



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**CARACTERIZACIÓN DE LOS BUCLES ESTRUCTURALES DEL DNA  
DEL LOCUS MULTIGÉNICO DE LA FAMILIA ALBÚMINA EN LA RATA  
Y ESTABLECIMIENTO DE UNA CORRELACIÓN FÍSICA Y  
FUNCIONAL ENTRE LOS BUCLES Y LAS UNIDADES DE  
REPLICACIÓN *IN VIVO***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**JUAN CARLOS RIVERA MULIA**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. ARMANDO ARANDA ANZALDO**

**MÉXICO, D.F.**

**ABRIL, 2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx), bajo la dirección del Dr. Armando Aranda Anzaldo. La presente tesis se realizó dentro del proyecto CONACyT 48447-Q (25506) a cargo del Dr. Armando Aranda Anzaldo.

Los estudios de postgrado en el programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de Juan Carlos Rivera Mulia fueron apoyados por una beca otorgada por el CONACyT (194998).

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo integrado por:

Dr. Armando Aranda Anzaldo

Facultad de Medicina, UAEMéx.

Dr. Rolando Hernández Muñoz

Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. Federico Martínez Montes

Facultad de Medicina, UNAM.

*A Claudia,  
con todo mi afecto, por estar siempre a mi lado apoyándome y alentándome  
y por su confianza y comprensión en todo momento.*

*A mi padres, Carlos y Marisa,  
por el ejemplo de vida y el aliento constante.*

*A Papatalos,  
por impulsarme siempre a superarme.*

*A Julio, Nancy, Kiki y Vicky  
por todo su apoyo y por compartir su alegría.*

*A las "Trevilla" y a los "Omares"  
por otorgarme su valiosa amistad.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Armando Aranda Anzaldo, por su confianza y excelente asesoría en la realización de este trabajo, por constituir una guía fundamental en mi formación académica y por permitirme participar en su grupo de investigación.

Al Dr. Rolando Hernández Muñoz y al Dr. Federico Martínez Montes, miembros de mi comité tutorial, por sus sugerencias durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Myrna Dent, por el valioso apoyo y consejos brindados a lo largo de mi estancia en el Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias de la UAEMéx.

A Claudia, por su cariño y comprensión y por el apoyo técnico brindado para la extracción y manipulación de los linfocitos de rata.

A los miembros del jurado por la dedicación otorgada durante la revisión de esta tesis y por sus observaciones y sugerencias que contribuyeron a mejorar este trabajo.

A todos los miembros del Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias de la UAEMéx por sus consejos, compañerismo y amistad.

*“One thing I have learned in a long life: that all our science, measured against reality, is primitive and childlike - and yet it is the most precious thing we have”*

(Algo que he aprendido en una larga vida es que toda nuestra ciencia, comparada con la realidad, es primitiva e infantil, sin embargo es lo más preciado que tenemos)

Albert Einstein  
(1879-1955)

## ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	5
Antecedentes.....	9
I. La organización de la cromatina en el núcleo en interfase.....	9
II. La Matriz Nuclear.....	12
III. El anclaje del DNA a la MN.....	15
IV. Los bucles estructurales como entidades funcionales independientes.....	20
a. Los bucles estructurales como unidades de transcripción.....	20
b. Los bucles estructurales y la replicación del DNA.....	23
V. El locus multigénico de la familia albúmina.....	28
VI. La regeneración hepática como modelo de replicación in vivo.....	29
Hipótesis.....	30
Objetivo.....	30
Objetivos particulares.....	30
Estrategia experimental.....	31
a. Predicción de secuencias MARS.....	31
b. Animales experimentales.....	31
c. Hepatectomía parcial (PHx).....	31
d. Extracción de células primarias.....	31
e. Preparación de nucleoides.....	32
f. Digestión de los nucleoides con DNasa-I.....	32
g. Diseño de primers.....	33
h. Amplificación por PCR.....	33
Resultados.....	34
I. Determinación de los bucles estructurales del locus de la familia albúmina.....	34
a. Predicción de secuencias MARS.....	34
b. Diseño de una nueva estrategia para la determinación de bucles estructurales.....	36
c. Cinéticas de digestión del DNA asociado a la MN.....	38
d. Mapeo de la posición de secuencias relativa a la MN.....	42
e. Determinación de la organización estructural del DNA con respecto a la MN.....	48
II. Análisis de la organización estructural del DNA durante la replicación.....	50
a. Cinéticas de digestión del DNA asociado a la MN.....	50
b. Mapeo de la posición de secuencias relativa a la MN.....	52
c. Determinación de la organización estructural del DNA con respecto a la MN.....	58
Discusión.....	60
I. Determinación de los bucles estructurales en el locus de la familia albúmina.....	60
II. Análisis de la organización estructural del DNA durante la replicación.....	67
Conclusiones.....	80
Anexo I. Rivera-Mulia, J. C. y Aranda-Anzaldo, A., 2010.....	81
Anexo II. Rivera-Mulia, J. C. y Aranda-Anzaldo, A., 2008.....	95
Bibliografía.....	114

## RESUMEN

En los metazoarios las extensas fibras del DNA nuclear se encuentran organizadas en forma de bucles anclados a una subestructura proteica denominada *matriz nuclear* (MN). Los bucles se anclan a la MN por medio de secuencias que no codifican, conocidas como *regiones de anclaje a la matriz* (MARs), las cuales a pesar de ser ricas en AT no presentan ninguna secuencia consenso. Sin embargo, no todos los MARs potenciales se encuentran anclados a la MN. Los MARs han sido clasificados operacionalmente en constitutivos-estructurales y facultativos-funcionales. Así, los MARs que constituyen los puntos de anclaje de los bucles estructurales son denominados *regiones de anclaje del bucle* o LARs. Se ha planteado que la organización del DNA en bucles anclados a la MN puede desempeñar un papel muy importante en la regulación de la síntesis y la expresión del DNA.

En el presente estudio, se desarrolló un método experimental basado en principios topológicos generales, el cual permite establecer la configuración espacial del DNA asociado a la MN en cualquier región genómica con secuencia conocida, sin la necesidad de caracterizar los LARs (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010). Esta estrategia se basa en la determinación de la posición relativa a la MN de secuencias específicas de DNA. Considerando que el DNA es una fibra continua deformable, al determinar las posiciones de distintos puntos (secuencias) a lo largo de la fibra en relación a un invariante posicional (MN) podemos establecer su configuración espacial con respecto a dicho invariante (la MN). Este nuevo método se utilizó para determinar la organización estructural *in vivo* de los bucles de DNA en el locus multigénico de la familia albúmina en hepatocitos primarios y linfocitos B inactivos de rata. Esta región se organiza en cinco bucles estructurales con tamaño menor a las 40 Kb en los hepatocitos primarios, mientras que en los linfocitos B inactivos se organiza en catorce bucles pequeños cuya longitud máxima es de 14 Kb. La organización diferencial del locus de la familia albúmina en hepatocitos y linfocitos B de rata sugiere que la arquitectura espacial de los bucles anclados a la MN puede ser determinante para establecer el potencial transcripcional de los genes presentes (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010).

Por otra parte, se ha propuesto que los bucles de DNA pueden constituir regiones autónomas del genoma, las cuales podrían corresponder a dominios funcionales independientes como las unidades de replicación (replicones). Con el objeto de determinar el mecanismo general de replicación del DNA *in vivo* y establecer si los bucles estructurales anclados a la MN constituyen las unidades funcionales de replicación, se analizaron los cambios en la organización estructural del locus multigénico de la familia albúmina durante la fase de síntesis del DNA (S).

Para ello, utilizamos el modelo de regeneración hepática posterior a la hepatectomía parcial en la rata, sistema que permite la obtención de hepatocitos primarios sincronizados en la fase S *in vivo*. Se encontró que hay un cambio transitorio en la configuración espacial de los bucles estructurales del locus multigénico de la familia albúmina durante la replicación del DNA. Los resultados obtenidos son consistentes con el modelo para la replicación del DNA *in vivo* que propone que la maquinaria de replicación permanece fija asociada a la subestructura nuclear y es el templado el que se mueve de manera progresiva hacia dicha maquinaria para ser duplicado. Así, nuestros resultados sugieren que los bucles estructurales del DNA corresponden a los replicones. También, nuestros resultados permiten establecer que la organización estructural de la región del locus de la familia albúmina se restablece una vez que los hepatocitos han retornado a la quiescencia después de la regeneración hepática.

## ABSTRACT

In metazoans the extensive fibers of nuclear DNA are organized in loops anchored to a proteinaceous substructure called the *nuclear matrix* (NM). The loops are anchored to the NM through non-coding sequences known as *matrix attachment regions* (MARs), which despite being rich in AT do not have a consensus sequence. However, not all potential MARs are anchored to the NM. The MARs are operationally classified into structural-constitutive and functional-facultative. Thus, MARs involved in the attachment of the structural loops are called *loop attachment regions* or LARs. It has been suggested that the organization of DNA in loops anchored to the MN may play an important role in regulating the synthesis and expression of DNA.

In this study we developed an experimental methodology based on general topological principles, which allows the establishment of the spatial configuration of DNA associated with the NM in any genomic region with known sequence, without previous characterization of the LARs involved (Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010). This strategy is based on mapping the relative position to the NM of specific sequences of DNA. Considering that DNA is a continuous deformable fiber, by determining the position of several points (sequences) along the fiber relative to a position-reference invariant (NM) we can establish the spatial configuration of the fiber with respect to that invariant (NM). This new method was used for determining *in vivo* the organization of the structural DNA loops in the multigenic locus of the albumin family in both primary hepatocytes and naïve B cells from the rat. In primary hepatocytes this region is divided into five structural loops smaller than 40 Kb in length, while in naïve B cells is divided into fourteen small loops with a maximum length of 14 kb. The differential organization of the locus of the albumin family in hepatocytes and naïve B lymphocytes suggests that the spatial architecture of the loops anchored to the MN can be crucial for establishing the transcriptional potential of the genes involved (Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010 .)

On other hand, it has been suggested that DNA loops may constitute autonomous regions of the genome, that might correspond to functional domains such as the replication units (replicons). In order to determine the general mechanism of DNA replication *in vivo* and whether the structural loops anchored to the MN are the functional units of replication, we analyzed the changes in the structural organization of the multigenic locus of albumin family during the synthesis of DNA (S). We used the model of liver regeneration after partial hepatectomy in rats, a system that allows to obtain primary hepatocytes synchronized *in vivo* in the S phase. Our results indicate that during DNA replication there is a transient modification of the spatial configuration of the structural DNA loops in the multigenic locus of the albumin family.

The results are consistent with the model for DNA replication *in vivo* which suggests that the replication machinery remains fixed by association with the nuclear substructure and the template moves progressively toward the machinery to be duplicated. Thus, our results suggest that the structural loops of DNA correspond to the actual replicons, as well as indicating that the structural organization of the locus of the albumin family is restored once the hepatocytes have return to quiescence after liver regeneration.

## INTRODUCCIÓN

Desde los procariontes hasta los humanos, la molécula del ácido desoxirribonucleico (DNA) constituye el material genético. En los eucariontes las extensas fibras del DNA se encuentran confinadas en el interior del núcleo, el cual comúnmente ocupa sólo una décima parte del volumen celular. Por lo tanto, el material hereditario debe estar eficazmente empaquetado en el espacio nuclear, pero al mismo tiempo permanecer accesible para los diferentes procesos fundamentales de la fisiología celular, como la replicación y la transcripción (Wachsmuth *et al.*, 2008).

Dentro del núcleo celular el genoma es compactado mediante diversos niveles de organización que involucran la asociación del DNA con las histonas para formar la *cromatina*, el plegamiento de la cromatina en estructuras tridimensionales más condensadas (Goetze *et al.*, 2007; Wachsmuth *et al.*, 2008) y la formación de *bucles* o asas ancladas a una subestructura nuclear denominada *matriz nuclear* (MN), *nucleoesqueleto* o *subestructura nuclear* (Nickerson, 2001; Tsutsui *et al.*, 2005). Recientemente, se ha planteado que los distintos niveles de organización de la cromatina no sólo tienen la función de empacar el genoma, sino que también pueden desempeñar un papel muy importante en la regulación de la síntesis y la expresión del DNA (Anachkova *et al.*, 2005; Elcock y Bridger, 2008). Además, se ha establecido que los cromosomas no se encuentran dispersos al azar en el interior del núcleo interfásico, sino que ocupan territorios específicos que no se superponen (Cremer y Cremer, 2006a; Cremer y Cremer, 2006b); estos territorios parecen ser mantenidos por el anclaje físico de los bucles de DNA a la MN (Ma *et al.*, 1999; Chubb *et al.*, 2002; Petrova *et al.*, 2005; Petrova *et al.*, 2006).

Los bucles de DNA se anclan a la MN por medio de secuencias conocidas como *regiones de anclaje a la matriz* o MARs por sus siglas en inglés (*matrix attachment region*), las cuales, a pesar de ser ricas en AT, no presentan ninguna secuencia consenso que permita identificarlas *a priori* (Boulikas, 1995; Ottaviani *et al.*, 2008). Las secuencias MARs son todas aquellas que tienen afinidad por la MN; sin embargo, no todas participan en el establecimiento de los anclajes del DNA a la MN. Se han definido operacionalmente dos tipos de MARs, los MARs estructurales o constitutivos, que resisten la extracción con altas concentraciones de sal y los MARs facultativos o funcionales, que no resisten este tipo de extracción (Razin *et al.*, 1985; Razin y Gromova 1995). Los MARs estructurales se han denominado *regiones de anclaje del bucle* o LARs por sus siglas en inglés (*loop attachment region*) y constituyen los anclajes permanentes de los bucles de DNA a la MN (Razin, 2001; Maya-Mendoza *et al.*, 2003).

Debido a la importancia de las relaciones topológicas entre el genoma y la subestructura nuclear para la fisiología celular, se han diseñado distintas estrategias para determinar el orden superior de organización del DNA en bucles anclados a la MN. Estos métodos se basan en la identificación experimental de los anclajes a la subestructura nuclear (Gombert *et al.*, 2003; Iarovaia *et al.*, 2004; Hair y Vassetzky, 2007; Kumar *et al.*, 2007). Sin embargo, la identificación experimental de los LARs es muy laboriosa y deben ajustarse las condiciones experimentales a cada locus estudiado en particular y a cada tipo de muestras experimentales utilizadas. También se han diseñado algoritmos computacionales que permiten la identificación *in silico* de MARs potenciales en función de las propiedades del DNA a nivel de su secuencia (Singh *et al.*, 1997; van Drunen *et al.*, 1999; Glazko *et al.*, 2001; Frisch *et al.*, 2002). No obstante, se ha demostrado que los algoritmos computacionales carecen de valor predictivo, ya que únicamente identifican secuencias con afinidad por la MN (secuencias MARs) pero no las secuencias LARs (Evans *et al.*, 2007).

En el presente estudio, se desarrolló un método experimental basado en principios topológicos generales que permite establecer la configuración espacial del DNA asociado a la MN (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010). Esta estrategia se basa en la determinación de la posición relativa a la MN de secuencias de DNA. Considerando que el DNA es una fibra continua deformable, al determinar las posiciones de distintos puntos a lo largo de la fibra con respecto a un invariante posicional (MN) podemos establecer su configuración espacial con respecto a dicho invariante (la MN). Así, el método que desarrollamos permite determinar la configuración de los bucles de DNA anclados a la MN en cualquier región genómica con secuencia conocida sin la necesidad de caracterizar los puntos de anclaje (LARs). Esta nueva técnica se utilizó para determinar la organización estructural *in vivo* de los bucles de DNA del locus multigénico de la familia albúmina en hepatocitos primarios de rata. Se analizaron las posiciones con respecto a la MN de secuencias blanco (amplicones) ubicadas a intervalos regulares a lo largo de una región genómica de 162 Kb que incluye tres genes del locus multigénico de la albúmina. Así, se estableció la organización estructural de esta región en cinco bucles estructurales con tamaño menor a las 40 Kb. Además, se determinó la organización de la misma región en linfocitos B inactivos, con el objeto de establecer en forma comparativa la organización en bucles estructurales de este locus en células primarias que no expresan los genes de la familia albúmina. En los linfocitos B inactivos la región de 162 Kb se organiza en catorce bucles pequeños cuya longitud máxima es de 14 Kb. La organización diferencial del locus de la familia albúmina en hepatocitos y linfocitos B de rata sugiere que la arquitectura espacial de los bucles anclados a la MN puede ser determinante para establecer el potencial transcripcional de los genes presentes (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010).

Por otra parte, se ha observado que algunos de los procesos fundamentales de la fisiología nuclear como la replicación del DNA, la transcripción y el procesamiento de los transcritos primarios ocurren en complejos macromoleculares organizados sobre la MN (Wei *et al.*, 1998; Cook, 1999; Anachkova *et al.*, 2005; Razin *et al.*, 2007). Además, las relaciones topológicas entre los bucles de DNA y la MN parecen ser muy importantes para la fisiología nuclear (Aranda-Anzaldo y Dent, 1997; Aranda-Anzaldo *et al.*, 1999; Linnemann y Krawetz, 2009), por lo que se ha propuesto que los bucles de DNA pueden constituir regiones autónomas del genoma, las cuales podrían corresponder a dominios funcionales independientes como son las unidades de transcripción o de replicación (Boulikas, 1995; Razin, 2001; Razin *et al.*, 2007).

A pesar de que existen diversas evidencias de que los genes transcripcionalmente activos se localizan próximos a la MN (Nelkin *et al.*, 1980; Cook *et al.*, 1982; Jackson y Cook, 1985; Stein *et al.*, 1995), se ha demostrado que la posición de los genes con respecto a la MN es independiente de su actividad transcripcional (Maya-Mendoza *et al.*, 2003; Maya-Mendoza *et al.*, 2004). Además, se ha observado que una sola unidad transcripcional puede estar organizada en varios bucles de DNA anclados a la MN (Iarovaia *et al.*, 2004), lo que descarta la posibilidad de que los bucles estructurales corresponden a las unidades de transcripción.

Por otro lado, se ha propuesto que los bucles de DNA anclados a la MN constituyen las unidades funcionales de replicación (Mechali, 2001; Razin, 2001), ya que existe una correlación entre el tamaño promedio de los bucles de DNA y el de los replicones (Buongiorno-Nardelli *et al.*, 1982). Más aún, se ha observado que el DNA recién replicado se encuentra estrechamente asociado con la subestructura nuclear (McCready *et al.*, 1980; Pardoll *et al.*, 1980), que los orígenes de replicación (*ori*) se ubican próximos a los LARs (Ortega y DePamphilis, 1998) y que se asocian a la MN en función del estado del ciclo celular (Djeliova *et al.*, 2001). Además, evidencias experimentales recientes indican que secuencias génicas ubicadas en distintos bucles de DNA se aproximan a la MN durante la fase S y regresan a sus posiciones originales cuando las células retornan a G0 (Maya-Mendoza *et al.*, 2003; Maya-Mendoza *et al.*, 2004).

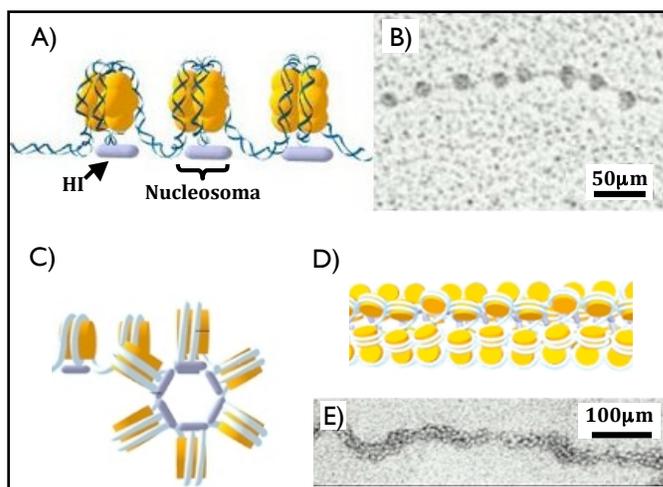
También se ha demostrado que la replicación ocurre en grandes complejos macromoleculares denominados fábricas de replicación, que se encuentran en sitios fijos organizados sobre la MN (Hozak *et al.*, 1993; Jackson y Pombo, 1998; Dimitrova y Berezney, 2002). Considerando estas evidencias se planteó un modelo del mecanismo de replicación *in vivo* en el cual se propone que las DNA polimerasas permanecen fijas en las fábricas de replicación, mientras que el DNA es el que se mueve hacia éstas (Cook, 1999). Esto evitaría el enorme gasto energético que representaría el mover grandes complejos multiproteicos como la maquinaria de replicación a lo largo de un templado con una compleja topología estructural como el DNA.

Con el objeto de determinar el mecanismo general de replicación del DNA *in vivo* y establecer si los bucles estructurales anclados a la MN constituyen las unidades funcionales de replicación, se analizaron los cambios en las posiciones relativas a la MN de diferentes secuencias (amplicones) ubicadas en los bucles estructurales del locus multigénico de la familia albúmina durante la fase de síntesis de DNA (S). Para ello, utilizamos el modelo de regeneración hepática posterior a la hepatectomía parcial en la rata, sistema que permite la obtención de hepatocitos primarios sincronizados en la fase S del ciclo celular *in vivo* (Michalopoulos, 2007; Michalopoulos, 2009). Se analizaron las posiciones con respecto a la MN de diferentes secuencias blanco (amplicones) en hepatocitos primarios de rata durante el pico máximo de síntesis de DNA a las 24 h post-hepatectomía, utilizando para este propósito la estrategia desarrollada por nosotros para determinar la organización de bucles estructurales de DNA anclados a la MN. Así, se pudo establecer que hay un cambio transitorio en la configuración espacial de los bucles estructurales del locus multigénico de la familia albúmina durante la replicación del DNA. También se determinaron las posiciones de los amplicones en muestras de hepatocitos extraídos a los 7 días post-hepatectomía, cuando los hepatocitos han retornado a la quiescencia después de la regeneración hepática (Michalopoulos, 2009). Los resultados sugieren que al terminar la regeneración hepática los bucles estructurales recuperan una configuración espacial muy similar a la original. Los resultados obtenidos son consistentes con el modelo para la síntesis de DNA *in vivo* que propone que la maquinaria de replicación permanece fija y es el templado el que se mueve hacia ella para ser duplicado.

## ANTECEDENTES

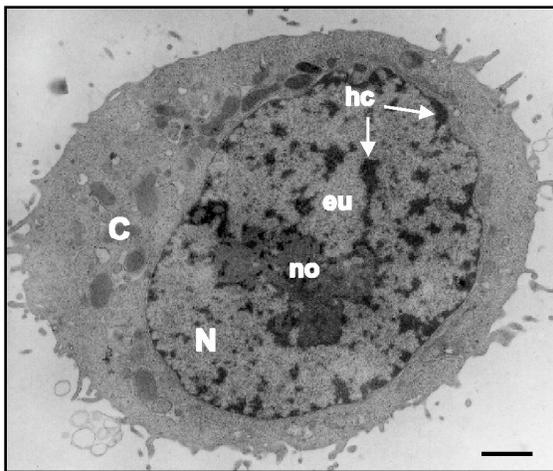
### I. La organización de la cromatina en el núcleo en interfase

En las células eucariontes el DNA se encuentra confinado en el interior del núcleo, el cual mide alrededor de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro lo que representa típicamente la décima parte del volumen total celular. Sin embargo, el DNA total de una célula dispuesto linealmente es muy largo por lo que existen mecanismos que permiten su compactación para empaquetarlo en el núcleo. En la cromatina el DNA se asocia con un conjunto de proteínas con carga positiva denominadas *histonas*, de las cuales existen cinco tipos principales: H1, H2A, H2B, H3 y H4. La unidad estructural básica de la cromatina es el *nucleosoma*, el cual consiste en aproximadamente 150 pares de bases (pb) de DNA enrollados alrededor de un octámero proteico constituido por dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Este empacamiento mediado por las histonas produce una fibra de 10 nm de diámetro (Figura 1) que consta de nucleosomas separados por segmentos de DNA que funcionan como eslabones (Calladine *et al.*, 2004; Wachsmuth *et al.*, 2008). La histona H1 fija el DNA eslabón entre cada octámero proteico estableciendo un arreglo espacial de los nucleosomas en forma de hélice (solenoides) para lograr una mayor compactación. Bajo condiciones fisiológicas de fuerza iónica, se ha observado *in vitro* que la fibra de cromatina se organiza en una estructura en espiral tipo solenoide que tiene un diámetro de 30 nm y una densidad de 6-7 nucleosomas cada 11 nm, que corresponden a una vuelta de la espiral (Figura 1). Comúnmente, se asume que este arreglo estructural de la cromatina es el que está presente *in vivo* durante la interfase. Sin embargo, sigue siendo materia de debate la configuración espacial de los nucleosomas y la estructura de la fibra cromatínica durante la interfase (Goetze *et al.*, 2007; Banfalvi, 2008; Wachsmuth *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Los nucleosomas. A) Esquema de la estructura de los nucleosomas. B) Micrografía electrónica de los nucleosomas. C) Esquema de la vista frontal del solenoide. D) Vista lateral del solenoide. E) micrografía electrónica de las fibras cromatínicas en forma de solenoide.

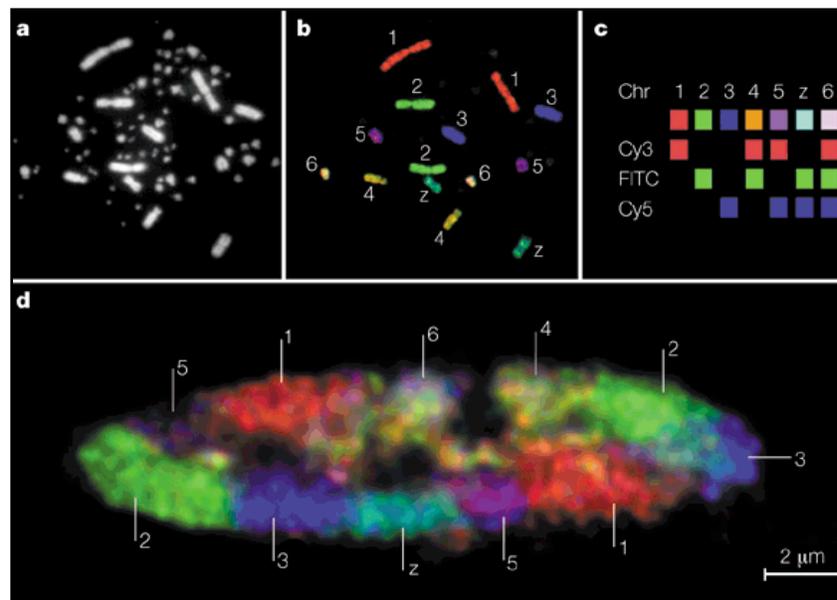
En el núcleo en interfase la mayor parte de la cromatina se encuentra formando fibras agrupadas en cromosomas de tamaños y longitudes específicas. No obstante, un cromosoma típico humano organizado en fibras de tipo solenoidal mediría 1 mm de largo, por lo que claramente deben existir niveles superiores de empaquetamiento (Alberts *et al.*, 2002; Calladine *et al.*, 2004). Además, el DNA no se encuentra compactado de la misma forma a lo largo de las fibras de cromatina, sino que existen regiones más densamente empaquetadas que otras. Así, se ha descrito que la cromatina transcripcionalmente activa o *eucromatina* es menos densa, mientras que la *heterocromatina* presenta un mayor grado de compactación (Figura 2). Existen dos tipos de heterocromatina: la constitutiva, que generalmente no se expresa y contiene secuencias pequeñas y repetitivas de DNA, y la facultativa, que sólo se expresa en algunos tipos celulares (Cook, 2001; Alberts *et al.*, 2002). Diversas evidencias indican que la fibra de cromatina se pliega en forma de bucles anclados a una subestructura proteica definida como matriz nuclear (MN). La MN está constituida por las láminas nucleares, complejos residuales del poro, una red interna de ribonucleoproteínas y el nucleolo residual (Berezney *et al.*, 1995; Nickerson, 2001; Tsutsui *et al.*, 2005; Ottaviani *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Micrografía electrónica de una célula HeLa. Se observa en el interior del núcleo diferentes densidades de la cromatina. La heterocromatina (hc) son las regiones más densas en el nucleoplasma; mientras que la eucromatina (eu) son las regiones menos densas. N = núcleo, C = citoplasma, no = nucleolo. Tomada de Cook, 2001.

Por otra parte, se ha demostrado que en las células eucariontes los cromosomas ocupan regiones específicas en el interior del núcleo que no se superponen; por ello, al espacio que ocupa cada cromosoma se le denominó *territorio cromosomal* (Cremer y Cremer 2006a; Cremer y Cremer 2006b). La irradiación de núcleos en interfase reveló que los cromosomas permanecen relativamente fijos, ya que el DNA que ha sido reparado no difunde libremente en el interior del organelo (Cremer *et al.*, 1984).

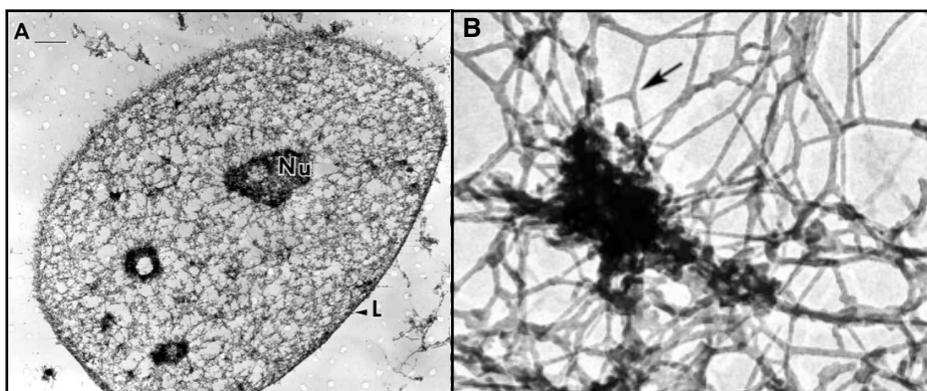
Mediante la tinción de cromosomas específicos por hibridación *in situ* se comprobó el arreglo espacial en interfase de los cromosomas en territorios distintos (Figura 3), los cuales no se superponen y no se mezclan entre sí (Visser *et al.*, 1998; Croft *et al.*, 1999; Visser *et al.*, 2000). Experimentos recientes en los que se analizaron las posiciones de los territorios cromosomales han demostrado que la disposición de los cromosomas en regiones específicas dentro del núcleo celular depende de la asociación del DNA con la MN (Ma *et al.*, 1999; Petrova *et al.*, 2005; Petrova *et al.*, 2006).



**Figura 3.** Territorios cromosomales en células en interfase. A) Preparación de cromosomas metafásicos de células diploides. B) Misma preparación de los cromosomas después de la hibridación con diferentes sondas específicas fluorescentes. C) Fluoróforos utilizados para cada uno de los cromosomas analizados. D) Sección óptica del núcleo en interfase donde se muestran los territorios cromosomales que no se superponen. Tomado de Cremer y Cremer, 2001.

## II. La Matriz Nuclear

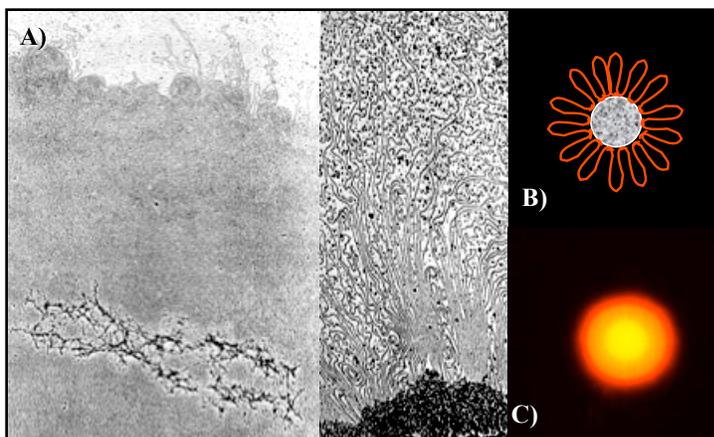
Estudios en la década de 1940 mostraron la existencia de una estructura que aparentemente era la responsable de mantener la forma y el volumen nuclear (Zbarskii, 1998). Sin embargo, fue hasta 1974 que se denominó matriz nuclear (MN) a la estructura que se obtenía al lisar las células utilizando detergentes, altas concentraciones de sal y nucleasas, para remover lípidos, proteínas solubles (principalmente las histonas), DNA y parte del RNA (Figura 4), obteniendo una estructura no cromatínica que conserva la forma del núcleo (Berezney y Coffey, 1974). Distintos grupos de investigación aislaron de manera independiente estructuras residuales similares mediante diferentes procesos de extracción salina, designándolas como andamio nuclear (Mirkovitch *et al.*, 1984), nucleoesqueleto (Cook, 1988) o carioesqueleto (Fisher, 1989) para referirse a la subestructura nuclear. A pesar de que aún no se conoce la composición precisa a nivel molecular de la MN, se han identificado cerca de 400 proteínas distintas asociadas con esta subestructura (Mika y Rost, 2005; Albrethsen *et al.*, 2009); sus componentes principales son las láminas nucleares, los complejos residuales del poro, una red interna de ribonucleoproteínas y el nucleolo residual (Berezney *et al.*, 1995; Nickerson, 2001).



