobre estructuras de ARN en la PDB solo revelaba tres secuencias como posibles candidatas, y en todos estos casos se sospecha que los nudos en la estructura surgen como un artefacto de la reconstrucción usando criomicroscopía electrónica (Micheletti *et al.*, 2015; Burton *et al.*, 2015). Algunos autores creen que la ausencia de nudos en ARN se debe simplemente a una falta de ejemplos en la PDB, de forma similar a como ocurrió con el caso de las proteínas hasta el año 2000. Aún así, algunos autores han señalado que seguramente deben existir restricciones termodinámicas o cinéticas que evitan la formación de nudos profundos en los polímeros de ARN (Micheletti *et al.*, 2015), por lo que no sería extraño que no se encuentren, aún cuando haya aumentado la cantidad de estructuras de ARN almacenadas en el PDB.

Aún así, esto no quiere decir que la estructura tridimensional de las moléculas de ARN no tenga importancia. Debido a la complementariedad de bases entre distintas regiones de una o más moléculas de ARN, suelen formarse estructuras de **tallo**, que localmente se parecen a lo que sería el ARN de doble cadena. Estas regiones son relativamente estables y rígidas, por lo que se pueden pensar como parte de la estructura topológica del ARN⁶⁹. En este sentido, aunque no hayan nudos *en el esqueleto*

⁶⁸ En realidad, Hui Wang *et al.* sintetizaron en 1996 una molécula de ARN que podía ser cerrada y así adoptar dos formas: una desanudada y otra anudada en forma de trébol, que podían interconvertirse usando ADN-topoisomerasa III de *E. coli* (¡lo cual la convierte en la primera ARN-topoisomerasa conocida!). Este caso, lamentablemente, es muy particular y no parece haber indicación de que ocurra en la naturaleza..

⁶⁹ En el sentido de que *son parte de la estructura usual para una secuencia dada*, similar a como los nudos en las proteínas “siempre se puedan desatar” en teoría, pero no se suelen desatar en la práctica (por formar parte de la conformación nativa).

ribosa-fosfato, cabría la posibilidad de que estas moléculas de presenten propiedades topológicas interesantes *al tomar en cuenta las estructuras de tallos*, aún en cadenas abiertas de ARN (caso similar al de las proteínas).

2.4.2 Pseudonudos

Además de los tallos, las moléculas de ARN pueden presentar un tipo peculiar de estructura llamada “**pseudonudo**”. Los pseudonudos ya son estructuras bastante conocidas, habiéndose observado por primera vez en un virus del género *Tymovirus* en 1982 (Rietveld et al.) y desde entonces en casi todos los organismos vivos. Presentan al menos una estructura secundaria de tallo-bucle en la que parte de un tallo se encuentra intercalado con parte de otro (Figuras 2.4:1, 2.4:2)⁷⁰. Esto les lleva a adoptar una conformación tridimensional que posee diversas funciones, aunque no constituyan nudos propiamente dichos⁷¹.

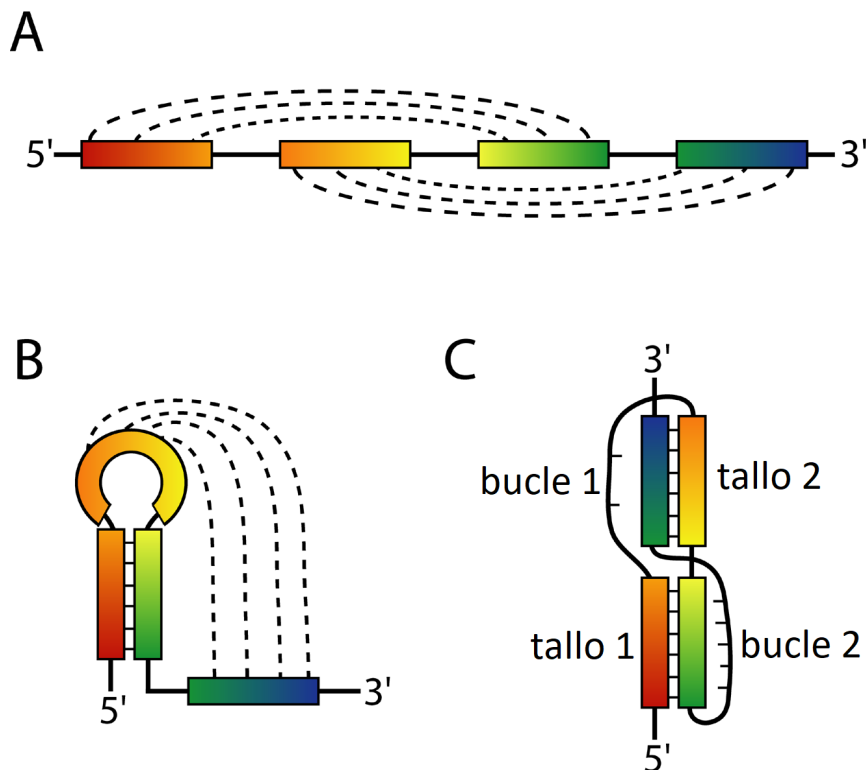


Fig. 2.4:1: Arquitectura de un pseudonudo de ARN tipo H. Las líneas punteadas indican qué bases se aparean con cuáles. **(A)** Estructura lineal dentro de un pseudonudo de ARN. **(B)** Formación de estructura tallo-bucle dentro de la secuencia del pseudonudo. **(C)** Estructura típica de un pseudonudo de tipo H. Reproducido parcialmente y traducido bajo licencia CC BY, a partir de Staple & Butcher (2005).

Los pseudonudos juegan un papel fundamental en la **actividad catalítica** de ciertos ARN, como por ejemplo el ARN del virus de la hepatitis D (HDV, *Hepatitis Delta Virus*), el

⁷⁰ Por supuesto, existen diferentes tipos de pseudonudos, siendo los de tipo H los mejor estudiados.

⁷¹ Intuitivamente, si uno “tirara de los extremos” de un pseudonudo (como el que aparece en la figura 2.4:1), el mismo se desataría inmediatamente. Recordar que ya usamos esta imagen al hablar de la definición intuitiva de una “curva abierta anudada” al inicio de la sección 2.3.

ARN de la ribozima telomerasa humana (hTR) y los *Group I self-splicing introns* que poseen la capacidad de realizar el proceso de corte y empalme sin la presencia de ninguna proteína, permitiendo la auto-edición de ciertos pre-ARNm. Otro rol que cumplen los pseudonudos es el de **cambiar el marco de lectura** en la dirección +1 o -1 para la traducción del ARNm. Un cambio de posición de -1 es típico de muchos virus, y es necesario para la correcta replicación y proliferación de todos los retrovirus. En este caso, se cree que el pseudonudo lleva a que el ribosoma frene sobre una secuencia “resbaladiza”, lo que tiende a causar un cambio en la posición del mismo (Staple & Butcher, 2005).

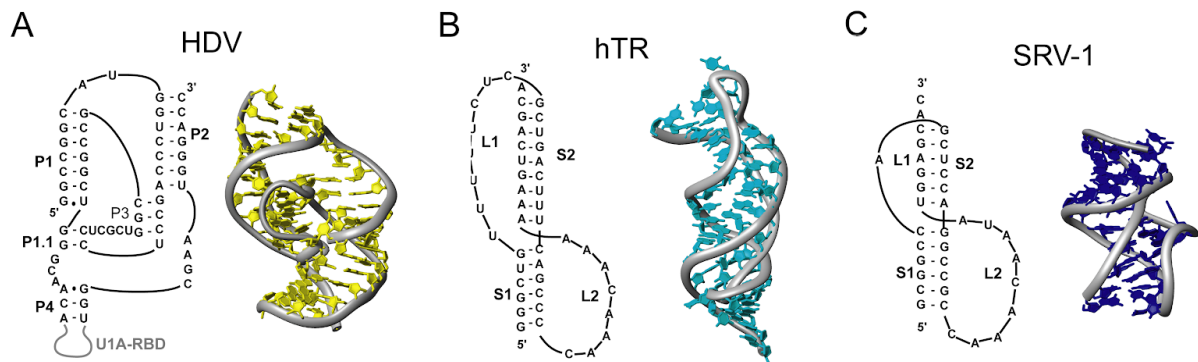


Fig. 2.4.2: Secuencias y estructuras de algunos pseudonudos de ARN. Los bucles están marcados con L (*loop*), mientras que los tallos están marcados con S (*stem*), excepto en el caso del HDV, donde se refleja la nomenclatura usual para el mismo. **(A)** Virus de la hepatitis D. **(B)** Telomerasa humana. **(C)** Retrovirus simiano 1. Reproducido parcialmente bajo licencia CC BY, a partir de Staple & Butcher (2005).

Cabe mencionar que existen autores que proponen que, aunque hoy en día parecen no existir nudos en el ARN, bajo la hipótesis del “mundo ARN” *podrían haber existido moléculas de ARN anudadas* en el pasado, posiblemente en abundancia, y con propiedades estructurales y funcionales interesantes y de gran importancia en los orígenes de la vida, tal como actualmente lo hacen otras estructuras secundarias más simples como los pseudonudos. Se ha propuesto que en el “mundo ARN”, las interacciones entre moléculas de ARN hubieran sido críticas para generar y mantener redes de moléculas interactuantes, que, se cree, podrían haber tenido propiedades similares a los seres vivos (*life-like behaviours*) (Vaidya *et al.*, 2012). En este caso, dos cadenas de ARN entrelazadas podrían fácilmente interactuar de forma recurrente sin la necesidad de que hayan enlaces covalentes entre ellas, y de forma más estable que si estuvieran unidas solamente por interacciones de sus estructuras secundarias (Burton *et al.*, 2016).

2.4.3 Un polinomio para el ARN

De acuerdo con los datos presentados en esta sección, queda claro que las moléculas de ARN, aún cuando no estén anudadas, poseen estructuras tridimensionales que determinan en gran medida su funcionalidad, y que generan ciertas restricciones topológicas que pueden asimilarse a las propias de moléculas anudadas. No sería extraño pensar, entonces, en usar métodos de la teoría de nudos para analizar y clasificar las distintas conformaciones espaciales de estos polímeros.

Siguiendo precisamente este razonamiento, Tian y colaboradores (2017) han propuesto ver las moléculas de ARN como *nudos con un tipo de cruce especial* correspondientes a las estructuras tallo-bucle características de los mismos. Considerados de esa forma, el análisis de las propiedades topológicas del ARN se convierte en una **teoría alternativa de nudos** en la que, además de existir los cruces clásicos representando el posicionamiento espacial del esqueleto ribosa-fosfato, existen también cruces especiales correspondientes a los tallos, representando la rigidez inducida por la interacción entre las bases nitrogenadas del ARN. De esta forma, se puede analizar el ARN teniendo en cuenta todas las propiedades de la molécula, permitiendo ganar un mayor entendimiento de la misma.

En su artículo, los autores presentan este nuevo tipo de cruce, al que llaman *vértice rígido*, y describen los “movimientos de Reidemeister” correspondientes a esta nueva estructura, que según ellos, reflejan los posibles movimientos que puede experimentar localmente una molécula de ARN al centrarse en un punto rígido como el generado por un tallo (Fig. 2.4:3). En el mismo trabajo, los autores distinguen dos tipos de vértices rígidos (denominados R y L) según la orientación local del nudo cerca del cruce (Fig. 2.4:4), y proponen *skein relations* entre distintos diagramas de nudos, permitiendo de esta forma pasar de un diagrama representando una molécula de ARN a una combinación lineal de diagramas representando nudos clásicos abiertos, que pueden cerrarse virtualmente (como se propuso en el caso de las proteínas)(Fig. 2.4:5).

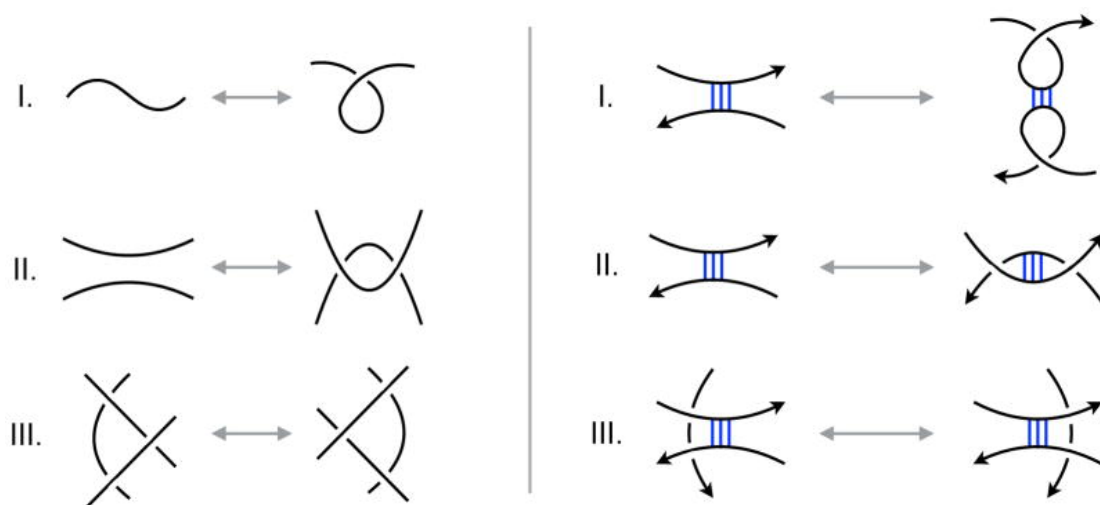


Fig. 2.4:3: Movimientos diagramáticos sobre los “nudos de ARN”. (Izquierda) Los movimientos de Reidemeister clásicos. (Derecha) Los movimientos locales correspondientes al nuevo tipo de cruce. Reproducido bajo licencia CC BY-NC-ND a partir de Tian *et al.* (2017).

A partir de estos diagramas clásicos cerrados, pueden calcularse invariantes conocidos, particularmente el *bracket polynomial* de Kauffman para poder analizar e identificar los nudos resultantes. Cabe mencionar que en el artículo los autores proponen primero una igualdad más complicada entre los tallos y cruces clásicos, pero terminan definiendo una versión más simple, que junto con el cálculo del *bracket polynomial*, define un polinomio propio de las moléculas de ARN que denominan el **polinomio simplificado de ARN o SiRP** (de *Simplified RNA Polynomial*), que refleja no solo información sobre el

esqueleto ribosa-fosfato, sino también sobre la estructura secundaria del ARN, como se deseaba. Como una aplicación particular, los autores demuestran que el SiRP de un pseudonudo (como el de la fig. 2.4:5a) es igual a $(A^8 + 1 - A^4)tw$.

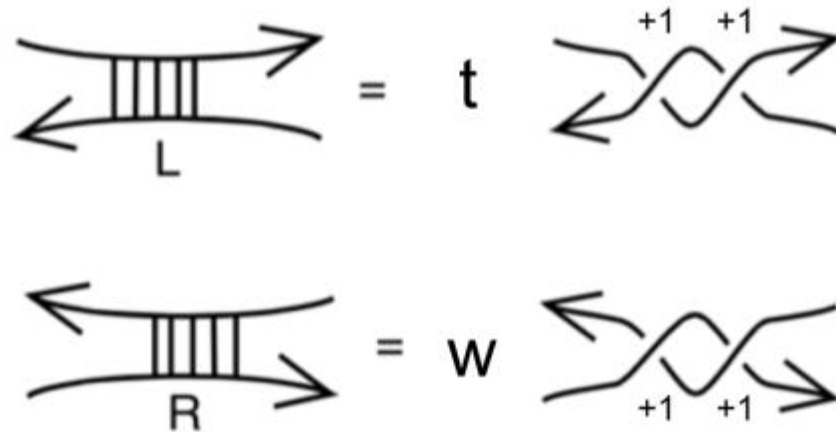


Fig. 2.4:4: *Skein relation* usada para el cálculo del SiRP (*Simplified RNA Polynomial*) . Adaptado de Tian *et al.* (2017).

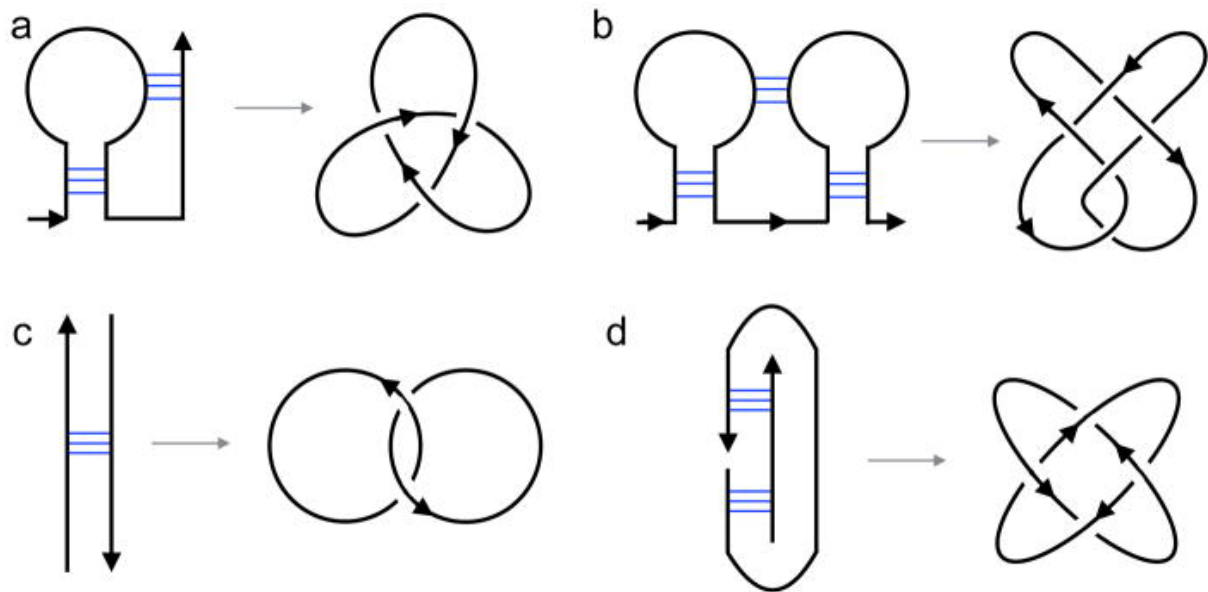


Fig. 2.4:5: Ejemplos de diagramas representando estructuras de ARN antes y después del cerrado virtual del nudo y de la aplicación de la *skein relation*. Reproducido a partir de Tian *et al.* (2017).

Más allá de esta aplicación particular, los autores proponen que este polinomio podría ser usado para el **estudio teórico de estructuras secundarias que no suelen ser consideradas** en este tipo de análisis, como son los puentes disulfuro presentes en la estructura secundaria de muchas proteínas. En la sección 2.3 mencionamos brevemente esta posibilidad, aunque la ignoramos debido a la poca atención que se le ha prestado en la literatura disponible. La existencia de herramientas matemáticas como esta, sin embargo, podría ser de gran utilidad para el desarrollo de esta área. Ya vimos cómo “ir más allá” en el estudio de la topología proteínica (considerando las “huellas dactilares” y las clausuras

virtuales) revela una visión mucho más sutil y compleja de las estructuras que influyen la función y evolución de las proteínas, aspectos que se podrían aplicar al estudio de la topología del ARN. **Quizás el siguiente paso lógico sea agregar a estos aspectos la participación de restricciones estructurales como los puentes disulfuro, analizándolas como nuevos tipos de cruces y usando los hallazgos de las modernas teorías alternativas de nudos, y lleve a una comprensión más profunda de las macromoléculas en general, y del ARN y las proteínas en particular.**

2.5 Conclusión

A lo largo de toda la sección 2 se han expuesto un gran número de situaciones en las que la teoría de nudos, presentada en la sección 1, juega un rol en ciertos aspectos biológicos relacionados a la estructura de macromoléculas importantes, en este caso ADN, proteínas y ARN. Esto quiere decir que luego de haber leído esta sección, el lector debería tener una visión general de las aplicaciones de esta teoría a la biología, así como de su importancia histórica y biológica.