**Figura 4.** Micrografías electrónicas de la matriz nuclear (MN). A) MN en microscopía electrónica, se observa la lámina nuclear (L) en la periferia y el nucleolo residual (Nu). B) Micrografía electrónica de mayor ampliación de la MN en la que se muestra la estructura interna constituida por la red de ribonucleoproteínas, se observan diversas conexiones entre los filamentos de la estructura interna (flecha). Tomada de Nickerson, 2001.

Poco tiempo después de la descripción de la MN (Berezney y Coffey, 1974), estudios independientes demostraron que la cromatina presenta un comportamiento helicoidal similar al de las moléculas circulares de DNA (como los cromosomas bacterianos y mitocondriales), es decir, que el DNA humano está dividido en subunidades hiperenrolladas en forma de asas o bucles (Cook y Brazell, 1975; Cook y Brazell, 1976; Cook *et al.*, 1976).

Este comportamiento inmediatamente sugirió que el DNA está formando bucles anclados a la MN, lo que es consistente con las observaciones por microscopía electrónica de los cromosomas mitóticos sin histonas, que revelaron una serie de bucles unidos al *andamio cromosomal* (Figura 5), una estructura proteica probablemente equivalente a la matriz nuclear en interfase (Paulson y Laemmli, 1977; Zehnbauer y Vogelstein, 1985).

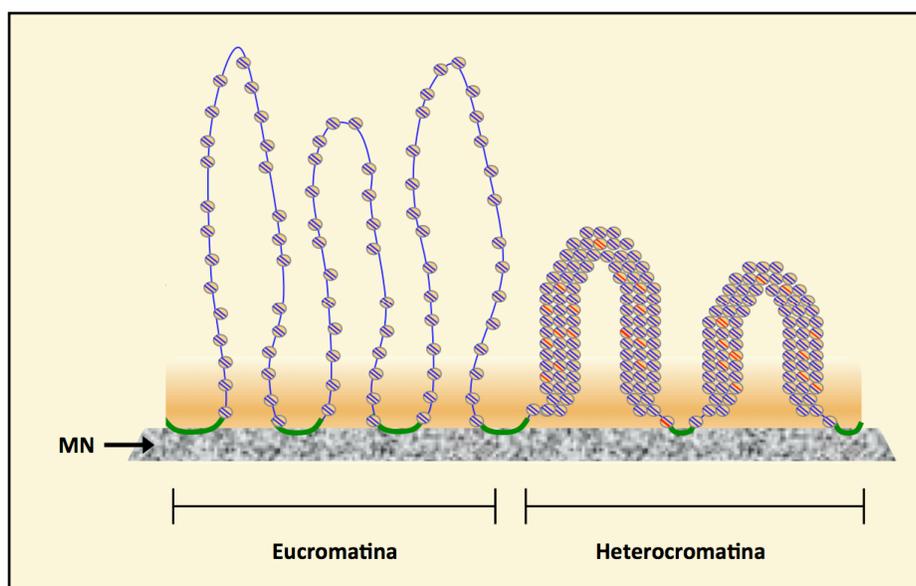


**Figura 5.** A) Micrografía electrónica de los bucles anclados al andamio cromosomal. Tomado de Paulson y Laemmli, 1977. B) esquema del halo con los bucles anclados a la matriz y C) nucleoide en microscopía de fluorescencia.

En los cromosomas interfásicos, la presencia de bucles se comprobó mediante el análisis por microscopía de fluorescencia de los *nucleoides* (MNs extraídas sin el uso de nucleasas para conservar el DNA); los cuales, en presencia de agentes intercalantes del DNA, como el bromuro de etidio, forman halos fluorescentes que rodean a la MN (Figura 5) debido al desenrollamiento de los bucles (Cook *et al.*, 1976). Más tarde, se observó que el tamaño del halo representa el tamaño promedio de los bucles (Vogelstein *et al.*, 1980). Así, se ha establecido que la cromatina se organiza en bucles anclados a la MN (Figura 6).

Después de la descripción de la disposición de la cromatina en bucles anclados a la MN, surgieron diversas evidencias de que este arreglo podría jugar un papel clave en procesos importantes de la fisiología celular (Tsutsui *et al.*, 2005; Ottaviani *et al.*, 2008). Se ha observado que las maquinarias de replicación y de transcripción se organizan en grandes complejos macromoleculares que se asocian con la MN (Jackson y Cook, 1985; Tubo y Berezney, 1987; Hozak *et al.*, 1993; Hozak y Cook, 1994; Iborra *et al.*, 1996). Distintas hormonas se unen a la MN de células que responden a esteroides, lo que se correlaciona con la respuesta fisiológica del tejido a estas hormonas (Barrack y Coffey, 1982). La reparación del daño al DNA inducido por luz ultravioleta ocurre en sitios fijos dentro del núcleo, lo que sugiere la asociación de la maquinaria de reparación a la MN (Jackson *et al.*, 1994). Asimismo, componentes esenciales para el proceso de recombinación homóloga se unen a la MN en los sitios discretos del núcleo después de inducir daño al DNA (Mladenov *et al.*, 2009).

El procesamiento de los transcritos primarios ocurre en complejos moleculares organizados sobre la MN (Zeitlin *et al.*, 1987; Zeitlin *et al.*, 1989; Blencowe *et al.*, 1994; Mortillaro y Berezney, 1998; Blencowe *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2003). Además, se ha comprobado que diversos componentes de las maquinarias de remodelación de la cromatina están asociadas a la MN (Hendzel *et al.*, 1991; Hendzel *et al.*, 1994; Reyes *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1999).



**Figura 6.** Organización del DNA en bucles anclados a la MN. Tanto la euromatina como la heterocromatina forma bucles anclados a la MN, la diferencia entre ambas es el grado de compactación dentro de los bucles de DNA.

Dentro del núcleo la organización de la cromatina en territorios cromosomales se mantiene mediante la asociación del DNA con la MN, pues la cromatina presenta movimientos restringidos probablemente por el anclaje a sitios fijos de la MN (Marshall *et al.*, 1997; Chubb *et al.*, 2002). Más aún, en extracciones de la MN con altas concentraciones de sal pero sin el uso de nucleasas se preserva la organización de los territorios cromosomales (Ma *et al.*, 1999). Además, la desintegración de los componentes internos de la MN con RNasa resulta en la pérdida de la arquitectura de los territorios cromosomales, lo que indica que los cromosomas se encuentran restringidos a espacios particulares mediante su asociación con elementos de la red interna de la MN (Ma *et al.*, 1999). Análisis posteriores han revelado que la localización específica de los centrómeros al interior del núcleo se conserva a pesar de la remoción de hasta el 80 % de la cromatina; esto indica que la organización de los cromosomas en interfase se mantiene por la interacción entre el material genético y la MN (Petrova *et al.*, 2005; Petrova *et al.*, 2006).

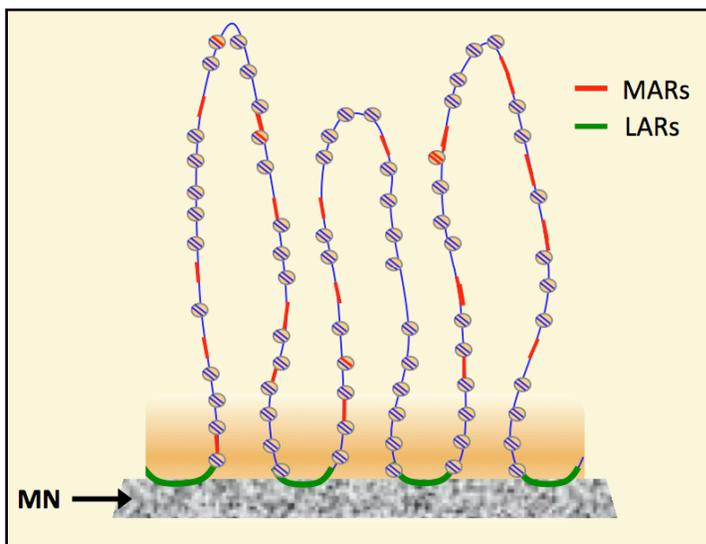
El análisis de la arquitectura del DNA con respecto a la MN en hepatocitos de rata de diferentes edades ha revelado que el grado de hiperenrollamiento de los bucles de DNA se incrementa en función de la edad; esto es consistente con la reducción de la longitud promedio de los bucles de DNA. Además, al ubicar la posición relativa a la MN de diversas secuencias génicas se ha observado un reordenamiento de la arquitectura global del DNA en el interior del núcleo que depende de la edad cronológica del animal. Estos cambios se correlacionan con la estabilización estructural de la MN y el incremento del diámetro promedio de esta subestructura (Maya-Mendoza *et al.*, 2005; Aranda-Anzaldo, 2009).

### III. El anclaje del DNA a la MN

---

La interacción del DNA con la MN es tan resistente que permanece aún después de la extracción con alta fuerza iónica y digestión del DNA de los bucles con nucleasas (Heng *et al.*, 2004). La cromatina está anclada a la MN por medio de secuencias llamadas regiones de anclaje a la matriz (MARs por sus siglas en inglés); los MARs no presentan secuencias consenso que permitan su identificación *a priori*, son secuencias repetitivas, ricas en nucleótidos A-T y no son codificantes (Ottaviani *et al.*, 2008). La longitud de los MARs que se han identificado experimentalmente varía entre los 100 pb hasta los 2000 pb. Sin embargo, se ha sugerido que la aparente asociación de regiones extensas de DNA a la MN podría resultar de puntos múltiples de anclaje separados por secuencias de longitud pequeña, por lo que la longitud real de las MARs podría ser menor (Iarovaia *et al.*, 2004). Generalmente, los puntos de anclaje se encuentran en regiones del genoma donde el DNA tiende a ser curvo y fácilmente desnaturalizado (Kohwi-Shigematsu y Kohwi, 1990; von Kries *et al.*, 1990; Bode *et al.*, 1992; Fiorini *et al.*, 2006; Ottaviani *et al.*, 2008).

Los MARs se unen a la MN de manera constitutiva (permanentemente), o facultativa (temporalmente). La organización superior de la cromatina parece depender de los anclajes constitutivos, mientras que los anclajes facultativos pueden establecer uniones dinámicas (Figura 7) probablemente implicados en estados fisiológicos temporales, como la transcripción (Heng *et al.*, 2004; Ottaviani *et al.*, 2008). La técnica de aislamiento de la MN, basada en la extracción con altas concentraciones de sal, permite poner en evidencia a los MAR's estructurales, ya que por su alta afinidad resisten el proceso de extracción; mientras que los MAR's transitorios no son resistentes a la alta fuerza iónica y se pierden durante la extracción (Razin *et al.*, 1985). Debido a que los anclajes estructurales constituyen los puntos de anclaje a la MN se han denominado *regiones de anclaje del bucle* o LARs por sus siglas en inglés (Razin, 2001; Maya-Mendoza *et al.*, 2003; Maya-Mendoza *et al.*, 2005).

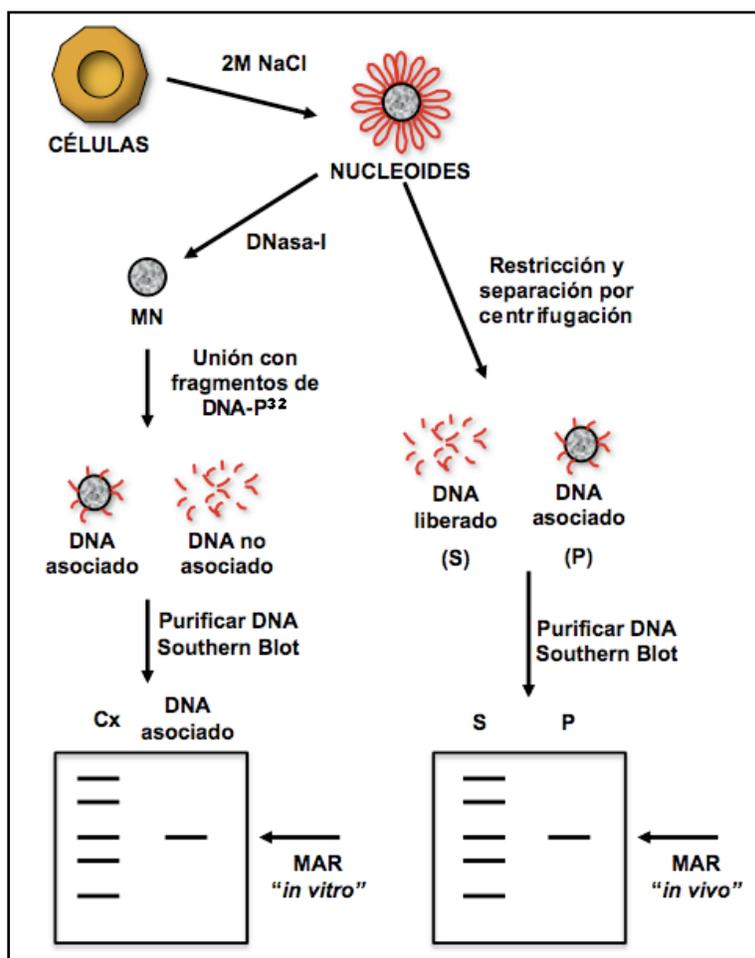


**Figura 7.** Secuencias de anclaje a la MN. Las secuencias MARs están distribuidas a lo largo de los bucles de DNA. Los puntos de anclaje constitutivos (LARs) establecen bucles estructurales anclados a la MN.

Existen diferentes estrategias experimentales que permiten la identificación de secuencias MARs en regiones del genoma de interés (Figura 8). Una de las primeras estrategias utilizadas es la identificación de MARs *in vitro*, en la que se extraen matrices nucleares purificadas mediante extracciones salinas seguidas de la digestión del DNA con nucleasas; entonces las matrices se incuban con distintos fragmentos de DNA de la región bajo estudio en presencia de secuencias competidoras con el objeto de determinar cuáles de éstas se asocian con la subestructura nuclear. La identificación de los fragmentos asociados a la MN se realiza mediante Southern blot, o bien, por autorradiografía utilizando sondas previamente marcadas (Cockerill y Garrard 1986; Gasser y Laemmli 1986; Izaurralde *et al.*, 1988). No obstante, la asociación entre los fragmentos de DNA y la MN *in vitro* puede diferir de la interacción *in vivo* presente en la región de interés, ya que al eliminar gran parte del DNA original la MN es más accesible para establecer contactos con cualquier tipo de DNA. Además, al utilizar fragmentos de tamaños limitados se pierden las limitantes topológicas de los bucles de DNA que determinan los puntos de anclaje reales, por lo que esta técnica únicamente permite la identificación de secuencias que tienen afinidad por la MN (secuencias MARs) pero no los puntos de anclaje de los bucles estructurales (secuencias LARs).

Con el objeto de determinar las regiones ancladas a la MN en forma constitutiva (LARs) se han diseñado diversas estrategias (Figura 8). Una de las primeras es el ensayo de identificación de MARs *in vivo* mediante la digestión del DNA con enzimas de restricción y la identificación de las secuencias asociadas por Southern blot (Mirkovitch *et al.*, 1984). Esta técnica requiere de la preparación de nucleoides (MNs extraídas sin el uso de nucleasas para conservar el DNA), los cuales son digeridos con mezclas de enzimas de restricción. Posteriormente, los nucleoides son lavados y centrifugados obteniendo dos fracciones, la del DNA asociado a la MN (el botón) y la del DNA que ha sido cortado (sobrenadante).

El DNA asociado a la MN es purificado mediante la digestión de la MN con proteasas y las secuencias son identificadas por Southern blot. Si la secuencia de interés se encuentra en la fracción del botón se infiere que forma parte de un anclaje a la MN constitutivo (Mirkovitch *et al.*, 1984; Rollini *et al.*, 1999; Purbowasito *et al.*, 2004).



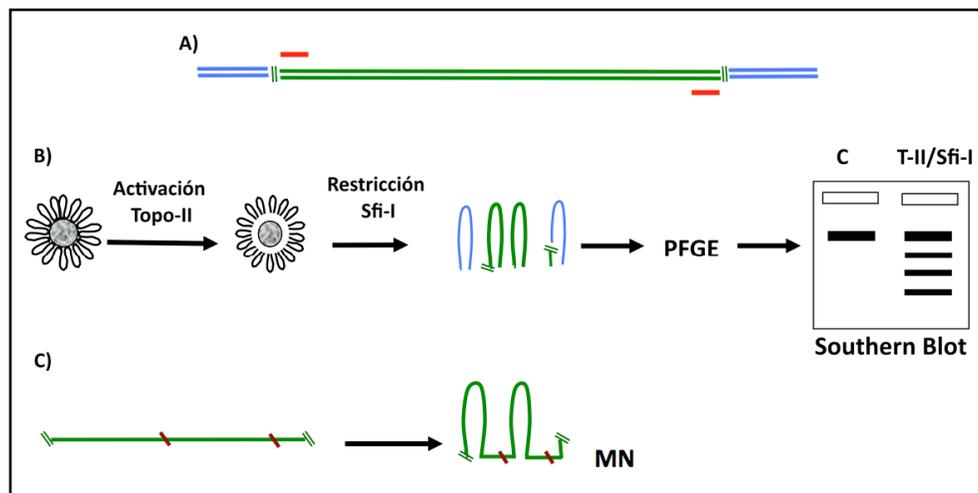
**Figura 8.** Ensayos para la identificación de secuencias MARs/LARs. El ensayo de MARs *in vitro* requiere de la purificación de MNs, éstas son incubadas con fragmentos marcados de la región de interés, posteriormente los fragmentos asociados a la MN se purifican y son identificados por Southern blot. El ensayo de MARs *in vivo* identifica secuencias LARs mediante la digestión de los bucles y la separación del DNA cortado mediante centrifugación. Los fragmentos que permanecen asociados a la MN son purificados e identificados por Southern blot.

Esta es una de las técnicas experimentales más utilizada para la identificación de los puntos de anclaje y actualmente se ha simplificado con el uso de la PCR para la determinación de las secuencias que se encuentran en la fracción de DNA asociado a la MN (Rollini *et al.*, 1999; Gombert *et al.*, 2003; Purbowasito *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2007). Sin embargo, este método puede resultar en artefactos debido al uso de enzimas de restricción, ya que al depender de secuencias específicas para realizar el corte del DNA pueden existir fragmentos de diversos tamaños que no son cortados y por lo tanto permanecen asociados a la MN.

Además, la generación de fragmentos más pequeños que las sondas utilizadas (o amplicones) para su identificación provoca que la señal se observe en ambas fracciones (DNA asociado a la MN y DNA cortado). Este problema es muy frecuente y se ha tratado de resolver con el empleo de análisis por densitometría y estadística para determinar en cual de las fracciones está más enriquecida la señal correspondiente (Beggs y Migeon, 1989; Gombert *et al.*, 2003; Braem *et al.*, 2008; Tachiki *et al.*, 2009).

Uno de los métodos más confiables para la identificación de las regiones de anclaje a la MN es el mapeo de LARs mediante el corte de los bucles por medio de la topoisomerasa-II (Figura 9), ya que esta enzima resiste el proceso de extracción con altas concentraciones de sal, por lo que persiste en las preparaciones de la MN. Además, los sitios de corte para la topoisomerasa-II están enriquecidos en los anclajes a la MN (Iarovaia *et al.*, 2004). El método consiste en la extracción de la MN y su tratamiento con buffers que permiten la activación de la topoisomerasa-II endógena unida a la MN, en presencia de inhibidores de la enzima que impiden de manera específica el paso de re-ligación del DNA. De este modo, se logra la liberación de los bucles de la MN al cortar el DNA en los anclajes. Los sitios de unión a la MN son identificados de acuerdo a la longitud de fragmentos de restricción de la región de interés que están truncados por el corte de la topoisomerasa-II (Gromova *et al.*, 1995; Iarovaia *et al.*, 1996; Iarovaia *et al.*, 2004). A pesar de que este método permite la identificación de los LARs de una manera confiable no es una técnica muy utilizada, ya que requiere de un proceso cuidadoso para la extracción de la MN para evitar rupturas en el DNA por la manipulación de la muestras. Además, requiere de electroforesis en campos pulsados (PFGE por sus siglas en inglés [*pulse field gel electrophoresis*]) para la separación de los fragmentos de restricción y su posterior identificación por Southern blot.

Recientemente, se han diseñado distintas estrategias para la identificación de los LARs utilizando la tecnología de los microarreglos de DNA y basándose en la separación del DNA en la fracción asociada a la MN y la fracción eliminada mediante el corte con nucleasas. La estrategia es básicamente la misma que la del ensayo de MARS *in vivo*, la única diferencia es el sistema de detección que está basado en la hibridación de las fracciones del DNA asociado a la MN y la del DNA cortado con diferentes microarreglos de DNA, diseñados a partir de cósmidos, cromosmas artificiales de bacterias o bibliotecas de oligonucleótidos, lo que además de incrementar la sensibilidad permite la identificación de los puntos de anclaje en grandes regiones del genoma (Sumer *et al.*, 2003; Ioudinkova *et al.*, 2005; Petrov *et al.*, 2006; Hair y Vassetzky, 2007; Linnemann *et al.*, 2007)



**Figura 9.** Ensayo para la determinación de LARs por medio del corte con topoisomerasa-II. A) Se eligen enzimas de restricción cuyos puntos de corte (líneas dobles verdes) generen fragmentos que incluyan la región de interés. Se diseñan sondas para los extremos de los fragmentos de restricción. B) Se extraen nucleoides que son digeridos con la topoisomerasa-II (Topo-II) para liberar los bucles por sus bases y posteriormente con la enzima de restricción elegida (Sfi-I). Los fragmentos generados son separados por PFGE y su tamaño es determinado mediante transferencia de Southern utilizando las sondas contra los extremos. Mediante el tamaño de los fragmentos se establece el punto de corte de la Topo-II. C) Al deducir los puntos de corte de la Topo-II se puede establecer cuál es la organización en bucles anclados a la MN.

Por otra parte, el MARFinder fue la primera herramienta bioinformática diseñada para la identificación de MARs potenciales. El programa se basa en la ocurrencia estadística de motivos consenso descritos para los MARs, como son la presencia de orígenes de replicación, de secuencias ricas en dinucleótidos T-G, DNA con curvatura, sitios de corte para la topoisomerasa-II y riqueza en los nucleótidos A-T (Singh *et al.*, 1997). Poco después, se diseñó el MARScan que se basa en la identificación de los MARs potenciales mediante la búsqueda de una “firma de reconocimiento de MAR/SAR”, que está compuesta por dos secuencias degeneradas (AATAAYAA y AWWRTAANNWWGNNNC) encontradas en algunos de los MARs ya caracterizados experimentalmente (van Drunen *et al.*, 1999). El algoritmo ChrClass se desarrolló utilizando pruebas estadísticas de multivariantes, específicamente el análisis discriminante lineal, para analizar regiones de cromosomas asociadas a diferentes estructuras (sinaptonema, lámina nuclear y MN). Este programa se basa en los motivos encontrados por el análisis multivariado que incluyen riqueza en nucleótidos A-T, regiones que tienden a desaparecer (cadenas sencillas), DNA curvo, superposición de distintos tramos con secuencias AT, TA, poli-T, poli-A, secuencias consenso para la topoisomerasa-II, y otras características (Rogozin *et al.*, 2000; Glazko *et al.*, 2001).

Finalmente, mediante la caracterización experimental de secuencias MARs se desarrolló una base de datos que incluye las secuencias de cada uno de las regiones de anclaje descritos. Así, se desarrolló el algoritmo S/MARTest, que identifica secuencias MARs en regiones de interés de acuerdo a su similitud con las secuencias previamente identificadas (Frisch *et al.*, 2002).

Los algoritmos de predicción de secuencias MARs han sido ampliamente utilizados en la identificación de posibles regiones de anclaje a la MN y en algunos casos la predicción ha sido confirmada mediante la identificación experimental (Kramer *et al.*, 1998; Kramer *et al.*, 1998; Shewchuk *et al.*, 2001; Ostermeier *et al.*, 2003; Purbowasito *et al.*, 2004; Dai *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2007; Braem *et al.*, 2008; Tachiki *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha observado que las secuencias MARs caracterizadas experimentalmente muestran una gran variabilidad a nivel de secuencia. Además, se ha demostrado que los programas carecen de valor predictivo y que una simple búsqueda de regiones enriquecidas en nucleótidos A-T produce resultados comparables con los obtenidos mediante estos programas (Evans *et al.*, 2007); ya que tales algoritmos únicamente identifican secuencias con afinidad potencial por la MN (secuencias MARs) pero no las regiones actuales de anclaje de un bucle de DNA *in vivo* (secuencias LARs) .

#### **IV. Los bucles estructurales como entidades funcionales independientes**

---

La asociación del DNA con la MN divide al genoma en múltiples bucles cuyo tamaño va de los 5 a los 200 Kb (Jackson *et al.*, 1990). Desde el descubrimiento de la organización superior de la cromatina definida por las interacciones entre el DNA y la MN, ha surgido el interés de establecer si los bucles estructurales corresponden a unidades funcionales independientes. Se ha propuesto que los bucles de DNA pueden constituir regiones autónomas en el genoma, las cuales podrían establecer dominios funcionales independientes como las unidades individuales de transcripción o de replicación (Boulikas, 1995; Razin, 2001; Razin *et al.*, 2007).

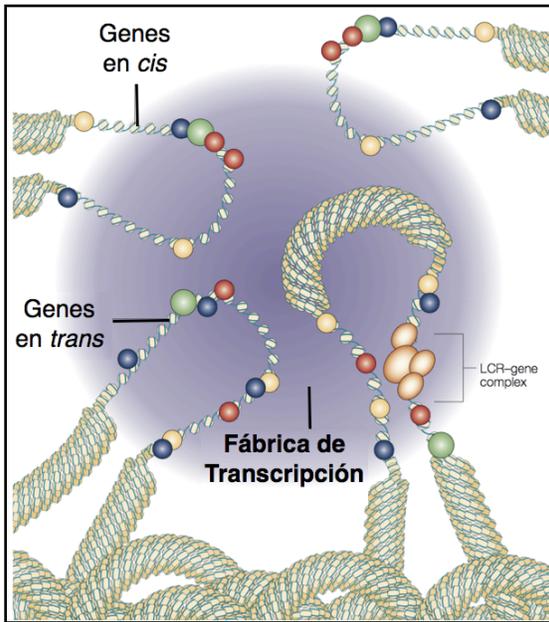
##### ***a. Los bucles estructurales como unidades de transcripción***

Las observaciones que mostraban una asociación del proceso de transcripción con la MN, se llevaron a cabo gracias al desarrollo de la técnica de mapeo que permite establecer la posición relativa de secuencias génicas con respecto a la subestructura nuclear. Esta técnica consiste en digerir nucleoides con enzimas de restricción eliminando progresivamente el DNA de la periferia hacia el centro de la MN (Cook y Brazell, 1980). Posteriormente, las secuencias que permanecen unidas a esta subestructura son purificadas y analizadas mediante Southern blot.

Así, se encontró que existen secuencias que resisten la digestión y que permanecen unidas a la matriz, por lo que se estableció que los puntos de anclaje no se distribuyen al azar (Cook y Brazell, 1980). Utilizando esta técnica se encontró que genes transcripcionalmente activos se encuentran asociados a la MN (Nelkin *et al.*, 1980; Jackson *et al.*, 1981; Cook *et al.*, 1982; Jackson y Cook, 1985). Además, se observó que los genes cuya activación depende de la acción de hormonas esteroideas, se asocian a la subestructura nuclear en presencia de la hormona correspondiente (Ciejek *et al.*, 1982; Robinson *et al.*, 1982; Ciejek *et al.*, 1983).

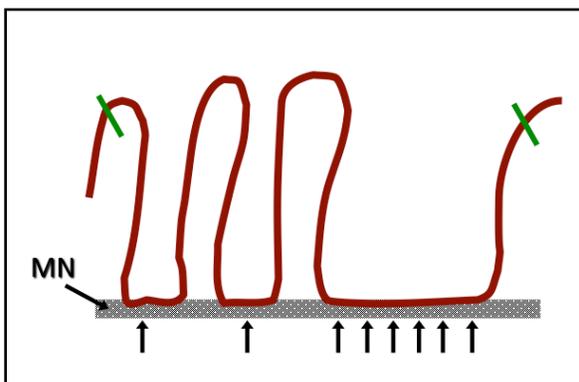
Se ha observado, mediante el marcaje con pulsos de análogos de nucleótidos, que la transcripción ocurre en sitios fijos al interior del núcleo (Wansink *et al.*, 1993; Jackson *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 1999). Estos sitios de transcripción, así como los transcritos nacientes, las RNA polimerasas I y II y diversos factores de transcripción retienen su distribución espacial en preparaciones de MN (Jackson y Cook, 1985; Dickinson *et al.*, 1990; Xing y Lawrence, 1991; van Wijnen *et al.*, 1993; Wansink *et al.*, 1996; Zeng *et al.*, 1997; Mancini *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 1999; Stenoien *et al.*, 2000). Debido a que la transcripción ocurre en sitios fijos en el interior del núcleo en los que se agrupan los diversos componentes de la maquinaria de transcripción, se les ha denominado fábricas de transcripción (Carter *et al.*, 2008; Sutherland y Bickmore, 2009; Cook, 2010).

El análisis por microscopía de fluorescencia ha revelado que genes que se encuentran muy distantes entre sí, e incluso en cromosomas distintos, pueden ser transcritos en la misma fábrica (Osborne *et al.*, 2004; Osborne *et al.*, 2007). Esto sugiere que las fábricas de transcripción son complejos macromoleculares localizados en regiones subnucleares específicas que pueden sintetizar RNAs de múltiples genes ubicados en cromosomas distintos (Sexton *et al.*, 2007a). La colocalización de los genes en las fábricas de transcripción se observa únicamente durante su activación transcripcional (Sexton *et al.*, 2007b; Schoenfelder *et al.*, 2010), lo que implica el movimiento dinámico de estas secuencias génicas hacia las fábricas de transcripción. El desplazamiento de la cromatina ha sido observado en células vivas a manera de movimiento browniano restringido, lo que es consistente con el arreglo de la cromatina en forma de bucles anclados a la MN (Marshall *et al.*, 1997; Chubb *et al.*, 2002). Considerando el movimiento restringido de la cromatina y la convergencia de genes activos en las fábricas de transcripción (Figura 10), se ha planteado que durante la síntesis del RNA los genes forman bucles transitorios que migran hacia las maquinarias de transcripción (Chakalova *et al.*, 2005; Sexton *et al.*, 2007b).



**Figura 10.** Modelo del movimiento de los bucles a las fábricas de transcripción. Los genes se extienden hacia fuera de sus territorios cromosomales tanto en *cis* como en *trans* para ser transcritos en la misma fábrica de transcripción. Los círculos representan los factores de transcripción unidos al DNA. Modificado de Chakalova *et al.*, 2005.