En el caso particular del ADN, todas las consideraciones topológicas que deben hacerse son consecuencia del hecho de que la información genética existe en cada célula viva en la forma de unas pocas moléculas de gran tamaño con forma de doble hélice. Este hecho, que fue descubierto (no sin controversias) en 1953 por Watson y Crick, da origen al estudio profundo del ADN y (más importante para nosotros) al estudio de la topología de las moléculas biológicas, área que eventualmente llevaría al descubrimiento de conceptos tan fundamentales para la correcta función del ADN como el superenrollamiento, las topoisomerasas y el mecanismo de las recombinasas, permitiéndonos tener un entendimiento más profundo de la actividad del material genético *in vivo*. Históricamente, mucha de esta investigación estuvo motivada por el problema de separar las moléculas hijas luego del proceso de replicación, lo que permitió comprobar ciertas características del modelo de Watson y Crick. Tratamos de poner énfasis en las diferentes escalas en las que aparecen los nudos en el ADN: tanto a nivel “micro”, con la existencia de la doble hélice, como a nivel “macro”, con la anudación de moléculas de ADN enteras, dos niveles que se relacionan matemáticamente usando la fórmula de White, originalmente un descubrimiento de la matemática puramente teórica.

Habiendo tenido éxito en el terreno del ADN, planteamos una situación similar para las proteínas y notamos que, en este caso, el mismo problema debe ser planteado de forma diferente si deseamos obtener alguna respuesta. Esperamos que el lector entienda las dificultades propias de esta situación, así como las diferencias con el caso del ADN, entre las que aparece el problema del plegamiento de las proteínas, uno de los problemas más importantes de la biología actual. En ese respecto, los nudos parecen indicar que las teorías actuales más populares no son suficientes para predecir el comportamiento de este pequeño grupo de proteínas, y que por lo tanto es necesario crear nuevos modelos que puedan verdaderamente explicar la gran diversidad estructural presente en las proteínas *in vivo*. La baja variabilidad de las “huellas dactilares” de las proteínas es otra buena muestra de la importancia de la topología en el dominio biológico, mostrando que las estructuras de topología no trivial (tanto a nivel local como global), pueden proveer de ventajas evolutivas sumamente importantes a las proteínas, capaces de sobreponerse a todas las dificultades energéticas, cinéticas y de los movimientos de plegado que, intuitivamente, nos dicen que no deberían existir.

Finalmente, se cierra la sección 2 con una discusión de la topología del ARN, que hasta ahora ha resultado ser básicamente trivial. Sin embargo, con el uso de nuevas teorías alternativas de nudos, se poseen herramientas matemáticas para el estudio de la estructura de estas moléculas, de alguna forma “evidenciando nudos que no estaban allí”. Este

enfoque sigue siendo muy nuevo, por lo que no se ha podido observar su posible impacto, pero es de esperar que la teoría de nudos, usada en estos territorios menos tradicionales, sea capaz de producir nuevos problemas y resultados de gran interés para las ciencias biológicas.

3 Representación matricial de nudos

Una lección que se encuentra distribuida a lo largo del texto matemático y biológico que forma el grueso de este trabajo, es que **los nudos pueden verse de muchas formas**. Prueba de ello son las distintas aplicaciones biológicas del concepto de “nudo” en situaciones y escalas bastante distintas. En efecto, los polímeros pueden estar anudados, pueden estar “anudados virtualmente”, pueden ser vistos como nudos formados por otros nudos y pueden presentar estructuras distintas a la de un nudo, pero que pueden ser asimiladas a los mismos de todas formas. En el terreno puramente teórico, vimos que los nudos pueden verse como una curva en el espacio, una curva en el plano con ciertas estructuras especiales (los cruces), una palabra, un conjunto de *tangles* y un grafo. Cada una de estas representaciones nos permite estudiar los mismos objetos desde diferentes puntos de vista, *facilitando la comprensión de los mismos* (y sus posibles contrapartes biológicas) y permitiéndonos *unificar distintas perspectivas sobre este concepto abstracto*.

La idea que inició mi estudio de la teoría de nudos y que dio origen a esta tesis fue el de la exploración de una nueva representación para los nudos mediante el uso de una **matriz**, propuesta originalmente por Pomi (2013). Esta representación está inspirada en el formalismo de los **modelos matriciales de memorias asociativas**, provenientes del área de las redes neuronales. A partir de este modelo inicial, me dediqué a la búsqueda de propiedades interesantes que esta representación matricial pudiera presentar. El estudio de esta representación me llevó a profundizar aún más en la teoría de nudos de lo que se ha presentado aquí, y sigue existiendo la posibilidad de que esta matriz, a la que he denominado para este trabajo “**matriz de cruce**”, pueda ofrecer oportunidades interesantes para esta área de la matemática, y por tanto, para todas sus aplicaciones en la biología.

A continuación, y para finalizar este texto, presentaré un resumen de mi investigación sobre las matrices de cruce y sus propiedades, comenzando con una introducción a los modelos matriciales de memorias asociativas para poder definir correctamente el objeto de mi estudio.

3.1 Memorias asociativas y sus modelos matriciales

El estudio de las redes neuronales se inició como una forma de intentar comprender, y dar un fundamento teórico a las capacidades cognitivas del cerebro humano, a partir de modelos matemáticos del funcionamiento de las células encargadas de transmitir información en el sistema nervioso de los humanos: las neuronas. Estas unidades simplificadas pueden conectarse de formas muy diversas, generando nuevas redes que presenten colectivamente propiedades de procesamiento muy por encima de lo que podría lograr cualquier neurona individualmente. Esta disciplina empezó a desarrollarse en su forma más temprana en la década de 1940 con el trabajo de Warren McCulloch y Walter Pitts (1943) y tuvo un avance significativo en los 80s, con el trabajo del grupo PDP (Procesamiento Distribuido en Paralelo, por sus siglas en inglés) (Rumelhart *et al.*, 1987),

cuando se presentaron importantes algoritmos para el aprendizaje de redes multicapa que potentes importantes capacidades de cómputo con múltiples aplicaciones a la vida real.

Un problema importante para la biología fue el de modelar cómo se almacenan las memorias en el cerebro, y cómo las mismas se relacionan. En su artículo, Anderson (1970) plantea que las memorias biológicas deben poseer ciertas características distintas a las presentadas por las memorias de las computadoras existentes hasta aquel momento, que ocupan el menor espacio de almacenamiento posible, son independientes entre sí y confiables (con poco ruido). Las memorias biológicas claramente no presentan estas propiedades, habiendo evidencia experimental de su naturaleza distribuida, es decir que cada traza de memoria, sea cual sea su forma de almacenamiento, está guardada en forma dispersa en un gran número de neuronas. También es conocido que las trazas de memoria interaccionan entre sí y que seguramente exista ruido involucrado en las mismas. De esta forma, las memorias resultan de la actividad de **grupos extensos de neuronas**, cada una contribuyendo en parte al almacenamiento de varias memorias distintas. En ese y subsecuentes trabajos, Anderson (1972) y en forma independiente Kohonen (1972) y Cooper (1973) plantearon un **modelo lineal de memorias asociativas**, basado en evidencia fisiológica que se hallaba disponible (ver, por ejemplo, Nass & Cooper, 1975)

En este tipo de modelos, los patrones de actividad de grupos extensos de neuronas son naturalmente representados por vectores de componentes reales, de un espacio de alta dimensión. Cada coeficiente de estos vectores suele interpretarse como la frecuencia media de disparo de una cierta neurona. Cualquier actividad cognitiva, desde el punto de vista neural, **es un cierto patrón de activación** de grupos numerosos de neuronas. Entonces, este espacio vectorial puede representar, a la vez, el espacio de posibles patrones neuronales y un espacio abstracto de conceptos o ideas. En el marco de estos modelos, una memoria está definida por su capacidad de guardar asociaciones entre pares de patrones de actividad neuronal, representados por vectores. Dados dos conjuntos de vectores⁷²: $\{\mathbf{f}_1, \dots, \mathbf{f}_P\}$ de dimensión N y $\{\mathbf{g}_1, \dots, \mathbf{g}_P\}$ de dimensión Q , y definiendo el producto interno usual $\langle, \rangle$ como

$$\langle \mathbf{f}, \mathbf{f}' \rangle = \langle (f(1), \dots, f(N)), (f'(1), \dots, f'(N)) \rangle = f(1)f'(1) + \dots + f(N)f'(N) = \sum_{i=1}^N f(i)f'(i) \quad (3.1)$$

si se asume que los vectores del conjunto de estímulos son ortogonales, es decir que $\langle \mathbf{f}_i, \mathbf{f}_j \rangle = 0$ para todo $i, j = 1, \dots, P$ ⁷³, puede definirse una memoria asociativa lineal $\mathbf{M}$ que a cada $\mathbf{f}_i$ le asocia su correspondiente $\mathbf{g}_i$ como

$$\mathbf{M} = \sum_{i=1}^P \mathbf{g}_i \mathbf{f}_i^T = \mathbf{g}_1 \mathbf{f}_1^T + \dots + \mathbf{g}_P \mathbf{f}_P^T \quad (3.2)$$

siendo $\mathbf{f}^T$ la traspuesta de $\mathbf{f}$.

Esta matriz puede verse como la suma de varias matrices de tamaño $Q \times N$. Sabiendo que para vectores $\mathbf{f}$ y $\mathbf{f}'$ del mismo tamaño se cumple que $\mathbf{f}^T \mathbf{f}' = \langle \mathbf{f}, \mathbf{f}' \rangle$ y

⁷² En esta sección usaremos la notación usual para estos modelos, representando vectores con letras minúsculas en negrita (eg: $\mathbf{x}_1$), y matrices con letras mayúsculas en negrita (eg: $\mathbf{M}$). Las entradas de los vectores se denotarán sin negrita, entre paréntesis (eg: $\mathbf{x} = (x(1), x(2), \dots, x(N))$).

⁷³ Esta condición es muy probable si se considera que la dimensión de estos vectores es mucho mayor que el número de vectores en el conjunto de entrada y que cada concepto se mapea a un vector de forma aleatoria con igualdad de probabilidad para signos opuestos (Mizraji *et al.*, 1994)

recordando que $\langle \mathbf{f}_i, \mathbf{f}_j \rangle = 0$ para todos los $i, j = 1, \dots, P$, se puede ver que, dado un vector estímulo $\mathbf{f}_k$ perteneciente al conjunto que guarda la memoria, se puede recuperar el correspondiente vector asociado $\mathbf{g}_k$, multiplicado por un escalar:

$$\mathbf{M}\mathbf{f}_k = \mathbf{g}_1\mathbf{f}_1^T\mathbf{f}_k + \dots + \mathbf{g}_P\mathbf{f}_P^T\mathbf{f}_k = \mathbf{g}_1\langle \mathbf{f}_1, \mathbf{f}_k \rangle + \dots + \mathbf{g}_P\langle \mathbf{f}_P, \mathbf{f}_k \rangle = \mathbf{g}_k\langle \mathbf{f}_k, \mathbf{f}_k \rangle \quad (3.3)$$

En estos modelos, el reconocimiento se da por el ángulo, en cierta manera representado por el producto escalar, independientemente de la longitud del vector. Este tipo de memorias además presentan ciertas propiedades biológicas que nos interesan: aunque a cada patrón vectorial de entrada le corresponda uno solo de salida asociada, la matriz que los asocia contiene información de todos estos pares en *cada una de sus entradas*, lo que muestra su naturaleza distribuida. Aún más, este tipo de memorias es capaz de asociar correctamente aún si no se cumple estrictamente la condición de ortogonalidad, aunque presenta una cierta interferencia debido a la cercanía (en el espacio vectorial) de las distintas memorias.

Estos modelos clásicos de memorias asociativas distribuidas, formuladas originalmente por Kohonen (1972), Anderson (1972) y Cooper (1973), tienen una limitación importante: ante un mismo estímulo, la memoria responde siempre de la misma manera, mientras que las memorias biológicas se caracterizan por presentar asociaciones adaptativas, en las que un mismo estímulo elicit diferentes respuestas, dependiendo del contexto. La ampliación de las capacidades de las memorias asociativas clásicas para que permitan asociaciones contexto-dependientes fue planteada por Mizraji (1989). En este modelo, otro patrón de actividad neuronal, codificado en un “vector contexto”, es premultiplicado con el vector entrada mediante una operación llamada “**producto de Kronecker**”, antes de ingresar a la memoria.

El producto de Kronecker es una operación definida para dos matrices $\mathbf{A} = (a_{ij})$ y $\mathbf{B} = (b_{hk})$ de cualquier tamaño según la fórmula $\mathbf{A} \otimes \mathbf{B} = (a_{ij}\mathbf{B})$, es decir

$$\mathbf{A} \otimes \mathbf{B} = \begin{bmatrix} a_{11}\mathbf{B} & \cdots & a_{1n}\mathbf{B} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{m1}\mathbf{B} & \cdots & a_{mn}\mathbf{B} \end{bmatrix}$$

El producto de Kronecker cumple varias propiedades interesantes que permiten usarlo para dar contexto, entre ellas

- (a) $\mathbf{A} \otimes \mathbf{B} \otimes \mathbf{C} = (\mathbf{A} \otimes \mathbf{B}) \otimes \mathbf{C} = \mathbf{A} \otimes (\mathbf{B} \otimes \mathbf{C})$
- (b) $(\mathbf{A} + \mathbf{B}) \otimes (\mathbf{C} + \mathbf{D}) = \mathbf{A} \otimes \mathbf{C} + \mathbf{A} \otimes \mathbf{D} + \mathbf{B} \otimes \mathbf{C} + \mathbf{B} \otimes \mathbf{D}$
- (c) $(\mathbf{A} \otimes \mathbf{B})(\mathbf{C} \otimes \mathbf{D}) = (\mathbf{AC}) \otimes (\mathbf{BD})$
- (d) $(\mathbf{A} \otimes \mathbf{B})^T = (\mathbf{A}^T \otimes \mathbf{B}^T)$

Si $\mathbf{a}$ y $\mathbf{c}$ son vectores columna de dimensión m y $\mathbf{b}$ y $\mathbf{d}$ vectores columna de dimensión n , al aplicar (c) y (d), obtenemos la siguiente propiedad:

$$(e) \quad (\mathbf{a} \otimes \mathbf{b})^T(\mathbf{c} \otimes \mathbf{d}) = (\mathbf{a}^T \otimes \mathbf{b}^T)(\mathbf{c} \otimes \mathbf{d}) = (\mathbf{a}^T\mathbf{c}) \otimes (\mathbf{b}^T\mathbf{d}) = \langle \mathbf{a}, \mathbf{c} \rangle \langle \mathbf{b}, \mathbf{d} \rangle$$

Usando el producto de Kronecker, podemos definir una **memoria asociativa contexto-dependiente** $\mathbf{M}$ según la fórmula

$$\mathbf{M} = \sum_{i=1}^P \mathbf{g}_i(\mathbf{f}_i \otimes \mathbf{p}_i)^T = \mathbf{g}_1(\mathbf{f}_1 \otimes \mathbf{p}_1)^T + \dots + \mathbf{g}_P(\mathbf{f}_P \otimes \mathbf{p}_P)^T \quad (3.4)$$

donde $\mathbf{f}_i$ son los vectores de entrada, $\mathbf{g}_i$ los de salida y $\mathbf{p}_i$ los vectores de contexto. Escrito de esta forma, no tienen por qué ser diferentes los distintos $\mathbf{f}_i$, en efecto, puede ser que $\mathbf{f}_1 = \mathbf{f}_2$ y que esta memoria lo asocie a diferentes memorias $\mathbf{g}_1 \neq \mathbf{g}_2$ bajo los contextos $\mathbf{p}_1 \neq \mathbf{p}_2$. Para que esta memoria funcione correctamente, debemos asumir que los distintos contextos presentes (sin contar repeticiones) son ortogonales entre sí, así como los diferentes $\mathbf{f}_i$ asociados al *mismo contexto*. Es decir que

$$\begin{aligned} (1) \quad & \langle \mathbf{p}_i, \mathbf{p}_j \rangle = \mathbf{p}_i^T \mathbf{p}_j = 0 && \text{si } \mathbf{p}_i \neq \mathbf{p}_j \\ (2) \quad & (\mathbf{f}_i \otimes \mathbf{p}_k)^T (\mathbf{f}_j \otimes \mathbf{p}_k) = \langle \mathbf{f}_i, \mathbf{f}_j \rangle \langle \mathbf{p}_k, \mathbf{p}_k \rangle = 0 && \text{si } \mathbf{f}_i \neq \mathbf{f}_j \end{aligned}$$

De esta forma se puede ver que nuestra memoria es capaz de recuperar a partir de una memoria de entrada $\mathbf{f}_e$ bajo un contexto $\mathbf{p}_e$ una memoria de salida $\mathbf{g}_e$ ya que

$$\begin{aligned} \mathbf{M}(\mathbf{f}_e \otimes \mathbf{p}_e) &= \mathbf{g}_1(\mathbf{f}_1 \otimes \mathbf{p}_1)^T (\mathbf{f}_e \otimes \mathbf{p}_e) + \dots + \mathbf{g}_P(\mathbf{f}_P \otimes \mathbf{p}_P)^T (\mathbf{f}_e \otimes \mathbf{p}_e) \\ &= \mathbf{g}_1 \langle \mathbf{f}_1, \mathbf{f}_e \rangle \langle \mathbf{p}_1, \mathbf{p}_e \rangle + \dots + \mathbf{g}_P \langle \mathbf{f}_P, \mathbf{f}_e \rangle \langle \mathbf{p}_P, \mathbf{p}_e \rangle \\ &= \mathbf{g}_e \langle \mathbf{f}_e, \mathbf{f}_e \rangle \langle \mathbf{p}_e, \mathbf{p}_e \rangle \end{aligned} \quad (3.5)$$

En un planteo más general, la salida asociada $\mathbf{g}_i$ puede contener un contexto, es decir, puede darse que $\mathbf{g}_i = \mathbf{h}_j \otimes \mathbf{p}_j$ siendo ahora $\mathbf{h}_j$ el patrón de actividad neural asociado, “marcado” con un nuevo contexto vectorial $\mathbf{p}_j$. En este caso, la salida puede ser usada como entrada para otra memoria contexto-dependiente, lo que permite encadenar memorias asociativas para poder realizar funciones más complejas (Mizraji *et al.*, 2009; Pomi *et al.*, 2018).

Los modelos matriciales de memorias contexto-dependientes han demostrado poseer una gran versatilidad para modelizar, utilizando arquitecturas multimodulares, distintas funciones cognitivas, como la toma de decisiones diagnósticas (Pomi & Mizraji, 2001; Pomi, 2017), el cómputo mediante lógicas difusas (Mizraji, 1992; Mizraji & Lin, 2001), la producción de secuencias lingüísticas (Valle-Lisboa *et al.*, 2014) y han podido ser utilizados para la representación neural de grafos semánticos (Pomi & Mizraji, 2004) y de grupos finitos (Pomi, 2016).

3.2 La matriz de cruce (y cómo obtenerla)

Ahora que tenemos claro el formalismo matricial de las memorias contexto-dependientes, podemos pasar a definir nuestra representación matricial de un nudo. Sea $D(K)$ un diagrama de nudo de un cierto nudo K . Si nombramos a cada cruce con un número y orientamos el nudo, podemos ir recorriéndolo en el sentido de la orientación, pasando por los diferentes cruces, a veces por arriba (O, *over*) y por debajo (U, *under*). Para construir la representación matricial, **cada cruce del nudo y cada contexto (arriba (O) o debajo (U)) serán mapeados sobre vectores ortogonales.**

Los vectores correspondientes a los cruces serán de la mínima dimensión como para poder usar la base canónica para representarlos ortogonalmente⁷⁴. Esta última condición es equivalente a decir que **si tenemos N cruces en un diagrama, los vectores serán la base canónica del espacio N-dimensional euclídeo, $\mathbb{R}^N$** . Por tanto, $\mathbf{1} = (1, 0, \dots, 0)^T$, $\mathbf{2} = (0, 1, \dots, 0)^T, \dots$, $\mathbf{N} = (0, 0, \dots, 1)^T$. Similarmente, los vectores contexto serán representados utilizando los vectores de la base canónica de dimensión 2. Cabe mencionar que, como en el caso de las memorias neuronales, se podría suponer que los vectores asignados a cada cruce tienen una alta dimensionalidad y son asignados al azar, pero este modelo **no intenta ser una representación biológicamente plausible de cómo el cerebro representa curvas en el espacio realmente**, sino que es tan solo una forma de representar los nudos inspirada en los modelos de redes neuronales.