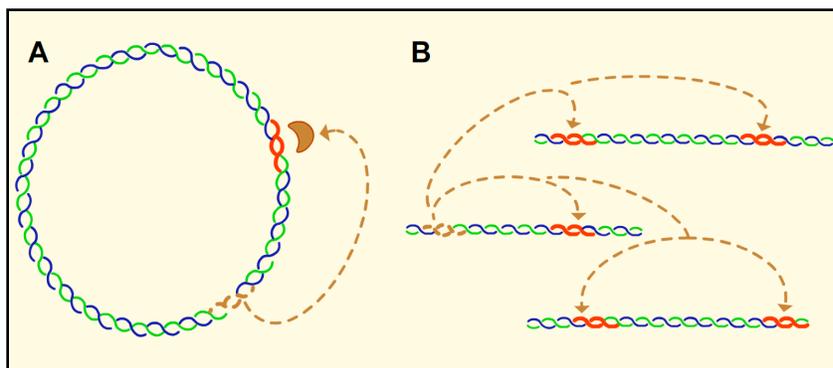
A pesar de que existen claras evidencias de que el proceso de transcripción se encuentra asociado a la MN, se ha observado que los bucles estructurales del DNA anclado a la MN no constituyen unidades independientes de transcripción; ya que el mapeo de secuencias génicas distribuidas al azar en el genoma de la rata ha demostrado que todos los genes se encuentran relativamente cercanos a la MN y que pueden presentar acercamientos en sus posiciones relativas a la MN independientemente de su actividad transcripcional (Maya-Mendoza *et al.*, 2003; Maya-Mendoza *et al.*, 2004; Maya-Mendoza *et al.*, 2005). Asimismo, el análisis de uno de los genes más grandes conocidos (el de la distrofina) indica que se encuentra organizado en varios bucles, es decir, presenta varios sitios de anclaje internos a la región codificante (Figura 11), lo que descarta la posibilidad de que los bucles estructurales corresponden a unidades de transcripción individuales (Iarovaia *et al.*, 2004).



**Figura 11.** Organización estructural del gen de la distrofina en bucles anclados a la MN. Se muestra el gen de la distrofina (línea roja) y los puntos de anclaje a la MN (flechas de la parte inferior). Las líneas verdes delimitan la zona estudiada. Tomado de Iarovaia *et al.*, 2004.

### ***b. Los bucles estructurales y la replicación del DNA***

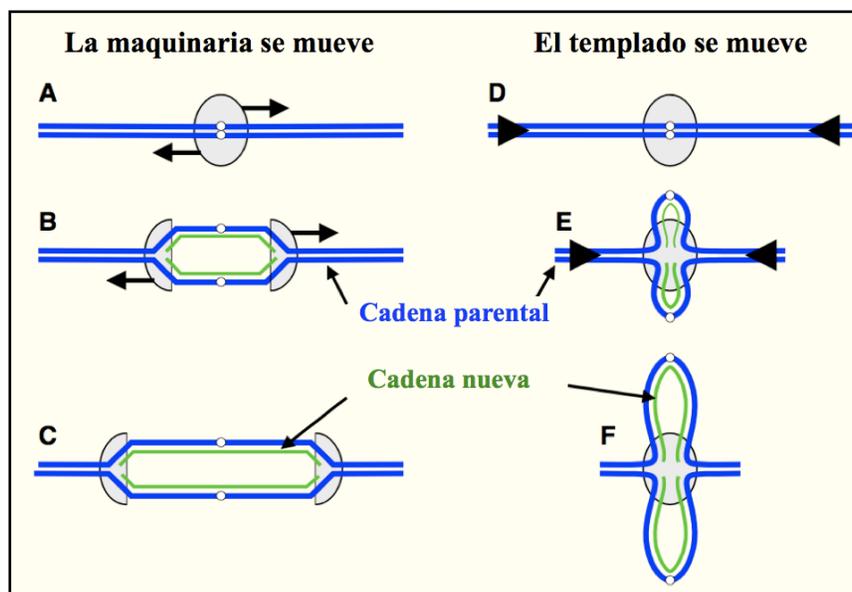
El modelo del replicón sugiere que la síntesis del DNA ocurre mediante la interacción de dos elementos específicos determinados genéticamente (Jacob, 1964; Jacob, 1993). El primero se expresa a partir de un gen estructural y es un componente que difunde y regula el inicio de la polimerización: el iniciador. El iniciador interactúa con el segundo elemento, que es una secuencia específica de nucleótidos en el DNA que determina el sitio en el que comienza la síntesis: el replicador (Figura 12-A). En este modelo, el replicón es una molécula circular de DNA (como los cromosomas bacterianos) que constituye una entidad funcional independiente de replicación del DNA. A pesar de que el modelo del replicón se planteó originalmente para comprender la síntesis del DNA de las bacterias, pronto se extendió como posible mecanismo de replicación en los eucariontes (Gilbert, 2004). De esta manera, se visualizó a cada cromosoma eucarionte como un conjunto de replicones (Figura 12-B). El arreglo en tándem de los replicones eucariontes fue demostrado mediante la visualización de fibras extendidas de DNA posterior al marcaje con pulsos de exposición a análogos radioactivos de nucleótidos (Huberman y Riggs 1968; Taylor, 1968; Edenberg y Huberman, 1975; Hand, 1975; Jackson y Pombo, 1998; Berezney *et al.*, 2000).



**Figura 12.** El modelo del replicón. A) Modelo original del replicón en bacterias, se representa el gen que codifica al iniciador (líneas punteadas en el DNA circular) y el replicador (líneas rojas en el DNA circular), la replicación se inicia por la interacción del iniciador (ovalo café) con el replicador y procede hasta completar el cromosoma. B) Modelo del replicón en eucariontes, debido al tamaño de los cromosomas eucariontes se propuso que cada cromosoma está conformado por varios replicones, cada uno de los cuales es regulado por el iniciador. El iniciador es codificado por un gen estructural y regula el inicio de la síntesis del DNA en múltiples replicadores a lo largo de cada uno de los cromosomas. Tomado de Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2008 (Anexo II).

Debido a que la asociación del DNA con la MN separa al genoma en dominios estructurales independientes, se ha sugerido que los bucles anclados a la MN podrían constituir las unidades funcionales de replicación en eucariontes superiores, es decir que cada bucle corresponde a un replicón (Marilley y Buongiorno-Nardelli, 1984; Razin, 2001). Esta hipótesis es consistente con la correlación observada entre el tamaño promedio de los bucles y el tamaño típico de los replicones de acuerdo a la especie (Buongiorno-Nardelli *et al.*, 1982).

Por otro lado, se ha planteado que el modelo más aceptado del mecanismo de replicación implica problemas topológicos para las cadenas recién sintetizadas; ya que el movimiento de las polimerasas sobre el templado generaría estrés torsional en ambos lados de la horquilla que podría ocasionar que las cadenas resultantes se enredaran entre sí siendo imposible separarlas. El estrés torsional es resuelto por la acción de las topoisomerasas, nucleasas que cortan de manera transitoria el DNA para permitir su rotación. No obstante, el movimiento de una maquinaria de replicación de enorme tamaño implicaría un gasto energético elevado, más aún si se consideran dos maquinarias por horquilla sintetizando en direcciones opuestas sobre el templado (Figura 13). Por ello se sugiere que las enzimas de copiado permanecen inmóviles en grandes complejos macromoleculares denominados fábricas de replicación (Figura 13), mientras que el DNA es el que se mueve hacia estas fábricas de manera progresiva y las abandona conforme va siendo sintetizado (Dingman, 1974; Cook, 1999; Cook, 2001).



**Figura 13.** Modelos del mecanismo de replicación. A) La maquinaria de replicación se ensambla sobre el origen de replicación. B) La maquinaria de replicación se mueve en direcciones opuestas sobre el templado para generar las cadenas nuevas de DNA (C). D) El DNA se mueve hacia las maquinarias de replicación que están fijas sobre la MN. E-F. Las cadenas parentales del DNA se mueven a través de la maquinaria de replicación para producir las nuevas cadenas. Modificado de Cook, 2001.

Los primeros experimentos que establecieron una asociación del DNA recién sintetizado con la MN se basaron en el marcaje del DNA con isótopos radioactivos, lo que reveló que el DNA recién replicado se encuentra cercano a la MN (Berezney y Coffey, 1975; Smith *et al.*, 1984; Razin *et al.*, 1986). Más aún, al progresar la síntesis de DNA el marcaje se va extendiendo de la subestructura nuclear a la periferia, lo que sugiere que el DNA se mueve a través de complejos de replicación fijos en la MN (McCready *et al.*, 1980; Pardoll *et al.*, 1980; Vogelstein *et al.*, 1980; Gerdes *et al.*, 1994). Además, se han encontrado evidencias de que la replicación ocurre en sitios fijos sobre la MN, ya que diversos componentes de la maquinaria de replicación están relativamente fijos al interior del núcleo y presentan una asociación con la MN. Este es el caso de las DNA polimerasas, las primasas, el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y la topoisomerasa-II (Tubo y Berezney, 1987a; Tubo y Berezney, 1987b; Tubo y Berezney, 1987c; Hozak *et al.*, 1994; Leonhardt *et al.*, 2000; Anachkova *et al.*, 2005).

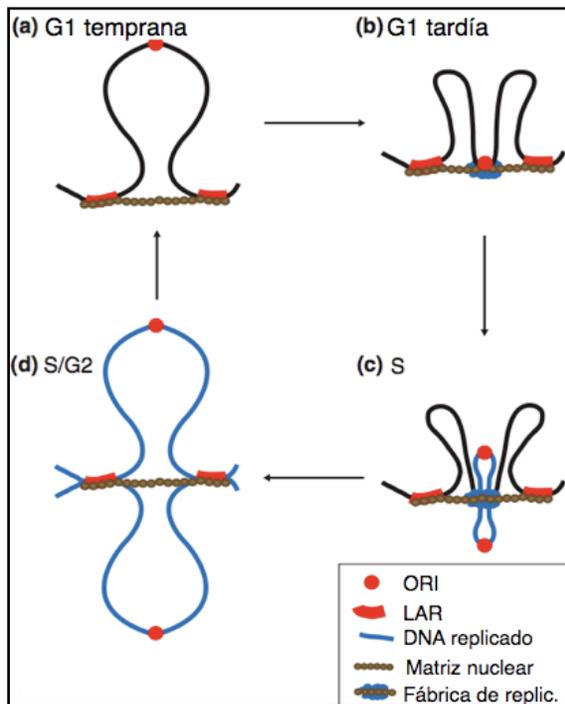
Diversos experimentos con líneas celulares aportaron evidencias que sugieren que los orígenes de replicación se asocian con la MN (Aelen *et al.*, 1983; van der Velden *et al.*, 1984; Dijkwel *et al.*, 1986; Razin *et al.*, 1986; Lagarkova *et al.*, 1998). Estudios posteriores indicaban que los orígenes de replicación se ubican próximos a las regiones de anclaje a la MN (Dijkwel y Hamlin, 1988; Ortega y DePamphilis, 1998; Gimenes *et al.*, 2008). Más tarde se demostró que los orígenes de replicación están en una región del bucle que se une a la MN en la fase G1 tardía y que es liberada después de la síntesis del DNA. Además, se ha demostrado que los orígenes se asocian con la MN antes de que inicien la replicación (fase G1 tardía) y se separan después de que se han activado (Djeliova *et al.*, 2001a; Djeliova *et al.*, 2001b).

Una de las evidencias más notable que sugiere que la síntesis del DNA tiene lugar en sitios fijos sobre la MN es el descubrimiento de las fábricas de replicación en el interior del núcleo. El análisis de fibras extendidas de DNA duplicado reveló que la replicación ocurre en cientos de pequeños focos discretos (Jackson y Pombo, 1998). El número de focos de replicación permanece constante pero su tamaño e intensidad fluorescente se incrementa conforme progresa la replicación (Nakamura *et al.*, 1986). Con base al tamaño de cada foco de replicación y la intensidad del marcaje, se propuso que cada uno debía contener aproximadamente 1 Mb de DNA y por lo tanto al menos 6 replicones que disparan simultáneamente (Nakamura *et al.*, 1986; Ma *et al.*, 1998; Berezney *et al.*, 2000). Estudios posteriores demostraron que los focos de replicación permanecen fijos aún después de la extracción de la MN y a pesar de remover el 90 % del DNA (Smith *et al.*, 1984; Tubo y Berezney, 1987; Tubo *et al.*, 1987; Nakayasu y Berezney, 1989; Hozak *et al.*, 1993; Berezney y Wei, 1998). Además, al realizar la replicación *in vitro* en MN extraídas se formaron focos de replicación similares a los observados *in vivo* (Nakayasu y Berezney, 1989).

Se ha desarrollado un ensayo de replicación *in vitro* a partir de segmentos de DNA purificado inyectados en ovocitos de *X. laevis* en el que la duplicación se lleva a cabo de una forma reminiscente del ciclo celular del embrión normal. La replicación de estos segmentos depende de la formación *in vitro* de estructuras denominadas pseudo-núcleos y del ensamblaje de un núcleo-esqueleto; además, la realización de extracciones salinas sugiere que los pseudo-núcleos son capaces de formar estructuras similares a la MN (Forbes *et al.*, 1983; Blow y Sleeman, 1990; Newport *et al.*, 1990; Jenkins *et al.*, 1993). Mas aún, la replicación del DNA se puede llevar a cabo *in vitro* utilizando preparaciones de MN y medios suplementados con nucleótidos (Jackson y Cook, 1986); incluso se ha demostrado que la replicación *in vitro* sobre la MN es dependiente del ciclo celular y no requiere de la estructura de los cromosomas intactos, ya que puede iniciarse en fracciones de DNA residual de digestiones con DNasa-I (Radichev *et al.*, 2005). Estudios por microscopía electrónica de ensayos de replicación *in vitro* sobre preparaciones de MN muestran que el DNA recién sintetizado está asociado a grandes conglomerados proteicos anclados a la MN. La DNA polimerasa- $\alpha$  y el PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) son algunas de las proteínas que conforman estos conglomerados, lo que sugiere que las fábricas de replicación se organizan sobre la MN (Hozak *et al.*, 1993; Hozak *et al.*, 1994; Philimonenko *et al.*, 2004). Actualmente se han identificado diversos factores que están asociados a las fábricas de replicación como el PCNA, la proteína de replicación A (RPA), las DNA polimerasas  $\alpha$  y  $\epsilon$ , la DNA ligasa I, la topoisomerasa II- $\alpha$ , metiltransferasas, desacetilasas de histonas y otros factores relacionados con el inicio de la fase S (Cardoso *et al.*, 1993; Hozak *et al.*, 1993; Chuang *et al.*, 1997; Montecucco *et al.*, 1998; Rountree *et al.*, 2000; Niimi *et al.*, 2001; Fuss y Linn, 2002). Además, el patrón espacial de los focos de replicación persiste sin cambios por numerosas generaciones celulares, aunque el número de focos disminuye a la mitad en cada mitosis debido a la duplicación semi-conservativa del genoma (Jackson y Pombo, 1998; Ma *et al.*, 1998; Dimitrova y Berezney, 2002). Esto sugiere que los cromosomas poseen una organización específica preexistente a la fase S y que se hereda a las siguientes generaciones. La asociación durante todo el ciclo celular de estos dominios indica que son unidades cromosomales estables que muy probablemente corresponden a los bucles de DNA anclados a la MN.

Por otra parte, con el desarrollo de métodos que permiten establecer la posición de diferentes secuencias con respecto a la MN (Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo, 2003), se han obtenido evidencias que apoyan la idea de que cada bucle constituye un replicón. Así, se ha observado que en todos los casos analizados las secuencias génicas distribuidas al azar en el genoma de la rata se acercan a la MN durante la fase de síntesis del DNA. Además, una vez que el genoma se ha duplicado y que las células regresan a la quiescencia, las secuencias génicas regresan a sus posiciones originales (Maya-Mendoza *et al.*, 2003; Maya-Mendoza *et al.*, 2004).

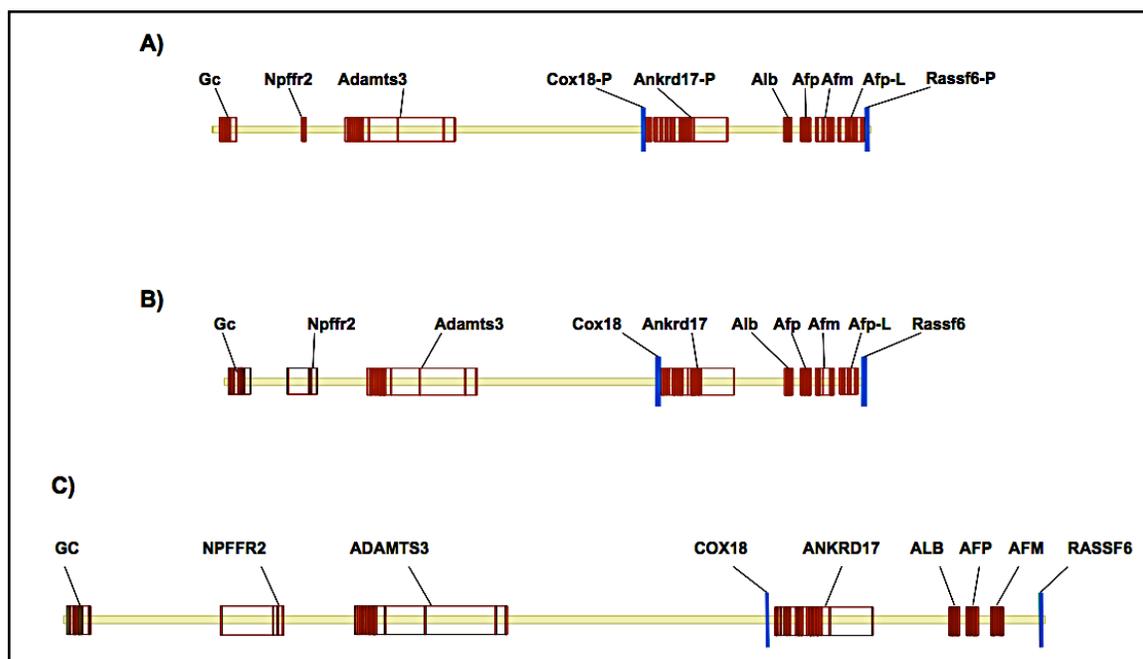
Tomando en cuenta las evidencias que asocian el proceso de replicación con la MN, se ha planteado un modelo del mecanismo de duplicación del genoma considerando que cada bucle estructural corresponde a un replicón. El modelo establece que cada bucle estructural contiene un origen de replicación, el cual puede estar en la parte apical del bucle (Figura 14). Durante la replicación el origen de replicación se asocia a la MN y la duplicación del bucle parental comienza a partir de este punto de manera bidireccional. Al ser replicado el bucle parental, las cadenas que están siendo sintetizadas son expulsadas de la maquinaria de replicación que se encuentra ensamblada sobre la MN. El movimiento del DNA a través de la maquinaria de replicación y la expulsión de las nuevas cadena replicadas generarían dos nuevos bucles que crecerían a partir del punto de replicación. Al terminar la duplicación del bucle parental se producen dos nuevos bucles completos y en su configuración inicial (Anachkova *et al.*, 2005; Ottaviani *et al.*, 2008).



**Figura 14. Replicación de los bucles estructurales del DNA.** La replicación ocurre sobre la MN. A) Los replicones se encuentran anclados a la MN en la fase G1 mediante secuencias LARs. B) durante la fase G1 tardía los orígenes de replicación se asocian a la MN, donde se encuentran las fábricas de replicación. C) Durante la fase S, la replicación inicia en el origen de manera bidireccional produciendo nuevos bucles. D) al finalizar la replicación se producen los nuevos bucles replicados. Modificado de Ottaviani *et al.*, 2008.

## V. El locus multigénico de la familia albúmina

Uno de los genes más importantes es el de la albúmina que constituye la proteína más abundante en el plasma sanguíneo de los mamíferos. Este gen se ubica en una región multigénica que incluye a los genes albúmina, alfa-fetoproteína, afamina y la proteína de unión a la vitamina D (Gc), que constituyen el locus de la familia albúmina. Estos genes derivan de la duplicación de un gen ancestral y su expresión es tejido-específica. Además, se expresan de manera regulada en función del desarrollo del hígado. El locus está localizado en el cromosoma 14 de la rata e incluye secuencias reguladoras (enhancers) y secuencias intergénicas que en total corresponden a 1.2 Mb (McLeod y Cooke, 1989; Lazarevich, 2000). Además, este locus se comporta a manera de agrupamiento génico (cluster), ya que los genes que lo conforman están relacionados tanto en su evolución como en su patrón de expresión. Así, aunque este locus puede estar ubicado en diferentes cromosomas en distintos organismos, los genes siempre están ordenados de la misma manera. El locus completo se encuentra en el cromosoma 14 en la rata, en el cromosoma 5 en el ratón y en el cromosoma 4 en el humano (Figura 15).



**Figura 15.** Locus multigénico de la familia albúmina en la rata (A), el ratón (B) y el humano (C). Se muestra la localización de los genes de la familia albúmina: albúmina (*Alb*), alfa-fetoproteína (*Afp*), afamina (*Afm*) y el componente específico de grupo (*Gc*). En el caso de la rata y el ratón se indica la localización de un pseudogen similar a *Afp* (*Afp-L*). *Npffr2*: receptor de neuropéptido FF; *Adamts3*: metaloproteína de la familia ADAMT; *Cox18*: homólogo de la citocromo-C oxidasa; *Ankrd17*: proteína con dominios tipo ankirina; *Rassf6*: componente de la familia de proteínas con dominios de unión a RAS.

## **VI. La regeneración hepática como modelo de replicación *in vivo***

---

Los hepatocitos de los mamíferos adultos son células quiescentes que se encuentran en fase G0 y que normalmente no se dividen. Sin embargo, después de un daño severo el tejido hepático tiene una gran capacidad para regenerarse; esta capacidad de regeneración del hígado después de una pérdida importante de tejido se observa en todos los vertebrados (Michalopoulos y DeFrances, 1997). Uno de los modelos más utilizados para comprender el proceso de la regeneración hepática es la hepatectomía parcial (PHx) en la rata, que consiste en extirpar dos terceras partes del hígado. La estructura multilobular del hígado de los roedores permite remover quirúrgicamente los tres lóbulos de mayor tamaño (que constituyen el 70 % de la masa hepática) sin dañar los lóbulos residuales. En el caso de la rata se observa que a partir del tercio restante puede regenerarse el órgano completo en aproximadamente 7 días (Michalopoulos, 2007).

La regeneración hepática post-hepatectomía se lleva a cabo en una serie de eventos secuenciales que son muy reproducibles. En contraste con otros tipos de tejidos, la regeneración del hígado no depende de un pequeño grupo de células progenitoras, sino que se lleva a cabo mediante la proliferación de todas las poblaciones celulares que integran el hígado: hepatocitos, células epiteliales, células endoteliales, células de Kupffer (macrofagos hepáticos) y las células de Ito (Michalopoulos y DeFrances, 1997; Michalopoulos, 2009). Posterior a la hepatectomía parcial, cerca del 97% de los hepatocitos remanentes entran a fase G1 de manera sincronizada (Fabrikant, 1968; Sigal *et al.*, 1995; Sigal *et al.*, 1999). Se ha demostrado que el punto máximo de síntesis de DNA (fase S) se lleva a cabo alrededor de las 24 h post-hepatectomía (Fabrikant, 1968; Berezney y Buchholtz, 1981; Smith y Berezney, 1983). Además, se presentan dos picos más de síntesis de DNA a las 36 y 48 h post-hepatectomía, pero sólo una pequeña subpoblación de los hepatocitos remanentes vuelve a proliferar. Posteriormente, a las 96 h post-hepatectomía los hepatocitos se encuentran en G1 y a los 7 días regresan a la quiescencia (Michalopoulos y DeFrances, 1997; Michalopoulos, 2007).

## **HIPÓTESIS**

- Los bucles estructurales de DNA corresponden a las unidades funcionales de replicación. Por lo tanto, considerando que las fábricas de replicación se organizan sobre la MN, la región génica del locus de la familia albúmina organizada en bucles estructurales debe presentar cambios posicionales relativos a la MN en función del estado del ciclo celular.

## **OBJETIVO**

- Conocer la estructura, morfología y asociación del DNA con la MN y su relación con los mecanismos de duplicación del DNA.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Diseñar un método para establecer la organización en bucles estructurales del locus multigénico de la familia albúmina en células primarias de rata.
- Determinar si existen cambios en las posiciones relativas con respecto a la MN de secuencias codificantes y no codificantes ubicadas en la región del locus multigénico de la familia albúmina, en función de los estadios quiescente (G0) y proliferante (S) del ciclo celular.
- Establecer si existe una correlación entre los bucles estructurales y los replicones que operan *in vivo* en la región multigénica de la familia albúmina.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### ***a. Predicción de secuencias MARs***

Los MARs potenciales, a lo largo de la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina, fueron identificados utilizando cuatro diferentes programas de predicción *in silico* con sus respectivos parámetros estándar: MarFinder (Singh *et al.*, 1997), MARScan (van Drunen *et al.*, 1999), ChClass (Rogozin *et al.*, 2000; Glazko *et al.*, 2001) y SMARTest (Frisch *et al.*, 2002).

### ***b. Animales experimentales***

En todos los experimentos se utilizaron ratas Wistar macho de 200 a 250 g de peso, alimentadas *ad libitum*. Los animales fueron sacrificados bajo anestesia con éter para el aislamiento de células primarias. El manejo de los animales se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

### ***c. Hepatectomía parcial (PHx)***

Se utilizaron ratas previamente anestesiadas que se sometieron a hepatectomía parcial. Para ello, se realizó una pequeña incisión en la cavidad abdominal para la extracción y remoción de los lóbulos lateral izquierdo y central del hígado. Posteriormente, se suturó la incisión y se dejó recuperar al animal (Maya-Mendoza *et al.*, 2003). Todos los animales fueron hepatectomizados entre las 7 y 8 am y sacrificados a las 24 h o 7 días post-hepatectomía.

### ***d. Extracción de células primarias***

Para la extracción de los hepatocitos primarios de rata se expuso la cavidad abdominal, se canuló la vena porta hepática con una aguja calibre 18. Se perfundió el hígado con PBS-A (2.68 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 136.9 mM NaCl, 7.75 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4) a 37 °C durante 5 min a 15 ml/min para las ratas control y por 2 min para las ratas hepatectomizadas. Se extrajo el hígado y se perfundió con colagenasa-IV, Sigma (0.025% de colagenasa, 0.075% CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O en buffer HEPES, pH 7.6) por 8 min para las ratas control y por 3 min para las ratas hepatectomizadas. El hígado se fragmentó y filtró a través de una malla con poros de 400 µm y los hepatocitos se purificaron mediante sedimentación por gravedad durante 20 min a 4 °C. Finalmente, los hepatocitos aislados fueron cuantificados con un hemocitómetro y utilizados inmediatamente para la preparación de los nucleoides (Maya-Mendoza *et al.*, 2003).

Se extrajeron linfocitos B inactivos de rata a partir del bazo mediante la fragmentación y filtración del tejido en PBS-A. Los linfocitos totales se aislaron en gradientes preformados de Percoll isotónico (25%) mediante centrifugación a 2100 rpm por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, los linfocitos B inactivos se purificaron por separación magnética (columnas de separación MACS, Miltenyi Biotec) con esferas específicas anti-CD43 (rat CD43 microbeads, Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los linfocitos inactivos se cuantificaron mediante hemocitómetro y se utilizaron inmediatamente para la preparación de nucleoides.

#### ***e. Preparación de nucleoides***

El aislamiento de nucleoides se llevó a cabo mediante la extracción con altas concentraciones de sal (Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo, 2003). Las células aisladas se resuspendieron en PBS-A y alícuotas de 50  $\mu$ l con  $3 \times 10^5$  hepatocitos o con  $5 \times 10^5$  linfocitos se mezclaron con 150  $\mu$ l de solución de lisis (2.6 M NaCl, 1.3 mM EDTA, 2.6 mM Tris base, 0.6 % TRITON X100 pH 8). Los hepatocitos se lisaron por 20 min a 4 °C y los linfocitos B inactivos por 15 min a 4 °C. Posteriormente, las muestras se lavaron con 14 ml de PBS-A a 4 °C por 4 min a 3000 rpm (1500 g). El botón resultante se recuperó en un volumen de 200-300  $\mu$ l.

#### ***f. Digestión de los nucleoides con DNasa-I***

Los nucleoides lavados con PBS-A ( $1.8 \times 10^6$  nucleoides de hepatocitos o  $2.5 \times 10^6$  nucleoides de linfocitos B inactivos) se recuperaron en 1.2 ml de PBS-A y se digirieron a 37 °C con 0.5 U/ml de DNasa I (Sigma) en 5 ml de buffer de digestión (10 mM  $MgCl_2$ , 0.1 mM de dithiothreitol o 0.2 mM de mercaptoetanol, 50 mM Tris base pH 7.2). Se tomaron muestras de nucleoides digeridos a los 0, 5, 15, 30 y 60 min. Cada tiempo de digestión contiene  $3 \times 10^5$  nucleoides de hepatocitos o  $5 \times 10^5$  nucleoides de linfocitos B inactivos. La digestión se detuvo con 200  $\mu$ l de buffer de paro (0.2 M EDTA, 10 mM Tris base pH 7.5). Los nucleoides digeridos con DNasa I a diferentes tiempos se centrifugaron por 10 min a 9,000 x g a 4 °C. El botón de nucleoides se resuspendió con 1 ml de PBS-A y se centrifugó por 10 min a 9,000 x g (10,000 rpm) a 4 °C; se realizaron otros dos lavados del botón resultante, de la misma manera pero con 1 ml de agua bidestilada ( $H_2O$ -bd). Finalmente el botón correspondiente a la MN con el DNA residual anclado a ella, se resuspendió en 200  $\mu$ l de  $H_2O$ -bd y el DNA residual asociado a la MN se determinó por espectrofotometría.

### ***g. Diseño de primers***

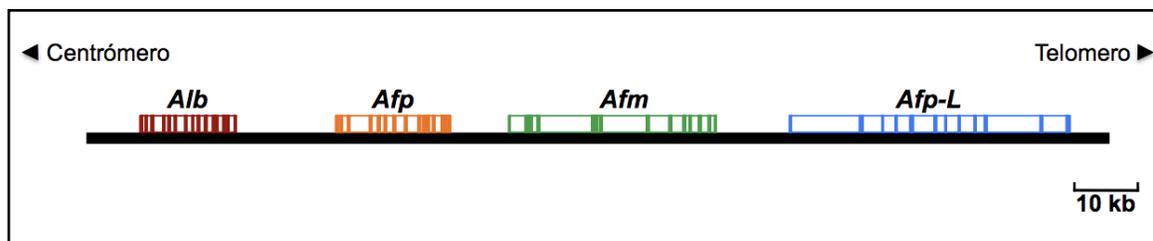
Se diseñaron pares de oligonucleótidos o “primers” para el establecimiento de las posiciones topológicas relativas a la MN de 15 secuencias blanco (amplificones) localizadas a lo largo de la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina de la rata. Los primers se diseñaron en el programa Vector NTI aproximadamente cada 10 Kb con el objeto de establecer intervalos regulares a lo largo de la región estudiada. Todos los oligos se diseñaron con una longitud promedio de 20-25 pb, un contenido de G-C de 50-55 %, temperatura de fusión ( $T_m$ ) de 55-60 °C, diferencia en  $T_m$  menor de 2.0 °C y en G-C menor de 5 % para cada par de oligos y para amplificar secuencias de 200-550 pb. Además, se evitaron todos aquellos que forman dímeros o estructuras secundarias con valores de energía libre menor a  $-2.0$  kcal/mol y  $-1.0$  kcal/mol respectivamente. Todos estos parámetros se tomaron en cuenta para obtener oligos que amplificaran de manera eficiente bajo las mismas condiciones de PCR. Finalmente, se probó la especificidad de cada oligo utilizando el algoritmo de búsqueda de alineamientos del NCBI (BLAST [*Basic Local Alignment Search Tool*]) y se eligieron únicamente aquellos que presentaron los coeficientes de alineamiento más altos.

### ***h. Amplificación por PCR***

Se utilizaron muestras de nucleoides con DNA parcialmente digerido directamente como templado para la amplificación por PCR. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador 2720 de Applied Biosystems en un volumen final de 50  $\mu$ l. Se utilizaron 0.7 U de GoTaq DNA polimerasa (Promega), 2.5 mM  $MgCl_2$ , 0.2 mM de cada dNTP, 0.1  $\mu$ M de cada oligo y 50 ng de nucleoides. La amplificación de todas las secuencias se realizó utilizando el mismo programa: desnaturalización inicial de 94 °C (5 min), 35 ciclos de desnaturalización (94 °C por 45 s), alineamiento (56 °C por 1 min) y extensión (72 °C por 1 min) y una extensión final (72 °C 10 min). Los productos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml). Se utilizó el 10 % del producto amplificado. La electroforesis se realizó en TBE 0.5 X (a 100 V y 450 mA) y los geles se visualizaron con luz UV. El análisis de los productos amplificados se realizó utilizando el programa Kodak 1D Image Analysis Software 3.5 system utilizando los parámetros estándar.