Una vez asignada la representación vectorial para los cruces y la posición de la curva, **la matriz de cruce $M(K)$ será la memoria asociativa que a cada cruce le asigna el próximo en la secuencia, bajo el contexto de si se pasa por arriba o por debajo** (Pomi, 2013). Una primera observación es que de esta forma, se cumplen nuestras condiciones de ortogonalidad para la construcción de una buena memoria asociativa contexto-dependiente, y aún más, como todos los vectores tienen norma 1, los valores multiplicando la salida en la ecuación (3.5) valen 1 y obtenemos exactamente la salida que deseábamos encontrar. Además, es inmediato a partir de estas consideraciones que si nuestro diagrama inicial tiene N cruces, $M(K)$ será una matriz cuadrada de tamaño $2N$.

Antes de presentar un ejemplo, puede ser que la “preparación” mencionada antes de la definición suene conocida. De hecho, estos pasos de rotular los cruces y elegir una orientación son los mismos que se describieron en la introducción matemática de esta tesis a la hora de definir el **código de Gauss** de un diagrama de nudo. En efecto, la matriz de cruce está estrechamente vinculada al código (no signado) de Gauss y, en el caso de un enlace de solo un componente, puede definirse basándose en este sin necesidad de hacer referencia a ningún diagrama de nudo. En este caso, la matriz de cruce es aquella que asocia a cada término del código de Gauss el próximo en la secuencia, considerando a cada letra como contexto para el número.

Para ilustrar todo esto, comencemos con uno de los ejemplos más simples: el diagrama mínimo del trébol (Fig. 3.2:1). Si numeramos los cruces secuencialmente como en la figura (es decir, elegimos un cruce 1 y una orientación y a partir de allí numeramos al siguiente 2 y así sucesivamente), obtenemos que la palabra de Gauss correspondiente es O1U2O3U1O2U3.

⁷⁴ Recordar que la representación vectorial de las memorias en general es completamente arbitraria; estas decisiones son las que simplifican la representación al máximo, facilitando su visualización y manipulación.

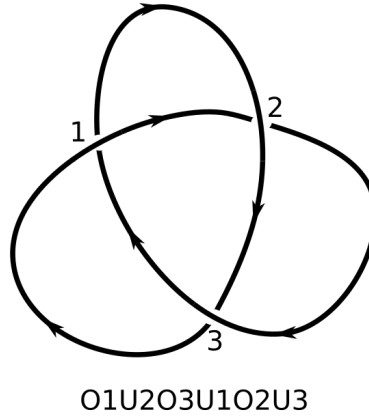


Fig. 3.2:1: Diagrama mínimo del nudo trébol (3_1) orientado y con cruces numerados, junto con su correspondiente código de Gauss.

Como sólo presenta 3 cruces, usamos la correspondencia $\mathbf{1}=(1,0,0)$, $\mathbf{2}=(0,1,0)$ y $\mathbf{3}=(0,0,1)$, y designamos $\mathbf{O}=(1,0)$ y $\mathbf{U}=(0,1)$. Entonces, si llamamos 3_1 al trébol (como es usual), en este caso la matriz de cruces $M(3_1)$ correspondiente al trébol viene dada por la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \mathbf{M}(3_1) = & (\mathbf{U} \otimes \mathbf{2})(\mathbf{O} \otimes \mathbf{1})^T + (\mathbf{O} \otimes \mathbf{3})(\mathbf{U} \otimes \mathbf{2})^T + (\mathbf{U} \otimes \mathbf{1})(\mathbf{O} \otimes \mathbf{3})^T + (\mathbf{O} \otimes \mathbf{2})(\mathbf{U} \otimes \mathbf{1})^T \\ & + (\mathbf{U} \otimes \mathbf{3})(\mathbf{O} \otimes \mathbf{2})^T + (\mathbf{O} \otimes \mathbf{1})(\mathbf{U} \otimes \mathbf{3})^T \end{aligned} \quad (3.6)$$

Se recomienda al lector chequear que esta ecuación se corresponde con las definiciones dadas hasta ahora, y que realice alguno de estos productos para poder observar su forma general. Observamos que esta suma incluye una unión entre el último término del código y el primero, por lo que si se elige una numeración fija para un diagrama, la matriz será siempre la misma (independientemente del “punto de inicio del recorrido”). Luego de hacer los cálculos, la matriz de cruce para el diagrama mínimo del nudo trébol es finalmente:

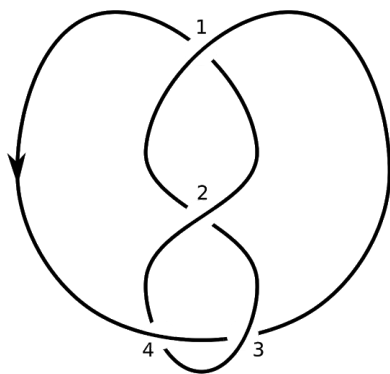
$$M(3_1) = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Antes de presentar más ejemplos, es importante (y casi inmediato) ver una forma algorítmica de escribir la matriz de cruce dado un código de Gauss, sin la necesidad de escribir una sumatoria de $2N$ términos. Básicamente, a cada columna de la matriz le corresponde un símbolo del código de Gauss (es decir, un número junto con O o U), en particular las primeras N columnas se refieren a $O1, O2, \dots, ON$ y las últimas N columnas se refieren a $U1, U2, \dots, UN$. Lo mismo ocurre con las filas de la matriz. Si vemos los términos de la sumatoria (3.6), podemos observar que se corresponden a matrices cuadradas de tamaño $2N$ cuyas entradas son todas 0 excepto por una, correspondiente a la columna de “entrada” y la fila de “salida”, que tiene una entrada de valor 1. Entonces, si empezamos con una

matriz de tamaño $2N \times 2N$ vacía, podemos construir la matriz de cruce a partir del código de Gauss de la siguiente forma:

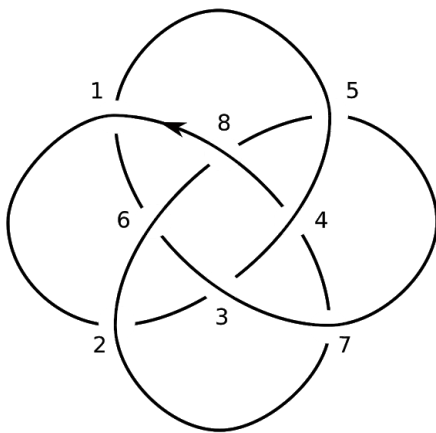
1. Ir a la primera columna, correspondiente al cruce O1
2. Ubicar la fila correspondiente al siguiente término en el código de Gauss (en este caso es U2, la 5ª fila)
3. Asignar un 1 a la entrada de la primera columna correspondiente a dicha fila
4. Asignar 0 al resto de la primera columna
5. Ir a la siguiente columna (en este caso, la segunda, correspondiente a O2)
6. Repetir los pasos 2-5 hasta que se haya completado toda la matriz

De esta forma, es más sencillo calcular las matrices de cruce correspondientes a muchos nudos, como los siguientes:



O1U2O3U4O2U1O4U3

$$M(4_1) = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$



O1U2U3O4O5U1U6O3O7U5U8O6O2U7U4O8

$$M(8_{19}) = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

3.3 Algunas propiedades iniciales de la matriz de cruce

Al igual que el código de Gauss, **la matriz de cruce puede ser usada para representar nudos virtuales**, simplemente ignorando los cruces virtuales y prosiguiendo normalmente con los cruces clásicos. Por otro lado, el código de Gauss como lo presentamos sólo está definido para nudos de un componente (para los enlaces se puede escribir, mediante un artificio, una palabra separada para cada componente), pero la matriz de cruce es más potente: es siempre posible e inmediato escribir la matriz de cruce a partir de cualquier diagrama de enlace (por ejemplo, ver la fig. 3.3:1), lo que quiere decir que **la matriz de cruce es una representación matricial de cualquier diagrama de enlace virtual**.

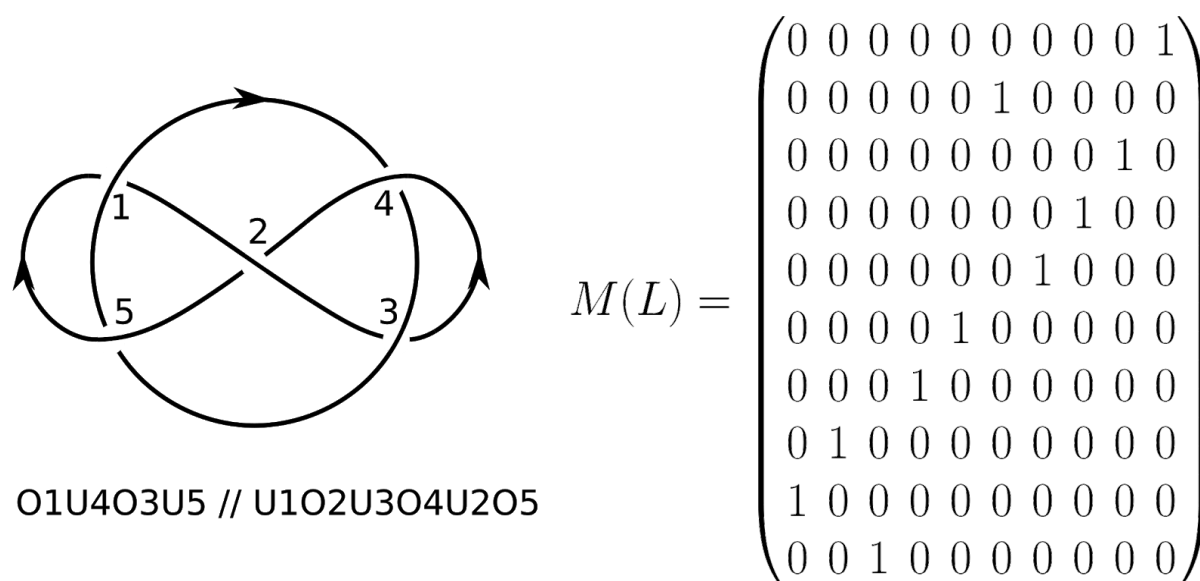


Fig. 3.3:1: Matriz de cruce para el enlace de Whitehead, un enlace de dos componentes. A partir de un diagrama de enlace de más de un componente puede obtenerse su matriz de cruce, así como un código de Gauss con más de un “componente”, como se muestra en la figura. No es inmediatamente claro cómo pasar de un código de este estilo a una matriz, por lo que aquí la definición original de la matriz de cruce resulta más poderosa, pudiendo representar cualquier enlace en su definición más básica.

No obstante, esta representación matricial comparte con el código (no signado) de Gauss una importante limitación: *¡no representa a un diagrama de forma única!* Esto último puede no parecer obvio, pero es un hecho conocido en la teoría de nudos de que **un código de Gauss no signado puede representar a más de un diagrama de nudo**. Por ejemplo, aunque hasta ahora venimos hablando de “el nudo trébol”, existen 2 versiones del mismo: uno en que todos sus cruces son positivos y otros en que todos sus cruces son negativos (Fig. 3.3:2). No es obvio que estos dos diagramas correspondan a nudos diferentes, pero esto puede demostrarse calculando el polinomio de Jones de ambos (como se hizo en la introducción) y observando que son distintos.

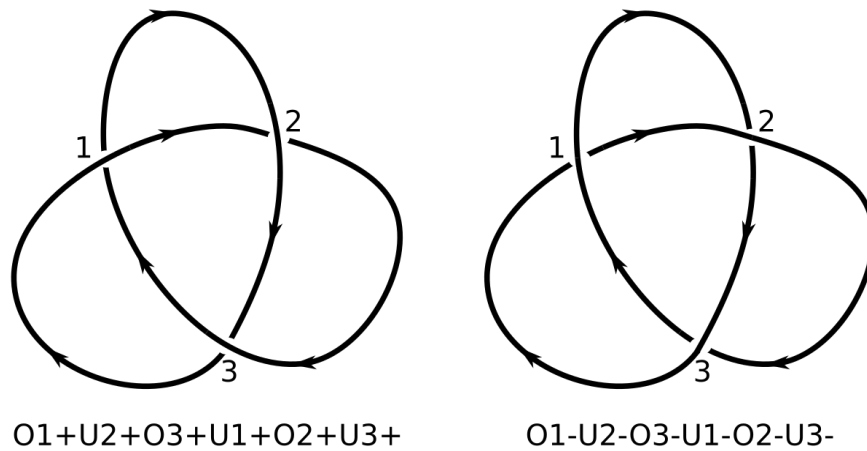


Fig. 3.3:2: Los dos tipos de nudos de tres cruces, ambos llamados trébol (*trefoil*) o 3_1 . Ambos nudos son diferentes, aunque se diferencian solamente en el signo de sus cruces, siendo idénticos sus códigos de Gauss. La matriz de cruces $M(K)$ propuesta en este trabajo no permite diferenciarlos, pues se basa solamente en el código de Gauss sin signos.

Estas son algunas de las primeras propiedades de nuestra representación matricial, e incluyen una que *nos gustaría modificar*. Es decir, nos gustaría poder encontrar alguna forma de que nuestro modelo representase **toda la información de un diagrama** (particularmente los signos de sus cruces). Resulta que, efectivamente, **podemos realizar estos cambios**, pero antes de eso deberíamos presentar algunas propiedades interesantes que ya se pueden observar en esta representación más básica.

Primero que nada, al estar trabajando con una matriz cuadrada, deberíamos estudiar su polinomio característico para ver si se relaciona con el nudo que representa. Para esto, observamos que una matriz de cruce $M(K)$ de tamaño $2N \times 2N$ tiene siempre el mismo polinomio característico: $x^{2N} - 1$. Esto se debe a que es una matriz de permutación con un sólo ciclo, de largo $2N$, por lo que el polinomio $P(x) = x^{2N} - 1$ cumple las siguientes propiedades:

- a) $P(M(K)) = 0$
- b) $P(x)$ tiene como raíces las $2N$ raíces complejas (todas distintas) de la unidad
- c) El grado de $P(x)$ es igual a la dimensión de $M(K)$

la primera propiedad surge precisamente de que se describe un ciclo de longitud $2N$: sea e_i un vector de la base canónica de tamaño $2N$, entonces $P(M(K))e_i = M(K)^{2N}e_i - e_i$ pero $M(K)^{2N}e_i = e_i$ para todo e_i (es como recorrer el nudo una vuelta entera empezando desde diferentes puntos), por lo que $P(M(K))e_i = 0$ para todo e_i . Estas tres propiedades muestran que $P(x)$ debe ser el polinomio mínimo de $M(K)$ y, por su grado, también su polinomio característico. De esta forma, podemos concluir que **las matrices de cruce correspondientes a diagramas de nudo con un mismo número de cruces comparten el mismo polinomio característico**.

Una segunda observación importante es esta: debido al uso de dos contextos, la matriz queda dividida en 4 cuadrantes de tamaño $N \times N$ de forma natural, correspondiendo a las entradas con

1. columnas tipo **O** y filas tipo **O**
2. columnas tipo **U** y filas tipo **O**
3. columnas tipo **O** y filas tipo **U**
4. columnas tipo **U** y filas tipo **U**

siendo las columnas/filas “tipo **O**” las primeras N y las de “tipo **U**” las últimas N . Si tomamos en cuenta lo que significan las entradas, se ve que el bloque 1 se corresponde a los pasajes de “over” a “over”, es decir, a cada vez que un **O** sigue a otro **O** en el código de Gauss. Lo mismo, pero con **U** pasa en el bloque 4, mientras que en los bloques 2 y 3 se representan los pasajes de la forma **UO** y **OU** respectivamente. En general llamaremos a los bloques 1 y 4 “**bloques diagonales**” y a los bloques 2 y 3 “**bloques antidiagonales**” (Fig. 3.3:3)

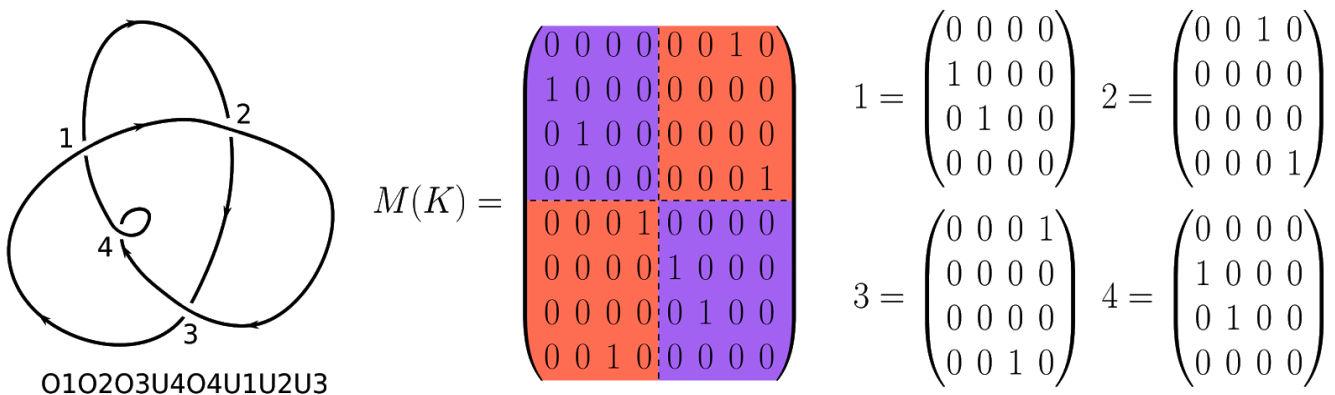


Fig. 3.3:3: Bloques de una matriz de cruce. **(Izquierda):** Diagrama K de un nudo equivalente al nudo trivial, junto con su código de Gauss. **(Centro):** Matriz de cruces para el diagrama K , con sus bloques separadas por líneas punteadas. Si la matriz es de tamaño $2N \times 2N$, las líneas punteadas la separan en 4 submatrices de tamaño $N \times N$. Los *bloques diagonales* están en violeta y los *bloques antidiagonales* están en naranja. **(Derecha):** Los cuatro bloques como matrices independientes, identificados según la numeración presentada en el texto.

Podemos entonces decir que *una matriz de cruce es alternante si tiene bloques diagonales nulos* (es decir, que todas sus entradas son 0), y que *un diagrama es alternante si le corresponde alguna matriz de cruce alternante*. Claramente esta definición es equivalente a la usual (presentada en la introducción) y es independiente de la numeración elegida para los cruces. La definición de nudo alternante es análoga a la original a partir de estas observaciones. Por supuesto, podemos definir una matriz no-alternante como aquella que tenga alguna entrada no nula en alguno de sus bloques diagonales. Esta clasificación rudimentaria ya sirve para distinguir dos tipos de matrices, y está involucrada en lo que fue la primera incógnita de mi trabajo.

3.4 Círculos de Seifert y una nueva clasificación de nudos

Una de las primeras cuestiones que investigué con respecto a este modelo está relacionada con la noción de una “matriz alternante” y “no alternante”, y fundamentalmente, con unas estructuras llamadas **círculos de Seifert**. Los círculos de Seifert son curvas que se pueden obtener a partir de cualquier diagrama clásico (i.e.: no virtual) orientado de nudo, eliminando cruces según lo mostrado en la figura 3.4:1. Básicamente, en cada cruce hay 4 secciones: dos entrantes y dos salientes, que están unidas dos a dos. El procedimiento entonces consiste en cambiar a qué segmento saliente está unido cada segmento entrante, con lo que se elimina el cruce y eventualmente se delimita una curva cerrada sin intersecciones. Las curvas obtenidas de esta forma son los llamados “círculos de Seifert”.

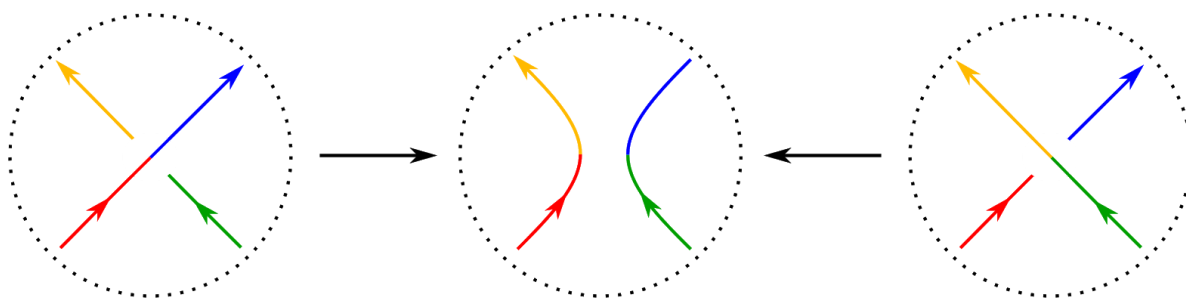


Fig. 3.4:1: Eliminación de cruces para obtener los círculos de Seifert. Esta operación se define para cualquier cruce de un diagrama clásico orientado de un nudo, y consiste básicamente en cortar y pegar las hebras que participan en un cruce, respetando su orientación. En esta figura se muestra esta operación, tanto para cruces positivos (izquierda) como negativos (derecha). Los colores en la figura son arbitrarios y sirven solamente para poder identificar mejor las secciones del nudo.

Los círculos de Seifert juegan un papel en la construcción de las llamadas “superficies de Seifert”, superficies con borde cuyo borde es topológicamente igual al nudo del diagrama inicial. Este algoritmo facilitó la obtención de este tipo de superficies, que son de utilidad a la hora de clasificar nudos, por lo que cualquier conexión entre la matriz de cruces y las mismas podría ser de importancia.

La observación inicial que me llevó a pensar que podría existir una relación entre ambos temas fue que, si tomamos un bloque de los 4 antes definidos, podemos interpretar sus entradas como determinando secuencias de cruces de la siguiente forma: si a y b son cruces del diagrama, **decimos que el bloque determina la secuencia a - b si la entrada en la columna a y fila b es 1. Un bloque determina la secuencia x_1 - x_2 -...- x_n si determina las secuencias x_1 - x_2 , x_2 - x_3 , ... y x_{n-1} - x_n , como si cada bloque fuera una memoria asociativa que asocia cruces con cruces, sin el contexto O o U .**

Esta última perspectiva puede verse algebraicamente para cualquier matriz de cruce $M(K)$ usando las propiedades del producto de Kronecker, de donde se obtiene que toda matriz de cruce se puede escribir como la suma de cuatro matrices cuyas entradas son

nulas excepto en uno de los bloques⁷⁵. A partir de la definición, la matriz de cruce puede escribirse:

$$\begin{aligned} \mathbf{M}(K) = & \sum_i (\mathbf{U} \otimes \mathbf{x}_{i+1})(\mathbf{O} \otimes \mathbf{x}_i)^T + \sum_j (\mathbf{O} \otimes \mathbf{x}_{j+1})(\mathbf{U} \otimes \mathbf{x}_j)^T + \sum_h (\mathbf{U} \otimes \mathbf{x}_{h+1})(\mathbf{U} \otimes \mathbf{x}_h)^T \\ & + \sum_k (\mathbf{O} \otimes \mathbf{x}_{k+1})(\mathbf{O} \otimes \mathbf{x}_k)^T \end{aligned}$$

Y utilizando propiedades del producto de Kronecker se puede reescribir como:

$$\begin{aligned} = & \sum_i (\mathbf{UO}^T) \otimes (\mathbf{x}_{i+1}\mathbf{x}_i^T) + \sum_j (\mathbf{OU}^T) \otimes (\mathbf{x}_{j+1}\mathbf{x}_j^T) + \sum_h (\mathbf{UU}^T) \otimes (\mathbf{x}_{h+1}\mathbf{x}_h^T) \\ & + \sum_k (\mathbf{OO}^T) \otimes (\mathbf{x}_{k+1}\mathbf{x}_k^T) \\ = & \mathbf{UO}^T \otimes \left(\sum_i \mathbf{x}_{i+1}\mathbf{x}_i^T \right) + \mathbf{OU}^T \otimes \left(\sum_j \mathbf{x}_{j+1}\mathbf{x}_j^T \right) + \mathbf{UU}^T \otimes \left(\sum_h \mathbf{x}_{h+1}\mathbf{x}_h^T \right) \\ & + \mathbf{OO}^T \otimes \left(\sum_k \mathbf{x}_{k+1}\mathbf{x}_k^T \right) \end{aligned}$$

Obsérvese que $\mathbf{UO}^T$, $\mathbf{OU}^T$, $\mathbf{UU}^T$ y $\mathbf{OO}^T$ son matrices unitarias de 2×2 , con un 1 en uno de los cuadrantes correspondientes a transiciones diagonales (over-over y under-under) o antidiagonales (over-under y under-over). En ese cuadrante quedarán situadas las matrices cuadradas que las multiplican (las que se encuentran entre paréntesis), y que contienen la sumatoria de un mismo tipo de transiciones entre cruces, por ejemplo $\mathbf{O} \rightarrow \mathbf{U}$. Estas matrices entre paréntesis son memorias asociativas clásicas (sin contexto).

Por ejemplo, en el caso del trébol, ambos bloques antidiagonales son idénticos y muestran la secuencia 1-2-3-1, donde el último término indica que la secuencia es efectivamente cíclica. Esto es bastante evidente desde el código de Gauss: $\mathbf{O1U2O3U1O2U3}$. Los bloques 2 y 3 muestran las secuencias de la forma $\mathbf{UOUO} \dots$ y $\mathbf{OUOU} \dots$ respectivamente, que en el caso del trébol dan de forma idéntica secuencias numeradas como 1-2-3-1. Otros diagramas, como el del nudo 4_1 , tienen bloques antidiagonales diferentes, correspondientes a las secuencias 1-2-1 y 3-4-3 (bloque 3) y 1-3-2-4-1 (bloque 2) (Fig. 3.4:2 (derecha)). Lo curioso es que **estas secuencias son las mismas secuencias que definen a los círculos de Seifert de esas proyecciones** (Fig. 3.4:2), por lo que podemos decir que estos nudos cumplen la siguiente propiedad:

Propiedad 1: Decimos que un diagrama de nudo cumple esta propiedad si los círculos de Seifert del diagrama son equivalentes a los ciclos presentes en los bloques de la matriz de cruce⁷⁶.

⁷⁵ Este hecho queda como ejercicio para el lector que desee practicar las operaciones con matrices.

⁷⁶ Por supuesto, en los ejemplos mencionados esto es equivalente a decir que los ciclos están presentes en los bloques antidiagonales de la matriz, siendo que en estos ejemplos los bloques diagonales son nulos.

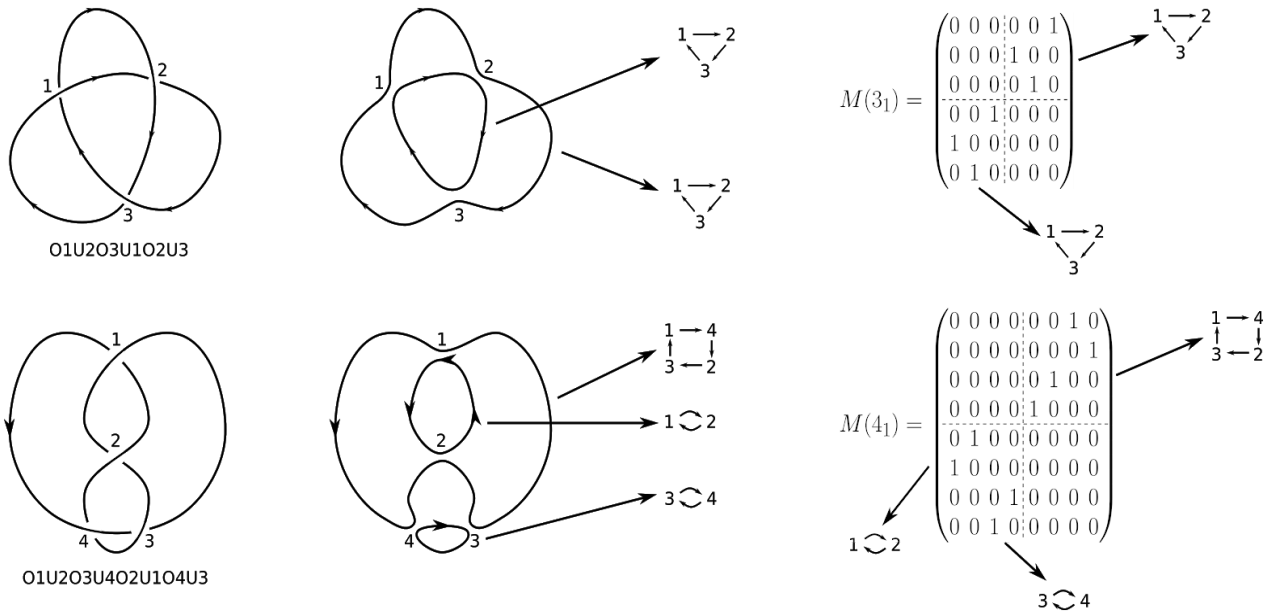


Fig. 3.4.2: Diagramas de nudos que cumplen la Propiedad 1. **(Izquierda):** Diagramas mínimos de los nudos 3_1 (arriba) y 4_1 (abajo). **(Centro):** Círculos de Seifert, obtenidos a partir de los diagramas a la izquierda. Cada círculo puede ser descrito por la secuencia de “cruces” que recorre (es decir, los puntos donde solían estar los cruces). Estas secuencias están asociadas a su círculo correspondiente con una flecha. **(Derecha):** Matrices de cruce para los diagramas de la izquierda, con sus 4 submatrices divididas por líneas punteadas. Examinando cada submatriz pueden obtenerse ciclos, que en este caso coinciden exactamente con los ciclos de los círculos de Seifert lo que, por definición, significa que estos diagramas cumplen la Propiedad 1.

Un primer resultado a partir de esta definición es que **todos los diagramas alternantes, como los ejemplos mencionados, cumplen la Propiedad 1**, lo que pasaremos a demostrar a continuación. Para esta demostración, definiremos una forma de colorear los segmentos de un diagrama alternante cualquiera con dos colores y veremos que:

1. Las secuencias que se obtienen para el bloque antidiagonal inferior siempre serán de un color, mientras que las secuencias que se obtienen a partir del bloque antidiagonal superior siempre son del otro color (recordar que en un diagrama alternante los otros dos bloques tienen entradas 0).
2. Cada círculo de Seifert es monocromático.

De esta forma veremos que un ciclo correspondiente a un círculo de Seifert puede describirse usando solamente una de las dos matrices antidiagonales; y como todo segmento de un diagrama forma parte de algún círculo de Seifert, esto quiere decir que las **secuencias que se obtienen a partir de cada bloque forman ciclos y coinciden exactamente con los círculos de Seifert para el mismo diagrama**.

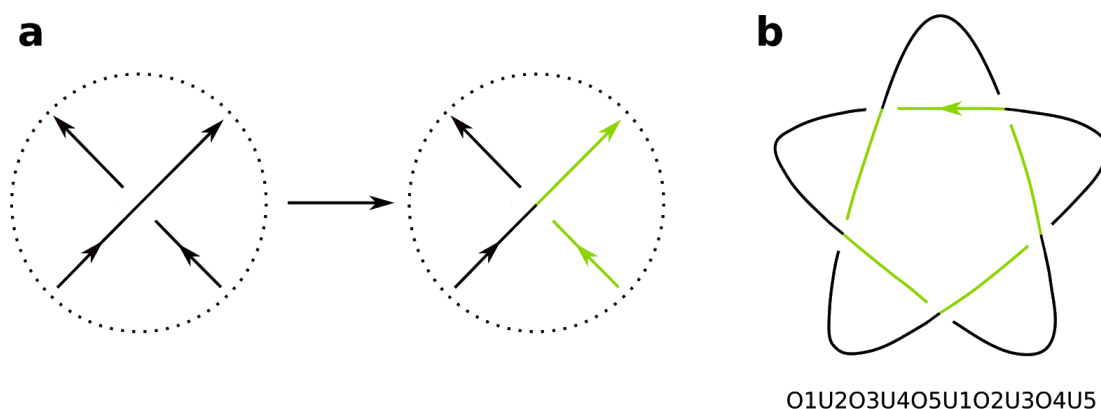


Fig. 3.4:3: Una forma de colorear los segmentos de un diagrama de nudo. **a:** Definición de esta coloración en un cruce de signo positivo; **b:** Diagrama mínimo del nudo 5_1 coloreado según esta coloración. Observar que esto solo es posible para un diagrama alternante.

La coloración se define como en la figura 3.4:3a. A cada segmento (lease: sección de la curva entre dos cruces) se le asigna un color, verde o negro, de la siguiente forma: un segmento es negro si se acerca a un cruce por arriba o se aleja por abajo, y es verde si se aleja de un cruce por arriba o se acerca por abajo. Esta definición es local, pero como en un diagrama alternante alejarse de un cruce por arriba implica acercarse a un cruce por abajo (y viceversa), se pueden colorear los diagramas alternantes usando este criterio. Dicho más fácilmente: **en un diagrama alternante, si un segmento va hacia un cruce por arriba, es negro, si no, es verde.** Un ejemplo de un diagrama alternante coloreado de esta forma está en la figura 3.4:3b.

Luego de esto, debemos preguntarnos: ¿Qué significa que la secuencia a-b esté presente en un bloque de M ? Si elegimos particularmente el bloque 3 (antidiagonal inferior), vemos que las columnas hacen referencia a los N cruces del diagrama, bajo el contexto O . Por otro lado, sus filas hacen referencia a los N cruces del diagrama bajo el contexto U . Decimos que la secuencia x_1-x_2 está en el bloque 3 si la entrada correspondiente a la columna Ox_1 y a la fila Ux_2 de M es igual a 1. Esto es lo mismo que decir que la palabra de Gauss contiene la secuencia Ox_1Ux_2 . La observación importante aquí es que, en el diagrama, el segmento que va desde el cruce x_1 por arriba hasta el cruce x_2 por abajo *debe ser de color verde*, porque va hacia un cruce por debajo. Según este razonamiento, si la secuencia $x_1-x_2-\dots-x_n$ está en el bloque 3, también lo están las secuencias $x_1-x_2, \dots, x_{n-1}-x_n$ (que se corresponden a un segmento verde cada una) y por tanto, **la misma se corresponde con una serie de segmentos verdes en el diagrama de nudo.** Un razonamiento similar lleva a que **toda secuencia presente en el bloque 2 se corresponde con una serie de segmentos negros en el diagrama de nudo.** Es decir que las secuencias presentes en los bloques antidiagonales se corresponden con secuencias de segmentos de un solo color en el diagrama de nudo original. Como todo segmento se define por sus extremos y esto se refleja en el código de Gauss, esto significa que todas los segmentos verdes están representados en la matriz 3 y todos los segmentos negros están en la matriz 2.

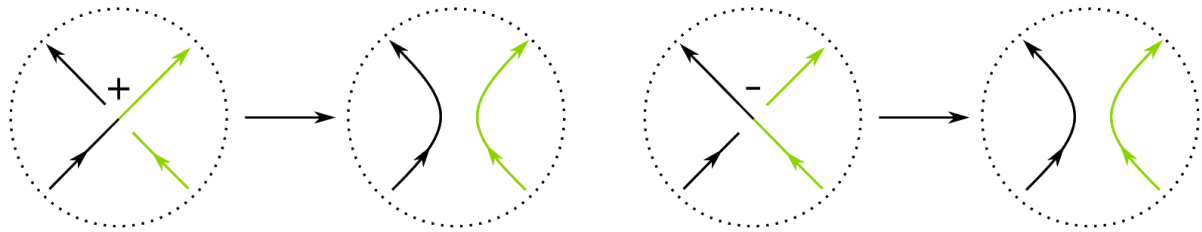


Fig. 3.4:4: La operación de eliminación para obtener los círculos de Seifert lleva a círculos monocromáticos tanto para cruces positivos como para cruces negativos.

Tomando en cuenta que todos los segmentos pertenecen a algún bloque, podemos ver que **cada bloque antidiagonal representa todos los segmentos de un cierto color**. Entonces, si demostramos que cada círculo de Seifert es *una secuencia de segmentos de un cierto color*, cada círculo tiene que corresponderse con una secuencia de segmentos representados en uno de los dos bloques antidiagonales (eg: Si un círculo es verde, debe ser una secuencia de segmentos verdes y por tanto, debe estar representada en el bloque 3). Más aún, como todo segmento forma parte de un círculo de Seifert, no pueden existir segmentos representados en un bloque que no pertenezcan a un círculo de Seifert, y por tanto, **los círculos de Seifert son exactamente las secuencias representadas en los bloques antidiagonales, lo que por definición significa que todo diagrama alternante cumple la Propiedad 1**, que es lo que queríamos demostrar. Demostrar que cada círculo de Seifert es una secuencia de segmentos de un solo color es fácil: existen dos tipos de cruces, positivos y negativos, así que basta ver que en ambos casos el proceso de eliminar cruces une segmentos verdes con verdes y negros con negros. Esto implica que **si un segmento pertenece a un círculo de Seifert, el siguiente debe ser del mismo color y así sucesivamente, por lo que todo el círculo es del mismo color**. Que esto es verdad se comprueba fácilmente, como lo muestra la figura 3.4:4, que finaliza nuestra demostración.

Esta propiedad *obviamente* no tiene por qué ser verdad para los diagramas/matrices no alternantes: en un diagrama no alternante, los bloques antidiagonales no necesariamente contienen ciclos cerrados, debido a que los bloques diagonales no están vacíos. Sin embargo, en muchos diagramas no alternantes es posible “pegar” las secuencias obtenidas en los diferentes bloques para formar los círculos de Seifert (Fig.3.4:5a,b). Para agrupar los casos que se comportan de esta manera, definimos la siguiente propiedad:

Propiedad 2: Un diagrama de nudo cumple esta propiedad si no cumple la Propiedad 1 y los círculos de Seifert del diagrama pueden ser construidos a partir de los ciclos presentes en los bloques de la matriz de cruce.

La Propiedad 2 puede parecer totalmente trivial, ya que si permitimos pegar secuencias sueltas, es esperable que pudiéramos formar cualquier tipo de secuencia, pero la clave está en que no se pueden cortar las secuencias que se forman dentro de un bloque. Esta restricción puede resultar arbitraria, pero resulta de tratar de generalizar, para diagramas no alternantes, la equivalencia entre ciclos y círculos de Seifert demostrada para diagramas alternantes. Sin embargo, existen diagramas para los cuales ni siquiera permitiendo esto se pueden obtener los círculos de Seifert a partir de las secuencias en los bloques (Fig. 3.4:5c), lo que muestra que no es una cuestión totalmente trivial.

Podemos ahora clasificar nuestras matrices en 3 categorías: aquellas que cumplen la Propiedad 1, aquellas que cumplen la Propiedad 2 y aquellas que no cumplen ninguna de las dos propiedades (nombraremos a esta última “propiedad por defecto” como **Propiedad 3**). Es claro que todas las matrices alternantes están dentro del primer grupo, pero existen matrices no alternantes en los dos últimos grupos, y de hecho, podremos ver la pertenencia de un diagrama a cada uno de estos grupos, como una especie de medida de su “grado de alternatividad”. Aún más, es fácil demostrar que no existe ningún diagrama de nudo (estrictamente hablando, es decir un enlace de un componente) no alternante cuya matriz cumpla la Propiedad 1⁷⁷, lo que significa que los diagramas que cumplen la Propiedad 1 son exactamente los diagramas alternantes.