## RESULTADOS

El presente trabajo se desarrolló con el objeto de determinar el mecanismo general de replicación del DNA *in vivo* y establecer si los bucles estructurales anclados a la MN constituyen las unidades funcionales de replicación. Para ello se decidió utilizar el locus multigénico de la familia albúmina, debido a que es uno de los mejor caracterizados a nivel de secuencia en el genoma de la rata. Sin embargo, para establecer el papel de la organización del DNA con respecto a la MN en el proceso de replicación, un requisito indispensable es conocer el arreglo de este locus en bucles anclados a la subestructura nuclear. Por lo tanto, se diseñó una nueva estrategia para determinar la organización de cualquier región genómica en bucles estructurales anclados a la MN. Así, una vez caracterizada la organización en bucles estructurales del locus de la familia albúmina, se analizaron los cambios en las posiciones relativas a la MN de diferentes secuencias (amplicones) dentro de este locus durante la fase de síntesis de DNA (S). Sin embargo, debido a que el locus multigénico de la familia albúmina de la rata es muy extenso (1.2 Mb), decidimos enfocarnos a una región de 162 Kb (Figura 16) que incluye los genes de la albúmina (*Alb*), alfa-fetoproteína (*Afp*) y afamina (*Afm*) y el pseudogen derivado de alfa-fetoproteína (*Afp-L*).



**Figura 16. Región genómica de estudio.** La región bajo estudio comprende 162 Kb del locus multigénico de la familia albúmina de la rata. Se muestra la localización de los genes de la familia albúmina: albúmina (*Alb*), alfa-fetoproteína (*Afp*), afamina (*Afm*) y el pseudogen similar a Afp (*Afp-L*).

### I. Determinación de los bucles estructurales del locus de la familia albúmina

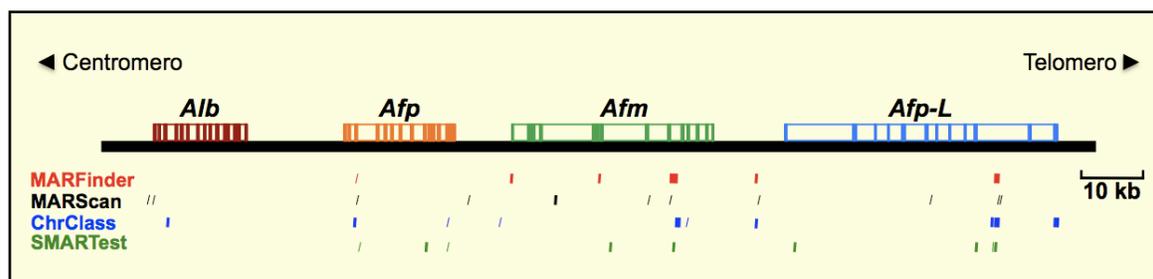
#### a. Predicción de secuencias MARs

Como una primera aproximación para identificar las secuencias con el potencial de anclarse a la MN en la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina, se llevó a cabo el análisis de predicción de MARs utilizando los cuatro programas disponibles: MarFinder (Singh *et al.*, 1997), Marscan (van Drunen *et al.*, 1999), Chrclass (Glazko *et al.*, 2001) y SMARTest (Frisch *et al.*, 2002).

Para la identificación *in silico* de las secuencias MARs se utilizaron los parámetros estándar, la región de estudio se dividió en fragmentos de 50 Kb y se omitieron las regiones de secuencia variable, de acuerdo a los requerimientos de cada programa. Se detectaron numerosos sitios potenciales de anclaje a la MN para cada algoritmo utilizado, de los cuales se descartaron aquellos cuyo potencial de afinidad a la MN resultó muy bajo. Así, se establecieron los MARs potenciales a lo largo de la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina de la rata (Tabla 1 y Figura 17).

MARFinder			MARScan			ChrClass			SMARTest		
Inicio	Fin	Longitud (pb)	Inicio	Fin	Longitud (pb)	Inicio	Fin	Longitud (pb)	Inicio	Fin	Longitud (pb)
36380	36580	201	1762	1824	63	5035	5595	561	36686	37120	435
62080	62580	501	2980	3002	23	35884	36384	501	47786	48090	305
76480	76880	401	36939	37003	65	51284	51584	301	51306	51640	335
88480	89580	1101	55573	55589	17	59884	60284	401	78281	78580	300
102380	102980	601	69392	69513	122	88984	89884	901	88811	89300	490
141901	142601	701	84791	84806	16	90784	91084	301	108916	109295	380
			88179	88232	54	102561	102861	301	138866	139280	415
			102643	102669	27	141301	141801	501	141341	141650	310
			131451	131487	37	142101	142601	501	142106	142570	465
			142475	142491	17	153801	154601	801			
			142773	142788	16						

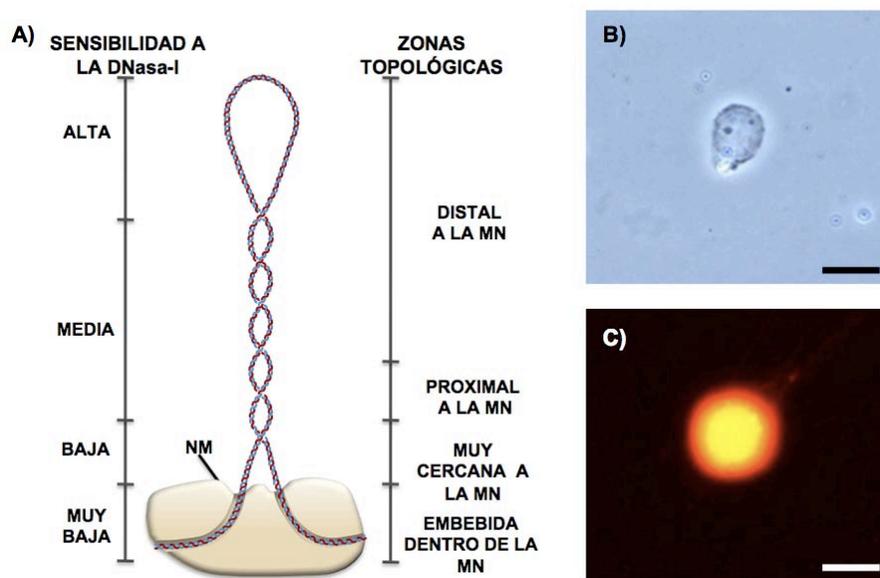
**Tabla 1.** Localización de los MARs potenciales en la región de 162 Kb estudiada, de acuerdo a la predicción realizada con los cuatro diferentes programas de identificación de MARs. Los números indican los nucleótidos correspondientes a la posición de inicio y la posición final dentro de la región estudiada. La longitud de los MARs potenciales se indica en pares de bases (pb).



**Figura 17.** Predicción de secuencias MARs en el locus de la familia albúmina. Se muestran únicamente los MAR's que tienen un alto potencial de unión a la MN y los que son detectados por más de un programa. Los diferentes algoritmos utilizados fueron MARfinder, Marscan, ChrClass y S/MARtest. La ubicación de los MAR's potenciales está representada por las líneas de color abajo del esquema del locus.

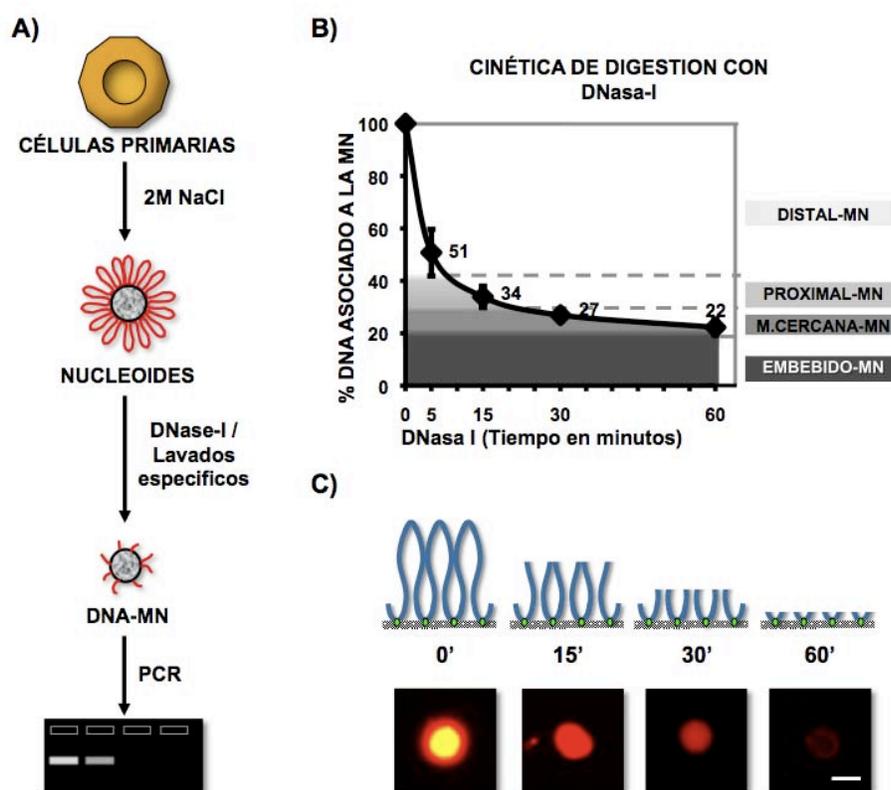
***b. Diseño de una nueva estrategia para la determinación de bucles estructurales***

Los bucles de DNA más la subestructura nuclear (MN) constituyen un *nucleoide*, un agregado de nucleoproteínas generado por la lisis celular en detergentes no iónicos y altas concentraciones de sal. A pesar del proceso de extracción, en los nucleoides el DNA se mantiene formando bucles anclados a la MN y el hiperenrollamiento negativo se conserva (Figura 18). Es por ello que al tratar los nucleoides con agentes intercalantes del DNA, como el bromuro de etidio, los bucles se desenrollan formando un halo de DNA alrededor de la MN (Figura 18C). Sin embargo, el hiperenrollamiento no es el mismo a lo largo del bucle, sino que se observa un gradiente que va de menor en la parte más apical a un mayor hiperenrollamiento en la parte basal del bucle (Figura 18A). Así, un típico bucle estructural de DNA puede ser dividido en diferentes zonas topológicas en función de la cercanía relativa a la MN y al gradiente de hiperenrollamiento. Estas propiedades topológicas de los bucles de DNA generan una patrón diferencial de sensibilidad al corte por endonucleasas inespecíficas como la DNasa-I, cuya eficiencia de corte depende de la topología local del DNA, siendo ésta inversamente proporcional a la proximidad relativa del DNA a la MN (Figura 18A).



**Figura 18.** Propiedades topológicas de los bucles de DNA anclados a la MN. A) Esquema de un bucle de DNA típico mostrando las diferentes zonas topológicas (distal, proximal, muy cercana y embebida dentro de la MN) que se correlacionan con la distancia relativa a la MN y la sensibilidad a la DNasa-I. B) MN de hepatocitos vista en contraste de fases. C) Micrografía de fluorescencia de un nucleoide de hepatocito mostrando el halo de DNA alrededor de la MN causado por el desenrollamiento de los bucles de DNA por el tratamiento con bromuro de etidio (80  $\mu\text{g/ml}$ ). Las barras representan 10  $\mu\text{m}$ .

Considerando las propiedades topológicas de los bucles anclados a la MN y el patrón diferencial de sensibilidad a la digestión con DNasa-I, diseñamos una nuevo método para establecer la organización estructural del DNA con respecto a la MN. Esta estrategia depende de la determinación de la posición relativa a la MN de secuencias de DNA ubicadas dentro de la región genómica de interés (Figura 19). El mapeo de las posiciones relativas a la MN de secuencias de DNA se basa en la digestión progresiva de los bucles de DNA anclados a la MN con concentraciones limitadas de DNasa-I (Figura 19B), para obtener muestras de nucleoides parcialmente digeridos (Figura 19C).



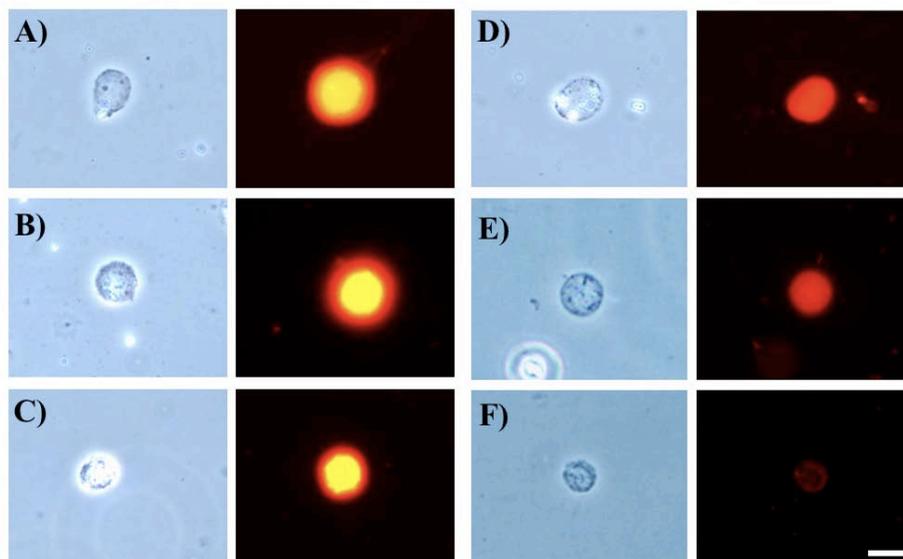
**Figura 19.** Mapeo de la posición relativa a la MN de diferentes secuencias de DNA. A) Los nucleoides preparados a partir de células primarias de rata son incubados con DNasa-I para digerir de manera progresiva el DNA, mediante lavados específicos se elimina el DNA cortado y el DNA residual asociado a la MN es utilizado como templado para amplificar por PCR secuencias blanco de la región genómica de interés. B) Las cinéticas de digestión con DNasa-I de los nucleoides muestran un comportamiento muy homogéneo que consta de tres fases, lo que permite establecer zonas topológicas relativas a la MN (distal, proximal, muy cercana la MN y embebida dentro de la MN). C) Muestras de nucleoides parcialmente digeridos obtenidas a diferentes tiempos del tratamiento con DNasa-I (la barra representa 10 µm). Para determinar la posición de las secuencias de interés, se analizan los amplicones en geles de agarosa (A) y se registra su presencia como positiva (+) o negativa (-) para cada una de las zonas topológicas establecidas en función de la cinética de digestión (B).

Debido a las propiedades topológicas de los bucles anclados a la MN es posible obtener cinéticas de digestión muy homogéneas y altamente reproducibles, lo que permite establecer diferentes zonas topológicas en función del porcentaje de DNA residual asociado a la MN (Figura 19B). Las muestras de los nucleoides parcialmente digeridos son utilizadas directamente como templado para la amplificación por PCR de las distintas secuencias dentro de la región de interés (Figura 19A). Finalmente, correlacionando los patrones de amplificación (Figura 19A) con las cinéticas de digestión (Figura 19B) es posible determinar la posición relativa a la MN de las secuencias de interés.

### *c. Cinéticas de digestión del DNA asociado a la MN*

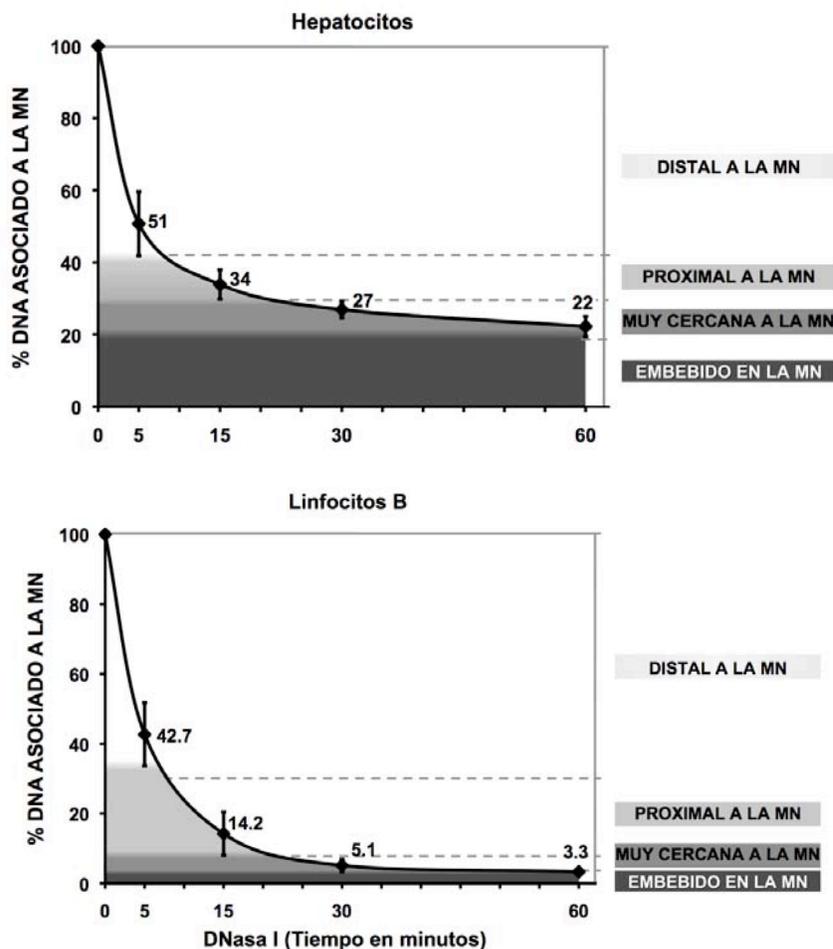
Para determinar la organización en bucles estructurales de la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina de la rata, se utilizaron nucleoides obtenidos a partir de hepatocitos primarios de rata. Los hepatocitos constituyen las principales unidades funcionales del hígado y la principal proteína que producen es la albúmina en el organismo adulto. Además, el proceso de extracción de células primarias a partir del hígado permite el aislamiento de una población celular muy homogénea, ya que >80% de las células obtenidas son hepatocitos (Freshney, 1994). Además, con el objeto de establecer en forma comparativa la organización en bucles estructurales de este locus en células primarias que no expresan los genes de la familia albúmina, se utilizaron los nucleoides obtenidos a partir de linfocitos B inactivos de rata.

Los nucleoides extraídos a partir de las células primarias de rata fueron tratados con una concentración limitada de DNasa-I (0.5 U/ml) para digerir de manera progresiva el DNA asociado a la MN. El DNA residual, asociado a la MN, fue determinado por espectrofotometría (ver estrategia experimental). Asimismo, se analizaron los nucleoides parcialmente digeridos por microscopía de fluorescencia para corroborar el corte progresivo del DNA unido a la MN (Figura 20).



**Figura 20.** Nucleoides de hepatocitos parcialmente digeridos. Los nucleoides fueron digeridos con DNasa-I (0.5 U/ml), teñidos con bromuro de etidio (80  $\mu\text{g/ml}$ ) y visualizados por microscopía de contraste de fases (columnas a la izquierda) y de fluorescencia (columnas a la derecha). A) Nucleoides de hepatocitos lavados con PBS-A. B-F Nucleoides de hepatocitos durante la digestión con DNasa-I (B = 0 min, C = 5 min, D = 15 min, E = 30 min, F = 60 min).

En el caso de los hepatocitos de rata se obtuvieron cinéticas de digestión que mostraron un comportamiento muy homogéneo que consta de tres fases fácilmente identificables. En la primera fase la cinética es muy rápida y es eliminado aproximadamente el 60 % del DNA total durante los primeros 5 minutos; el DNA eliminado corresponde a la fracción que se encuentra en la zona distal a la MN. En la segunda fase se observa una cinética menos rápida debido a la pérdida del hiperenrollamiento y a la cercanía a la MN; esta fase dura 10 minutos y se elimina aproximadamente un 10 % más del DNA. La tercera fase es la más lenta y dura 45 minutos, en ésta se elimina otro 10 % de DNA y el principal factor que impide el corte por la DNasa-I es la presencia de la MN en la base de los bucles que actúa como barrera estérica (Figura 21).



**Figura 21.** Cinéticas de digestión del DNA asociado a la MN. Los nucleoides fueron digeridos con DNasa-I (0.5 U/ml). El valor de cada tiempo de digestión es el promedio de experimentos independientes con animales distintos (n=9 para los nucleoides de hepatocitos, n=4 para los nucleoides de linfocitos). Las barras indican la desviación estándar correspondiente. Las zonas topológicas corresponden a los porcentajes decrecientes de DNA total asociado a la MN. Para los hepatocitos: distal (100-42 %), proximal (42-30 %), muy cercano (30-19%) y embebido dentro de la MN (19-0 %). Para los linfocitos B inactivos: distal (100-33 %), proximal (33-7 %), muy cercano (7-4%) y embebido dentro de la MN (4-0 %).

Por otro lado, en el caso de los linfocitos B inactivos tratados con la misma concentración de DNasa-I (0.5 U/ml), se observan cinéticas de digestión más rápidas. Sin embargo, también pueden observarse tres fases en las cinéticas obtenidas con los nucleoides de linfocitos B inactivos. La primera, es una fase muy rápida que dura 5 minutos y se elimina cerca del 70 % del DNA total asociado a la MN. La segunda fase es menos rápida, dura 10 minutos, y en ella se elimina aproximadamente 25 % del DNA total. La tercer fase dura 45 minutos, la cinética se hace mucho más lenta y en ella se elimina únicamente un 3 % del DNA total asociado a la MN (Figura 21).

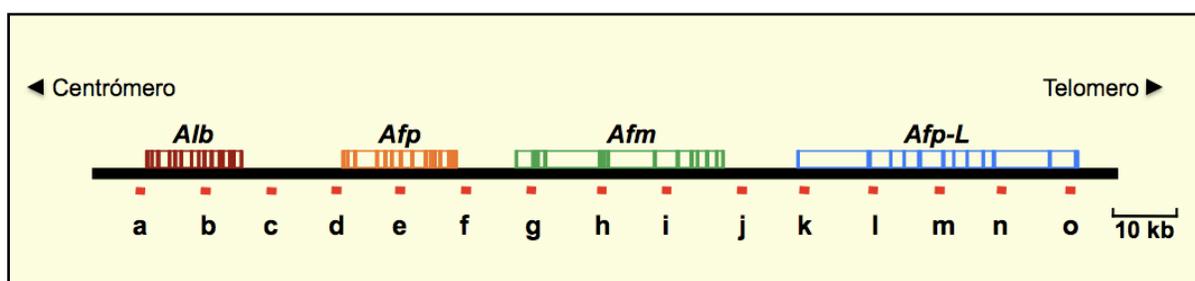
El análisis de las pendientes entre los distintos puntos de las curvas de digestión con DNasa-I demuestra que existen claras diferencias entre los distintos intervalos de la cinéticas de digestión (Tabla 2). Así, es factible establecer distintas zonas en función de las propiedades topológicas de los bucles de DNA anclados a la MN y del grado de sensibilidad al corte por DNasa-I de los mismos (ver discusiones). De esta manera se establecieron zonas topológicas relativas a la MN que fueron denominadas como distal, proximal, muy cercana y embebida en la MN (Tabla 2 y Figura 21). La zona distal a la MN comprende al DNA que se encuentra más alejado de la MN y que presenta un menor grado de hiperenrollamiento, por lo cual es más sensible al corte por la DNasa-I. La zona proximal a la MN corresponde al DNA que tiene un mayor grado de hiperenrollamiento, por lo que la cinética de digestión es menos rápida. La zona muy cercana a la MN corresponde al DNA que es poco sensible al corte por la DNasa-I, por lo que su cinética de digestión es la más lenta, debido a que la MN actúa como barrera estérica que protege al DNA contra la acción de la enzima. Finalmente, el DNA que permanece asociado a la MN, aún después de 60 minutos de digestión, corresponde a la zona embebida a la MN, ya que este DNA no es sensible al corte con concentraciones limitadas (0.5 U/ml) de DNasa-I (Tabla 2 y Figura 21). Más aún, al realizar cinéticas de digestión más prologadas se observa que las pendientes posteriores a los 60 minutos tienden a 0 (Tabla 2), lo que confirma que el DNA residual embebido dentro de la MN es prácticamente insensible a la acción de la enzima.

Intervalo de Digestión (min)	Pendientes		Zona relativa a la MN
	Hepatocitos	Linfocitos	
0-5	-9.80	-11.46	Distal
5-15	-1.70	-2.84	Proximal
15-30	-0.47	-0.61	Muy cercana
30-60	-0.17	-0.06	
60-120	-0.17	-0.03	Embebida

**Tabla 2.** Pendientes de las cinéticas de digestión del DNA asociado a la MN. Las pendientes fueron calculadas a partir de los valores promedio de las cinéticas de digestión (Figura 21). Las pendientes con valores más altos corresponden a la zona distal a la MN y se observan en la primer fase de la cinética de digestión (0-5 minutos) tanto para los nucleoides de hepatocitos como para los de linfocitos B inactivos. La zona proximal a la MN corresponde a las pendientes en el intervalo de digestión con valores intermedios (5-15 minutos). La zona muy cercana a la MN corresponde a las pendientes cuyos valores se aproximan a 0 (15-60 minutos). La zona embebida a la MN corresponde al DNA residual que permanece asociado a la MN después de 60 minutos de digestión, cuando las pendientes tienden a cero indicando insensibilidad del DNA a la acción de la DNasa-I.

#### d. Mapeo de la posición de secuencias relativa a la MN

Para determinar la organización estructural del DNA del locus de la familia albúmina es necesario establecer la posición con respecto a la MN de distintas secuencias a lo largo de esta región genómica. Para ello, se diseñaron primers para amplificar pequeñas secuencias ubicadas a intervalos regulares (~ 10 Kb) dentro de la región de 162 Kb estudiada (Figura 22). Todos los oligos fueron diseñados tomando en cuenta consideraciones importantes para obtener primers altamente específicos contra las secuencias blanco (Tabla 3) y capaces de amplificar de manera eficiente bajo las mismas condiciones de PCR (ver estrategia experimental).



**Figura 22.** Distribución de los amplicones diseñados dentro de la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina. Los amplicones (cuadros rojos indicados con las letras a-o) están distribuidos a intervalos regulares dentro del locus (~ 10 Kb). *Alb*: gen de la albúmina; *Afp*: gen de alfa-fetoproteína; *Afm*: gen de la afamina; *Afp-L*: pseudo-gen muy similar a alfa-fetoproteína.

Amplicón	Primer Sentido	Primer Antisentido	Longitud del Amplicón
a	TGGCAAACATACGCAAGGGA	GCGAAACACACCCCTGGAAA	275 pb
b	GAGGACAGTTAGTGCTGTAGGGTTG	CCTCCAACGAAGTCCCAGAAT	547 pb
c	TCCTTTGTAACCAGGCAAGTGG	CCCATTCCCAGATCCTTCACTCT	374 pb
d	CCCAGGGTCAGAGTATATCAGTGC	CGCTGAACGTATGCTGAGTCA	305 pb
e	TGGTAGGCAGAGATGTGAGGAAAG	CCTGTTGTCCTAATGCTGGTCCTA	382 pb
f	CTGATCTTCAGGCAATATGGCAGG	TTGGCTGATGTCGTCTGGACA	393 pb
g	AAGGATAGGTGCTTGGCTGACA	GCCCTAACCTGTGTGTATCTTG	504 pb
h	GATCACGTAACAACCCTGTCAGCT	CCTTACAGCACCCGTCATACA	263 pb
i	GGTGCTGGGAATTTGACTAAGGC	TAAACTCAGGTGACAGGCTACGGC	465 pb
j	AGGAACCAGGGAATCGAGTGCT	AACTTGCGGGTGTCTCTCCTT	392 pb
k	TGTCAGCATGATGGTGGCTCA	CTCGATTGCCATGCCTGTCT	252 pb
l	GGGCTGGGTCCATATTGCTTGA	ATGCTTTGGGCTGCCTGAAG	373 pb
m	ACGACTTCCCTTCTATCCACAG	GTAGAAAGTCGTTCTGGTTGCCAC	234 pb
n	CCCTAATCTTGCTGTGGTTTGG	TGAGAGCTGGGCAGACATCAA	355 pb
o	GGTGACAGTTGACAGAGGCCTTC	GCTCCATGCTGACCTGAAGTCTA	272 pb

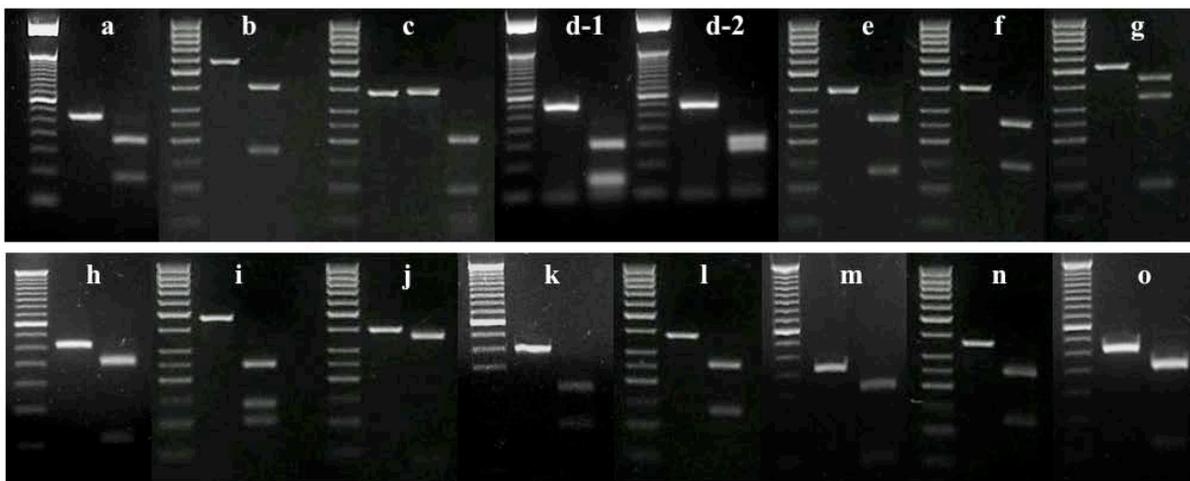
**Tabla 3.** Pares de primers diseñados contra las 15 secuencias blanco de la región genómica de 162 Kb del locus de la familia albúmina. Se muestra la secuencia de cada uno de los oligos y los tamaños de los amplicones generados (a-o).

Se realizaron distintas pruebas de PCR para cada par de oligos con el fin de establecer las condiciones óptimas de amplificación. Se utilizó DNA genómico obtenido a partir de hepatocitos aislados utilizando DNAzol de GibcoBRL de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para estandarizar la amplificación óptima se realizaron pruebas con distintas concentraciones de MgCl<sub>2</sub> (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 4.0 mM). Se amplificó con 50 ng de DNA por mezcla de reacción (50 µl), 0.2 µM de cada oligo, 0.7 U de GoTaq DNA polimerasa (Promega) y 0.2 mM de dNTP's. Se encontró que la concentración adecuada de MgCl<sub>2</sub> es de 2.5 mM para todos los pares de oligos. Asimismo, se probaron diferentes concentraciones de los primers, encontrando que la amplificación óptima se logra con 0.1 µM de éstos.

Para determinar la autenticidad de cada uno de los amplicones, se realizó un análisis de restricción utilizando preferentemente enzimas que realizaran cortes únicos y generaran fragmentos de diferente peso molecular. Para cada amplicón se establecieron los sitios de corte y las enzimas óptimas (Tabla 4). En todos los casos el programa de análisis de imagen digital (Kodak 1D Image Analysis Software 3.5) detecta las bandas de los fragmentos esperados de acuerdo a la enzima de restricción utilizada con los pesos moleculares correspondientes (Figura 23).