¿Qué características debe tener un diagrama para cumplir la Propiedad 2? Debe ser no alternante, lo que significa que existen secuencias de la forma **O...O** y/o **U...U** en su código de Gauss. Si **la longitud máxima de estas secuencias es dos** (es decir que aparecen como máximo dos pases seguidos por arriba o por debajo en el diagrama), entonces las secuencias presentes en los bloques diagonales serán de la forma $x_i - x_j$ (ver Fig. 3.4:5b). La misma demostración que prueba que todos los diagramas alternantes cumplen la Propiedad 1 sirve para demostrar que toda secuencia de segmentos en un bloque antidiagonal forma parte de algún círculo de Seifert (considerando que una secuencia de segmentos alternantes puede ser coloreada como en la demostración), lo que significa que **toda secuencia alternante de cruces en un diagrama es compatible con los círculos de Seifert del mismo**. Sabemos entonces que, aún en los diagramas no alternantes, las partes alternantes del diagrama se corresponderán sin problema con los círculos de Seifert, excepto por ciertos “agujeros” correspondientes a las partes no alternantes. Pero, si las secuencias no alternantes son siempre de la forma $x_i - x_j$, estos agujeros *¡siempre se pueden completar!* No puede existir incompatibilidad entre los “ciclos arreglados” y los círculos de Seifert porque los círculos de Seifert siempre siguen una línea uniendo dos cruces: si en un ciclo alternante falta un segmento uniendo los cruces x_i y x_j , *debe* existir en el código de Gauss una secuencia de la forma Ox_iOx_j o Ux_iUx_j , por lo que se puede rellenar sin problema.

⁷⁷ La demostración queda como un ejercicio para el lector que le interese.

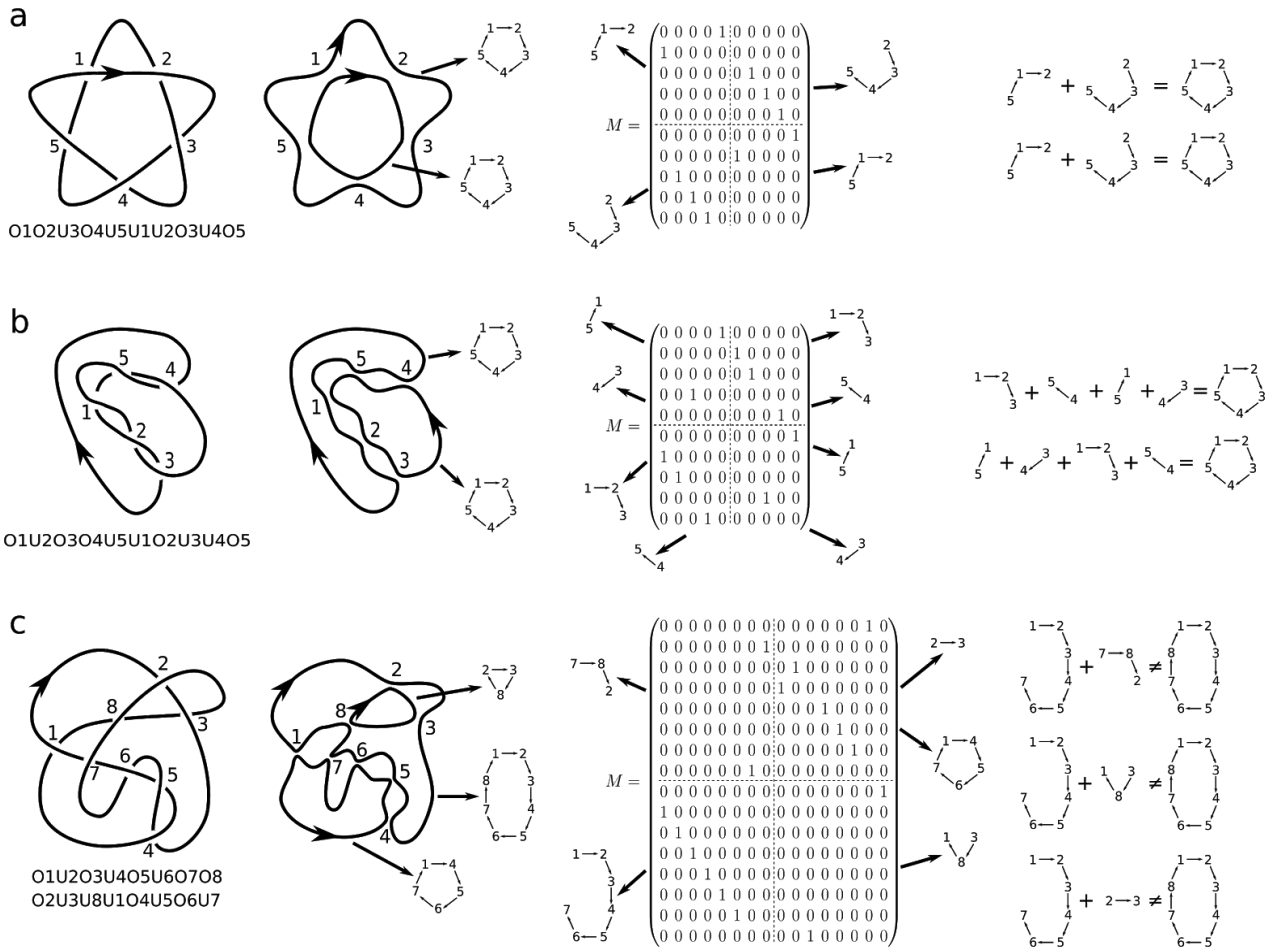


Fig. 3.4:5: Diagramas de nudo y la Propiedad 2. De izquierda a derecha, en sucesivas columnas aparecen: diagramas de nudo junto con su código de Gauss; sus correspondientes círculos de Seifert junto con las secuencias que los representan; sus correspondientes matrices de cruce junto con las secuencias que pueden obtenerse a partir de sus bloques; cómo pueden (o no) combinarse las secuencias de los bloques para formar las secuencias de los círculos de Seifert **a:** Diagrama no alternante del nudo trébol; **b:** Diagrama no alternante del nudo trivial. En ambos casos se puede escribir las secuencias de sus círculos de Seifert “pegando” secuencias de los diferentes bloques de la matriz M , lo que por definición significa que cumplen la Propiedad 2. **c:** Otro diagrama no alternante del nudo trébol. En este caso, *no se puede construir uno de sus círculos de Seifert* a partir de las secuencias presentes en los bloques de M . Por definición, este diagrama no cumple las Propiedades 1 ni 2, por lo que cumple la Propiedad 3.

Obtenemos así nuestro segundo resultado clasificatorio: **Todos los diagramas no alternantes que posean secuencias no alternantes de a lo sumo dos cruces, poseen la Propiedad 2.** Otra forma de verlo es así: todos los diagramas con “secuencias no alternantes de longitud uno (es decir, diagramas alternantes) cumplen la Propiedad 1, mientras que aquellos con secuencias no alternantes de longitud igual a 2 cumplen la Propiedad 2. Necesariamente, **todos los diagramas que cumplen la Propiedad 3 deben tener secuencias no alternantes de longitud igual o mayor que tres.** Obsérvese, sin embargo, que el recíproco no es verdadero: *existen diagramas con secuencias de esta característica que cumplen la Propiedad 2* (eg: Fig. 3.4:6).

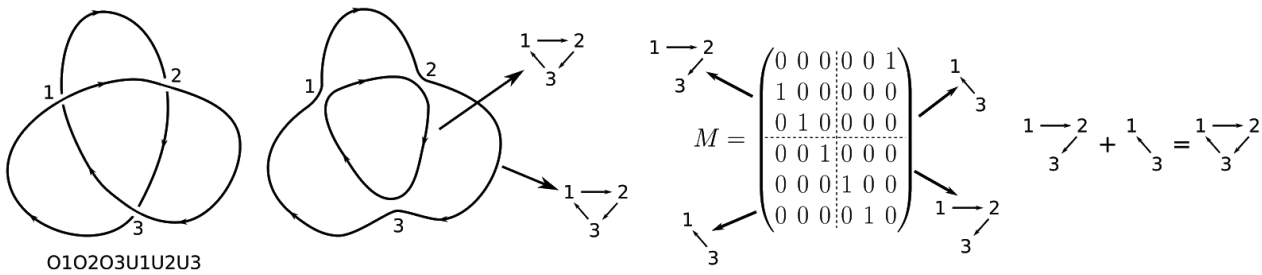


Fig. 3.4:6: Ejemplo de un diagrama (representando el nudo trivial) con segmentos no alternantes de longitud tres que no cumple la Propiedad 3. El código de Gauss de este diagrama tiene la forma OOOUUU, por lo que decimos que tiene secuencias no alternantes de hasta tres cruces o, equivalentemente, que tiene secuencias no alternantes de longitud *a lo sumo* tres.

A partir de esto (e inspirándonos en la definición de nudo alternante) podríamos decir que **un nudo cumple la Propiedad 1 si existe algún diagrama de dicho nudo que cumpla la Propiedad 1; cumple la Propiedad 2 si ningún diagrama cumple la Propiedad 1 y alguno cumple la Propiedad 2; y cumple la Propiedad 3 si no cumple ni la 1 ni la 2**⁷⁸. Según esta definición, todos los nudos alternantes cumplirían la Propiedad 1 y, cómo ningún diagrama no alternante puede cumplir la Propiedad 1, decir que un nudo cumple la Propiedad 1 es equivalente a decir que es alternante. Esta definición podría ser buena para diferenciar entre nudos no alternantes, separándolos en dos grupos. Intuitivamente es fácil pensar que los nudos que cumplan la Propiedad 2 serán aquellos con algún diagrama de secuencias no alternantes de longitud *a lo sumo* dos, porque los diagramas sin esa característica que cumplen la Propiedad 2 suelen poder ser simplificados a uno que seguramente tenga menos cruces no alternantes seguidos (eg: Fig. 3.4:8). Esta intuición es correcta pero engañosa, porque **todo diagrama de nudo es equivalente a un diagrama que posee secuencias no alternantes de longitud *a lo sumo* 2**.

¿Cómo convertir un diagrama cualquiera en un diagrama que posea *a lo sumo* secuencias no alternantes de 2 cruces? Puede parecer sorprendente, pero de hecho es bastante trivial, e incluso se le puede dar una estructura muy regular. Supóngase que se tiene un diagrama de nudo cualquiera, junto con su código de Gauss $y_1 y_2 \dots y_{2N}$ (siendo y_i una combinación de una letra y un número de cruce). Un movimiento de Reidemeister de tipo I (que recordamos, introduce un nuevo cruce tal como lo muestra la Fig. 1.1:5) produce un diagrama equivalente al original y modifica el código de Gauss insertando una secuencia de la forma $Ox_i Ux_i$ (o $Ux_i O x_i$) en cualquier lugar del mismo. Es claro entonces que nuestro diagrama original con código $y_1 y_2 \dots y_{2N}$ es equivalente a un diagrama con código $y_1 O x_i U x_i y_2 O x_i U x_i y_3 \dots y_{2N} O x_{2N} U x_{2N}$. Este último diagrama, aunque complicado (Fig. 3.4:7), claramente solo puede poseer un máximo de 2 cruces por arriba o por debajo seguidos, que es lo que queríamos demostrar. Vale la pena mencionar que un resultado más general (que todo diagrama se puede convertir en un diagrama de la forma $Ox_1 O x_2 U x_3 U x_4 O x_5 O x_6 \dots U x_{2N-1} U x_{2N}$) fue demostrado hace casi 15 años (Hackney *et al.*, 2005)

⁷⁸ Esta definición es similar a la definición de las Propiedades para los diagramas. Si no separamos bien estos tres casos, los nudos podrían tener distintas propiedades al mismo tiempo, algo que nos gustaría evitar.

al tratar de generalizar el concepto de nudo alternante, con una demostración básicamente igual a la recién presentada.

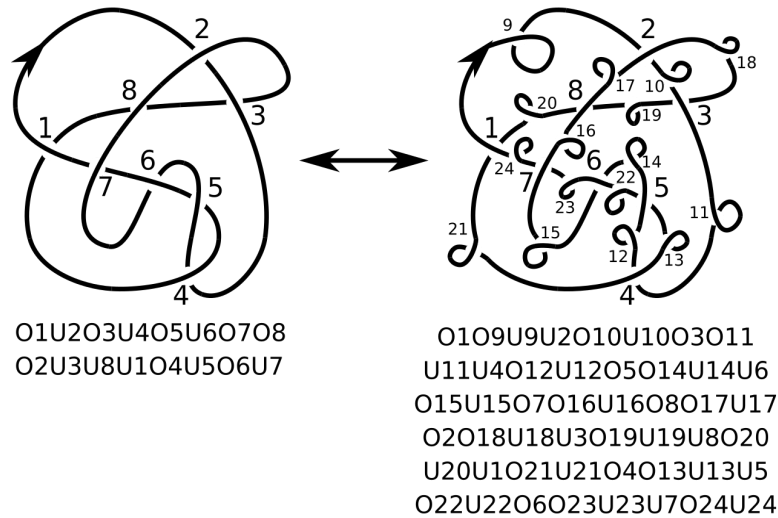


Fig. 3.4:7: Dos diagramas equivalentes, uno que no cumple la Propiedad 2 y otro que si. El segundo diagrama se obtiene del primero agregando la secuencia $OxUx$ entre cada par de cruces, con lo que se logra que este diagrama tenga secuencias no alternantes de longitud máxima 2, lo que implica que cumple la Propiedad 2. Por supuesto, ambos diagramas son del trébol, por lo que podríamos decir que el nudo cumple la Propiedad 1 (según la primera definición), pero este método sirve para cualquier diagrama, lo que demuestra que todo nudo tiene un diagrama que cumple la Propiedad 2.

Sabemos entonces que esta clasificación no es muy útil porque es *formalmente equivalente a la clasificación en nudos alternantes y no alternantes*. Sin embargo, los tipos de diagramas que aparecen en la demostración anterior son bastante complicados y pueden claramente ser simplificados a algún diagrama que no necesariamente cumpla esa propiedad. Quizás nos centramos en la característica errónea de los nudos alternantes al tratar de hacer esta clasificación compatible con la de alternante/no alternante. Existen distintas formas equivalentes de definir un nudo alternante⁷⁹, basándose en distintas propiedades de los mismos. Como ya mencionamos al final de la Introducción matemática de este trabajo (Sección 1.4), **puede decirse que un nudo es alternante si tiene algún diagrama mínimo alternante**, y **un nudo primo es alternante si y sólo si todos sus diagramas mínimos son alternantes**. Por lo tanto, en vez de usar la definición que usamos anteriormente, podríamos decir que **un nudo cumple la Propiedad 1 si tiene algún diagrama mínimo que cumpla la Propiedad 1; cumple la propiedad 2 si ningún diagrama mínimo cumple la Propiedad 1 y algún diagrama cumple la 2; y cumple la Propiedad 3 si no cumple la 1 o la 2 (es decir, todos sus diagramas mínimos cumplen la 3).**

⁷⁹ Algunas de complejidad mucho mayor a la de este texto, por lo que no las mencionaremos. Se dirige al lector interesado a leer el *review* de Menasco (2019) sobre nudos alternantes.

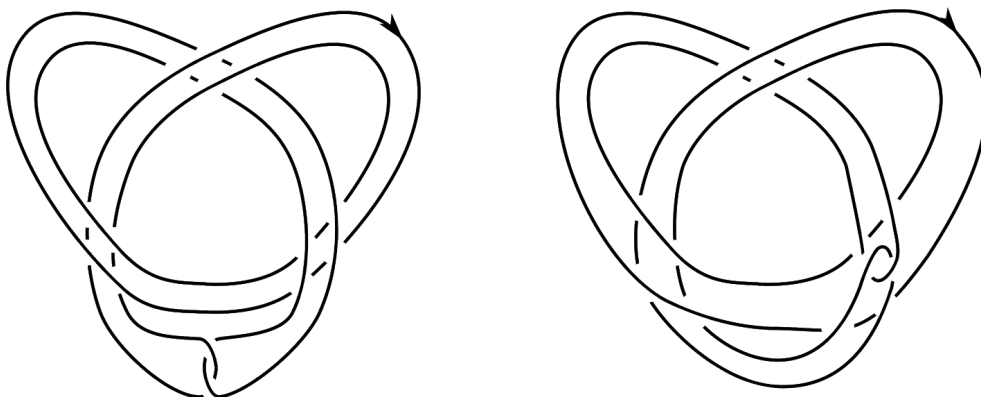


Fig. 3.4:8: Dos diagramas mínimos del mismo nudo, uno de los cuales cumple la Propiedad 2 y el otro no. El diagrama de la izquierda es el diagrama mínimo usual de este nudo, y cumple la Propiedad 3 (lo cual puede comprobarse fácilmente, obsérvese que presenta tres cruces por arriba seguidos, es decir que *tiene una secuencia no alternante de tres cruces* y compárese con los círculos de Seifert). El diagrama de la derecha, por otro lado, solo tiene secuencias no alternantes de longitud 1 y 2, por lo que cumple la Propiedad 2. Este ejemplo muestra que no es obvio decir que un *nudo* cumple la Propiedad 3 (según la segunda definición), pues esto querría decir que *ningún* diagrama mínimo del mismo puede cumplir las Propiedades 1 o 2.

Según esta definición, la Propiedad 1 una vez más se corresponde con ser alternante. Una gran cantidad de nudos no alternantes cumplen la Propiedad 2, pero *no es claro si existen nudos que cumplan la Propiedad 3*. Por supuesto, existen nudos no alternantes cuyo diagrama mínimo usual no cumple las Propiedades 1 y 2. Sin embargo, algunos de ellos tienen diagramas mínimos que, aunque no sean los usuales, poseen la Propiedad 2 (Fig. 3.4:8). Hasta donde sé, *aunque los diagramas mínimos de nudos alternantes están relativamente bien caracterizados, este no es el caso para los diagramas mínimos de los nudos no alternantes*, por lo que no es fácil determinar si esta puede ser una propiedad que diferencie entre dos grandes clases de nudos no alternantes, o incluso, cómo puede interactuar con las otras clasificaciones. Sin embargo, **me gustaría conjeturar que deben existir nudos con la Propiedad 3**, y que por lo tanto, **esta clasificación es una generalización no trivial de la división en nudos alternantes-no alternantes para enlaces clásicos de un componente** y puede ser útil para el estudio de los nudos no alternantes.⁸⁰

Por último, es interesante mencionar que, habiéndose encontrado con el mismo resultado que yo (que todos los nudos tienen un diagrama de la forma $Ox_1Ox_2Ux_3Ux_4Ox_5Ox_6\ldots Ux_{2N-1}Ux_{2N}$), el grupo de Hackney *definió un invariante a partir de los diagramas mínimos de un nudo*. Ellos definieron un diagrama k -alternante como cualquier diagrama cuyo código de Gauss sea una secuencia de k veces O seguida por k veces U y así sucesivamente (en este caso un diagrama alternante es 1-alternante, y ellos

⁸⁰ Otra clasificación posible y relacionada con la presente sería decir que un nudo es de “clase n ” si todos sus diagramas mínimos presentan por lo menos una secuencia de n cruces no alternantes. De esta forma, los alternantes serían de clase 1 (equivalente a la Propiedad 1), los de clase 2 cumplirían todos las Propiedad 2 y de ahí en adelante podrían encontrarse nudos de clase 3, que seguramente cumplirían la Propiedad 3.

demonstraron que todo nudo tiene un diagrama 2-alternante). De esta forma, definieron el **exceso k-alternante** de un nudo K como

$$x_k(K) = \min\{c(P) - c(K)\}$$

siendo P un diagrama k-alternante de K, $c(P)$ el número de cruces en P y $c(K)$ el número mínimo de cruces del nudo K. A partir de esta definición, que viene a representar “qué tan cerca de la representación mínima están las representaciones k-alternantes”, definen un nudo como **mínimamente k-alternante** para un cierto k si $x_k(K) = 0$, y demuestran que **para todo k existen nudos mínimamente k-alternantes** y además que, **para nudos alternantes se cumple que $x_k(K) \leq (k-1)c(K)$** (Hackney *et al.*, 2005). Observar que esta primera propiedad solo dice que existe *algún* diagrama mínimo que cumple la Propiedad 3, no que todos los hagan, por lo que no aporta soluciones a lo anteriormente conjeturado.