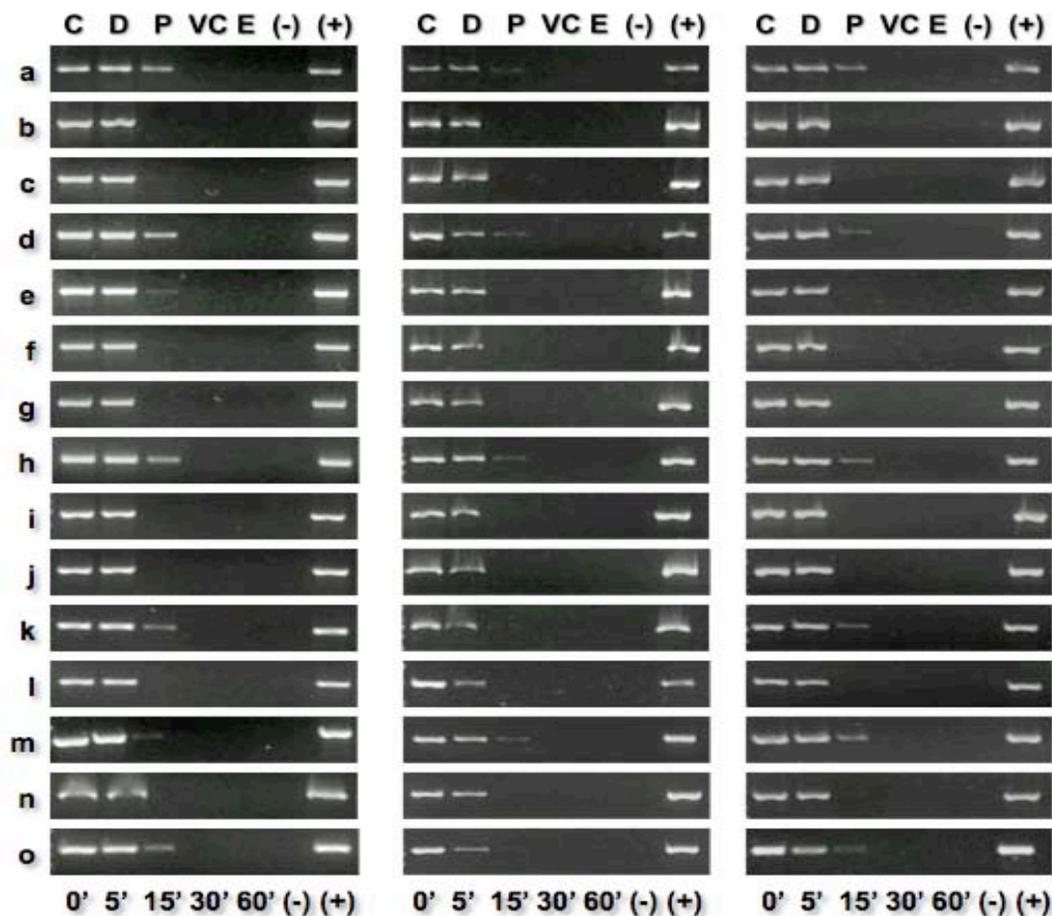
<b>Amplicón</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Enzima</b>	<b>Fragmentos</b>
<b>a</b>	275 pb	Hinc-II	184 / 91
<b>b</b>	547 pb	Hind-III	383 / 164
<b>c</b>	374 pb	Alu-I	233 / 141
<b>d</b>	305 pb	Alu-I Xmn-I	74 / 155 / 76 164 / 141
<b>e</b>	382 pb	Xba-I / Alu-I	261 / 121
<b>f</b>	393 pb	Mbo-I	254 / 137
<b>g</b>	504 pb	Mbo-I	418 / 86
<b>h</b>	263 pb	Eco-RV	207 / 56
<b>i</b>	465 pb	Ava-II	242 / 130 / 93
<b>j</b>	392 pb	Ava-II	356 / 36
<b>k</b>	252 pb	Hind-III	153 / 99
<b>l</b>	373 pb	Xba-I	252 / 121
<b>m</b>	234 pb	Mva-I	179 / 55
<b>n</b>	355 pb	Bgl-I	242 / 113
<b>o</b>	272 pb	Ava-II	211 / 66

**Tabla 4.** Enzimas utilizadas para el análisis de restricción de los amplicones (a-o). Se indica el tamaño de los amplicones, las enzimas utilizadas y el tamaño de los fragmentos generados por la restricción.



**Figura 23.** Análisis de restricción para comprobar la autenticidad de los productos amplificados. Los amplicones (a-o) fueron restringidos con las enzimas correspondientes (Tabla 4) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. El análisis de los fragmentos se realizó por electroforesis en agarosa al 3 % teñidos con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ). Se muestra el análisis de restricción para cada uno de los amplicones de la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina (a-o). En todos los casos la primer línea corresponde al marcador de peso molecular de 50 pb, la segunda al amplicón sin restringir y la tercer línea a la restricción. En el caso del amplicón *d*, se analizó el corte por la enzima Alu-I (d-1) y por la enzima Xmn-I (d-2).

Para determinar la posición relativa a la MN de cada una de las secuencias (a-o) de la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina en hepatocitos de la rata, se realizaron amplificaciones de muestras de nucleoides parcialmente digeridos a distintos tiempos con DNasa-I (Figura 24). La mayoría de los amplicones amplifica únicamente hasta los 5 min de digestión con DNasa-I, por lo que se encuentran en la zona distal a la MN; mientras que algunos de los amplicones se encuentran más cercanos a la MN (en zona proximal), ya que amplifican hasta los 15 min de digestión (Figura 24).



**Figura 24.** Mapeo de la posición relativa a la MN de los distintos amplicones del locus de la familia albúmina de la rata. Nucleoides de hepatocitos de rata fueron tratados con DNasa-I (0.5 U/ml) por diferentes tiempos. El DNA residual asociado a la MN fue usado directamente como templado para amplificar por PCR las secuencias del locus (a-o). Los amplicones fueron visualizados en geles de agarosa al 2 % teñidos con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml). C = control a los 0 minutos de digestión. Zonas topológicas con respecto a la MN: D = distal, P = proximal, VC = muy cercano, E = embebido en la MN. (-) Control negativo (sin templado), (+) control positivo (DNA genómico puro). El patrón de amplificación fue reproducido de manera consistente en experimentos individuales con muestras de animales distintos (n=4).

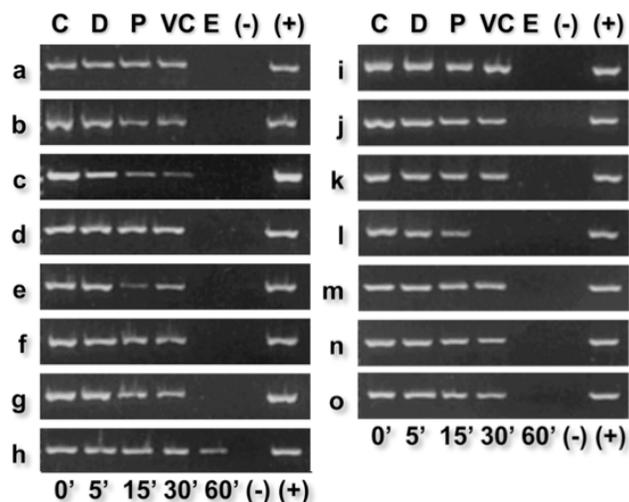
Considerando la señal de amplificación para cada uno de las secuencias (a-o) de la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina en nucleoides de hepatocitos (Figura 24) y las zonas topológicas de las cinéticas de digestión (Figura 21), se establecieron las posiciones relativas a la MN de cada uno de los amplicones estudiados. Así, se ubicaron las diferentes secuencias del locus (a-o) en cada una de las zonas topológicas con respecto a la MN (Tabla 5).

Amplicón	ZONAS TOPOLÓGICAS RELATIVAS A LA MN			
	Distal a la MN	Proximal a la MN	Muy Cercana a la MN	Embebida en la MN
<b>a</b>	+	+	-	-
<b>b</b>	+	-	-	-
<b>c</b>	+	-	-	-
<b>d</b>	+	+	-	-
<b>e</b>	+	-	-	-
<b>f</b>	+	-	-	-
<b>g</b>	+	-	-	-
<b>h</b>	+	+	-	-
<b>i</b>	+	-	-	-
<b>j</b>	+	-	-	-
<b>k</b>	+	+	-	-
<b>l</b>	+	-	-	-
<b>m</b>	+	+	-	-
<b>n</b>	+	-	-	-
<b>o</b>	+	+	-	-

**Tabla 5.** Localización de los amplicones en las zonas topológicas relativas a la MN en hepatocitos de rata. Los amplicones fueron registrados como positivos o negativos para cada zona relativa a la MN en función del análisis de detección llevado a cabo por el sistema de análisis de imagen digital (Kodak 1D Image Analysis Software 3.5).

Además, se determinó la posición relativa a la MN de cada una de las secuencias (a-o) de la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina en linfocitos B inactivos de la rata, con el objeto de establecer en forma comparativa la organización de este locus en células primarias que no expresan los genes de la familia albúmina. Para determinar la posición relativa a la MN de cada una de las secuencias (a-o) del locus de la familia albúmina de la rata en los linfocitos B inactivos, se realizaron amplificaciones en muestras de nucleoides parcialmente digeridos a distintos tiempos con DNasa-I (0.5 U/ml). El patrón de amplificación en nucleoides de linfocitos B inactivos muestra que la posición de todos los amplicones es más cercana a la MN (Figura 25) en comparación a lo observado en los nucleoides de hepatocitos (Figura 24).

Considerando la señal de amplificación para cada uno de las secuencias (a-o) de la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina en los nucleoides de linfocitos B inactivos (Figura 25) y las zonas topológicas de las cinéticas de digestión (Figura 21), se establecieron las posiciones relativas a la MN de cada uno de los amplicones estudiados. Así, se ubicaron las diferentes secuencias del locus (a-o) en cada una de las zonas topológicas con respecto a la MN para los linfocitos B inactivos (Tabla 6).



**Figura 25.** Mapeo de la posición relativa a la MN de los distintos amplicones en linfocitos B inactivos de rata. Nucleoides de linfocitos B inactivos de rata fueron tratados con DNasa-I (0.5 U/ml) por diferentes tiempos. El DNA residual asociado a la MN fue usado directamente como templado para amplificar por PCR las secuencias del locus (a-o). Los amplicones fueron visualizados en geles de agarosa al 2 % teñidos con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ l/ml). C = control a los 0 minutos de digestión. Zonas topológicas con respecto a la MN: D = distal, P = proximal, VC = muy cercano, E = dentro de la MN. (-) Control negativo (sin templado), (+) control positivo (DNA genómico puro). El patrón de amplificación fue reproducido de manera consistente en experimentos individuales con muestras de animales distintos (n=3).

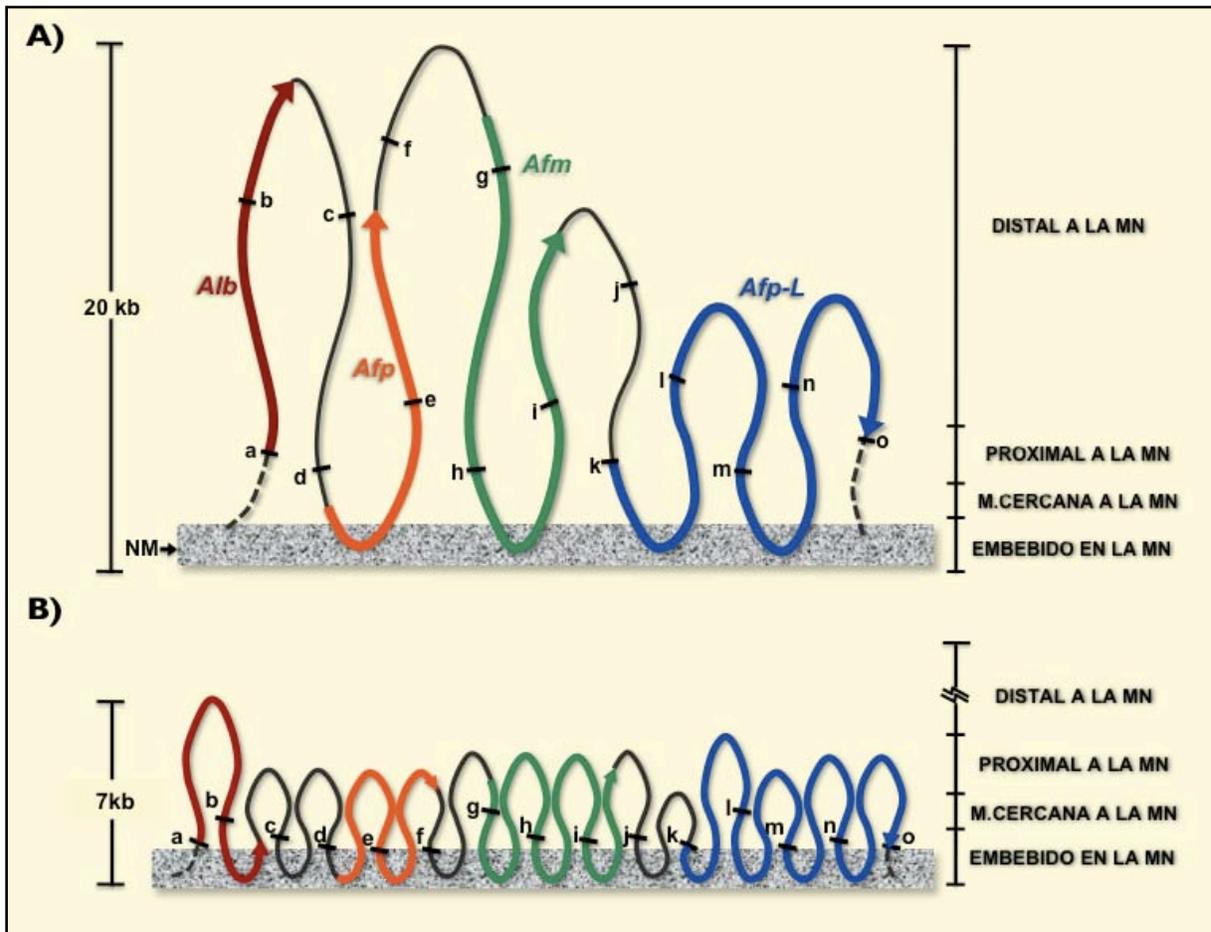
Amplicón	ZONAS TOPOLÓGICAS RELATIVAS A LA MN EN LINFOCITOS-B			
	Distal a la MN	Proximal a la MN	Muy Cercana a la MN	Embebida en la MN
a	+	+	+	-
b	+	+	+	-
c	+	+	+	-
d	+	+	+	-
e	+	+	+	-
f	+	+	+	-
g	+	+	+	-
h	+	+	+	+
i	+	+	+	-
j	+	+	+	-
k	+	+	+	-
l	+	+	-	-
m	+	+	+	-
n	+	+	+	-
o	+	+	+	-

**Tabla 6.** Localización de los amplicones en las zonas topológicas relativas a la MN en linfocitos B inactivos de rata. Los amplicones fueron registrados como positivos o negativos para cada zona relativa a la MN en función del análisis de detección llevado a cabo por el sistema de análisis de imagen digital (Kodak 1D Image Analysis Software 3.5).

***e. Determinación de la organización estructural del DNA con respecto a la MN***

Al caracterizar las cinéticas de digestión de los bucles de DNA anclados a la MN en función de sus propiedades topológicas desarrollamos una técnica para determinar la organización estructural del DNA. El método se basa en la determinación de la posición relativa a la MN por PCR de distintas secuencias elegidas a intervalos regulares a lo largo de una región del genoma de secuencia conocida en nucleoides extraídos a partir de células primarias. Considerando que el DNA es una cadena continua y flexible que se encuentra anclada en diferentes puntos a la MN, la cual constituye un referente de posición invariante, entonces al determinar las posiciones relativas a la MN de distintos sitios a lo largo de una región genómica, podemos deducir su organización topológica en tercera dimensión con respecto a la MN (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010).

De esta manera, al considerar las posiciones topológicas relativas a la MN de las secuencias blanco (a-o) ubicadas a lo largo de la región genómica de 162 Kb del locus multigénico de la albúmina (Tablas 5 y 6) y la secuencia lineal a nivel de nucleótidos, se estableció la organización estructural del locus en hepatocitos primarios y linfocitos B inactivos de rata (Figura 26). En los hepatocitos, la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina se organiza en 5 bucles de DNA con un tamaño menor a las 40 Kb. Los puntos de anclaje deben estar cercanos a los amplicones a, d, h, k, l y m (Figura 26A). Por otro lado, la misma región en linfocitos B inactivos se organiza en 14 pequeños bucles cuya longitud máxima es de 14 Kb y existen puntos de anclaje cercanos a la mayoría de los amplicones (Figura 26B).



**Figura 26.** Organización en bucles estructurales de DNA de la región de 162 Kb que contiene a miembros de la familia de la albúmina. A) Hepatocitos. B) Linfocitos B inactivos. La letras indican la posición de los amplicones dentro de los bucles de DNA. Las líneas resaltadas representan los genes completos. Las líneas punteadas indican la proyección de los bucles fuera de la región estudiada. La barra izquierda indica el tamaño de los bucles de DNA de la base a la parte apical; por lo tanto la longitud total de cada bucle es del doble del valor correspondiente. La barra derecha indica las zonas topológicas relativas a la MN en función de las cinéticas de digestión. El esquema es mostrado de acuerdo a la escala en Kb a lo largo de los ejes “x” e “y”.

## **II. Análisis de la organización estructural del DNA durante la replicación**

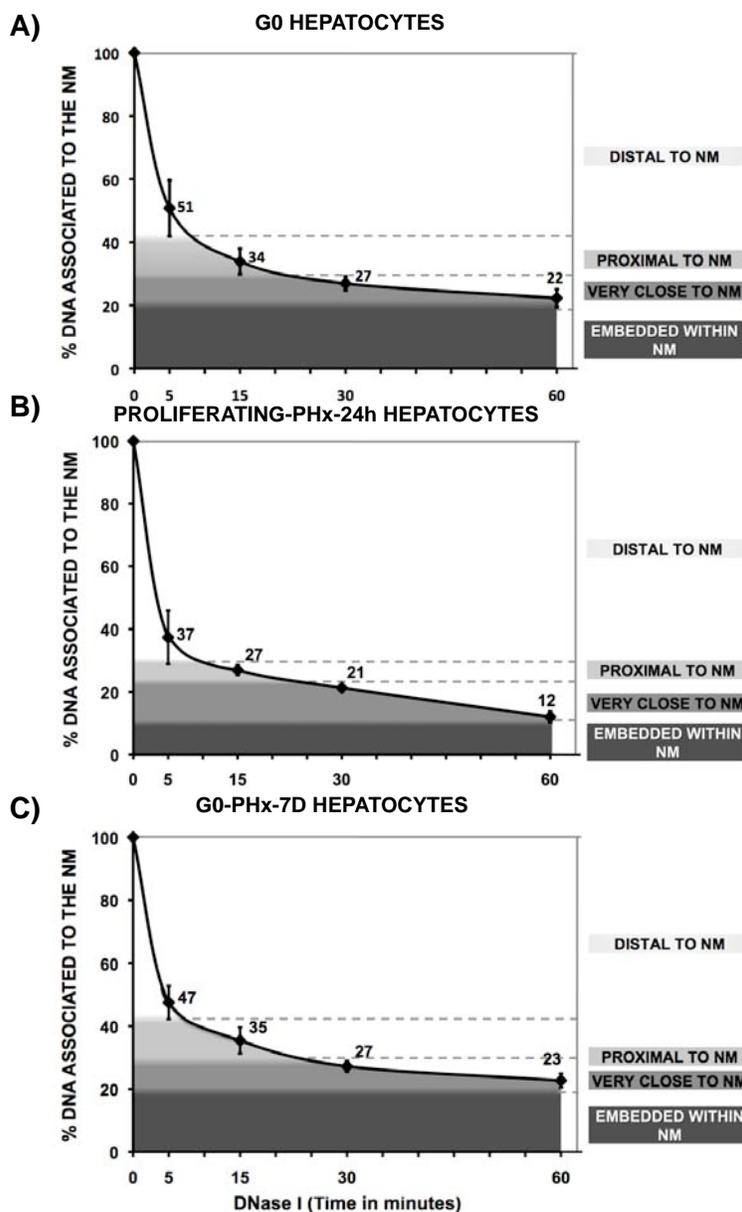
---

Para determinar el mecanismo general de replicación del DNA *in vivo* y establecer si los bucles estructurales anclados a la MN constituyen las unidades funcionales de replicación, se analizaron los cambios en la organización del DNA con respecto a la MN durante la fase de síntesis del DNA (S). Para ello, se analizaron los cambios en las posiciones relativas a la MN de las distintas secuencias blanco (amplicones) ubicadas en la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina (a-o) durante la regeneración hepática de la rata.

### ***a. Cinéticas de digestión del DNA asociado a la MN***

Los nucleoides extraídos a partir de hepatocitos de ratas parcialmente hepatectomizadas se trataron con una concentración limitada de DNasa-I (0.5 U/ml) para digerir de manera progresiva el DNA asociado a la MN. El DNA residual, asociado a la MN, se determinó por espectrofotometría (ver estrategia experimental). A las 24 h post-hepatectomía, tiempo en el que se observa el pico máximo de síntesis de DNA, se obtuvieron cinéticas de digestión más rápidas que en las ratas control (sin hepatectomizar) y el DNA total residual llega hasta el 12 % en promedio a los 60 minutos de digestión (Figura 27). Aunque las cinéticas son más rápidas, la digestión de los nucleoides de hepatocitos proliferantes (PHx-24 h) también muestra un comportamiento muy homogéneo que consta de tres fases. En la primera fase se elimina aproximadamente el 70 % del DNA, el cual corresponde a la fracción que se encuentra en la zona distal a la MN. Esta fase ocurre durante los primeros 5 minutos de la digestión con DNasa-I y la cinética es muy rápida (pendiente de -12.52). En la segunda fase se observa una cinética menos rápida (pendiente de -1.04) y se elimina aproximadamente un 8 % más del DNA; esta fase dura 10 minutos. La tercera fase es todavía menos rápida (pendiente de -0.3) y se elimina otro 12 % de DNA durante 45 minutos (Figura 27B y Tabla 7).

A los 7 días post-hepatectomía la regeneración hepática ha concluido y los hepatocitos han regresado a la quiescencia. Las cinéticas de digestión con DNasa-I de los nucleoides de hepatocitos extraídos a los 7 días post-hepatectomía son muy similares a las cinéticas control de nucleoides de hepatocitos de ratas sin hepatectomizar (Figura 27). También se observan tres fases cuyas pendientes son muy similares a las cinéticas control. La primera fase va del 100-42 % del DNA total residual, es la más rápida (pendiente -10.50) y ocurre durante los primeros 5 minutos. La segunda fase dura 10 minutos y el intervalo es del 42-30 % del DNA total residual (pendiente -1.21). La tercera fase es la más lenta y dura 45 minutos, la pendiente tiende a cero (-0.55 de 15 a 30 minutos y -0.15 de 30 a 60 minutos) y se elimina otro 10 % de DNA total (Figura 27C y Tabla 7).



**Figura 27.** Cinéticas de digestión del DNA de nucleoides de hepatocitos de rata. Los nucleoides fueron digeridos con DNasa-I (0.5 U/ml). El valor de cada tiempo de digestión es el promedio de experimentos independientes con animales distintos: hepatocitos en G0 (n = 9), hepatocitos en proliferación (n = 5), hepatocitos a los 7 días post-hepatectomía (n = 5). Las barras indican la desviación estándar correspondiente. Las zonas topológicas corresponden a los porcentajes decrecientes de DNA total asociado a la MN. Para los hepatocitos control (G0): distal (100-42 %), proximal (42-30 %), muy cercano (30- 19%) y embebido dentro de la MN (19-0 %). Para los hepatocitos proliferantes (PHx-24 h): distal (100-32 %), proximal (32-24 %), muy cercano (24- 10%) y embebido dentro de la MN (10-0 %). Para los hepatocitos en G0 a los 7 días post-hepatectomía (PHx-7D): distal (100-42 %), proximal (42-30 %), muy cercano (30- 19%) y embebido dentro de la MN (19-0 %).

Se establecieron zonas topológicas relativas a la MN en función de los porcentajes decrecientes de DNA total residual y de las pendientes entre los distintos puntos de digestión con DNasa-I para cada tipo de muestras de nucleoides: control, PHx-24 h y PHx-7 D (Figura 27 y Tabla 7). La zona distal a la MN comprende al DNA que se encuentra más alejado de la MN y que tiene un menor grado de hiperenrollamiento, por lo que es el más sensible al corte por la DNasa-I. La zona proximal a la MN corresponde al DNA que tiene un mayor hiperenrollamiento y que comienza a acercarse a la MN por lo que la cinética es menos rápida. La zona muy cercana a la MN corresponde al DNA que es poco sensible al corte por la DNasa-I, debido a que la MN actúa como barrera estérica contra la acción de la enzima por lo que su cinética de digestión es la más lenta. El DNA que permanece asociado a la MN, aún después de 60 minutos de digestión, se encuentra embebido en la MN (Tabla 7 y Figura 27).

Intervalo de Digestión (min)	Pendientes			Zona relativa a la MN
	Control G0	PHx-24h	PHx-7D	
0-5	-9.80	-12.52	-10.50	Distal
5-15	-1.70	-1.04	-1.21	Proximal
15-30	-0.47	-0.38	-0.55	Muy cercana
30-60	-0.17	-0.31	-0.15	

**Tabla 7.** Pendientes de las cinéticas de digestión del DNA asociado a la MN. Las pendientes fueron calculadas a partir de los valores promedio de las cinéticas de digestión (Figura 24). Las pendientes con valores más altos corresponden a la zona distal a la MN y se observan en la primer fase de las cinéticas de digestión (0-5 minutos). La zona proximal a la MN corresponde a las pendientes con valores intermedios (intervalo de digestión de 5-15 minutos). La zona muy cercana a la MN corresponde a las pendientes cuyos valores se aproximan a 0 (15-60 minutos). La pendiente claramente tiende a cero después de los 60 minutos de digestión, lo que indica que el DNA residual está embebido en la MN

#### ***b. Mapeo de la posición de secuencias relativa a la MN***

Para determinar la organización estructural del DNA de la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina durante la fase de síntesis del DNA (S), se analizaron las posiciones relativas a la MN de las distintas secuencias blanco de la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina (a-o) en nucleoides de hepatocitos de ratas parcialmente hepatectomizadas aislados a las 24 h después de la cirugía.

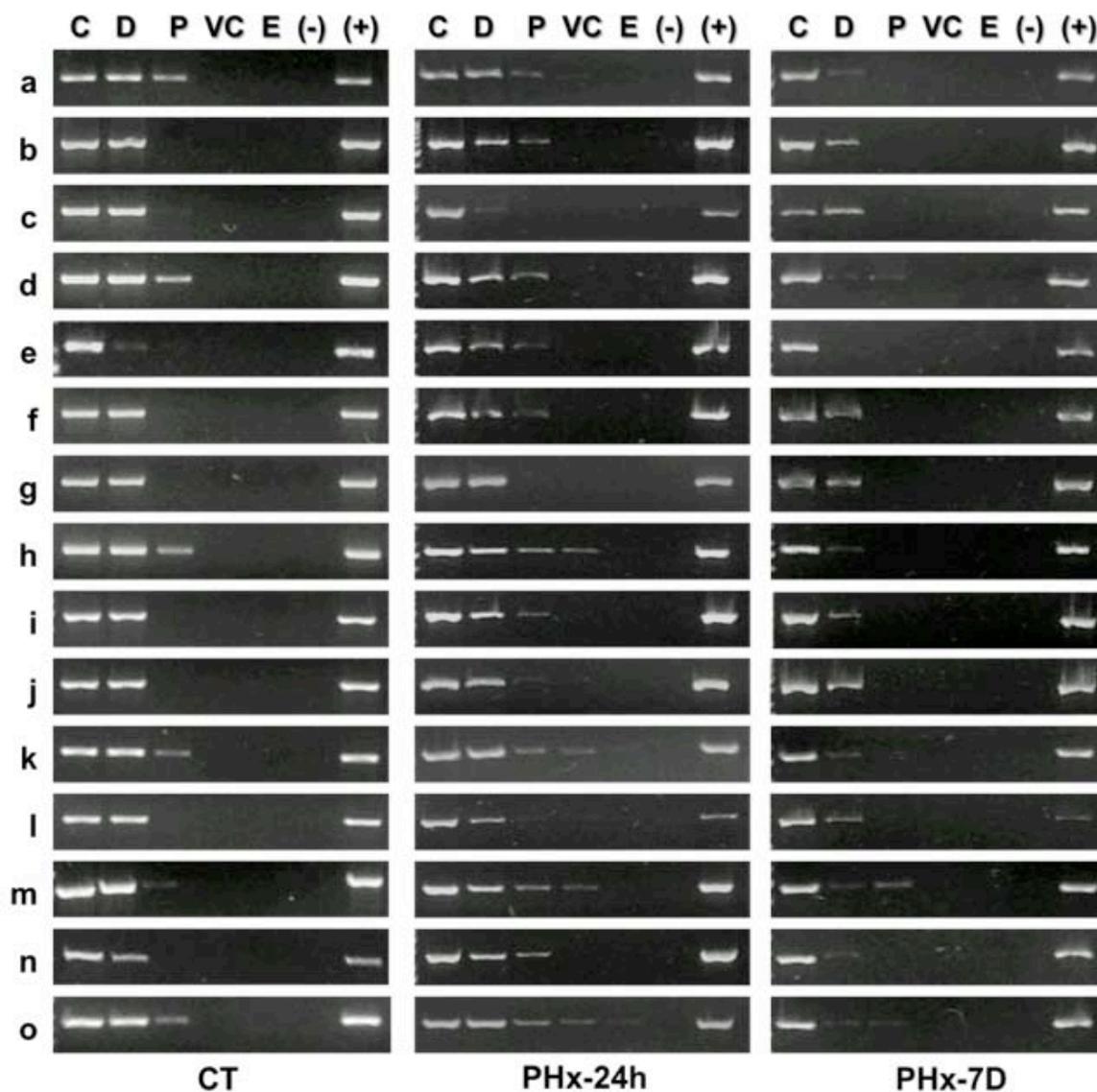
Además, con el objeto de contar con marcadores control ubicados fuera de la región del locus de la familia albúmina, se diseñaron primers para amplificar pequeñas secuencias ( $\leq 418$  pb) de genes no relacionados al locus de la albúmina y que se encuentran en territorios cromosómicos distintos en el interior del núcleo (el locus de la albúmina se encuentra en el cromosoma 14). Las secuencias génicas elegidas están ubicadas en la parte 5' de los genes que codifican para la proteína ácida glial fibrilar (*GFAP*), el receptor de superficie celular Cd23, la proteína cero de mielina (*MPZ*) y la cinasa Fyn (Tabla 8).

Los pares de oligos para amplificar las secuencias control (*Fyn*, *CD23*, *GFAP* y *MPZ*) fueron diseñados tomando en cuenta los mismos criterios que se emplearon para diseñar los primers del locus de la familia albúmina (ver estrategia experimental). Además, cada par de oligos fue estandarizado para establecer las condiciones óptimas de amplificación, encontrando que la concentración adecuada de  $MgCl_2$  es de 2.5 mM para todos los pares de oligos. Asimismo, la amplificación óptima se logra con 0.1 mM de primers. La autenticidad de cada uno de los amplicones se comprobó por análisis de restricción, en todos los casos el programa de análisis de imagen digital (Kodak 1D Image Analysis Software 3.5) detectó las bandas de los fragmentos esperados, con los pesos moleculares correspondientes de acuerdo a la enzima de restricción utilizada.

Amplicón	Cromosoma	Primer Sentido	Primer Antisentido	Longitud del Amplicón
<i>GFAP</i>	10	TCCAGCCCGTCCCTCAATAA	TCCCGAAGTCTGCCTGGTAA	418 pb
<i>CD23</i>	12	TAGGAGACGATGCTGCTGTGCA	CGTGGAAGAGGATCAGACAAGAA	284 pb
<i>MPZ</i>	13	CTTGCCCTACCCAGCTAT	TTCCTTGGCTGGCTCTCAAT	184 pb
<i>Fyn</i>	20	ACACAATGCTGATCTAGTCGTGGC	CACATCTGTGTTCACTGTCCG	340 pb

**Tabla 8.** Pares de primers diseñados contra los genes no relacionados al locus de la familia albúmina. Se indica la ubicación cromosómica, la secuencia de cada uno de los oligos y los tamaños de los amplicones generados. *GFAP* = proteína ácida glial fibrilar, *Cd23* = receptor de superficie celular Cd23, *MPZ* = proteína cero de mielina y *Fyn* = cinasa Fyn.