3.5 La matriz de cruce, generalizada

Como se dijo más arriba al considerar el polinomio característico, la matriz de cruce $\mathbf{M}(K)$ es una matriz de permutación, es decir, que describe una permutación entre los elementos del conjunto $\{O_1, \dots, O_N, U_1, \dots, U_N\}$, representados en este caso por los vectores de la base canónica del espacio euclídeo de dimensión $2N$ (en el mismo orden). Particularmente, esta permutación forma un ciclo, porque es claro que, partiendo desde cualquier cruce (ya sea por arriba o abajo), se retorna al mismo al cabo de $2N$ pasos. Esto puede representarse de forma gráfica con un conjunto de puntos, representando las distintas combinaciones de cruce y contexto, unidos por flechas que indican el orden de dichos elementos al recorrer el nudo (Fig. 3.5:1). Lo que acabamos de describir es, efectivamente, un grafo circular cuya matriz de adyacencia (según su definición usual) es la transpuesta de $\mathbf{M}(K)$.

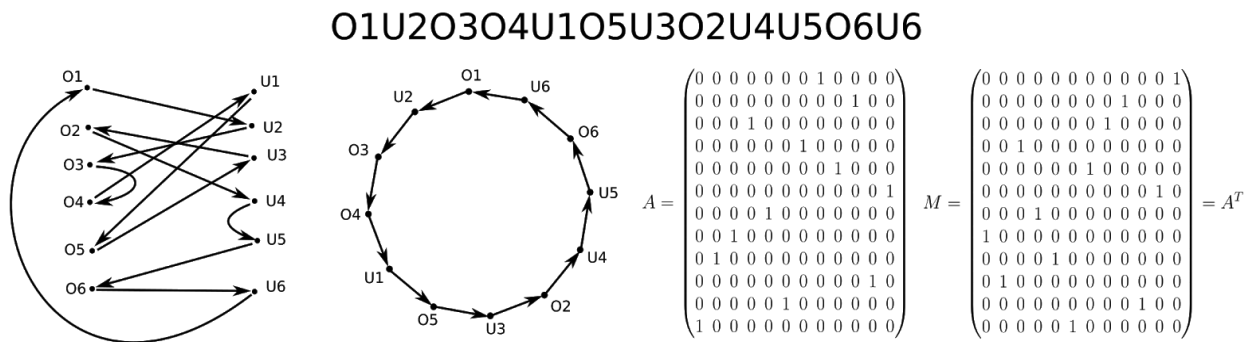


Fig. 3.5:1: El código de Gauss puede verse como un grafo cuya matriz de adyacencia es la transpuesta de $\mathbf{M}$. **(Arriba):** Un código de Gauss cualquiera. **(Abajo, de izquierda a derecha):** Un grafo que representa la información de la palabra de Gauss; el mismo grafo presentado en forma circular; la matriz de adyacencia A (según la definición usual) de ambos grafos; la matriz de cruces M asociada a esta palabra de Gauss, que se observa es la transpuesta de la matriz de adyacencia A.

Esto nos lleva a una observación interesante: todas las matrices $\mathbf{M}(K)$ definidas de esta manera representan grafos **topológicamente idénticos**. Es decir que, aunque sean diferentes como grafos, todos representan la misma figura: un círculo. Esto tiene una

consecuencia interesante, y es que por lo tanto, todas las matrices de tamaño $2N$ son matrices de adyacencia *del mismo grafo* (a menos de cambiarle los “nombres” a los distintos vértices), por lo cual *no podríamos diferenciarlas usando solamente técnicas de teoría de grafos*. En particular, esto implica que toda matriz de cruce de tamaño $2N$ tiene el mismo polinomio característico, cosa que ya habíamos demostrado.

Sin embargo no todo está perdido. Si recordamos la introducción de esta tesis, encontraremos un objeto que se relaciona con el grafo recién descrito: **el diagrama de Gauss**. Recordemos que el diagrama de Gauss se puede obtener a partir del código de Gauss, dibujando un grafo dirigido circular que representa el código de Gauss en orden, y luego uniendo los vértices correspondientes al mismo cruce, tal que del vértice correspondiente al cruce por arriba se pase al cruce por debajo (eg: Hay una flecha que va desde $O1$ hasta $U1$). Podemos ver entonces a $M(K)$ como (la transpuesta de) la matriz de adyacencia de un **subgrafo** del diagrama de Gauss, correspondiente al mismo código de Gauss.

Dado un diagrama de nudo, **denominaremos “matriz de Gauss” a (la transpuesta de) la matriz de adyacencia de su diagrama de Gauss** (manteniendo el orden de las columnas y filas como venimos usando hasta ahora) (Fig. 3.5:2), y la anotaremos como $G(K)$. Sorprendentemente, a pesar del gran número de trabajos recientes sobre las propiedades del diagrama de Gauss, no parecen haber trabajos sobre la misma en la literatura⁸¹. Esta ampliación del concepto de matriz de cruce resuelve los problemas de nuestra representación y provee a su vez una forma poco explorada de representar nudos. Antes de continuar, sin embargo, me parece importante recalcar cómo una representación basada originalmente en memorias asociativas (un área de la biología teórica) resultó estar tan relacionada con el diagrama de Gauss (una representación de gran importancia para la teoría de nudos reales y virtuales en los últimos 25 años).

Recordamos que el diagrama de Gauss puede o no, incluir información del signo de los cruces. En el primero de estos casos, se trata de **un grafo dirigido ponderado** (es decir, que los vértices se encuentran unidos por flechas, cada una de las cuales tiene uno de tres pesos: $-, 0, +$ ⁸²) y representa de forma unívoca un diagrama de nudo. El diagrama de Gauss también puede verse como la unión (no disjunta) de dos grafos: uno dirigido (el círculo exterior), y el otro dirigido y signado (uniendo los elementos del mismo cruce). Lo notable es que, ahora sí, **este grafo representa de forma única a un diagrama de nudo bajo isomorfismo de grafos**⁸³, es decir que dos diagramas de Gauss relacionados por una biyección que preserva los signos y las direcciones se corresponden al mismo diagrama de nudo.

⁸¹ Existen, por otro lado, trabajos sobre la llamada “matriz de adyacencia” (*adjacency matrix*), que se obtiene de forma totalmente distinta a partir de un diagrama de Gauss, por lo que no se relaciona con la recién definida matriz de Gauss.

⁸² A priori no le damos un valor numérico a los signos por no conocer cuál valor sería el más útil en la práctica.

⁸³ Fundamentalmente, esto se debe a que ahora los vértices tienen una “identidad” más allá de su etiqueta: los vértices correspondientes al mismo cruce están unidos, y más aún, se identifica cual es O y cual es U , así como el signo del mismo, todo en información propia del grafo.

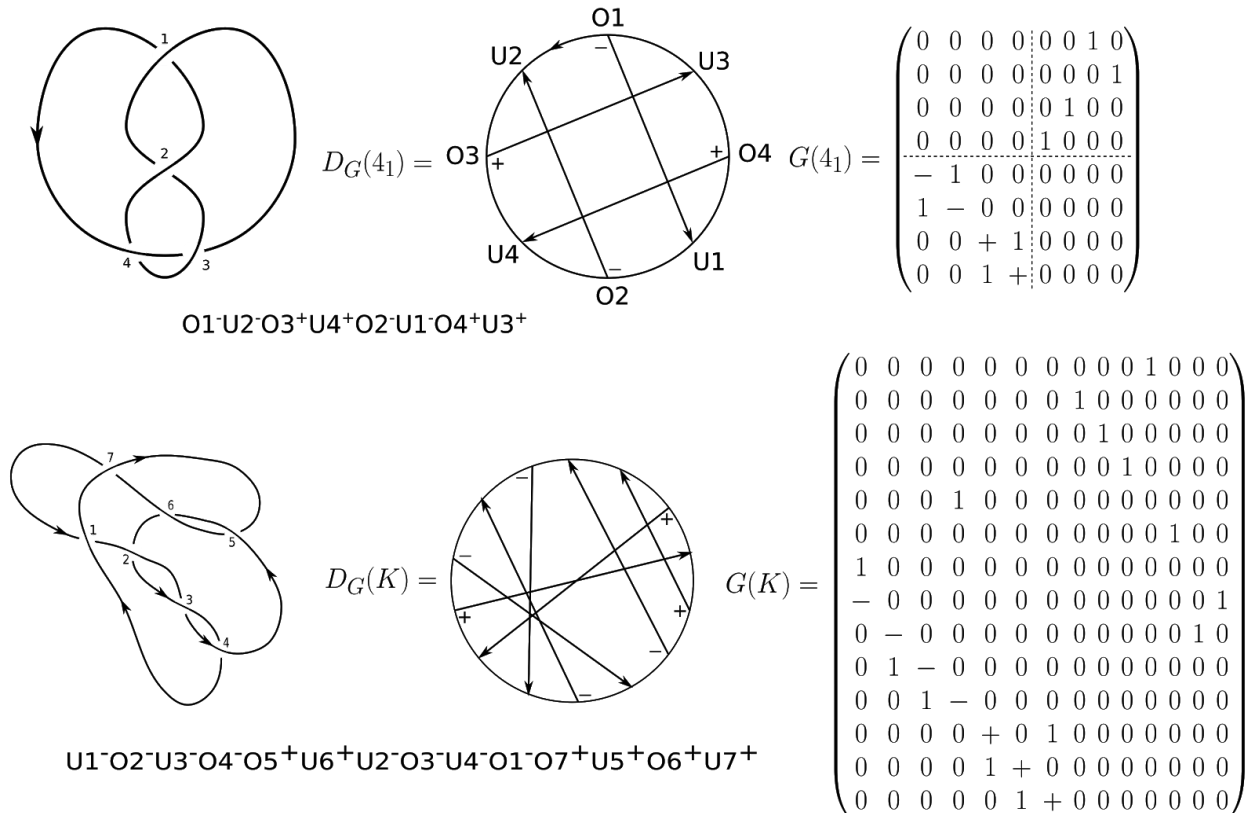


Fig. 3.5:2: Diagramas de nudo con sus códigos signados, matrices y diagramas de Gauss. **(Arriba):** Diagrama mínimo del nudo 4_1 . Se incluyen los nombres de los vértices así como la orientación del círculo exterior para refrescar la memoria del lector con respecto a este formalismo. **(Abajo):** Diagrama de nudo correspondiente al nudo trébol. La matriz de Gauss $\mathbf{G}$ es la transpuesta de la matriz de adyacencia del diagrama de Gauss (visto como un grafo), y consiste en la matriz de cruces $\mathbf{M}$ excepto que los signos de los diferentes cruces se encuentran representados en la diagonal del bloque 3.

Tenemos entonces para cada diagrama de nudo una matriz de Gauss que lo representa de forma única (a menos de reetiquetar los cruces, lo cual equivale a una permutación en el conjunto $\{1, \dots, N\}$ que conlleva una permutación en el conjunto $\{O1, \dots, ON, \dots, UN\}$).

Hasta ahora hemos presentado a la matriz de Gauss como una ampliación del concepto de matriz de cruce, pero solo lo hemos justificado para el caso de nudos propiamente dichos (es decir, enlaces de un componente). Recordamos que nuestra matriz $\mathbf{M}$ es capaz de representar enlaces de más de un componente, lo cual surge de su definición como memoria asociativa. Sin embargo, en este caso, la conexión entre la matriz de cruce y el código de Gauss se vuelve menos clara, problema que surge de que el código de Gauss para un enlace se escribe como una *secuencia de códigos*, separando así los distintos componentes (Fig. 3.5:3b). Esto genera un nuevo problema: si la matriz de Gauss realmente generaliza a la matriz de cruce, debe poder representar enlaces de más de un componente, pero la matriz $\mathbf{G}$ se define a partir del diagrama de Gauss, y por tanto, del código de Gauss, por lo que **no tendría por qué haber una definición clara de $\mathbf{G}$ para enlaces en general**. Afortunadamente, el diagrama de Gauss para enlaces de más de un componente es muy parecido al diagrama para nudos propiamente dichos, solo que hay más de un círculo

exterior (uno por componente), y los distintos cruces, una vez más, se unen por aristas dirigidas y signadas (Fig. 3.5:3c). Según la definición, entonces, queda claro que **la matriz de Gauss también permite representar naturalmente enlaces de cualquier número de componentes** (Fig. 3.5:3d). Notablemente, la matriz obtenida por esta definición ¡coincide con la obtenida por nuestra definición de **M** para enlaces de cualquier número de componentes! (comparar fig. 3.3:1 con 3.5:3), lo que quiere decir que **la matriz de Gauss es, efectivamente, una ampliación de la matriz de cruce para cualquier enlace**.

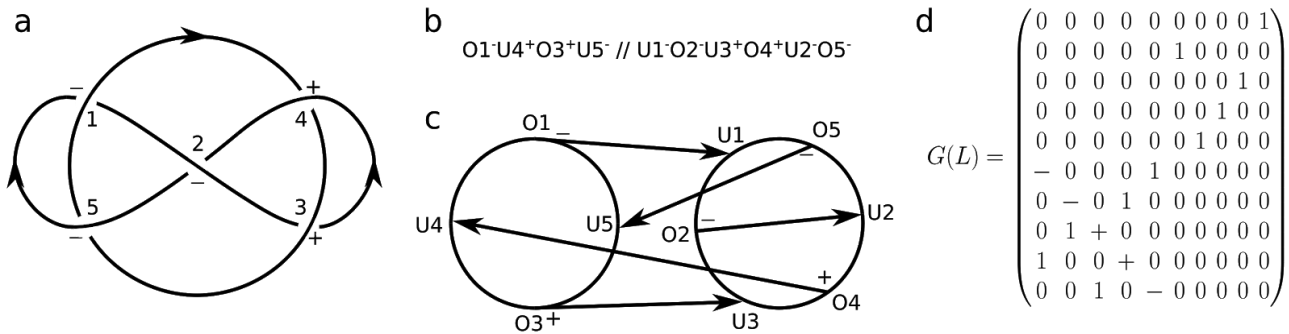


Fig. 3.5:3: La matriz de Gauss puede ser utilizada para representar diagramas de enlaces con más de un componente. **a:** Diagrama mínimo del enlace de Whitehead, con cruces etiquetados y sus signos señalados.; **b:** Código de Gauss para el diagrama en **a**. Para un enlace de más de un componente el código de Gauss está dividido en partes, cada una correspondiente a un componente del enlace; **c:** Diagrama de Gauss para el enlace en **a**, que consta de un círculo por cada componente, con flechas uniendo los puntos correspondientes al mismo cruce, como en el caso de los nudos propiamente dichos. Se incluyen los nombres de los vértices, aunque usualmente se omiten; **d:** Matriz de Gauss correspondiente al diagrama en **a**, obtenida como la transpuesta de la matriz de adyacencia del grafo en **c**. Observar que esta matriz es una ampliación de la matriz de cruces para este mismo enlace, como se muestra en la fig. 3.3:1.

Para terminar de demostrar que la matriz de Gauss generaliza la matriz de cruce, bastaría ver que es capaz de representar cualquier enlace virtual. Esto es bastante obvio, pues en la primera sección de este trabajo ya se mencionó que los diagramas de Gauss son capaces de representar cualquier enlace virtual, por lo que podemos concluir que **la matriz de Gauss es una generalización de la matriz de cruce, capaz de representar cualquier diagrama de enlace virtual de forma única, a menos de reetiquetar los cruces**

3.5.1 Perspectivas para el estudio de la matriz de Gauss

Hasta ahora, la matriz de Gauss resulta ser una matriz de tamaño $2N \times 2N$ que se puede calcular como la suma de la matriz de cruce y una matriz correspondiente a las aristas dirigidas entre los vértices correspondientes al mismo cruce (de *over* a *under*). Conocemos ya la primera matriz, y la segunda tiene una estructura bastante simple: las aristas siempre van de O_x a U_x , por lo que la transpuesta de su matriz de adyacencia (es decir, la matriz que nos interesa) tiene todas sus entradas 0, excepto en la diagonal del bloque 3 (en nuestra numeración anterior), cuyas entradas son signos + y -. No queda claro a qué deberían corresponderse estos símbolos, algebraicamente. Si se sigue la convención de los grafos signados, las entradas correspondientes a + y - serían +1 y -1,

respectivamente. Sin embargo, *esto no permite diferenciar entre los 1 propios del círculo exterior (sin signo) y los 1 propios del subgrafo signado* en la matriz de Gauss. Otra opción sería usar la convención de los grafos ponderados, asignándole pesos a +, - y 0. En este caso, el peso de 0 no debería ser 0, pero queda la duda de qué peso deberían tener + y - para no generar el mismo problema del caso anterior. Más aún, intuitivamente nos gustaría que - tuviera un peso negativo, pero la teoría de los grafos ponderados se ha desarrollado en gran medida bajo la suposición de que todos los pesos son positivos, por lo que esta idea no parecería ser muy útil. Finalmente, *podemos dejar + y - como signos arbitrarios* (posiblemente x e y respectivamente, para evitar confusión al sumar y restar) y eventualmente decidir según lo que más nos convenga.

Hasta ahora nos hemos referido solamente a matrices que representan diagramas de nudos. Pero como se habló en la introducción, esto no es suficiente, pues en general, no nos interesan los diagramas de nudos, sino los **nudos que estos representan**. Recordemos que todos los diagramas correspondientes al mismo nudo están relacionados por una serie de **movimientos de Reidemeister**, que tienen su contraparte en los diagramas de Gauss (Fig.3.5:4). Lamentablemente, los movimientos de Reidemeister no se pueden expresar de forma simple en términos de la matriz de Gauss (ni de la matriz de cruce en particular). Esto dificulta el estudio de los nudos con estas matrices, y más aún, hace menos probable la posibilidad de encontrar nuevos invariantes de nudos a partir de las mismas; sin embargo, creo que existe una posibilidad que merece ser explorada a este respecto: estudiar su vínculo con los **invariantes de Vassiliev**.

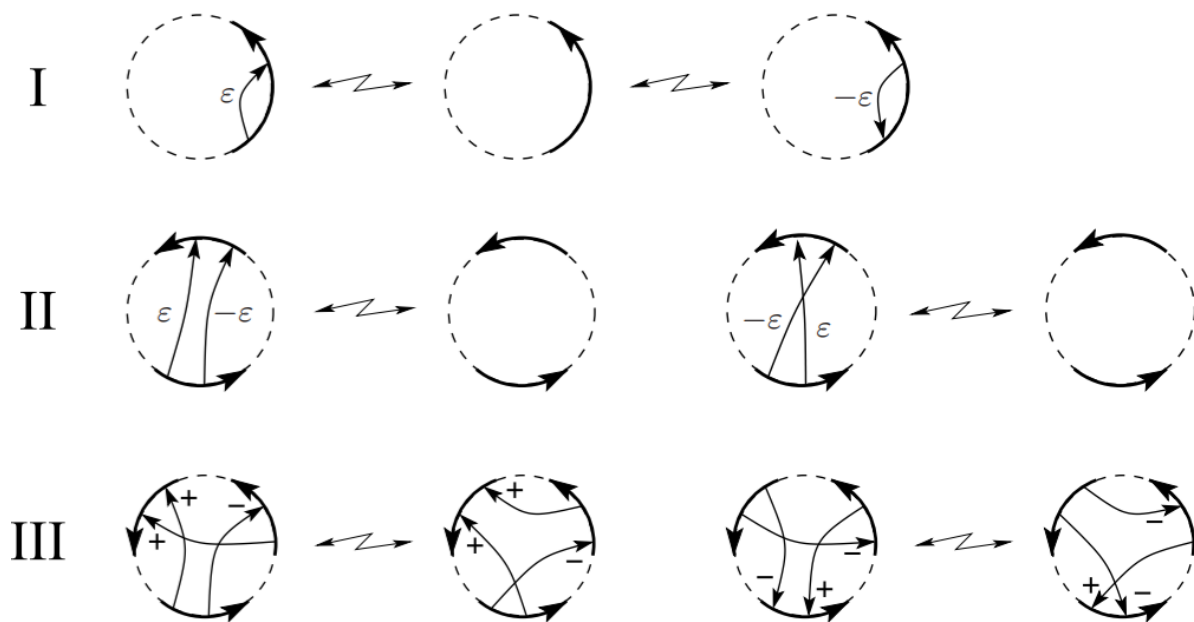


Fig. 3.5:4: Representación diagramática de los movimientos de Reidemeister en un diagrama de Gauss. $\mathbf{VQ}_n$: movimiento de Reidemeister tipo n ; ϵ : signo del cruce, puede ser + o -, con $-\epsilon$ representando el signo contrario. Las secciones punteadas del círculo exterior representan cualquier sección de diagrama (incluyendo, por ejemplo, flechas que se cruzan con las involucradas en el movimiento de Reidemeister). Adaptada de Chmutov *et al.* (2012).