Para determinar la posición con respecto a la MN de cada una de las secuencias estudiadas de la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina (a-o) durante la regeneración hepática de la rata, se realizaron amplificaciones en muestras de nucleoides parcialmente digeridos a distintos tiempos con DNasa-I (0.5 U/ml). Así, se observaron distintos patrones de amplificación en función del estado del ciclo celular de los hepatocitos (Figura 28).



**Figura 28.** Mapeo por PCR de la posición relativa a la MN de los distintos amplicones del locus de la familia albúmina de la rata. Nucleoides de hepatocitos de rata fueron tratados con DNasa-I (0.5 U/ml) por diferentes tiempos. El DNA residual asociado a la MN fue usado directamente como templado para amplificar por PCR las secuencias distribuidas a lo largo del locus (a-o). Los amplicones fueron visualizados en geles de agarosa al 2 % teñidos con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml). C = control a los 0 minutos de digestión. Zonas topológicas con respecto a la MN: D = distal, P = proximal, VC = muy cercano, E = embebido dentro de la MN. (-) Control negativo (sin templado), (+) control positivo (DNA genómico puro). CT = hepatocitos en G0, PHx-24h = hepatocitos a las 24 h post-hepatectomía, PHx-7D = hepatocitos a los 7 días post-hepatectomía. El patrón de amplificación fue reproducido consistentemente en experimentos individuales con muestras de animales distintos ( $n \geq 3$ ).

Para establecer si existen cambios en la organización del DNA con respecto a la MN en la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina durante la regeneración hepática, se determinaron las posiciones de las secuencias blanco (a-o) para cada clase de nucleoides analizados (Tabla 9) considerando la señal de amplificación en cada tiempo de digestión (Figura 28) y las zonas topológicas correspondientes a la cinética de digestión de los nucleoides de hepatocitos control obtenidos de ratas sin hepatectomizar (Figura 27A).

ZONAS TOPOLÓGICAS RELATIVAS A LA MN DE ACUERDO A LA CINÉTICA DE DIGESTIÓN DE LOS NUCLEOIDES DE HEPATOCITOS EN G0															
Amplicón	CONTROL G0					PHX-24 h					PHX-7D				
	C	D	P	VC	E	C	D	P	VC	E	C	D	P	VC	E
a	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-*	+	+	-*	-	-
b	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
c	+	+	-	-	-	+	+	+	-*	-	+	+	-	-	-
d	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
e	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-*	-	-	-
f	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
g	+	+	-	-	-	+	+	+	-*	-	+	+	-*	-	-
h	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-*	-	-
i	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
j	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-*	-	-
k	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-*	+	+	-*	-	-
l	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
m	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
n	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
o	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-*	+	+	+	-	-

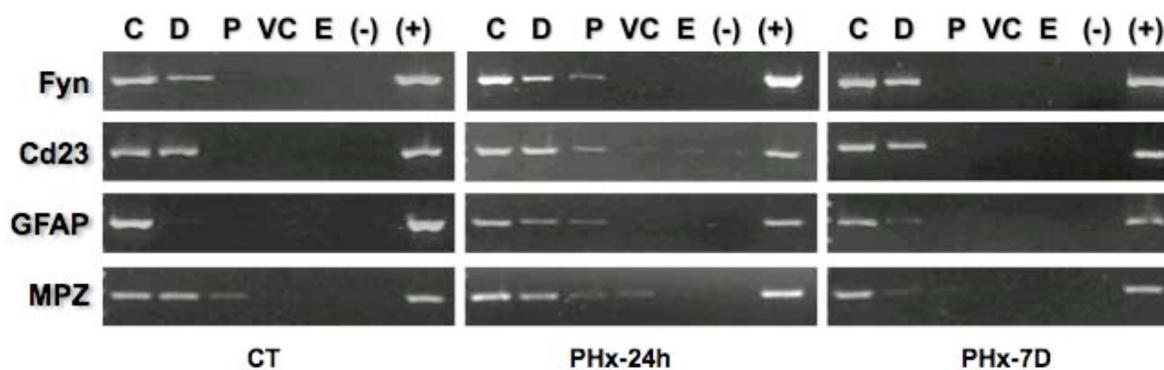
**Tabla 9.** Localización de los amplicones del locus de la familia albúmina de la rata en las zonas topológicas relativas a la MN de acuerdo a la cinética de digestión control de nucleoides de hepatocitos en G0 (Figura 27A). Los amplicones fueron registrados como positivos o negativos para cada zona relativa a la MN en función de del tiempo de digestión con DNasa-I, con base en la detección por el sistema de análisis de imagen digital (Kodak 1D Image Analysis Software 3.5). C = control a los 0 minutos de digestión. Zonas topológicas con respecto a la MN: D = distal, P = proximal, VC = muy cercano, E = embebido dentro de la MN. \* indica que una de las repeticiones es diferentes (-\* = registrado como negativo pero una de las repeticiones es positiva, +\* = registrado como positivo pero una de las repeticiones es negativa).

Para establecer las posiciones precisas de las secuencias de la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina(a-o) en cada zona topológica relativa a la MN durante la regeneración hepática, se determinaron las posiciones de los amplicones (Tabla 10) considerando la señal de amplificación en cada tiempo de digestión (Figura 28) y las zonas topológicas correspondientes a las cinéticas de digestión individuales (Figura 27) para cada clase de nucleoides analizados (Control G0, PHx-24 h y PHx-7D).

ZONAS TOPOLÓGICAS RELATIVAS A LA MN															
Amplicón	CONTROL G0					PHX-24 h					PHX-7D				
	C	D	P	VC	E	C	D	P	VC	E	C	D	P	VC	E
a	+	+	+	-	-	+	+	+	-*	-*	+	+	-*	-	-
b	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
c	+	+	-	-	-	+	+	-*	-	-	+	+	-	-	-
d	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
e	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-*	-	-	-
f	+	+	-	-	-	+	+	+	-*	-	+	+	-	-	-
g	+	+	-	-	-	+	+	-*	-	-	+	+	-*	-	-
h	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-*	-	-
i	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
j	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-*	-	-
k	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-*	+	+	-*	-	-
l	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
m	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
n	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
o	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-*	+	+	+	-	-

**Tabla 10.** Localización de los amplicones del locus de la familia albúmina de la rata en las zonas topológicas relativas a la MN de acuerdo a la cinéticas de digestión para cada clase de nucleoides de hepatocitos (Figura 27). Los amplicones fueron registrados como positivos o negativos para cada zona relativa a la MN en función del tiempo de digestión con DNasa-I, con base en la detección por el sistema de análisis de imagen digital (Kodak 1D Image Analysis Software 3.5). C = control a los 0 minutos de digestión. Zonas topológicas con respecto a la MN: D = distal, P = proximal, VC = muy cercano, E = embebido dentro de la MN. \* indica que una de las repeticiones es diferentes (-\* = registrado como negativo pero una de las repeticiones es positiva, +\* = registrado como positivo pero una de las repeticiones es negativa).

En el caso de las secuencias control ajenas al locus de la familia albúmina (*Fyn*, *CD23*, *GFAP* y *MPZ*), también se determinó la posición con respecto a la MN durante la regeneración hepática de la rata, mediante amplificaciones en muestras de nucleoides parcialmente digeridos a distintos tiempos con DNasa-I (Figura 29). Para establecer los cambios en la organización del DNA con respecto a la MN de las secuencias control durante la regeneración hepática, se determinaron las posiciones para cada tipo de nucleoides analizados (Tabla 11) considerando la señal de amplificación en cada tiempo de digestión (Figura 29) y las zonas topológicas correspondientes a la cinética de digestión de los nucleoides de hepatocitos control en G0 (Figura 27A). Para establecer las posiciones precisas de las secuencias control en cada zona topológica relativa a la MN durante la regeneración hepática, se determinaron las posiciones de los amplicones (Tabla 11) considerando la señal de amplificación en cada tiempo de digestión (Figura 29) y las zonas topológicas correspondientes a las cinéticas de digestión individuales para cada clase de nucleoides analizados (Figura 27).



**Figura 29.** Mapeo de la posición relativa a la MN de los distintos amplicones de las secuencias control ubicadas fuera del locus de la familia albúmina. Nucleoides de hepatocitos de rata fueron tratados con DNasa-I (0.5 U/ml) por diferentes tiempos. El DNA residual asociado a la MN fue usado directamente como templado para amplificar por PCR las secuencias control (*Fyn*, *CD23*, *GFAP* y *MPZ*). Los amplicones fueron visualizados en geles de agarosa al 2 % teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). C = control a los 0 minutos de digestión. Zonas topológicas con respecto a la MN: D = distal, P = proximal, VC = muy cercano, E = embebido dentro de la MN. (-) Control negativo (sin templado), (+) control positivo (DNA genómico puro). CT = hepatocitos en G0, PHx-24h = hepatocitos a las 24 h post-hepatectomía, PHx-7D = hepatocitos a los 7 días post-hepatectomía. El patrón de amplificación fue reproducido consistentemente en experimentos individuales con muestras de animales distintos (n = 3).

ZONAS TOPOLÓGICAS RELATIVAS A LA MN DE ACUERDO A LA CINÉTICA DE DIGESTIÓN DE LOS NUCLEOIDES DE HEPATOCITOS EN G0															
Amplicón	CONTROL G0					PHX-24 h					PHX-7D				
	C	D	P	VC	E	C	D	P	VC	E	C	D	P	VC	E
Fyn	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
CD23	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
GFAP	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
MPZ	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-*	+	+	+	-	-

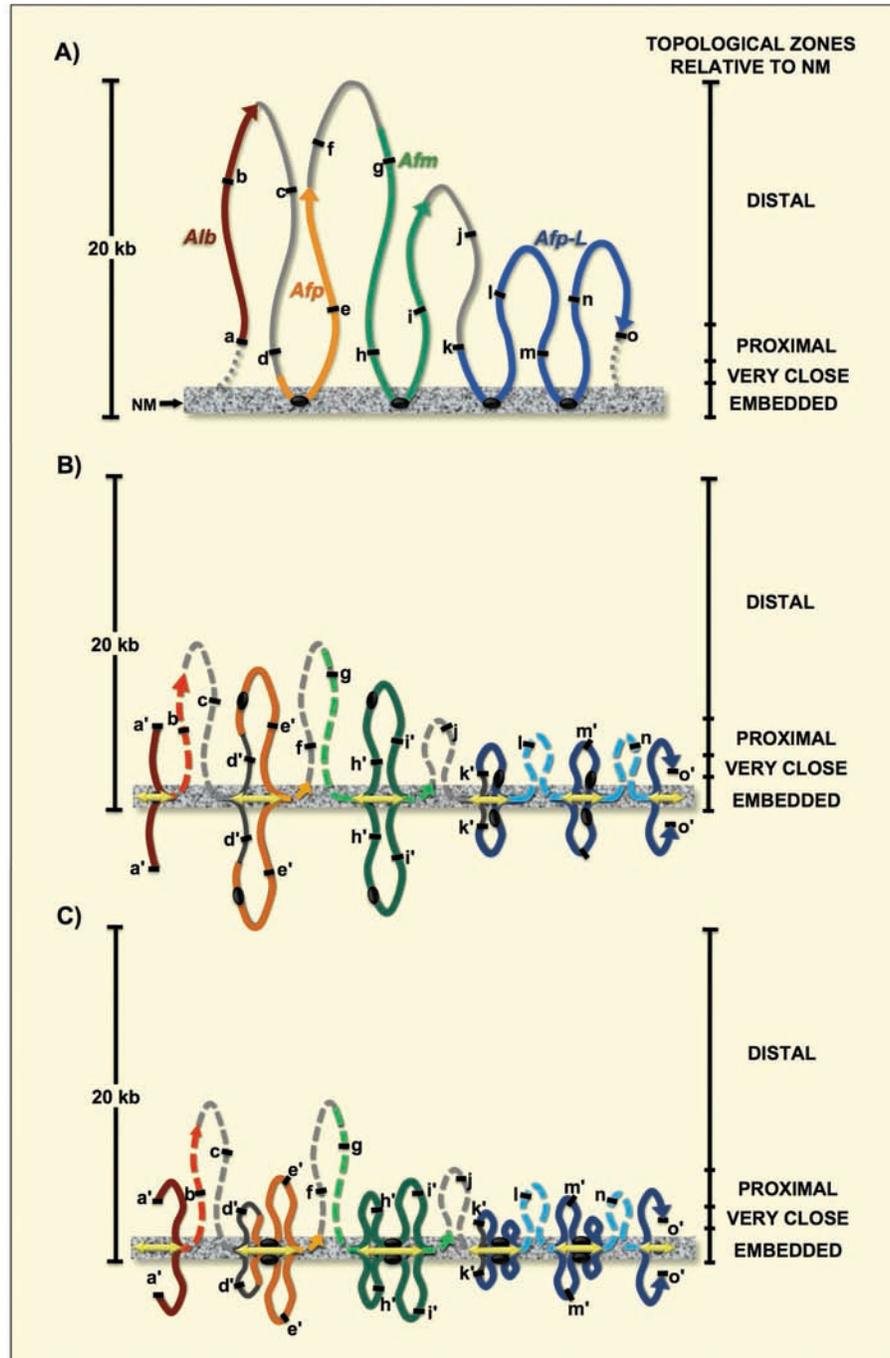
  

ZONAS TOPOLÓGICAS RELATIVAS A LA MN															
Amplicón	CONTROL G0					PHX-24 h					PHX-7D				
	C	D	P	VC	E	C	D	P	VC	E	C	D	P	VC	E
Fyn	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
CD23	+	+	-	-	-	+	+	+	-*	-	+	+	-	-	-
GFAP	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
MPZ	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-*	+	+	+	-	-

**Tabla 11.** Localización de los amplicones de las secuencias control ubicadas fuera del locus de la familia albúmina en las zonas topológicas relativas a la MN. En la parte superior se muestra la posición de los amplicones de acuerdo a la cinética de digestión control de nucleoides de hepatocitos en G0 (Figura 27A). En la parte inferior se muestran las posiciones de los amplicones de acuerdo a la cinéticas de digestión para cada clase de nucleoides de hepatocitos. Los amplicones fueron registrados como positivos o negativos para cada zona relativa a la MN en función del tiempo de digestión con DNasa-I, con base en la detección por el sistema de análisis de imagen digital (Kodak 1D Image Analysis Software 3.5). C = control a los 0 minutos de digestión. Zonas topológicas con respecto a la MN: D = distal, P = proximal, VC = muy cercano, E = embebido dentro de la MN. \* indica que una de las repeticiones es diferentes (-\* = registrado como negativo pero una de las repeticiones es positiva, +\* = registrado como positivo pero una de las repeticiones es negativa).

### *c. Determinación de la organización estructural del DNA con respecto a la MN*

Considerando la distancia lineal a nivel de secuencia del locus de la familia albúmina de rata y los cambios en las posiciones de cada una de las secuencias examinadas (a-o) durante la regeneración hepática (Tablas 5 y 6), se realizaron esquemas de la posible organización en bucles anclados a la MN de esta región del genoma durante la fase de síntesis del DNA (Fig. 30).

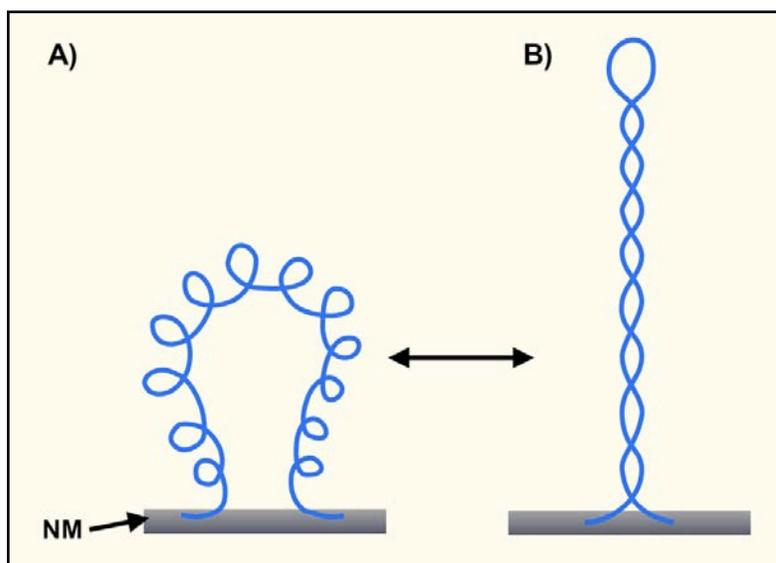


**Figura 30.** Cambios en la organización estructural del locus de la familia albúmina de rata durante la replicación del DNA. A). Organización de los bucles del DNA en hepatocitos G0. Las letras (a-o) indican la posición de las secuencias examinadas, los óvalos negros representan los LARs. B-C Diferentes configuraciones de la región analizada en hepatocitos proliferantes. Las letras (a'-o') indican la posición de las secuencias replicadas dentro de los nuevos bucles (las líneas continuas) y las líneas punteadas representan las regiones que no se han duplicado. B) Modelo en el que los LARs se pierden durante la expulsión del DNA recién replicado. C) Modelo en el que los LARs se unen a la MN una vez que han sido duplicados. Tomado de Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010.

## DISCUSIÓN

### I. Determinación de los bucles estructurales en el locus de la familia albúmina

Debido a que los bucles estructurales de la cromatina están anclados a la MN presentan propiedades topológicas similares a las de las moléculas circulares de DNA, ya que sus extremos no pueden rotar al estar restringidos por el anclaje a la MN. Así, el estrés generado a lo largo de cada bucle estructural provoca que la doble hélice del DNA se enrolle sobre sí misma adquiriendo su típica conformación de hiperenrollamiento negativo (Calladine *et al.*, 2004). Al interior de la célula, el estrés torsional del DNA es manejado en parte por su interacción con las histonas y otras proteínas de asociación al DNA, lo cual produce un hiperenrollamiento negativo principalmente de tipo toroidal (Figura 31). Sin embargo, al extraer los nucleoides en presencia de altas concentraciones de sal, son eliminadas las histonas y diversas proteínas asociadas al DNA, por lo que el estrés torsional produce un hiperenrollamiento negativo de tipo plectonómico en los bucles estructurales de DNA desnudo (Figura 31).



**Figura 31. Hiperenrollamiento de los bucles de DNA.** A) Hiperenrollamiento negativo de tipo toroidal. Entre cada uno de los giros de la hélice de DNA se encuentran diversas proteínas asociadas (histonas principalmente). B) Hiperenrollamiento negativo de tipo plectonómico. Al eliminar las histonas y demás proteínas asociadas al DNA el hiperenrollamiento provoca que el bucle se entrecruce sobre sí mismo formando la estructura plectonómica.

En los nucleoides el DNA se mantiene en forma de bucles anclados a la MN y el hiperenrollamiento negativo se conserva, de tal forma que se observa un gradiente (Figura 18A) que va de menor en la parte más apical a un mayor hiperenrollamiento en la parte basal de los bucles (Calladine *et al.*, 2004). Considerando las propiedades topológicas del DNA anclado a la MN, un bucle estructural típico puede ser dividido en diferentes zonas topológicas en función de la cercanía relativa a la MN y al gradiente de hiperenrollamiento (Figura 18A). A pesar de que el grado de hiperenrollamiento se va incrementando hacia la base de los bucles, las regiones de anclaje permanecen relajadas, ya que se ha observado que las secuencias MARs pueden funcionar como amortiguadores del estrés torsional (Bode *et al.*, 1992; Benham *et al.*, 1997). Estas propiedades topológicas de los bucles de DNA generan un patrón diferencial de sensibilidad al corte por una endonucleasa inespecífica como la DNasa-I, cuya eficiencia es dependiente de la topología local del DNA. El hiperenrollamiento constituye una barrera contra la acción de la DNasa-I, ya que para hidrolizar la doble hélice del DNA, esta enzima realiza cortes de cadena sencilla (Lewin, 1980); por lo que para liberar un fragmento completo es necesario que se realicen dos cortes en sitios contiguos o muy cercanos. De esta manera, la sensibilidad a la DNasa-I de los nucleoides es inversamente proporcional a la proximidad relativa a la MN, debido al gradiente de hiperenrollamiento y al impedimento estérico de la MN que actúa como barrera física al corte de la enzima (Figura 18A).

Las propiedades topológicas de los bucles de DNA anclados a la MN en los nucleoides de células primarias permiten generar cinéticas trifásicas de digestión que son muy homogéneas y reproducibles, utilizando concentraciones limitadas de DNasa-I (Figura 21). Así que es factible establecer zonas topológicas relativas a la MN en función de las distintas fases de la cinética de digestión, tomando en consideración las pendientes entre los tiempos de digestión con DNasa-I (Tabla 2). En las cinéticas de digestión se observan tres fases; la primera define la zona topológica distal a la MN, ocurre durante los primeros 5 minutos y es la más rápida. En esta fase se elimina el DNA que se encuentra más lejano a la MN y que presenta un menor grado de hiperenrollamiento, que es la única barrera para la acción de la enzima. La segunda fase delimita la zona topológica proximal a la MN y ocurre durante los siguientes 10 minutos de la digestión con la DNasa-I; en esta fase la cinética es menos rápida debido a un mayor grado de hiperenrollamiento original del DNA y a la proximidad a la MN. Cabe mencionar que la introducción de cortes (“nicks”) en el DNA genera puntos de desenrollamiento que reducen en forma progresiva el hiperenrollamiento del bucle. Por lo tanto, las cinéticas de digestión trifásicas sólo son observables cuando se usan concentraciones limitadas de DNasa-I que son compatibles con una pérdida gradual del hiperenrollamiento. La tercer fase corresponde a la zona topológica muy cercana a la MN y es la más lenta pues dura 45 minutos; la cinética lenta se debe al hiperenrollamiento residual del DNA y, principalmente, a la cercanía a la MN que actúa como barrera física contra la acción de la DNasa-I.

Finalmente, existe una fracción de DNA que permanece unida a la MN incluso después de 60 minutos de digestión con DNasa-I. Esta fracción corresponde al DNA que se encuentra estrechamente asociado a la MN y que es relativamente insensible a la enzima, por lo que define la zona topológica que corresponde al DNA embebido dentro de la MN (Figura 21; Tabla 2).

Las cinéticas de digestión de los nucleoides de linfocitos B inactivos son mucho más rápidas que las de los nucleoides de hepatocitos y al final se obtiene un porcentaje significativamente menor ( $\leq 5\%$ ) de DNA embebido en la MN (Figura 21). Esta cinética de digestión acelerada puede deberse a interacciones menos estables entre el DNA y la MN en los linfocitos B inactivos, pues la MN de los linfocitos B inactivos parece ser menos densa; ya que el análisis en geles de poliacrilamida indica una menor cantidad de proteínas, principalmente de las láminas nucleares (A, B y C) comparada con la MN de los hepatocitos (Trevilla-García y Aranda-Anzaldo, en preparación).

Tomando en cuenta las cinéticas de digestión de los nucleoides de células primarias, desarrollamos un método para determinar la organización del DNA en bucles estructurales anclados a la MN. Todas las estrategias descritas previamente para la caracterización de la organización estructural de una región del genoma dependen de la identificación de los LARs y la deducción posterior del arreglo de los bucles anclados a la MN (Gombert *et al.*, 2003; Iarovaia *et al.*, 2004; Hair y Vassetzky, 2007; Kumar *et al.*, 2007). La estrategia experimental que desarrollamos permite determinar la organización estructural de cualquier región genómica con secuencia conocida, sin la necesidad de identificar los puntos de anclaje a la MN (LARs). El método está diseñado para la determinación de la configuración espacial de los bucles de DNA anclados a la MN, pero no para la identificación de los puntos de anclaje (LARs). De hecho, las propiedades intrínsecas de las secuencias con afinidad a la MN (MARs) no permiten su análisis por medio de esta técnica, ya que al contener trectos de nucleótidos A-T y secuencias repetitivas, no es posible el diseño de primers para este tipo de secuencias con base en los criterios establecidos para una amplificación eficiente (ver estrategia experimental).

Nuestra técnica se basa en principios topológicos elementales, que nos permiten establecer la configuración espacial de cualquier fibra flexible (DNA) en función de la posición de distintos puntos dentro de esta fibra relativa a un invariante de referencia posicional (Flegg, 2001). Así, considerando que el DNA es una fibra continua que se encuentra anclada en diferentes regiones a la MN, entonces al determinar las posiciones relativas a la MN de distintos puntos a lo largo de la fibra podemos establecer su organización topológica con respecto a la MN (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010).

Para determinar la organización estructural en bucles anclados a la MN es necesario establecer la posición relativa a la MN de distintas secuencias elegidas a intervalos regulares a lo largo de una región genómica de interés. Para ello, se obtienen muestras de nucleoides parcialmente digeridos con DNasa-I, que son utilizados para amplificar por PCR las secuencias blanco distribuidas a intervalos regulares dentro de la región genómica de interés y su posición es determinada con base en el patrón de amplificación en función del tiempo de digestión con DNasa-I (Figura 19).

Un aspecto importante para la determinación de las posiciones relativas a la MN mediante esta técnica es el tamaño de los amplicones, ya que se ha demostrado que el tamaño promedio de los fragmentos generados por el corte de nucleasas no específicas en hepatocitos de rata es de 0.8 Kb (Berezney y Buchholtz, 1981). Es por ello que los amplicones fueron diseñados con un tamaño menor a las 550 pb (Tabla 3), por lo que es más probable que sean eliminados como unidades completas durante la digestión con DNasa-I, evitando la generación de fragmentos truncos de las secuencias blanco. En este método las secuencias analizadas son registradas como positivas o negativas, para cada tiempo de digestión, en función de la presencia o ausencia de la señal del producto amplificado. La detección se llevó a cabo mediante el sistema de análisis de imagen digital Kodak 1D Image Analysis Software 3.5 (independientemente de la intensidad de la señal detectada), utilizando los parámetros estándar del programa.

Esta nueva técnica se utilizó para determinar *in vivo* la organización estructural de los bucles de DNA de la región genómica de 162 Kb del locus multigénico de la albúmina en hepatocitos primarios de rata. Esta región en el genoma de la rata es una de las mejor caracterizadas a nivel de secuencia, lo que nos permitió el diseño de amplicones de PCR distribuidos a distancias regulares dentro del locus (Figura 22). Las posiciones relativas a la MN de estos amplicones fue determinada de acuerdo al patrón de amplificación (Figura 24) en muestras de nucleoides de hepatocitos primarios. Considerando las posiciones topológicas relativas a la MN de las secuencias blanco (a-o) ubicadas a lo largo de la región de 162 Kb del locus multigénico de la albúmina (Tabla 5) y la secuencia lineal a nivel de nucleótidos, se estableció la organización estructural del locus en hepatocitos primarios de rata. La región se organiza en 5 bucles de DNA con un tamaño menor a las 40 Kb (Figura 26A), dicho tamaño corresponde a la mitad del tamaño del bucle promedio (80 Kb) en hepatocitos de rata (Berezney y Buchholtz, 1981). Mediante la técnica utilizada no es posible identificar los LARs directamente, pero sí permite determinar las zonas embebidas en la MN, por lo cual los puntos de anclaje deben estar cercanos a los amplicones *a, d, h, k, l* y *m* (Figura 26A).

El locus de la familia albúmina es uno de los ejemplos clásicos de agrupamientos génicos conservados, ya que contiene genes que derivan de la duplicación de un gen ancestral, su expresión es tejido-específica y regulada en función del desarrollo del hígado. Así, se ha observado que la principal proteína en el hígado fetal es la alfa-fetoproteína (*Afp*) y su expresión decae en las etapas postnatales, mientras que la expresión de albúmina (*Alb*) y afamina (*Afm*) se incrementa hasta alcanzar sus niveles máximos en el organismo adulto (Lazarevich, 2000; Jin *et al.*, 2009). Durante las etapas fetales la expresión de *Afp* y *Alb* es regulada por tres enhancers que se encuentran en la región intergénica entre estos genes; más tarde en el desarrollo, la expresión de albúmina se incrementa, se vuelve independiente de los enhancers intergénicos y es regulada por la acción de un enhancer específico de *Alb* que se encuentra de 8.5-10 Kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Lazarevich, 2000; Jin *et al.*, 2009).

La región de los enhancers intergénicos se encuentra entre los amplicones *c* y *d* y no está asociada con la MN en la rata adulta (Figura 26A). Esta posición de las secuencias reguladoras se confirmó por el mapeo de la secuencia que corresponde al Enhancer-1 (E1), el cual se localiza en la región proximal a la MN (Figura 32). Aún no se ha caracterizado el enhancer específico de *Alb* en la rata, pero el análisis *in silico* del locus de la rata en comparación con la secuencia del ratón, sugiere que este enhancer se encuentra 8.3 Kb río arriba del sitio de inicio de transcripción. Por lo que podría estar estrechamente asociado a la MN, ya que nuestros resultados sugieren la presencia de un LAR 5 Kb río arriba del amplicón *a* (Figura 26A). Entonces, el enhancer específico de albúmina estaría a 2 Kb de la región de anclaje a la MN, aunque esto debe de corroborarse experimentalmente. Estos resultados sugieren que la actividad de control de la expresión de las secuencias como los enhancers podría depender de su proximidad a la MN, ya que se ha observado en hepatocitos de rata que la expresión del gen de la triptófano-oxigenasa (también regulado en el desarrollo de la rata) depende de la interacción de un enhancer específico con la MN (Kaneoka *et al.*, 2009).



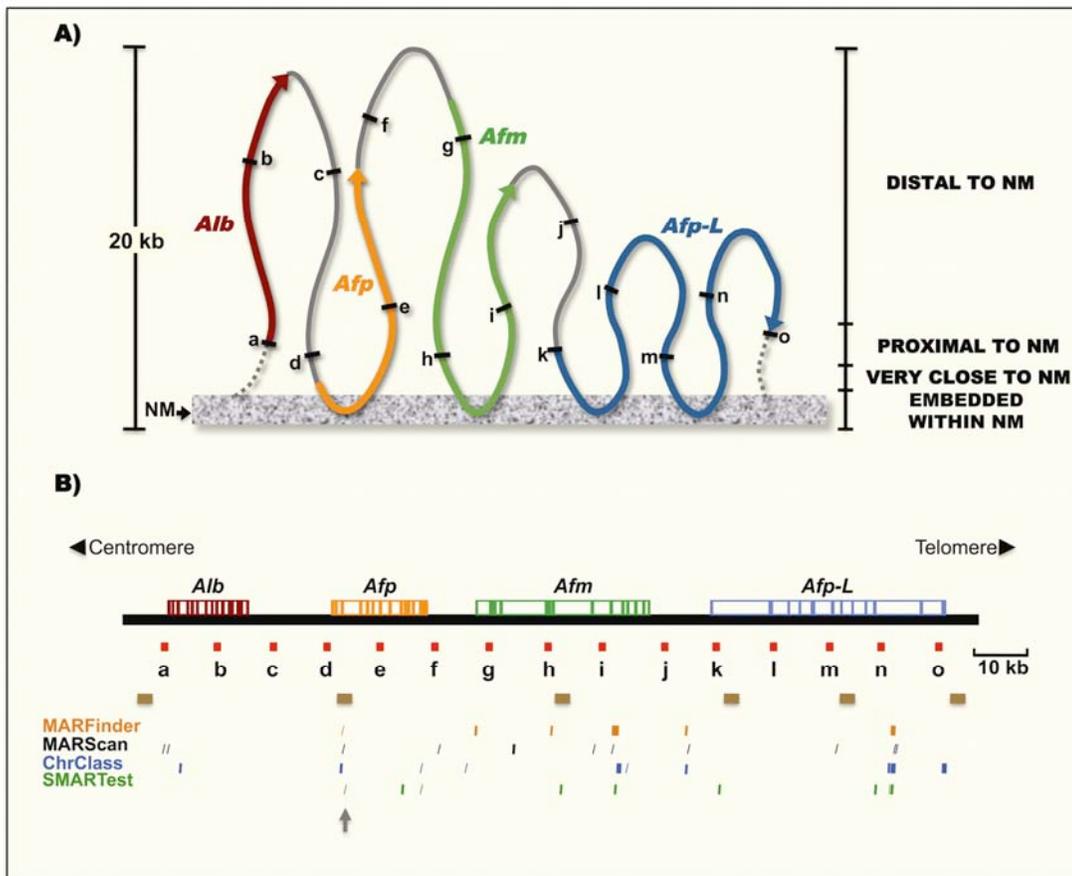
**Figura 32.** Mapeo de la posición relativa a la MN del enhancer-1 (E1) de *Afp*. Nucleoides de hepatocitos de rata fueron tratados con DNasa-I (0.5 U/ml) por diferentes tiempos. El DNA residual asociado a la MN fue usado directamente como templado para amplificar por PCR. C = control a los 0 minutos de digestión. Zonas topológicas con respecto a la MN: D = distal, P = proximal, VC = muy cercano, E = embebido dentro de la MN. (-) Control negativo (sin templado), (+) control positivo (DNA genómico puro). n = 3.