Invariantes de Vassiliev

Los invariantes de Vassiliev son un tipo de invariante de nudos cuyo cálculo está íntimamente relacionado con los diagramas de Gauss, por lo que podría ser interesante estudiar cómo se relacionan con la matriz de Gauss. A continuación presentaremos rápidamente la intuición que subyace a estos invariantes, así como su relación con los diagramas de Gauss. Como advertencia para el lector, esta última sección es la que más conocimiento matemático requiere, aunque trata de ser lo más legible posible. Lamentablemente, el conocimiento algebraico necesario para comprender plenamente estos invariantes, más allá de la intuición, está bastante por encima del que poseo actualmente, por lo que aún no he podido estudiar este aspecto de la representación matricial en forma rigurosa. Sin embargo, creo que puede ser una dirección interesante y posiblemente valiosa para avanzar la investigación en el futuro, por lo que una introducción al tema, por más somera que sea, debe ser interesante para cualquier lector que haya llegado hasta el final de este trabajo, lo que justifica su inclusión.

Intuición

Hasta ahora hemos descrito un nudo de muchas formas: como una curva cerrada en el espacio, como una clase de equivalencia de diagramas bidimensionales, como una clase de equivalencia de matrices, etc.. Sin embargo, fundamentalmente, un nudo es una **clase de equivalencia de encajes suaves del círculo en el espacio**. ¿Qué quiere decir esto? Lo explicaremos por partes. Consideremos una circunferencia abstracta. Podemos definir una función de la misma hacia el espacio tridimensional usual, que a cada punto del círculo le asigna un punto en el espacio. Si fuéramos recorriendo el círculo y visualizando las respectivas imágenes en el espacio, estaríamos recorriendo una curva en el espacio (suponiendo que la función es continua). Más aún, como el círculo es cerrado, si la función es continua, su imagen debe ser una curva cerrada en el espacio. Que una función de este tipo sea un *encaje suave* implica dos cosas: que la velocidad de la curva es continua (intuitivamente, la misma no tiene “pinchos”, o sea que se ve “suave”) y que todos los puntos del círculo se correspondan a puntos diferentes en el espacio (es decir, que la curva no se auto-intersecta). Básicamente, acabamos de re-describir nuestra primera definición: un nudo es una curva cerrada sin autointersecciones en el espacio, como una abstracción de un nudo compuesto de cuerda, pero esto no es suficiente: recordemos que un nudo sigue siendo el mismo si se deforma.

Dos encajes del círculo representarán el mismo nudo si y sólo si se pueden deformar el uno al otro de forma continua, sin que ocurran autointersecciones en ningún paso. Podemos pensar que dos encajes f_0 y f_1 representan el mismo nudo si existe una función continua $f(t) : [0,1] \rightarrow M$, siendo M el conjunto de las funciones suaves desde el círculo al espacio, y tal que $f(0) = f_0$, $f(1) = f_1$ y $f(t)$ sea un encaje⁸⁴ para todo t . Esta noción puede pensarse como que f_0 y f_1 están unidos por un camino que pasa solamente por funciones que representan nudos. Equivalentemente, si definimos K como el subconjunto de M cuyos elementos son encajes, podemos decir que dos funciones f_0 y f_1 representan el mismo nudo

⁸⁴ Que será suave por definición, por pertenecer a M .

si existe una función continua $f(t) : [0,1] \rightarrow K$, tal que $f(0) = \mathbf{f}_0$, $f(1) = \mathbf{f}_1$ ⁸⁵. Entonces, podemos definir a un nudo como **cualquier subconjunto de K cuyos elementos están todos unidos entre sí por caminos de este tipo, y tal que toda función que está unida a algún elemento del conjunto también pertenece al mismo**⁸⁶.

Pero ¿qué pasa con aquellas funciones en M que “no llegan” a representar nudos? Es decir, aquellas funciones suaves que no son encajes. Esas funciones se corresponden a todo lo que “rodea” al conjunto K , y constituyen el espacio que “separa” a los diferentes nudos. Si podemos caracterizar ese espacio, sabremos más sobre los nudos que separa. Esa es la intuición fundamental de los invariantes de Vassiliev, también llamados invariantes de tipo finito: **son invariantes de funciones que “no llegan a ser nudos”**, con lo que nos permiten estudiar una parte de este “espacio entre los nudos”. Más precisamente, una función $v(f)$ es un invariante de nudos si se cumple que $v(g) = v(f)$ para cualquier f y g que representen al mismo nudo. Se puede extender una función de ese tipo a **nudos singulares** (es decir, funciones que podrían ser nudos, excepto porque cuentan con un número positivo, aunque finito, de intersecciones), usando la *skein relation* de Vassiliev (Fig. 3.5:5). Una función de este tipo se llama **invariante de Vassiliev de orden n** si su valor es 0 para cualquier nudo singular con más de n autointersecciones.

$$v(\text{sing}) = v(\text{cross}) - v(\text{cross})$$

Fig. 3.5:5: *Skein relation* de Vassiliev, usada para extender invariantes de nudos a nudos singulares. En este caso v es un invariante de nudos cualquiera, y el proceso se repite tantas veces como sea necesario para que v esté bien definida para el nudo singular en cuestión. Chmutov *et al.* (2012).

Ya hemos estudiado algunos invariantes de Vassiliev, aunque no los tuviéramos presentes como tales. Por ejemplo, el más simple, de orden 2, es el llamado *invariante de Casson*, que no es nada más que el segundo término del *polinomio de Conway* (un polinomio equivalente al *polinomio de Alexander*, que puede obtenerse cambiando $t^{1/2} - t^{-1/2}$ por x en las *skein relations* presentadas en la Introducción). Más aún, si se le hace un cambio de variable conveniente tanto al polinomio de Alexander como al de Jones, se obtienen polinomios cuyos n -ésimos coeficientes son invariantes de Vassiliev de orden n . El *linking number* es el invariante de Vassiliev más simple para enlaces (Polyak & Viro, 1994), y existen otros, por ejemplo, que generalizan el concepto del *linking number* para reflejar el entrelazamiento de más de dos componentes.

Relación con los diagramas de Gauss

En su artículo de 1994, Polyak y Viro inventaron un método para calcular invariantes de Vassiliev a partir de diagramas de Gauss, esencialmente contando subdiagramas de los

⁸⁵ Es decir, que están unidos por un camino en K .

⁸⁶ Efectivamente, esto quiere decir que un nudo no es nada más que un componente arcoconexo de K .

misimos. A partir de este método que ahora presentaremos, todos los invariantes obtenidos son de Vassiliev. Posteriormente, se demostró incluso que todo invariante de Vassiliev puede ser obtenido de esta forma (Goussarov, 1998). El método consiste en definir los llamados **diagramas de flechas** (*arrow diagrams*), así como un producto que “multiplica” a los diagramas de flechas con diagramas de Gauss, obteniéndose de esa forma fórmulas simples para los invariantes de Vassiliev. La elegancia formal de estas fórmulas, así como su relación con los diagramas de Gauss, son lo que motiva esta presentación final, y creo que es en este tema que las matrices de Gauss pueden resultar de mayor interés.

Se define un **diagrama de flechas** de forma casi idéntica que un diagrama de Gauss: es un diagrama que consiste de un círculo exterior (orientado, pero como en el caso de los diagramas de Gauss, se asume que es antihorario y no se anota) con flechas que unen puntos del mismo. En este caso, sin embargo, las flechas *no tienen signo* pero *si tienen multiplicidad*. Una flecha tiene multiplicidad 1 si tiene una sola punta, y tiene multiplicidad 2 si tiene dos puntas apuntando hacia el mismo lado. Dos diagramas son isomorfos (léase: iguales) si existe un homeomorfismo (léase: una deformación continua) que lleva el círculo de uno al del otro, y preserva todas las flechas, orientaciones y multiplicidades. Debe observarse que esta definición coincide totalmente con la intuitiva: dos diagramas son iguales si son deformaciones uno del otro que preservan su estructura subyacente.

Estos diagramas se pueden *encajar* en un diagrama de Gauss, lo que se corresponde intuitivamente a ver un diagrama de flecha como una parte de un diagrama de Gauss. Formalmente, un encaje es una función de un diagrama de flecha “A” a un diagrama de Gauss “ D_G ” que manda el círculo exterior al círculo exterior y que manda flechas a flechas, respetando orientaciones. A una función f de este estilo la llamamos una **representación de A en D_G** y definimos su signo por la fórmula:

$$\text{sg}(f) = \prod_{C \subset A} \text{sg}(f(C))^{\mu(C)}$$

donde el producto se toma sobre todas las flechas C del diagrama A , $\mu(C)$ es la *multiplicidad* de C en A , y $\text{sg}(f(C))$ es el signo de la imagen de C por f (por ejemplo, si $f(C)$ es una flecha negativa, $\text{sg}(f(C)) = -1$).

A partir de allí podemos definir un producto $\langle A, D_G \rangle$ entre un diagrama de flechas A y un diagrama de Gauss G por la fórmula

$$\langle A, D_G \rangle = \sum_{f: A \rightarrow D_G} \text{sg}(f)$$

donde la sumatoria se toma sobre todas las posibles representaciones de A en D_G . Como una representación equivale en cierta forma a elegir un subdiagrama de D_G y contar sus signos (efectivamente ignorando los signos de aquellas flechas con multiplicidad 2), el producto en este caso equivale a considerar *todos los subdiagramas de D_G de una cierta forma*. Por ejemplo, podemos calcular el número de cruces $c(D_G)$ y el *writhe* $\text{Wr}(D_G)$ de un diagrama según las siguientes fórmulas:

$$c(D_G) = \langle \bigcirc \rightarrow, D_G \rangle$$

$$Wr(D_G) = \langle \bigcirc \rightarrow, D_G \rangle$$

Puede definirse el producto de combinaciones lineales de diagramas como la combinación lineal de productos, tal que:

$$\langle \lambda_1 A_1 + \dots + \lambda_n A_n, D_G \rangle = \lambda_1 \langle A_1, D_G \rangle + \dots + \lambda_n \langle A_n, D_G \rangle$$

Finalmente, podemos considerar *diagramas “basados”*, es decir, diagramas con un punto especialmente marcado en su círculo exterior (que se corresponde con un “punto base” en el diagrama de nudo). El producto de diagramas de flecha “basados” con diagramas de Gauss “basados” es igual al definido usualmente, solo que *solamente consideramos aquellas representaciones que respetan el punto base*. Finalmente, a partir de esto podemos obtener fórmulas para un gran número de invariantes, entre ellos el invariante de Casson, el *linking number*, etc. (Fig. 3.5:6)(Östlund, 2004).

Las fórmulas no implican necesariamente que el cálculo final sea más simple que el usual, pero ciertamente muestran una conexión que subyace a los invariantes de Vassiliev, además de proveer una estructura elegante para expresarlos y trabajar con ellos. Se le pueden dar estructuras algebraicas adicionales de este estilo a los diagramas de flechas, incluyendo productos y sumas conexas. Todo esto contribuye a generar una teoría rica en posibilidades para el estudio de algunos de los invariantes más potentes conocidos actualmente.

$$v_2(D_G) = \langle \bigcirc \otimes, D_G \rangle = \langle \bigcirc \otimes, D_G \rangle$$

$$v_3(D_G) = \langle \frac{1}{3} \bigcirc \otimes + \frac{1}{2} \bigcirc \oplus, D_G \rangle = \frac{1}{3} \langle \bigcirc \otimes, D_G \rangle + \frac{1}{2} \langle \bigcirc \oplus, D_G \rangle$$

$$Lk(D_L) = \langle \bigcirc \rightarrow \bigcirc, D_L \rangle$$

Fig. 3.5:6: Fórmulas de algunos invariantes de Vassiliev básicos que se obtienen a partir de productos entre diagramas de flechas y diagramas de Gauss. v_2 : Invariante de Casson, aquí con dos fórmulas equivalentes; v_3 : El invariante de Vassiliev (sin nombre) de orden 3 que vale 0 en el nudo trivial, 1 en el trébol positivo y -1 en el trébol negativo, aquí en su formulación compacta, y la misma fórmula, usando la definición de combinación lineal de diagramas; **Lk**: El *linking number*, que se define para enlaces de 2 componentes (en este caso las funciones que nos interesan son aquellas que mandan cada círculo a cada círculo del diagrama de Gauss). Las fórmulas se obtuvieron de Östlund (2004).

¿Cómo podría esto aplicarse a la matriz de Gauss que definimos nosotros? La matriz de Gauss contiene la misma información que el diagrama de Gauss, y parecería simple definir una matriz similar para los diagramas de flecha, considerando un símbolo especial que denote la multiplicidad (una vez más: este símbolo arbitrario podría ser reemplazado por un valor particular *a posteriori*, pero que no está claro en primera instancia). Seguramente el producto matricial usual no sea suficiente para conectar estas matrices de la forma sugerida, pero posiblemente se podría definir una nueva operación (usando por ejemplo el producto

de Kronecker, como ya hicimos), o introducir algún tipo de matriz auxiliar que permita computar invariantes a partir de matrices. Encontrar un método de esta forma podría ser valioso, a pesar de que fuera formalmente equivalente al método anterior, pues permitiría usar propiedades de las matrices que quizás no sean inmediatamente aparentes en la construcción del formalismo diagramático, e intuyo que desde el punto de vista computacional debe ser más sencillo (o por lo menos, existen más técnicas para) trabajar con matrices que con diagramas.

3.6 Conclusiones

En la última sección de esta tesis hemos presentado el aporte original de este trabajo. Debido a su contenido estrictamente matemático, puede considerarse independiente de la sección 2, excepto por su inspiración biológica. Presentamos una nueva forma de representar un diagrama de nudo mediante una matriz cuadrada, inspirada en un modelo de memoria asociativa que debe sus orígenes al estudio de las redes neuronales como modelos para comprender el funcionamiento del cerebro humano. Esta matriz, que llamamos “matriz de cruce”, presenta ciertas limitaciones a la hora de representar fidedignamente la información presente en un diagrama. Hemos explorado su relación con los círculos de Seifert, generando una “nueva clasificación de los nudos” que parcialmente coincide con la clásica dicotomía “alternante-no alternante”, aunque conjeturamos que ambas clasificaciones no son totalmente idénticas.

Quizás lo más interesante de esta sección es el haber encontrado un vínculo entre esta matriz y los diagramas de Gauss. A partir de esta relación planteamos una generalización definiendo una nueva matriz que logra representar la misma información que cualquier diagrama orientado de cualquier enlace virtual de un número arbitrario de componentes, a la cual bautizamos “matriz de Gauss”, y que parece no haber sido estudiada hasta ahora. Es notable que una representación surgida a partir de modelos de la biología teórica coincida tan bien con un diagrama que ha sido importante en la teoría de nudos en los últimos 25 años, particularmente en el estudio de los invariantes de Vassiliev. Para comprender un poco más sobre la posible importancia de la matriz de Gauss, presentamos una corta introducción al tema de los invariantes de Vassiliev, así como su relación con los diagramas de Gauss.

Queda por determinar si esta representación tendrá alguna ventaja particular frente a otras ya existentes y más estudiadas, pero creo que sirve como un cierre lógico para los temas de esta tesis. A lo largo de la misma presentamos la teoría de nudos de forma abstracta, pasando luego a mostrar cómo los problemas de esta área generan nuevos e inesperados problemas a la biología, así como técnicas para poder mejor formularlos y resolverlos. La última sección nos muestra una perspectiva final sobre esta interacción entre disciplinas: a partir de un modelo biológico pueden generarse representaciones para la teoría de nudos, que podrían eventualmente ser de utilidad para lidiar con los problemas propios de esta rama de la matemática.

Bibliografía

- Adams, C. C. (2004). *The knot book: an elementary introduction to the mathematical theory of knots*. American Mathematical Soc..
- Alexander, J. W. (1928). Topological invariants of knots and links. *Transactions of the American Mathematical Society*, 30(2), 275-306.
- Alexander, K., Taylor, A. J., & Dennis, M. R. (2017). Proteins analysed as virtual knots. *Scientific reports*, 7, 42300.
- Anderson, J. A. (1970). Two models for memory organization using interacting traces. *Mathematical Biosciences*, 8(1-2), 137-160.
- Anderson, J. A. (1972). A simple neural network generating an interactive memory. *Mathematical biosciences*, 14(3-4), 197-220.
- Andersson, F. I., Werrell, E. F., McMorran, L., Crone, W. J., Das, C., Hsu, S. T. D., & Jackson, S. E. (2011). The effect of Parkinson's-disease-associated mutations on the deubiquitinating enzyme UCH-L1. *Journal of molecular biology*, 407(2), 261-272.
- Arsuaga, J., Vazquez, M., McGuirk, P., Trigueros, S., & Roca, J. (2005). DNA knots reveal a chiral organization of DNA in phage capsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), 9165-9169.
- Avery, O. T., MacLeod, C. M., & McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *Journal of experimental medicine*, 79(2), 137-158.
- Baranello, L., Levens, D., Gupta, A., & Kouzine, F. (2012). The importance of being supercoiled: how DNA mechanics regulate dynamic processes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(7), 632-638.
- Bauer, W. R., Crick, F. H., & White, J. H. (1980). Supercoiled DNA. *Scientific American*, 243(1), 118-133.
- Bauer, W., & Vinograd, J. (1968). The interaction of closed circular DNA with intercalative dyes: I. The superhelix density of SV40 DNA in the presence and absence of dye. *Journal of molecular biology*, 33(1), 141-171.
- Bauer, W., & Vinograd, J. (1970). The interaction of closed circular DNA with intercalative dyes: III. Dependence of the buoyant density upon superhelix density and base composition. *Journal of molecular biology*, 54(2), 281-298.
- Berger, M. A., Kauffman, L. H., Khesin, B., & Moffatt, H. K. (2009). *Lectures on topological fluid mechanics: lectures given at the CIME Summer School held in Cetraro, Italy, July 2-10, 2001*. Springer.
- Berman, H. M., Bhat, T. N., Bourne, P. E., Feng, Z., Gilliland, G., Weissig, H., & Westbrook, J. (2000). The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics. *Nature Structural & Molecular Biology*, 7, 957-959.

- Best, R. B., Hummer, G., & Eaton, W. A. (2013). Native contacts determine protein folding mechanisms in atomistic simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(44), 17874-17879.
- Bugreev, D.V., & Nevinskt, G.A. (2009). Structure and mechanism of action of type IA DNA topoisomerases. *Biochemistry (Mosc)*, 74(13), 1467-81.
- Burton, A. S., Di Stefano, M., Lehman, N., Orland, H., & Micheletti, C. (2016). The elusive quest for RNA knots. *RNA biology*, 13(2), 134-139.
- Bush, N. G., Agarwal, M., Henderson, S. R., Waraich, N. F., & Maxwell, A. (2018). DNA in a twist? How topoisomerases solve topological problems in DNA. *The Biochemist*, 40, 26-31.
- Bölinger, D., Sułkowska, J. I., Hsu, H. P., Mirny, L. A., Kardar, M., Onuchic, J. N., & Virnau, P. (2010). A Stevedore's protein knot. *PLoS computational biology*, 6(4), e1000731.
- Cai, X. C., Kapilashrami, K., & Luo, M. (2016). Synthesis and assays of inhibitors of methyltransferases. In *Methods in enzymology* (Vol. 574, pp. 245-308). Academic Press.
- Capraro, D. T., & Jennings, P. A. (2016). Untangling the influence of a protein knot on folding. *Biophysical journal*, 110(5), 1044-1051.
- Chmutov, S., Duzhin, S., & Mostovoy, J. (2012). *Introduction to Vassiliev knot invariants*. Cambridge University Press. Manuscript retrieved from arXiv:1103.568.
- Chwastyk, M., & Cieplak, M. (2015a). Cotranslational folding of deeply knotted proteins. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 27(35), 354105.
- Chwastyk, M., & Cieplak, M. (2015b). Multiple folding pathways of proteins with shallow knots and co-translational folding. *The Journal of chemical physics*, 143(4), 07B611_1.
- Conway, J. H. (1970). An enumeration of knots and links, and some of their algebraic properties. In *Computational problems in abstract algebra* (pp. 329-358). Pergamon.
- Cooper, L. (1973). A possible organization of animal memory and learning. In *Proceedings of the Nobel Symposium on Collective Properties of Physical Systems* (pp. 252-264). Academic Press.
- Cozzarelli, N. R. (1980). DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science*, 207(4434), 953-960.
- Crick, F. (1976). Linking numbers and nucleosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(8), 2639-2643.
- Crick, F. (1989) *What mad pursuit: A personal view of scientific discovery* (Sloan Foundation science series), Weidenfeld and Nicolson, London.
- Crick, F. H., Wang, J. C., & Bauer, W. R. (1979). Is DNA really a double helix?. *Journal of molecular biology*, 129(3), 449-461.
- Crisona, N. J., Weinberg, R. L., Peter, B. J., & Cozzarelli, N. R. (1999). The topological mechanism of phage λ integrase. *Journal of molecular biology*, 289(4), 747-775.