También se determinó la organización en bucles estructurales de la misma región en linfocitos B inactivos, con el objeto de establecer en forma comparativa la organización en bucles estructurales de este locus en células primarias que no expresan los genes de la familia albúmina. Para ello, se determinaron las posiciones relativas a la MN de los distintos amplicones estudiados (a-o), de acuerdo al patrón de amplificación (Figura 25) en muestras de nucleoides de linfocitos B inactivos. Considerando las posiciones topológicas relativas a la MN de las secuencias blanco (a-o) en linfocitos B inactivos (Tabla 6), se estableció la organización del locus en bucles anclados a la MN. En los linfocitos B inactivos la región de 162 Kb analizada se organiza en 14 pequeños bucles cuya longitud máxima es de 14 Kb (Figura 26B).

La organización diferencial de la región de 162 Kb del locus multigénico de la albúmina en hepatocitos y linfocitos B inactivos, sugiere que la arquitectura espacial de los bucles anclados a la MN puede ser determinante para establecer el potencial transcripcional de los genes. En los linfocitos B inactivos no se expresan los genes del locus de la familia albúmina (Trevilla-García y Aranda-Anzaldo, en preparación), y este locus se organiza en bucles muy pequeños (<14 Kb) anclados a la MN (Figura 26B). Se ha demostrado en linfocitos B que genes que se encuentran muy distantes entre sí, e incluso en cromosomas distintos, pueden ser transcritos en la misma fábrica de transcripción (Osborne *et al.*, 2004; Osborne *et al.*, 2007; Schoenfelder *et al.*, 2010), lo que implica el movimiento dinámico de estas secuencias génicas hacia fábricas de transcripción compartidas para poder ser transcritas. Por lo tanto, la organización de este locus en bucles muy pequeños (Figura 26B) restringe el movimiento de los genes que se encuentran estrechamente asociados a la MN y esto podría evitar su migración hacia las fábricas de transcripción contribuyendo al silenciamiento estable de los genes (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010).

Nuestros resultados indican que los MARs potenciales, identificados mediante los algoritmos de predicción, no corresponden a los puntos de anclaje (LARs) a la MN. Los MARs potenciales identificados *in silico* no coinciden entre los diferentes programas, lo cual puede deberse a los diferentes criterios para la búsqueda de secuencias con afinidad a la MN. Los resultados experimentales del mapeo topológico sugieren la presencia de LARs cerca de los amplicones *a*, *d*, *h*, *k*, *m* y *o*; sin embargo, los programas únicamente identifican consistentemente una región cercana al amplicón *d* como MAR potencial. Además, todos los programas detectan secuencias de anclaje potenciales en regiones del locus que se encuentran en la zona distal a la MN, por lo que no se encuentran ancladas a la MN en hepatocitos (Figura 33). Más aún, en los linfocitos B inactivos se observa un mayor número de bucles (Figura 26), por lo que un mayor número de MARs potenciales forma anclajes reales (LARs). No obstante, los programas de predicción no detectan MARs cercanos a los amplicones *b* y *c* (Figura 33), a pesar de que estas secuencias se encuentran estrechamente asociadas a la MN (Figura 26).

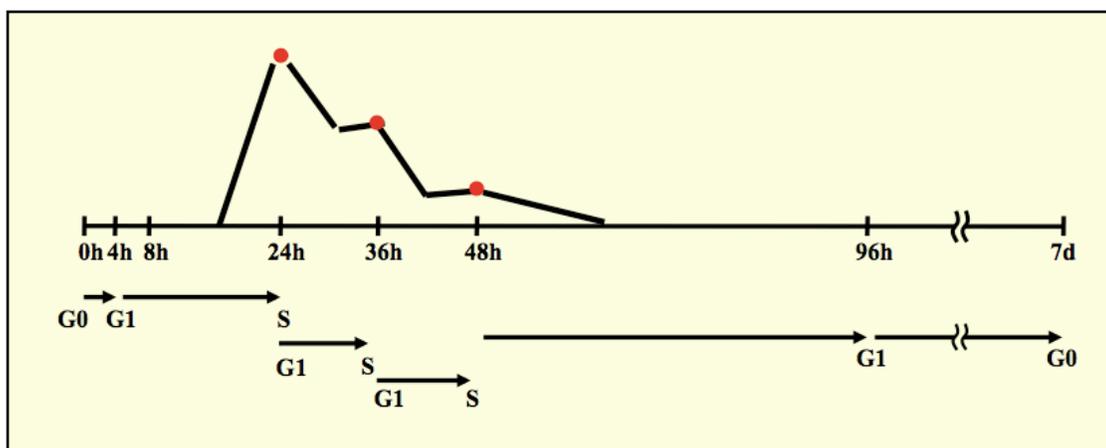
Esto sugiere que existen secuencias MARs que no son detectadas por ninguno de los programas de predicción disponibles. Nuestros resultados indican que los algoritmos de predicción carecen de utilidad en la identificación de regiones de anclaje a la MN en ausencia de datos experimentales concretos. Esto es consistente con reportes recientes que indican que una simple regla A-T es suficiente para identificar MARs potenciales y que ningún algoritmo de predicción de MARs existente es confiable (Evans *et al.*, 2007).



**Figura 33.** Comparación entre la localización de las secuencias embebidas en la MN determinadas experimentalmente con la localización de los MARs potenciales identificados mediante los programas de predicción. A) Organización estructural de la región de 162 Kb estudiada, determinada experimentalmente en hepatocitos. Las regiones de anclaje (LARs) deben estar localizadas dentro de las regiones embebidas en la MN. B) Se indica la posición de los LARs inferida de acuerdo a los datos experimentales (rectángulos cafés) debajo de las secuencias blanco utilizadas para mapear su posición relativa a la MN (cuadros rojos marcados con las letras a-o). Las líneas pequeñas en color naranja, negro, azul y verde indican la posición de los MARs potenciales de acuerdo a la predicción realizada por los cuatro programas utilizados. La flecha indica la ubicación del único MAR potencial detectado por los cuatro programas que parece coincidir con el posible LAR inferido de los datos experimentales. Nótese que todos los programas predicen de manera inconsistente MARs potenciales en regiones del bucle que se encuentran lejanas a la MN en hepatocitos.

## II. Análisis de la organización estructural del DNA durante la replicación

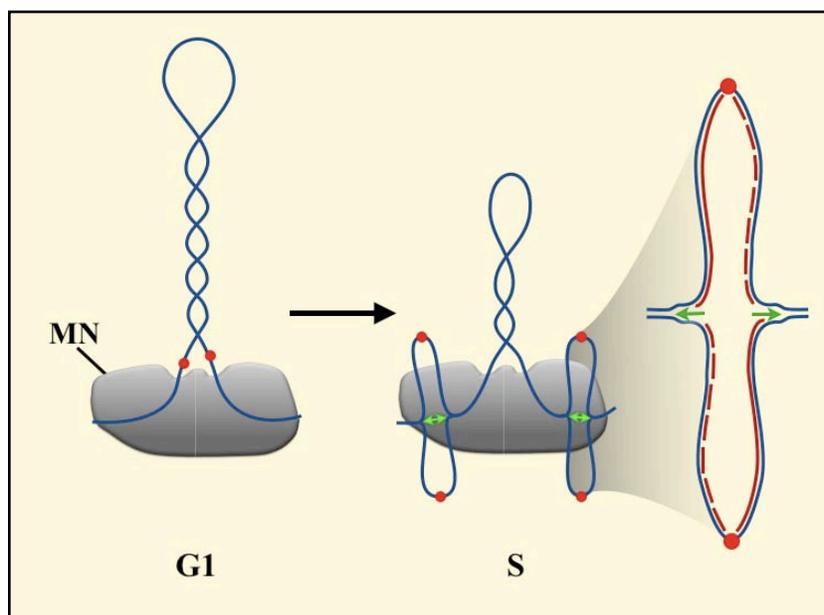
Una vez caracterizada la estructura del locus de la familia albúmina de la rata en bucles anclados a la MN, se analizaron los cambios en esta organización durante la regeneración hepática para determinar el papel del arreglo del DNA con respecto a la MN en el proceso de la replicación del material genético. Durante la regeneración hepática se observa que cerca del 97% de los hepatocitos remanentes entran en fase G1 de manera sincronizada (Fabrikant, 1968; Sigal *et al.*, 1995; Sigal *et al.*, 1999) y a las 24 h post-hepatectomía (Figura 34) alcanzan el punto máximo de síntesis de DNA; es decir, están sincronizadas en la fase S (Fabrikant, 1968; Berezney y Buchholtz, 1981; Smith y Berezney, 1983). Después de un ciclo celular aún no se recupera la masa celular hepática, por lo que existen dos picos más de síntesis de DNA a las 36 y 48 h post-hepatectomía (Figura 34). Sin embargo, en estos picos únicamente una pequeña fracción de los hepatocitos remanentes vuelve a proliferar, por lo que a las 36 y 48 h post-hepatectomía los hepatocitos están divididos en subpoblaciones que se encuentran en distintos puntos del ciclo celular (Michalopoulos y DeFrances, 1997; Michalopoulos, 2007). La estrategia que desarrollamos en el presente trabajo permite la determinación de la organización estructural del DNA con respecto a la MN (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010), pero requiere del análisis de las posiciones de distintas secuencias a lo largo de la región de estudio en poblaciones celulares homogéneas. Por ello decidimos examinar la organización de la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina en hepatocitos extraídos a las 24 h y a los 7 D post-hepatectomía parcial, tiempos a los que contamos con poblaciones celulares homogéneas en la fase de síntesis de DNA y de regreso a la fase de quiescencia (G0) respectivamente.



**Figura 34.** Dinámica del ciclo celular de los hepatocitos durante la regeneración hepática. En la parte superior se muestran los picos máximos de síntesis del DNA (medido por incorporación del marcaje) en función del tiempo posterior a la hepatectomía parcial. En la parte inferior se indican las fases del ciclo celular en las que se encuentran los hepatocitos remanentes posterior a la hepatectomía parcial.

El tratamiento de los nucleoides de hepatocitos con concentraciones limitadas de DNasa-I (0.5 U/ml) durante la regeneración hepática, produce cinéticas de digestión muy reproducibles que constan de tres fases (Figura 27). En los hepatocitos proliferantes (PHx-24h), la cinética de digestión con DNasa-I de los nucleoides de hepatocitos es más rápida y elimina una mayor cantidad de DNA que en los nucleoides de hepatocitos en G0 (Figura 27). Durante la primer fase de la digestión con DNasa-I (primeros 5 minutos), en la que se elimina el DNA de la zona distal a la MN, se observa una cinética muy rápida que elimina cerca del 70 % del DNA total (Figura 27B). Esto sugiere que a las 24 h post-hepatectomía se reduce el grado de hiperenrollamiento de los bucles anclados a la MN, lo cual podría deberse al proceso de síntesis del DNA. Durante la replicación el DNA es desenrollado por medio de la acción de las helicasas para permitir su duplicación, generando un menor grado de hiperenrollamiento y ocasionando que el DNA sea más accesible al corte por la enzima. Además, la cantidad del DNA residual al término de la digestión con DNasa-I (después de 60 minutos) corresponde a cerca de la mitad de la que se obtiene a partir de los nucleoides control en G0 (Figura 27). El incremento en la sensibilidad del DNA asociado a la MN en nucleoides de células en fase S ha sido descrito previamente (Berezney y Buchholtz, 1981; Aranda-Anzaldo, 1992; Aranda-Anzaldo, 1998) y podría ser causado por la presencia de regiones de cadena sencilla en el DNA, las cuales son generadas durante el proceso de replicación en la cadena rezagada (Cook, 1991). Debido a que la replicación ocurre en complejos macromoleculares organizados sobre la MN, entonces las regiones de cadena sencillas de las horquillas de replicación estarían estrechamente asociadas con la MN y generarían un mayor grado de sensibilidad a la DNasa-I (Figura 35); ya que se ha observado que el DNA de cadena sencilla es cortado con mayor facilidad por la DNasa-I (Simon *et al.*, 1971).

El proceso de regeneración hepática termina a los 7 días post-hepatectomía (PHx-7D), cuando los hepatocitos regresan a la quiescencia (G0) y la función del hígado se recupera (Michalopoulos y DeFrances, 1997; Michalopoulos, 2007). En este punto (PHx-7D), la cinética de digestión con DNasa-I de los nucleoides de hepatocitos es muy similar a la de los hepatocitos control (de ratas sin hepatectomizar) y las pendientes entre cada punto de digestión son muy parecidas (Figura 27). Asimismo, la cantidad de DNA residual final después de 60 minutos de digestión es prácticamente la misma que en los nucleoides de hepatocitos control (Figura 27). Estos resultados indican que los nucleoides de hepatocitos obtenidos a los 7 días post-hepatectomía presentan una sensibilidad a la DNasa-I comparable con los nucleoides de hepatocitos control (de ratas sin hepatectomizar) y sugieren que la organización topológica global del DNA con respecto a la MN también se restablece al finalizar el proceso de regeneración hepática.



**Figura 35.** Cambios en la organización del DNA con respecto a la MN durante la replicación. En G1 se observa un bucle de DNA anclado a la MN. En la fase S, la replicación inicia a partir de los orígenes de replicación (círculos rojos) de manera bidireccional, generando nuevos bucles con las cadenas que están siendo sintetizadas. Las cadenas parentales se muestran en azul y las nacientes en rojo. Nótese la presencia de regiones de cadena sencilla en la cadena rezagada que está siendo replicada.

Las muestras de los nucleoides de hepatocitos parcialmente digeridos se utilizaron para determinar la posición relativa a la MN de los distintos amplicones (a-o) diseñados a lo largo de la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina (Figura 28). Además, utilizando la estrategia diseñada para establecer la organización estructural del DNA con respecto a la MN (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010), analizamos las posiciones de los distintos amplicones (a-o) dentro de la región genómica de estudio en muestras de nucleoides extraídos a partir de hepatocitos control (en G0), PHx-24h (en fase S) y PHx-7D (cuando regresan a G0). Para determinar si existen cambios en la organización de esta región de 162 Kb con respecto a la MN durante la regeneración hepática, se analizaron las posiciones de los amplicones (a-o) tomando como referencia las zonas topológicas definidas por la cinética de digestión de los nucleoides de hepatocitos control de ratas sin hepatectomizar (Tabla 9). Al establecer las posiciones de los amplicones (a-o) con respecto a la MN durante la regeneración hepática, en función de las zonas topológicas control (G0), es posible determinar la magnitud de los cambios en la organización de la región de estudio. Así, se encontró que la mayoría de las secuencias blanco se acercan a la MN durante el pico máximo de síntesis del DNA (a las 24 h post-hepatectomía). Por lo que nuestros resultados sugieren que la replicación del DNA ocurre sobre la MN y requiere del acercamiento del DNA a esta subestructura.

Estos resultados son consistentes con observaciones previas que mostraron el acercamiento a la MN de diversas secuencias génicas durante la replicación del DNA (Maya-Mendoza *et al.*, 2003). Además, existen evidencias que sugieren que la duplicación del genoma de los eucariontes ocurre en grandes complejos macromoleculares denominados fábricas de replicación, que se encuentran en sitios fijos organizados sobre la MN (Hozak *et al.*, 1993; Jackson y Pombo, 1998; Dimitrova y Berezney, 2002; Anachkova *et al.*, 2005). El movimiento del DNA hacia la MN durante la fase de síntesis del DNA (PHx-24h) parece constituir un requisito indispensable para la duplicación del genoma; ya que las secuencias control (*Fyn*, *CD23*, *GFAP* y *MPZ*), ajenas al locus de la familia albúmina, también presentan cambios en su posición con respecto a la MN durante la regeneración del hígado. A las 24 h post-hepatectomía todas las posiciones de las secuencias control (*Fyn*, *CD23*, *GFAP* y *MPZ*) cambian hacia zonas topológicas más cercanas a la MN (Figura 29 y Tabla 11).

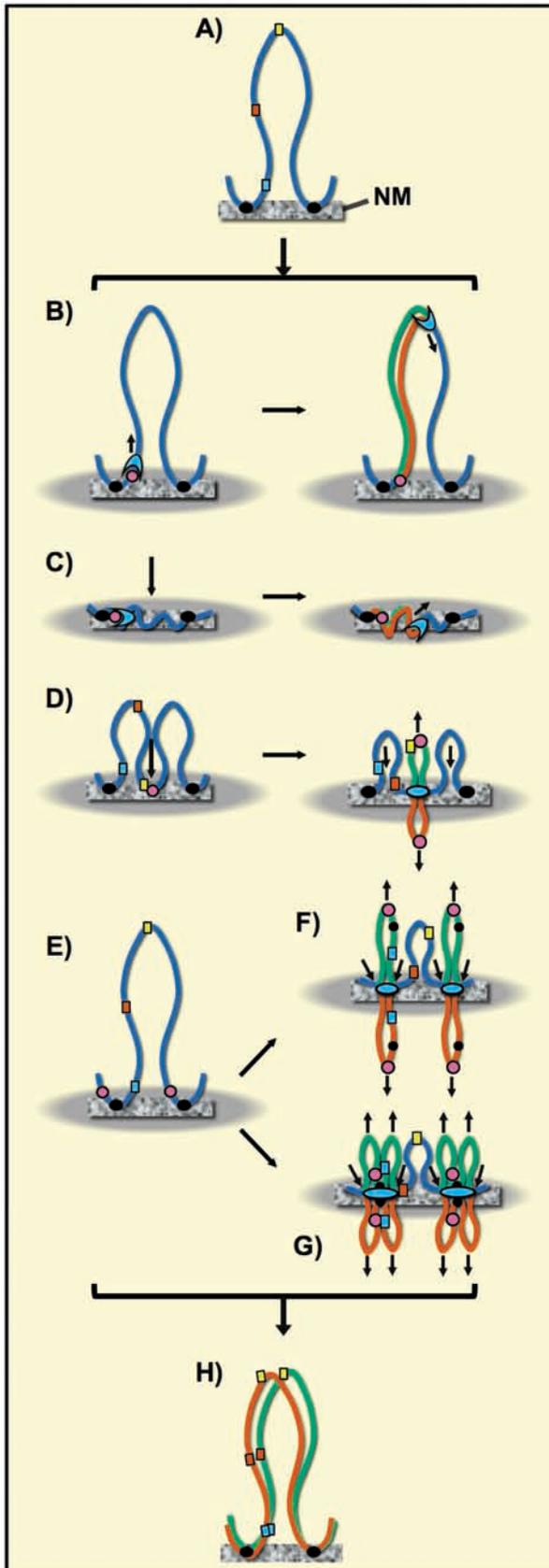
El acercamiento del DNA a la MN se observa únicamente durante la fase de síntesis de DNA, ya que el patrón de amplificación a los 7 D post-hepatectomía sugiere que las distintas secuencias de la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina (a-o) regresan a su posición original relativa a la MN (Figura 28 y Tabla 9). La recuperación de las posiciones originales con respecto a la MN, al finalizar la regeneración del hígado (PHx-7D), también se observa en los amplicones de las secuencias control ubicadas fuera del locus de la familia albúmina (Figura 29 y Tabla 11). Los cambios en las posiciones relativas a la MN de las secuencias analizadas, son consistentes con resultados previos que demostraron la aproximación hacia la MN de distintas secuencias distribuidas al azar en el genoma de la rata; este acercamiento ocurre durante la fase de síntesis del DNA y una vez que las células regresan a la quiescencia, las secuencias génicas regresan a sus posiciones originales (Maya-Mendoza *et al.*, 2003; Maya-Mendoza *et al.*, 2004).

Se ha observado que existe una correlación entre el tamaño promedio de los bucles y el tamaño típico de los replicones de acuerdo a la especie (Buongiorno-Nardelli *et al.*, 1982), lo que sugiere que los bucles anclados a la MN podrían constituir las unidades funcionales de replicación en eucariontes superiores; es decir, que cada bucle corresponde a un replicón (Marilley y Buongiorno-Nardelli, 1984; Mechali, 2001; Razin, 2001). De esta manera, se ha propuesto que la organización de la cromatina con respecto a la MN constituye la base estructural sobre la que se llevan a cabo los mecanismos de duplicación del genoma (Anachkova *et al.*, 2005; Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2008).

Se han planteado diferentes modelos para explicar el mecanismo de duplicación del DNA. Los modelos clásicos indican que la maquinaria de replicación se mueve sobre los templados mientras van sintetizando las nuevas cadenas (Alberts *et al.*, 2002). Sin embargo, modelos recientes sugieren que las polimerasas permanecen fijas y que es el templado el que se mueve hacia la maquinaria de replicación mientras que el DNA recién sintetizado va siendo expulsado fuera de ésta (Cook, 1999; Cook, 2001).

Considerando la organización del DNA al interior del núcleo en bucles anclados a la MN, existen diferentes modelos posibles para el mecanismo general de replicación del genoma (Figura 36). Estos modelos pueden agruparse en dos tipos principales: los modelos de encarrilamiento y los modelos de tipo carrete. Los modelos de encarrilamiento establecen que las DNA polimerasas sintetizan las cadenas nacientes mientras se mueven sobre los templados. El modelo más simple de encarrilamiento implica el movimiento de la maquinaria de replicación hasta completar la longitud completa de un bucle de DNA, comenzando en el origen de replicación (Figura 36B). Sin embargo, al marcar el DNA recién sintetizado se ha demostrado que la replicación ocurre en sitios discretos al interior del núcleo (Jackson y Pombo, 1998), los cuales permanecen fijos por su asociación a la MN (Berezney y Buchholtz, 1981; Smith *et al.*, 1984; Tubo y Berezney, 1987; Tubo *et al.*, 1987; Nakayasu y Berezney, 1989; Hozak *et al.*, 1993; Berezney y Wei, 1998). Considerando el tamaño de los focos de replicación, es posible que las polimerasas presenten un movimiento restringido dentro del espacio confinado en los focos de replicación. Por lo tanto, la duplicación del DNA podría llevarse a cabo por un encarrilamiento restringido de las polimerasas (Figura 36C).

Los modelos de tipo carrete sugieren que el DNA es el que se mueve a través de la maquinaria de replicación para ser duplicado y que las polimerasas permanecen fijas sobre la MN. Considerando que cada bucle estructural corresponde a un replicón existen distintas maneras de explicar la replicación mediante un mecanismo de tipo carrete. Uno de los modelos establece que cada bucle estructural anclado a la MN contiene un origen de replicación en la parte apical del bucle; durante la replicación el origen de replicación se asocia a la MN y la duplicación del bucle parental comienza a partir de este punto de manera bidireccional (Figura 36D). Al ser replicado el bucle parental las cadenas que están siendo sintetizadas son expulsadas de la maquinaria de replicación que se encuentra ensamblada sobre la MN (Anachkova *et al.*, 2005; Ottaviani *et al.*, 2008). Sin embargo, existen evidencias de que los orígenes de replicación (*ori*) se ubican próximos a los puntos de anclaje a la MN (LARs) y no en la parte apical del bucle (Ortega y DePamphilis, 1998; Razin, 2001; Ottaviani *et al.*, 2008). Por lo tanto, la replicación de los bucles de DNA debe comenzar en sitios muy cercanos a los LARs y de ahí deben empezar a expulsarse las cadenas recién sintetizadas de DNA (Figura 36E). No obstante, aún no se ha establecido si los LARs son expulsados después de ser replicados en las cadenas nacientes (Figura 36F), o bien, si se asocian a la MN inmediatamente después de que han sido duplicados (Figura 36G). El arreglo espacial de los bucles estructurales podría conservarse mediante el anclaje de los LARs a la MN inmediatamente después de su replicación; así, se mantendría la organización superior del DNA dentro del núcleo (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2008).

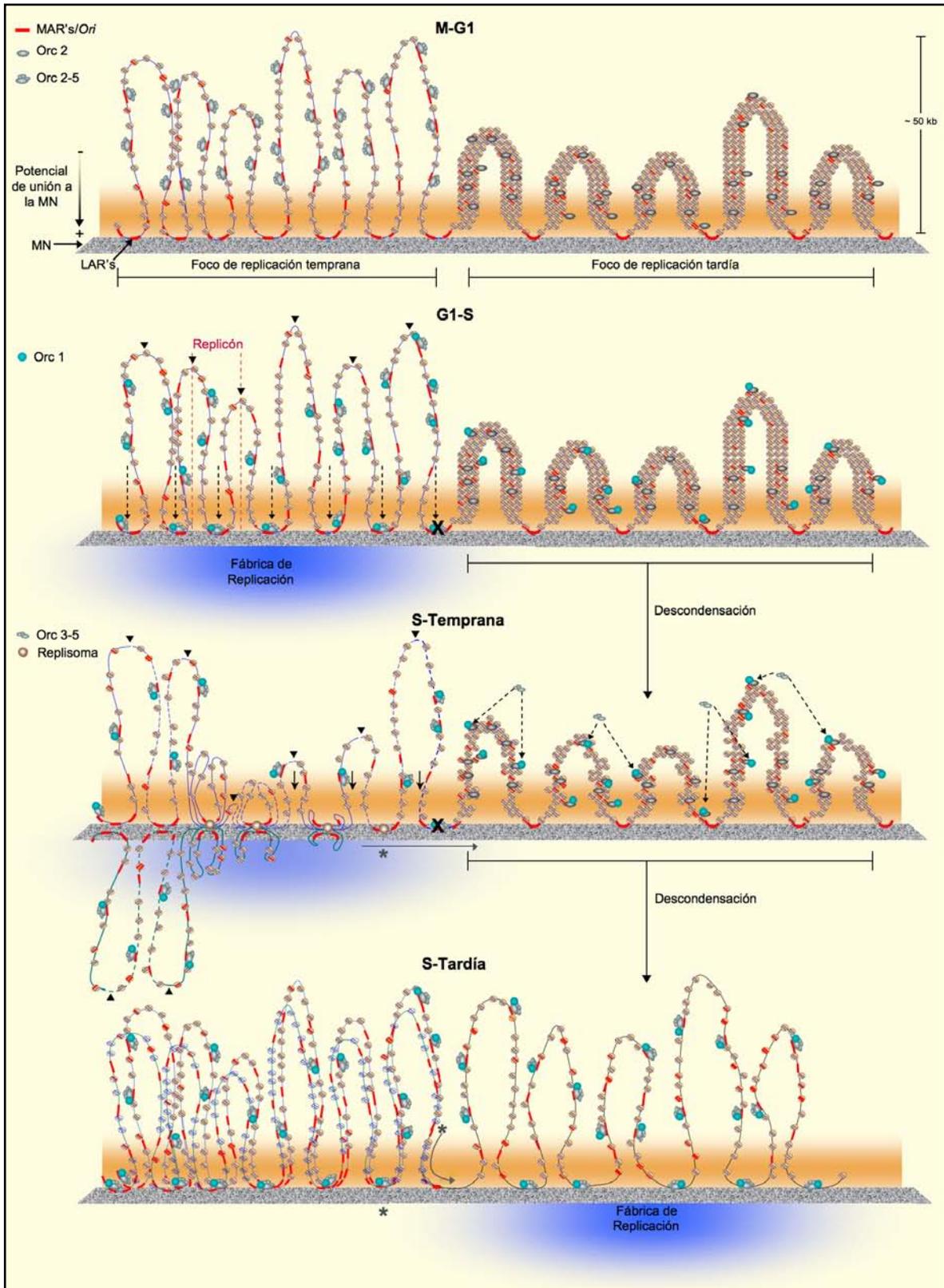


**Figura 36.** Posibles mecanismos de replicación de los bucles de DNA anclados a la MN. A) Bucles de DNA anclados a la MN (línea azul) por secuencias LARs (puntos negros) con diferentes secuencias génicas (cuadros azul, naranja y amarillo). B) Modelo de *encarrilamiento* de la replicación en el que el complejo de replicación (azul claro) se une al origen de replicación (círculo púrpura) y se mueve sobre el templado para sintetizar las nuevas cadenas (líneas naranja y verde). C) Modelo de *encarrilamiento restringido* en el que los bucles de DNA colapsan sobre la MN para ser duplicados dentro de la fábrica de replicación (óvalo gris). La maquinaria de replicación (azul claro) podría moverse sobre el templado dentro del espacio restringido de la fábrica de replicación. D-G Modelos tipo *carrete* de la replicación en los que el complejo de replicación (azul claro) permanece fijo sobre la MN y el DNA se mueve hacia éste mientras las nuevas cadenas se van expulsando hacia fuera (líneas naranja y verde). D) El origen de replicación (círculo púrpura) se encuentra en la parte apical del bucle, por lo que el inicio de la replicación divide al bucle parental por la mitad. E-G La replicación comienza en los orígenes de replicación (círculos púrpura) que se encuentran próximos a los LARs (círculos negros). F) La replicación comienza cerca de los LARs y el DNA recién sintetizado es expulsado de la maquinaria de duplicación llevándose consigo los LARs (puntos negros); los cuales se reestablecerían hasta la culminación de la replicación. En este caso se formarían cuatro nuevos bucles. G) Igual que en (F), pero una vez que los LARs han sido replicados, éstos se asocian de nuevo con la MN, por lo que la nuevas cadenas de DNA (líneas naranja y verde) generarían ocho nuevos bucles. H) Final de la replicación en la que se observa el bucle duplicado con la configuración espacial original.

Durante la replicación, el genoma de los eucariontes se replica siguiendo un patrón temporal regulado durante la fase S, la cual puede dividirse al menos en dos períodos, durante la primera mitad se replican las regiones de la cromatina ricas en genes que normalmente son abiertas (eucromatina), mientras que la heterocromatina se replica en la fase S tardía (Berezney *et al.*, 2000; Woodfine *et al.*, 2004). Es por ello que existe la formación de focos de replicación temprana y focos de replicación tardía. Con base en el tamaño de cada foco de replicación y la intensidad del marcaje, se sugiere que cada uno debe contener aproximadamente 1 Mb de DNA y por lo tanto al menos 6 replicones (Nakamura *et al.*, 1986; Ma *et al.*, 1998; Berezney *et al.*, 2000).

Considerando estas evidencias experimentales, se ha planteado un modelo de la replicación basado en los mecanismos de tipo carrete. En este modelo la replicación podría iniciarse en agrupamientos de bucles relajados (eucromatina) que pueden constituir un foco de replicación temprana; mientras que los agrupamientos de heterocromatina podrían (Figura 37) formar focos de replicación de la fase S tardía (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2008). La replicación inicia en regiones muy próximas a los LARs y se lleva a cabo bidireccionalmente, por lo que cada replicón abarca de la punta de un bucle a la punta del siguiente (Figura 37 G1-S). El tamaño distinto de los bucles explicaría las diferencias encontradas en el tamaño de las horquillas de algunos replicones (Berezney *et al.*, 2000). Durante la replicación, los puntos de anclaje (LARs) se asocian a la MN después de que han sido duplicados lo que permitiría conservar el arreglo espacial original de los bucles estructurales. Además, los sitios de arranque de la replicación ubicados en puntos de transición entre la eucromatina y la heterocromatina pueden bloquearse durante el disparo del foco temprano (“X” en la Figura 37).