- Dean, F. B., Stasiak, A., Koller, T., & Cozzarelli, N. R. (1985). Duplex DNA knots produced by Escherichia coli topoisomerase I. Structure and requirements for formation. *Journal of Biological Chemistry*, 260(8), 4975-4983.
- Delbrück, M. (1954). On the replication of desoxyribonucleic acid (DNA). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 40(9), 783-788.
- Delbrück, M. (1962). Knotting problems in Biology. in *Mathematical Problems in the Biological Sciences, Proceedings of Symposia in Applied Mathematics* 14, 327.
- Depew, R. E., & Wang, J. C. (1975). Conformational fluctuations of DNA helix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(11), 4275-4279.
- Depew, R. E., Liu, L. F., & Wang, J. C. (1978). Interaction between DNA and Escherichia coli protein omega. Formation of a complex between single-stranded DNA and omega protein. *Journal of Biological Chemistry*, 253(2), 511-518.
- Diao, Y. (1995). The knotting of equilateral polygons in R^3 . *Journal of Knot Theory and its Ramifications*, 4(02), 189-196.
- Diao, Y., Nardo, J. C., & Sun, Y. (2001). Global knotting in equilateral random polygons. *Journal of Knot Theory and its Ramifications*, 10(04), 597-607.
- Diao, Y., Pippenger, N., & Sumners, D. W. (1994). On random knots. In *Random knotting and linking* (pp. 187-197).
- Di Capua, E., Engel, A., Stasiak, A., & Koller, T. (1982). Characterization of complexes between recA protein and duplex DNA by electron microscopy. *Journal of molecular biology*, 157(1), 87-103.
- Dulbecco, R., & Vogt, M. (1963). Evidence for a ring structure of polyoma virus DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 50(2), 236.
- Dye, H. A. (2016). *An Invitation to Knot Theory: Virtual and Classical*. CRC Press.
- Flores, S. C., Lu, L. J., Yang, J., Carriero, N., & Gerstein, M. B. (2007). Hinge Atlas: relating protein sequence to sites of structural flexibility. *BMC bioinformatics*, 8(1), 167.
- Frisch, H. L., & Wasserman, E. (1961). Chemical topology. *Journal of the American Chemical Society*, 83(18), 3789-3795.
- Fuller, F. B. (1971). The writhing number of a space curve. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(4), 815-819.
- Gauss, C. F. (1973). *Werke*. Band VIII. (pp. 271-286)
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., & Nash, H. A. (1976a). DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(11), 3872-3876.
- Gellert, M., O'Dea, M. H., Itoh, T., & Tomizawa, J. I. (1976b). Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(12), 4474-4478.

- Goussarov, M. (1998). Finite type invariants are presented by Gauss diagram formulas. *Sankt-Petersburg Department of Steklov Mathematical Institute preprint (translated from Russian by O. Viro)*.
- Hackney, P., Van Wyk, L., & Walters, N. (2005). k-alternating knots. *Topology and its Applications*, 150(1-3), 125-131.
- Hansen, T. B., Jensen, T. I., Clausen, B. H., Bramsen, J. B., Finsen, B., Damgaard, C. K., & Kjems, J. (2013). Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*, 495(7441), 384.
- Hoste, J., Thistlethwaite, M., & Weeks, J. (1998). The first 1,701,936 knots. *The Mathematical Intelligencer*, 20(4), 33-48.
- Jackson, S. E. (1998). How do small single-domain proteins fold?. *Folding and Design*, 3(4), R81-R91.
- Jackson, S. E., Suma, A., & Micheletti, C. (2017). How to fold intricately: using theory and experiments to unravel the properties of knotted proteins. *Current opinion in structural biology*, 42, 6-14.
- Jamroz, M., Niemyska, W., Rawdon, E. J., Stasiak, A., Millett, K. C., Sułkowski, P., & Sulkowska, J. I. (2014). KnotProt: a database of proteins with knots and slipknots. *Nucleic acids research*, 43(D1), D306-D314.
- Jarmolinska, A. I., Perlinska, A. P., Runkel, R., Trefz, B., Ginn, H. M., Virnau, P., & Sulkowska, J. I. (2019). Proteins' Knotty Problems. *Journal of molecular biology*, 431(2), 244-257.
- Jeck, W. R., Sorrentino, J. A., Wang, K., Slevin, M. K., Burd, C. E., Liu, J., et al. (2013). Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *Rna*, 19(2), 141-157.
- Jones, V. F. (1985). A polynomial invariant for knots via von Neumann algebras. *Bull. Amer. Math. Soc. (N.S.)*, 12(1), 103-111.
- Jungreis, D. (1994). Gaussian random polygons are globally knotted. *Journal of Knot Theory and its Ramifications*, 3(04), 455-464.
- Kauffman, L. H. (1987). State models and the Jones polynomial. *Topology*, 26, 395-407.
- Kauffman, L.H. (1999). Virtual Knot Theory. *European Journal of Combinatorics*, 20(7), 663-691.
- Keller, W., & Wendel, I. (1974). Stepwise relaxation of supercoiled SV40 DNA. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 39, pp. 199-208). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Kersey, P. J., Allen, J. E., Allot, A., Barba, M., Boddu, S., Bolt, B. J., ... & Kumar, N. (2017). Ensembl Genomes 2018: an integrated omics infrastructure for non-vertebrate species. *Nucleic acids research*, 46(D1), D802-D808.
- King, N. P., Jacobitz, A. W., Sawaya, M. R., Goldschmidt, L., & Yeates, T. O. (2010). Structure and folding of a designed knotted protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(48), 20732-20737.
- King, N. P., Yeates, E. O., & Yeates, T. O. (2007). Identification of rare slipknots in proteins and their implications for stability and folding. *Journal of molecular biology*, 373(1), 153-166.
- Kohonen, T. (1972). Correlation matrix memories. *IEEE transactions on computers*, 100(4), 353-359.

- Krasnow, M. A., Stasiak, A., Spengler, S. J., Dean, F., Koller, T., & Cozzarelli, N. R. (1983). Determination of the absolute handedness of knots and catenanes of DNA. *Nature*, 304(5926), 559.
- Levinthal, C. (1969). How to fold graciously. *Mossbauer spectroscopy in biological systems*, 67, 22-24.
- Levitt, M., & Chothia, C. (1976). Structural patterns in globular proteins. *Nature*, 261(5561), 552.
- Lim, N. C., & Jackson, S. E. (2015). Mechanistic insights into the folding of knotted proteins in vitro and in vivo. *Journal of molecular biology*, 427(2), 248-258.
- Lipman, E. A., Schuler, B., Bakajin, O., & Eaton, W. A. (2003). Single-molecule measurement of protein folding kinetics. *Science*, 301(5637), 1233-1235.
- Liu, L.F., Depew, R.E., & Wang, J.C. (1976) Knotted single-stranded DNA rings: A novel topological isomer of circular single-stranded DNA formed by treatment with Escherichia coli ω protein. *Journal of molecular biology*, 106, 439-452.
- Liu, L. F., & Wang, J. C. (1987). Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(20), 7024-7027.
- Liu, L.F., Perkocha, L., Calendar, R., & Wang, J.C. (1981) Knotted DNA from bacteriophage capsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78, 5498-5502.
- Lua, R. C., & Grosberg, A. Y. (2006). Statistics of knots, geometry of conformations, and evolution of proteins. *PLoS computational biology*, 2(5), e45.
- Mallam, A. L. (2009). How does a knotted protein fold?. *The FEBS journal*, 276(2), 365-375.
- Mansfield, M. L. (1994). Are there knots in proteins?. *Nature structural biology*, 1(4), 213.
- Mansfield, M. L. (1997). Fit to be tied. *Nature structural biology*, 4(3), 166.
- McCulloch, W. S., & Pitts, W. (1943). A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *The bulletin of mathematical biophysics*, 5(4), 115-133.
- Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A., et al. (2013). Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*, 495(7441), 333.
- Menasco, W. W. (2019). Alternating knots. to appear in *The Concise Encyclopedia of Knot Theory*. Retrieved from arXiv:1901.00582v1.
- Menissier, J., Murcia, G. D., Lebeurier, G., & Hirth, L. (1983). Electron microscopic studies of the different topological forms of the cauliflower mosaic virus DNA: knotted encapsidated DNA and nuclear minichromosome. *The EMBO journal*, 2(7), 1067-1071.
- Meselson, M., & Stahl, F. W. (1958). The replication of DNA in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44(7), 671-82.
- Micheletti, C., Di Stefano, M., & Orland, H. (2015). Absence of knots in known RNA structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(7), 2052-2057.
- Millett, K., Dobay, A., & Stasiak, A. (2005). Linear random knots and their scaling behavior. *Macromolecules*, 38(2), 601-606.

- Millet, K. C., Rawdon, E. J., Stasiak, A., Sułkowska, J. I. (2013). Identifying knots in proteins. *Biochemical Society Transactions*, 41(2), 533-537. DOI: 10.1042/BST20120339
- Milo, R., & Phillips, R. (2015). *Cell biology by the numbers*. Garland Science.
- Mizraji, E. (1989). Context-dependent associations in linear distributed memories. *Bulletin of mathematical biology*, 51(2), 195-205.
- Mizraji, E. (1992). Vector logics: the matrix-vector representation of logical calculus. *Fuzzy Sets and Systems*, 50(2), 179-185.
- Mizraji, E., & Lin, J. (2001). Fuzzy decisions in modular neural networks. *International Journal of Bifurcation and Chaos*, 11(01), 155-167.
- Mizraji, E., Pomi, A., & Alvarez, F. (1994). Multiplicative contexts in associative memories. *Biosystems*, 32(3), 145-161.
- Mizraji, E., Pomi, A., & Valle-Lisboa, J.C. (2009). Dynamic searching in the brain. *Cognitive Neurodynamics*, 3, 401-414.
- Murasugi, K. (2007). *Knot theory and its applications*. Springer Science & Business Media.
- Nass, M. M., & Cooper, L. N. (1975). A theory for the development of feature detecting cells in visual cortex. *Biological cybernetics*, 19(1), 1-18.
- Nicolas, E., Lambin, M., Dandoy, D., Galloy, C., Nguyen, N., Oger, C. A., & Hallet, B. (2015). The Tn3-family of replicative transposons. In *Mobile DNA III* (pp. 693-726). American Society of Microbiology.
- Östlund, O. P. (2004). A diagrammatic approach to link invariants of finite degree. *Mathematica Scandinavica*, 295-319.
- Pohl, W. F. (1980). DNA and differential geometry. *The Mathematical Intelligencer*, 3(1), 20-27.
- Pohl, W. F., & Roberts, G. W. (1978). Topological consideration in the theory of replication of DNA. *Journal of mathematical biology*, 6(4), 383-402.
- Polyak, M., & Viro, O. (1994). Gauss diagram formulas for Vassiliev invariants. *International Mathematics Research Notices*, 1994(11), 445-453.
- Pomi, A. (2013) Una representación matricial de nudos construida a partir de un modelo de memoria asociativa. *2as. Jornadas de +Biofísica*, Fac. de Ciencias, Montevideo.
- Pomi, A. (2016). A possible neural representation of mathematical group structures. *Bulletin of mathematical biology*, 78(9), 1847-1865.
- Pomi, A. (2017). Exploring the sources and mechanisms of cognitive errors in medical diagnosis with associative memory models. *Diagnosis*, 4, 251-259.
- Pomi, A., & Mizraji, E. (2001). A cognitive architecture that solves a problem stated by Minsky, *IEEE on Systems, Man and Cybernetics B (Cybernetics)*, 31, 729-734.
- Pomi, A., & Mizraji, E. (2004). Semantic graphs and associative memories. *Physical review E*, 70(6), 066136.

- Pomi, A., Mizraji, E., & Lin, J. (2018). Tensor Representation of Topographically Organized Semantic Spaces. *Neural Computation*, 30, 3259–3280.
- Potestio, R., Micheletti, C., & Orland, H. (2010). Knotted vs. unknotted proteins: evidence of knot-promoting loops. *PLoS computational biology*, 6(7), e1000864.
- Prentiss, M. C., Wales, D. J., & Wolynes, P. G. (2010). The energy landscape, folding pathways and the kinetics of a knotted protein. *PLoS computational biology*, 6(7), e1000835.
- Reidemeister, K. (1932). *Knotentheorie*. Julius Springer, Berlin. doi: 10.1007/978-3-642-65616-3
- Rietveld, K., Van Poelgeest, R., Pleij, C. W., Van Boom, J. H., & Bosch, L. (1982). The tRNA-Uke structure at the 3' terminus of turnip yellow mosaic virus RNA. Differences and similarities with canonical tRNA. *Nucleic acids research*, 10(6), 1929-1946.
- Rodley, G. A., Scobie, R. S., Bates, R. H., & Lewitt, R. M. (1976). A possible conformation for double-stranded polynucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(9), 2959-2963.
- Rumelhart, D.E., McClelland J. L. & PDP Research Group (1987). *Parallel Distributed Processing: Explorations in the Microstructure of Cognition. Foundations. Volume 1*. Cambridge, MA: MIT Press.
- Shishido, K., Komiyama, N., & Ikawa, S. (1987). Increased production of a knotted form of plasmid pBR322 DNA in Escherichia coli DNA topoisomerase mutants. *Journal of molecular biology*, 195(1), 215-218.
- Škrbić, T., Micheletti, C., & Faccioli, P. (2012). The role of non-native interactions in the folding of knotted proteins. *PLoS computational biology*, 8(6), e1002504.
- Soteros, C. E., Sumners, D. W., & Whittington, S. G. (1992, January). Entanglement complexity of graphs in Z_3 . In *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society* (Vol. 111, No. 1, pp. 75-91). Cambridge University Press.
- Staple DW, & Butcher SE (2005) Pseudoknots: RNA Structures with Diverse Functions. *PLOS Biology* 3(6): e213. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030213>
- Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J. L., & Gatto, G. (2019). *Biochemistry, 9th edition*. New York: WH Freeman. ISBN-10: 1319114679.
- Sułkowska, J. I., Rawdon, E. J., Millett, K. C., Onuchic, J. N., & Stasiak, A. (2012). Conservation of complex knotting and slipknotting patterns in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), E1715-E1723.
- Sułkowska, J. I., Sułkowski, P., & Onuchic, J. (2009). Dodging the crisis of folding proteins with knots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3119-3124.
- Sumners, D. W. (1990). Untangling Dna. *The Mathematical Intelligencer*, 12, 71-80.
- Sumners, D. W. (1995). Lifting the curtain: using topology to probe the hidden action of enzymes. *Notices of the American Mathematical Society*, 42(5), 528-537.
- Sumners, D., & Whittington, S. G. (1988). Knots in self-avoiding walks. *Journal of Physics A: Mathematical and General*, 21(7), 1689.

- Takusagawa, F., & Kamitori, S. (1996). A real knot in protein. *Journal of the American Chemical Society*, 118(37), 8945-8946.
- Takusagawa, F., Kamitori, S., Misaki, S., & Markham, G. D. (1996). Crystal structure of S-adenosylmethionine synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(1), 136-147.
- Taylor, W. R. (2000). A deeply knotted protein structure and how it might fold. *Nature*, 406(6798), 916.
- The American Heritage® Medical Dictionary* (2007). recombinase. (n.d.) Retrieved June 27 2019 from <https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/recombinase>
- Tian, W., Lei, X., Kauffman, L. H., & Liang, J. (2017). A knot polynomial invariant for analysis of Topology of RNA Stems and Protein Disulfide Bonds. *Computational and Mathematical Biophysics*, 5(1), 21-30. <https://doi.org/10.1515/mlbmb-2017-0002>
- Torisu, I. (1999). On nugatory crossings for knots. *Topology and its Applications*, 92(2), 119-129.
- Ueda, Y., Taketomi, H., & Go, N. (1975). Studies on protein folding, unfolding and fluctuations by computer simulation. I. The effects of specific amino acid sequence represented by specific inter-unit interactions. *Int. J. Peptide Res*, 7, 445-459.
- Vaidya, N., Manapat, M. L., Chen, I. A., Xulvi-Brunet, R., Hayden, E. J., & Lehman, N. (2012). Spontaneous network formation among cooperative RNA replicators. *Nature*, 491(7422), 72.
- Valdés, A., Segura, J., Dyson, S., Martínez-García, B., & Roca, J. (2017). DNA knots occur in intracellular chromatin. *Nucleic acids research*.
- Valle-Lisboa, J.C., Pomi, A., Cabana, A., Elvevåg, B., & Mizraji, E. (2014). A modular approach to language production: Models and facts. *Cortex*, 55, 61–76.
- Vinograd, J., Lebowitz, J., Radloff, R., Watson, R., & Laipis, P. (1965). The twisted circular form of polyoma viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 53(5), 1104-1111.
- Virnau, P., Mirny, L. A., & Kardar, M. (2006). Intricate knots in proteins: Function and evolution. *PLoS computational biology*, 2(9), e122.
- Wallin, S., Zeldovich, K. B., & Shakhnovich, E. I. (2007). The folding mechanics of a knotted protein. *Journal of molecular biology*, 368(3), 884-893.
- Wang, H., Di Gate, R. J., & Seeman, N. C. (1996). An RNA topoisomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(18), 9477-9482.
- Wang, J. C. (1971). Interaction between DNA and an Escherichia coli protein ω . *Journal of molecular biology*, 55(3), 523-IN16.
- Wang, J. C. (1979). Helical repeat of DNA in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(1), 200-203.
- Wang, J. C. (1982). DNA topoisomerases. *Scientific American*, 247(1), 94-109.
- Wang, J. C. (1985). DNA topoisomerases. *Annual review of biochemistry*, 54(1), 665-697.
- Wang, J. C. (1991). DNA topoisomerases: why so many?. *Journal of Biological Chemistry*, 266(11), 6659-6662.

- Wang, J. C., Liu, L. F., (1990). DNA replication: topological aspects and the roles of DNA topoisomerases. *DNA Topology and its Biological Effects*, 321-340. DOI: 10.1101/087969348.20.321
- Wasserman, S. A., & Cozzarelli, N. R. (1986). Biochemical topology: applications to DNA recombination and replication. *Science*, 232(4753), 951-960.
- Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953a). Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171(4356), 737-738.
- Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953b). Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*, 171(4361), 964-967.
- White, J. H. (1969). Self-linking and the Gauss integral in higher dimensions. *American Journal of Mathematics*, 91(3), 693-728.
- Yang, W. (2010). Topoisomerases and site-specific recombinases: similarities in structure and mechanism. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 45(6), 520-534.

Créditos por imágenes:

By Jim.belk - Own work, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=9811330>

By Jkasd - Own work, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3937733>

By Jkasd - Own work, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4122906>

By Matemateca (IME/USP)/Rodrigo Tetsuo Argenton, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=68828200>

By en:User:C S (original); Pbroks13 (talk) (redraw) - en:Image:Ochiai unknot.png and M. Ochiai, Introduction to knot theory by computer, Makino publisher, 1996., CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4356461>

Todas las imágenes que no están acreditadas a algún autor, no hayan sido reproducidas ni adaptadas a partir de artículos referenciados en este trabajo fueron creadas por mí usando la versión 0.92 del software *open source* Inkscape.

Harrington, B. et al (2004-2018). *Inkscape*. <http://www.inkscape.org/>.