**Figura 37.** Modelo de la replicación de los metazoarios (siguiente página). Se representan dos agrupamientos de replicones que forman los focos de replicación temprana y tardía. En el foco de replicación temprana se representan bucles de eucromatina; mientras que en el de replicación tardía se muestran bucles de DNA más condensados que simbolizan la heterocromatina. Asimismo, se esquematiza la configuración de los bucles y sus interacciones con la maquinaria de replicación en diferentes periodos del ciclo celular; de la salida de la mitosis hasta G1 temprana (M-G1), de G1 tardía hasta el límite G1/S (G1-S), y durante diferentes tiempos de la fase S (S-Temprana y S-Tardía). Los triángulos negros señalan las puntas de los bucles. En cada foco de replicación los replicones disparan de manera sincronizada; sin embargo, con el objeto de ejemplificar el proceso de síntesis del DNA se representan diferentes tiempos de síntesis para cada bucle durante la fase S-Temprana en el foco de replicación temprana. (X), sitio de inicio de la replicación bloqueado por la presencia de la heterocromatina; (\*) sitio de inicio cuya elongación replicará la región de transición entre la eucromatina y heterocromatina. Tomado de Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2008 (Anexo II).



Al terminar la duplicación de los bucles del foco de replicación temprana, la fábrica de replicación se desensambla y sus componentes se establecen en una nueva fábrica que duplicará al grupo de bucles de heterocromatina (Figura 37 S-Temprana/S-Tardía). Esto debido a que existen evidencias del ensamble y desensamble de las fábricas de replicación, así como de la formación de nuevas fábricas en los agrupamientos de replicones adyacentes (Leonhardt *et al.*, 2000; Somanathan *et al.*, 2001; Sporbert *et al.*, 2002; Sadoni *et al.*, 2004). La descondensación de la heterocromatina puede ocurrir en forma gradual durante la replicación de la eucromatina (Figura 37 S-Temprana/S-Tardía). El sitio de inicio de la replicación que permanecía bloqueado en el punto de transición de la eucromatina y heterocromatina, (“X” en la Figura 37) puede ser replicado por la elongación de una de las horquillas del foco de replicación temprana adyacente (\* en la Figura 37), por lo que sería mucho más larga que la otra (Figura 37 S-Tardía). Esto explicaría la observación de horquillas asimétricas, así como la presencia de horquillas activas durante toda la fase S (Ermakova *et al.*, 1999).

Utilizando el método para la determinación de la organización estructural del DNA con respecto a la MN aquí descrito (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010), es posible analizar los cambios en las posiciones de las distintas secuencias (a-o) a lo largo de la región genómica de estudio, durante la replicación. Además, considerando el tipo de movimientos de estas secuencias durante la fase S, es factible determinar si la replicación ocurre por medio del encarrilamiento de las polimerasas; o bien, por medio de movimiento secuencial del DNA hacia la MN en un modelo de tipo carrete. Si la replicación del DNA ocurre mediante un mecanismo de encarrilamiento simple, no deben existir cambios en las posiciones de distintas secuencias a lo largo del bucle (Figura 36B). Si existe un mecanismo de encarrilamiento restringido, todas las secuencias a lo largo de un bucle de DNA deben asociarse de manera estrecha a la MN durante la replicación, sin importar su posición específica dentro del bucle (Figura 36C).

Por otro lado, si la duplicación del genoma se lleva a cabo por medio de un mecanismo de tipo carrete, se deben observar cambios secuenciales en las posiciones de distintas secuencias a lo largo de un bucle de DNA (cuadros azul, naranja y amarillo en la figura 36D-G). Si los orígenes de replicación se encuentran en la parte apical de los bucles estructurales, entonces debemos observar un cambio radical en las posiciones de las secuencias más apicales del bucle (cuadro amarillo) debido a su asociación con la MN; además, las regiones estrechamente asociadas a la MN (cuadro azul) no cambiarían su posición, ya que siempre permanecerían en posiciones muy cercanas a la MN (Figura 36D). En contraste, si los orígenes de replicación se encuentran cercanos a los puntos de anclaje a la MN (LARs), se deben observar cambios secuenciales en todas las regiones a lo largo de un bucle estructural (cuadros azul, naranja y amarillo). En este caso se observaría un acercamiento progresivo hacia la MN en el que se respetaría el orden de las secuencias a lo largo de un bucle de DNA (Figura 26E-G).

Para establecer las posiciones precisas de los amplicones (a-o) con respecto a la MN durante la fase de síntesis del DNA (PHx-24 h) y posterior a la regeneración hepática (PHx-7 D), se consideraron las zonas topológicas relativas a la MN definidas por las cinéticas de digestión específicas para cada clase de nucleoides de hepatocitos (Tabla 10). De esta manera, es posible determinar la organización de la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina durante la fase de replicación del DNA (PHx-24h) y cuando los hepatocitos retornan a la quiescencia (PHx-7D). El análisis de estas posiciones corrobora la tendencia al acercamiento hacia la MN de la mayoría de las secuencias estudiadas durante la replicación del DNA (Tabla 10). Además, el análisis de las posiciones de los amplicones control (*Fyn*, *CD23*, *GFAP* y *MPZ*) confirma el movimiento de las secuencias hacia la MN durante la replicación del DNA (Tabla 11).

En el caso de los nucleoides de hepatocitos extraídos a los 7 D post-hepatectomía (PHx-7 D), se observó que todas las secuencias analizadas en la región del locus de la familia albúmina (a-o) regresan a su posiciones originales una vez que ha concluido la regeneración hepática (Tabla 10). Debido a que las cinéticas de digestión de los nucleoides de hepatocitos PHx-7D son muy similares a las de los hepatocitos control (G0), las zonas topológicas relativas a la MN corresponden a los mismos porcentajes de DNA residual. Es por ello que no existen diferencias en las posiciones de las secuencias obtenidas en función de las zonas topológicas de los hepatocitos control (Tabla 9); o bien, al considerar la cinética de digestión específica para los nucleoides de hepatocitos a los 7 D post-hepatectomía (Tabla 10). Estos resultados confirman que la organización estructural de la región de 162 Kb del locus multigénico de la familia albúmina es restablecida al término de la regeneración hepática. Además, los resultados sugieren que la organización topológica global del DNA al interior del núcleo es restaurada, una vez que las células han regresado a la quiescencia, ya que las posiciones originales de las secuencias control (*Fyn*, *CD23*, *GFAP* y *MPZ*) también son restablecidas (Tabla 11).

El análisis detallado de las posiciones de los amplicones (a-o) de la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina (Tabla 10), revela que la mayoría de las secuencias blanco (**b**, **d**, **e**, **f**, **h**, **i**, **j**, **k**, **l**, **n** y **o**) se aproximan a la MN durante la fase de replicación del DNA (PHx-24 h). Los patrones de amplificación de las secuencias analizadas (a-o) presentaron pequeñas variaciones en experimentos realizados con animales independientes; por ello las posiciones fueron registradas en función del mayor número de repeticiones consistentes (Tabla 10). Estas pequeñas variaciones (indicadas por los asteriscos en la Tabla 10), sugieren que las secuencias analizadas podrían encontrarse en regiones cercanas a la frontera entre dos zonas topológicas distintas. Sin embargo, las posiciones de los amplicones relativas a la MN son altamente reproducibles entre experimentos diferentes, utilizando animales distintos y las variaciones observadas son mínimas. Esto indica que las fluctuaciones en la organización de los bucles de DNA son muy limitadas.

Las secuencias **b**, **e**, **f**, **i**, **j**, **l** y **n**, que se observan en posiciones distales a la MN en los hepatocitos control (G0), cambian a la región proximal relativa a la MN en hepatocitos proliferantes (PHx-24h). En el caso de los amplicones **d**, **h**, **k**, y **o**, normalmente se encuentran en la zona proximal (en G0) y se aproximan a la zona muy cercana a la MN durante la fase de síntesis de DNA (PHx-24h). Estos resultados sugieren un acercamiento de tipo secuencial hacia la MN durante la replicación del DNA, ya que encontramos que la mayoría de las secuencias (**b**, **d**, **e**, **f**, **h**, **i**, **j**, **k**, **l**, **n** y **o**) se aproximan a la MN de manera progresiva y respetando el orden en el que se encontraban en los hepatocitos control (Tabla 10). En contraste, las secuencias **a**, **c**, **g** y **m** permanecen en las mismas posiciones tanto en los nucleoides de hepatocitos control (G0) como en los de hepatocitos proliferantes a las 24 h post-hepatectomía (Tabla 10). En el caso de las secuencias blanco **a** y **m**, se observa que permanecen en la zona topológica proximal a la MN, mientras que las secuencias **c** y **g** permanecen en la zona distal a la MN (Tabla 10). Estos resultados sugieren que las secuencias **a** y **m** son las primeras en replicarse, debido a su cercanía a la MN, y por ello a las 24 h post-hepatectomía ya han sido duplicadas; mientras que las secuencias **c** y **g** se encuentran en las zonas más distales a la MN, por lo que son las últimas regiones en duplicarse.

Nuestros resultados indican que el mecanismo de replicación no se lleva a cabo mediante el encarrilamiento de las polimerasas sobre el DNA templado, ya que observamos movimientos en las posiciones de las distintas secuencias analizadas (Tablas 10 y 11). Además, el tipo de movimientos hacia la MN de las distintas secuencias (a-o) de la región genómica estudiada descarta también el mecanismo de encarrilamiento restringido, ya que se observa un movimiento de tipo secuencial y no el colapso de los bucles completos. Además, el hiperenrollamiento y el coeficiente de deformación del DNA dependiente de su típica longitud de persistencia (*persistence length*) confieren una rigidez intrínseca a los bucles de DNA (Calladine *et al.*, 2004), por lo que el colapso de los bucles sobre la MN implicaría costos energéticos muy elevados.

En cambio, nuestros resultados apoyan los mecanismos de replicación de tipo carrete, en los que la maquinaria permanece fija y el templado se mueve a través de ella para ser duplicado; ya que los movimientos de acercamiento hacia la MN parecen llevarse a cabo en forma secuencial en la mayoría de los casos (**b**, **d**, **e**, **f**, **h**, **i**, **j**, **k**, **l**, **n** y **o**). En el caso de las secuencias **a** y **m** sus posiciones podrían indicar que ya han sido replicadas y, por lo tanto, expulsadas de la maquinaria de replicación para recuperar sus posiciones originales (Figura 30). Por otra parte, las secuencias **c** y **g** apenas estarían acercándose a la MN para ser replicadas, pero al estar próximas a la parte apical del bucle los cambios en su posición no son detectables (Figura 30). Por lo tanto, estos resultados descartan los modelos de la replicación de tipo carrete en los que los orígenes de replicación se encuentran en las partes apicales de los bucles de DNA, ya que las secuencias **c** y **g** permanecen en sus posiciones distales.

Considerando la distancia lineal a nivel de secuencia del locus de la albúmina de rata y los cambios en las posiciones de cada una de las secuencias examinadas (a-o) a las 24 h post-hepatectomía, se realizaron esquemas de la posible organización de esta región del genoma durante la fase de síntesis del DNA (Figura 30). Las posiciones relativas a la MN durante la replicación, sugieren que los LARs se encuentran entre las primeras secuencias en ser replicadas y podrían ser expulsados de la MN una vez que han sido duplicadas junto con las cadena recién sintetizadas (Figuras 30B y 36F). Si los LARs no son expulsados y se asocian con la MN inmediatamente después de ser replicados, entonces crearían pequeños bucles transitorios en las cadenas recién sintetizadas (Figuras 30C y 36G); estos pequeños bucles desaparecerían una vez que la región completa se haya duplicado (Figura 36H). Sin importar si los LARs se anclan o no después de ser duplicados, la replicación mediante el mecanismo de tipo carrete implica el acercamiento secuencial hacia la MN de las distintas secuencias a lo largo de los bucles de DNA. Nuestros resultados indican claramente que la replicación del DNA requiere del movimiento progresivo del templado hacia la MN. Sin embargo, mediante el análisis de las posiciones de las secuencias examinadas (a-o) dentro del locus de la familia albúmina, no es posible discernir entre las dos configuraciones posibles durante la replicación del genoma (Figura 30B y 30C).

Las dos configuraciones son igualmente probables y sugieren que los bucles estructurales de la región de 162 Kb del locus de la familia albúmina son replicados de manera sincronizada mediante el disparo de orígenes de replicación cercanos a los LARs (Figura 30). Esto es consistente con la evidencia experimental que indica que las fábricas de replicación son lo suficientemente grandes como para replicar hasta 6 bucles contiguos (Nakamura *et al.*, 1986; Ma *et al.*, 1998; Berezney *et al.*, 2000; Sadoni *et al.*, 2004). Asimismo, se ha observado, en cromosomas de mamífero, que distintos orígenes de replicación se disparan de manera simultánea y que agrupamientos de replicones comparten las mismas fábricas de replicación (Jackson y Pombo, 1998; Sadoni *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que la distancia entre los orígenes de replicación es muy heterogénea, incluso entre agrupamientos de replicones (Berezney *et al.*, 2000; Conti *et al.*, 2007).

Por otro lado, se ha observado que el patrón temporal de replicación de regiones genómicas específicas se encuentra altamente conservado y que regiones con genes activos transcripcionalmente se replican usualmente en la fase S temprana (Wei *et al.*, 1998). Considerando estas evidencias experimentales y que el gen de la albúmina es uno de los de mayor nivel transcripcional en los hepatocitos (Jin *et al.*, 2009), es muy probable que el locus de la familia albúmina sea de replicación temprana.

Sin embargo, a pesar de que el proceso de regeneración hepática está muy caracterizado y que el máximo pico de síntesis de DNA ocurre a las 24 h post-hepatectomía (Fabrikant, 1968; Michaelopoulos y deFrances, 1997), no se conoce si los hepatocitos están lo suficientemente sincronizados en la fase S; es decir, si todos inician la replicación al mismo tiempo y si respetan la progresión dentro de las fases S temprana y tardía. Es por ello que las posibles configuraciones de los bucles de DNA de la región génomica estudiada durante la replicación (Figuras 30B y 30C), son resultado de las posiciones promedio de las secuencias analizadas en cerca de 2 millones de nucleoides de hepatocitos. Por lo tanto, podrían existir distintas subpoblaciones de hepatocitos en distintos períodos de la fase S. Por lo que podrían haber hepatocitos en los que la replicación de toda la región analizada ya ha terminado, mientras que en otros aún no ha comenzado. No obstante, las posiciones determinadas para los distintos amplicones (a-o) son altamente reproducibles en distintos experimentos de animales individuales, por lo que las configuraciones obtenidas durante la replicación del DNA son las más probables (Figuras 30B y 30C).

Nuestros resultados son consistentes con el mecanismo de replicación de tipo carrete, en el que las maquinarias de replicación permanecen fijas en la MN y el DNA migra de manera progresiva a través de estos complejos para ser duplicado. Además, estos resultados fueron obtenidos a partir de muestras frescas de células primarias sin manipular, cuya sincronización en el ciclo celular se llevó a cabo mediante el modelo de la hepatectomía parcial; por lo que los cambios observados corresponden a lo que sucede durante la replicación *in vivo*. Esto es muy importante, debido a que se han observado alteraciones considerables en el proceso de replicación de células en cultivo, las cuales dependen de condiciones como la rigidez del plato de cultivo y la viscosidad del medio (Paszek *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 2005). Asimismo, se han observado alteraciones en la replicación causadas por el proceso de sincronización de las células en cultivos *in vitro* (Conti *et al.*, 2007). Hasta ahora, no se conoce el mecanismo molecular específico que lleva a cabo el devanado del templado; es decir, cómo es que el templado puede migrar hacia la maquinaria de replicación y ser expulsado mientras es copiado. Sin embargo, la topoisomerasa-II podría ser el candidato para llevar a cabo esta tarea, ya que el mecanismo de acción de estas enzimas involucra la unión con las cadenas de DNA y el desplazamiento de éstas a través de la enzima. Además, se ha demostrado que la topoisomerasa-II es un componente intrínseco de la MN (Berrios *et al.*, 1985; Earnshaw *et al.*, 1985) que se encuentra en la base de los bucles de DNA (Gromova *et al.*, 1995) y que su actividad es necesaria para el disparo de los orígenes de replicación en extractos de ovocitos de *X. laevis*, lo que depende del remodelado (se reduce su tamaño) de los bucles de DNA (Lemaitre *et al.*, 2005). Más aún, si los LARs son expulsados de la MN durante la replicación (Figura 30C y 36F), la topoisomerasa-II podría mantener al DNA asociado con la subestructura nuclear, ya que una fracción de esta enzima permanece firmemente asociada con la MN.

## CONCLUSIONES

- Se desarrolló una nueva estrategia general para establecer el orden superior de organización del DNA en bucles estructurales anclados a la MN *in vivo* en cualquier región con secuencia conocida, la cual se basa en las propiedades topológicas del DNA (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010).
- Se determinó que el locus multigénico de la familia albúmina en hepatocitos primarios de rata está organizado en 5 bucles de DNA anclados a la MN, cada uno con un tamaño menor a las 40 Kb (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010).
- Se determinó que el locus multigénico de la familia albúmina en linfocitos B inactivos de rata está organizado en 14 bucles de DNA muy pequeños anclados a la MN. Esta organización puede contribuir a la inactivación transcripcional de los genes en forma estable, pues se ha demostrado que los genes activos en linfocitos deben migrar hacia fábricas de transcripción que son compartidas por genes distales y que pertenecen a cromosomas distintos (Osborne *et al.*, 2007; Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010).
- Se determinaron los cambios en la organización estructural del locus multigénico de la familia albúmina durante la fase de síntesis de DNA *in vivo* en hepatocitos primarios de rata. La configuración de los bucles del locus durante la replicación sugiere que la duplicación del genoma requiere del movimiento secuencial del templado de DNA hacia las maquinarias de replicación que se encuentran fijas sobre la MN.
- Se determinó la organización estructural de los bucles de DNA del locus multigénico de la familia albúmina a los 7 días post-hepatectomía en hepatocitos primarios de rata. Los resultados sugieren que se restablece la configuración original de los bucles estructurales de DNA cuando las células regresan a la quiescencia después de la regeneración hepática.

**ANEXO I**

**RIVERA-MULIA, J. C. Y ARANDA-ANZALDO, A., 2010**

## Determination of the *in vivo* structural DNA loop organization in the genomic region of the rat albumin locus by means of a topological approach

JUAN CARLOS Rivera-Mulia<sup>1,2</sup> and ARMANDO Aranda-Anzaldo<sup>1,2,\*</sup>

*Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Apartado Postal 428, C.P. 50000, Toluca, Edo. Méx., México<sup>1</sup> and Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, IFC-UNAM, Apartado Postal 70-243, C.P. 04510, D.F., México<sup>2</sup>*

\*To whom correspondence should be addressed. Tel. +52-722-2173552 ext: 222. Fax. +52-722-2174142. E-mail: aaa@uaemex.mx

Edited by Mitsuo Oshimura  
 (Received 25 September 2009; accepted 8 December 2009)

### Abstract

**Nuclear DNA of metazoans is organized in supercoiled loops anchored to a proteinaceous substructure known as the nuclear matrix (NM). DNA is anchored to the NM by non-coding sequences known as matrix attachment regions (MARs). There are no consensus sequences for identification of MARs and not all potential MARs are actually bound to the NM constituting loop attachment regions (LARs). Fundamental processes of nuclear physiology occur at macromolecular complexes organized on the NM; thus, the topological organization of DNA loops must be important. Here, we describe a general method for determining the structural DNA loop organization in any large genomic region with a known sequence. The method exploits the topological properties of loop DNA attached to the NM and elementary topological principles such as that points in a deformable string (DNA) can be positionally mapped relative to a position-reference invariant (NM), and from such mapping, the configuration of the string in third dimension can be deduced. Therefore, it is possible to determine the specific DNA loop configuration without previous characterization of the LARs involved. We determined in hepatocytes and B-lymphocytes of the rat the DNA loop organization of a genomic region that contains four members of the albumin gene family.**

**Keywords:** DNA topology; loop attachment regions; matrix attachment regions; nuclear matrix; nucleotype

### 1. Introduction

In the interphase nucleus of metazoan cells, the DNA is organized in supercoiled loops anchored to a nuclear substructure commonly known as the nuclear matrix (NM) which is a non-soluble complex of ribonucleoproteins obtained after extracting the nucleus with non-ionic detergents, high salt and treatment with DNase.<sup>1,2</sup> The exact composition of the NM is a matter of debate as some 400 proteins have been associated with this structure.<sup>3</sup> The DNA is anchored

to the NM by means of non-coding sequences of variable length known as matrix attachment regions (MARs). Yet, there is no consensus sequence for *a priori* identification of MARs, although they are generally rich in AT and repetitive sequences, and map to regions where the DNA is intrinsically curved or kinked and has a propensity for base unpairing.<sup>4</sup> MARs are operationally classified into structural-constitutive, resistant to high-salt extraction and functional-facultative, non-resistant to high-salt extraction.<sup>5,6</sup> Therefore, not all potential MARs are actually

bound to the NM constituting true loop attachment regions (LARs).<sup>5</sup> There is evidence that when multiple copies of a specific MAR are present, these are used in a selective fashion, indicating the adaptability of the MAR sequence to serve as anchor only under certain conditions.<sup>7</sup> The higher-order structure of interphase and metaphase chromosomes is likely to be maintained by constitutive MARs.<sup>4,8</sup> It has been suggested that the dynamic selectivity in the use of MARs as DNA anchors would modulate both the DNA loop average length and the stability of the topological relationships between DNA and the NM during development and cell differentiation.<sup>9,10</sup> Only a very limited number of proteins have been identified that participate in sequence-specific binding of DNA to the NM.<sup>2,4</sup> However, saturation experiments indicate the existence of some 150 000 salt-resistant DNA-binding sites per NM in rat hepatocytes,<sup>11</sup> whereas the average DNA loop size in adult rat hepatocytes is 80–90 kb,<sup>12</sup> and this figure is compatible with roughly 66 000 DNA loops per rat diploid genome.<sup>13</sup> Therefore, given that there are no MAR consensus sequences, these facts imply that such DNA–NM interactions are the result of indirect readout effects between DNA and NM proteins and thus not equivalent to the direct readout interactions between transcription factors and specific DNA sequences.<sup>14</sup> Such sequence-independent DNA–protein interactions depend on DNA shape and overall DNA mechanical properties such as curvature, helical twist and bending and torsional flexibilities,<sup>15</sup> therefore the local topology (spatial configuration) of the DNA involved must be a determining factor.<sup>16</sup> Fundamental processes of nuclear physiology such as DNA replication, transcription and processing of primary transcripts occur at macromolecular complexes or factories organized on the NM.<sup>17–19</sup> Thus, the topological relationship between the DNA loops and the NM appears to be very important for appropriate nuclear physiology. Indeed, correct repair of DNA damage must include the recovery of both the double helix integrity and the complex three-dimensional DNA topology; otherwise, the cell will not survive.<sup>20,21</sup>

Varied approaches have been used for establishing the DNA loop organization in a given region of the genome, based on the experimental<sup>22–26</sup> or the *in silico* identification of MARs<sup>27</sup> which has been shown to be quite unreliable in the absence of experimental confirmation,<sup>28</sup> and more recently on a combination of both approaches coupled to high-throughput analytical techniques.<sup>29,30</sup> All these methods have their specific advantages and pitfalls, but all of them have as priority the identification of the actual MARs (LARs) in a given DNA region so as to infer from such data the possible DNA loop organization. However, considering that DNA is a continuous helical string that becomes looped by binding to

the NM, thus establishing a topological higher-order in third-dimensional space, it follows from elementary topological considerations that by mapping the relative positions to the NM of several points (i.e. DNA sequences) along a given string of DNA whose whole sequence is known, it will be possible to establish the spatial configuration of the loops formed by such a DNA string without the need of characterizing the LARs involved. We have previously developed a method for mapping the position of any DNA sequence relative to the NM based on the direct use of PCR on NM-bound templates.<sup>31</sup> An extension of this method, described hereunder, was used for determining the structural DNA loop organization in a region of 162 kb in chromosome 14 of the rat where four closely related genes that are members of the albumin gene family are located. Such a characterization was done in nucleoids which consist of the NM plus the naked DNA loops attached to it, obtained from freshly isolated hepatocytes and naïve B-lymphocytes from the rat and so the resulting DNA loop organization very likely corresponds to the actual *in vivo* organization.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male Wistar rats weighing 200–250 g were used in accordance with the official Mexican norm for production, care and use of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999).

### 2.2. Primary cells

Primary rat hepatocytes were obtained from livers of male Wistar rats, using the protocol described previously.<sup>6</sup> Briefly, the livers were washed *in situ* by perfusion with PBS without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> (PBS-A) at 37°C for 5 min at 15 ml/min. Next, the tissue was perfused with a solution of collagenase IV, Sigma (0.025% collagenase with 0.075% CaCl<sub>2</sub> in HEPES buffer, pH 7.6) for 8 min. Viable hepatocytes were counted in a haemocytometer and used immediately for preparing nucleoids (see below). Primary naïve B-lymphocytes were obtained from the spleen of male Wistar rats. Briefly, the spleen was fragmented and filtered in PBS-A. Total lymphocytes were isolated in preformed gradients of isotonic Percoll (25%) by centrifugation at 2100 rpm 15 min at room temperature. Subsequently, naïve B-lymphocytes were purified by magnetic separation (MACS Separation columns, Miltenyi Biotec) with anti-CD43-specific beads (rat CD43 microbeads, Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. Viable B-lymphocytes were counted in a haemocytometer and used immediately for preparing nucleoids.

### 2.3. Preparation of nucleoids

The DNA loops plus the nuclear substructure constitute a 'nucleoid', a very large nucleoprotein aggregate generated by gentle lysis of a cell at pH 8 in non-ionic detergent and the presence of high-salt concentration. Nucleoids were prepared as described previously.<sup>21,31</sup> Briefly, freshly isolated and washed hepatocytes and naïve B-lymphocytes are suspended in ice-cold PBS-A, and aliquots of 50  $\mu$ l containing  $3 \times 10^5$  hepatocytes or  $5 \times 10^5$  lymphocytes are gently mixed with 150  $\mu$ l of a lysis solution containing 2.6 M NaCl, 1.3 mM EDTA, 2.6 mM Tris, 0.6% Triton-X 100 (pH 8.0). After 20 min for hepatocytes and 15 min for native B-lymphocytes (at 4°C), the mixture is washed in 14 ml of PBS-A at 4°C for 4 min at 3000 rpm (1500 g). The pellet is recovered in a volume ranging from 200 to 300  $\mu$ l.

### 2.4. DNase I digestion of nucleoid samples

The washed nucleoids are pooled for setting up the DNase I digestion curves ( $1.8 \times 10^6$  nucleoids of hepatocytes or  $2.5 \times 10^6$  nucleoids of naïve B-lymphocytes in 1.2 ml of PBS-A) and mixed with 5 ml of DNase I digestion buffer (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM dithiothreitol, 50 mM Tris at pH 7.2). Digestions were carried out at 37°C with 0.5 U/ml DNase I (Sigma). Each digestion time-point aliquot contains  $3 \times 10^5$  nucleoids of hepatocytes or  $5 \times 10^5$  nucleoids of B-lymphocytes. Digestion reactions were stopped by adding 200  $\mu$ l of stop buffer (final EDTA concentration of 30 mM). The stop buffer contains 0.2 M EDTA and 10 mM Tris at pH 7.5. After digestion with DNase I, the NM-bound DNA was determined by spectrometry on aliquots of partially digested nucleoid samples that

were washed and further handled as described previously.<sup>31</sup> The final nucleoid pellet was re-suspended in 200  $\mu$ l of double-distilled H<sub>2</sub>O to be used directly as a template for PCR.

### 2.5. Genomic DNA primers

Distinct sets of primers were designed for establishing the topological positions relative to the NM of 15 small DNA sequences located along 162 kb of the genomic region containing four members of the rat albumin gene family. Primer pairs were designed approximately 10 kb each in order to establish rather regular intervals along the region studied. We took into account important considerations in the oligonucleotide design so as to get primers with high specificity but able to perform efficient DNA amplification under the same PCR conditions (reactants concentrations, temperatures, times of each step and number of cycles). It is important to remark that MARs are not suitable targets for high-quality primer design, because their characteristic composition (richness of A-T tracks and repetitive DNA) prevents an acceptable design. Therefore, both potential and actual MARs within the chosen region are likely to be excluded by our primer-design algorithms. All primer sets were designed with a length of 20–25 bp, G-C content between 50% and 55% (with a difference <3%), T<sub>m</sub> of 55–60°C (with a difference <2°C), and PCR products of 250–550 bp (Table 1). Secondary structures with  $\Delta G < -1$  kcal/mol and dimers/duplexes with  $\Delta G < -2$  kcal/mol were avoided. Additionally, the specificity of each primer set was confirmed by the NCBI BLAST algorithm.

**Table 1.** Sets of primers and corresponding amplicon sizes defining 15 target sequences along the 162-kb genomic region containing members of the rat albumin gene family

Amplicon	Forward primer	Reverse primer	Amplicon length (bp)
a	TGGCAAACATACGCAAGGGA	GCGAAACACCCCCTGGAAA	275
b	GAGGACAGTTAGTGCTGTAGGGTTG	CCTCCAACGAAGTCCCAGAAT	547
c	TCCTTTGTAACCAGGCAAGTGG	CCCATTCCCAGATCCTTCACTCT	374
d	CCCAGGGTCAGAGTATATCAGTGC	CGCTGAACGTATGTCTGAGTCA	305
e	TGGTAGGCAGAGATGTGAGGAAAG	CCTGTTGCTCTAATGCTGGTCCTA	382
f	CTGATCTTCAGGCAATATGGCAGG	TTGGCTGATGTCGTCTGGACA	393
g	AAGGATAGGTGCTTGGCTGACA	GCCCTAACCTGTGTGTATCTTG	504
h	GATCACGTAACAACCTGTGAGCT	CCTTCACAGCACCCGTCATACA	263
i	GGTGTGGGAATTTGACTAAGGC	TAAACTCAGGTGACAGGCTACGGC	465
j	AGGAACCAGGGAATCGAGTGCT	AACTTGCGGGTGTTCTCTCCTT	392
k	TGTCAGCATGATGGTGGCTCA	CTCGATTTGCCATGTCCTGTCT	252
l	GGGCTGGTCCATATTGCTTGA	ATGCTTTGGGCTTGCCTGAAG	373
m	ACGACTCCCTTCCTATCCACAG	GTAGAAAGTCGTTCTGGTTGCCAC	234
n	CCCTAATCTTGCTGTGTTTGG	TGAGAGCTGGGCAGACATCAA	355
o	GGTGACAGTTGACAGAGGCCTTC	GCTCCATGCTGACCTGAAGTCTA	272

### 2.6. PCR amplification

Fifty nanograms of NM-bound DNA was used as a template for PCR. PCR was carried out using 0.7 U GoTaq DNA polymerase (Promega), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP and 0.1 μM of each primer. Amplification was performed in an Applied Biosystems 2720 thermocycler and the same amplification program was used for all pairs of primers: initial denaturing step at 94°C for 5 min, denaturing step at 94°C for 45 s, annealing at 56°C for 30 s and extension at 72°C for 1 min for 35 cycles, with a final extension at 72°C for 10 min. The identity of all the amplicons was confirmed by restriction analysis with the appropriate restriction enzymes. Amplicons were electrophoresed on 2% agarose gels and visualized using ethidium bromide staining (0.5 μl/ml), recorded and analyzed using a Kodak 1D Image Analysis Software 3.5 system. Amplicons were scored as positive or negative on partially digested nucleoid samples, depending on whether they are detectable by the software using the default settings.

### 2.7. Computer-aided prediction of MAR sequences

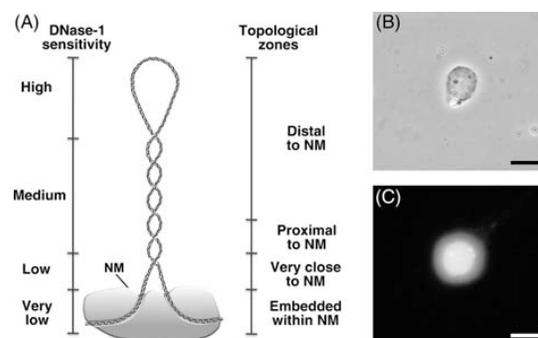
The potential MARs in the region studied were identified by *in silico* prediction using four different freely available software: MarFinder,<sup>32</sup> MARScan,<sup>33</sup> ChrClass<sup>34</sup> and SMARTest.<sup>27</sup>

## 3. Results and discussion

### 3.1. Rationale of the method

Our method exploits the topological properties of the average DNA loop that result from the fact that such loops are topologically constrained by being anchored to the NM, thus being equivalent to closed DNA circles. Under such a condition, the DNA molecule undergoes structural stress resulting from two factors: the covalently linked backbones of the DNA strands are helicoidal but rigid, and the low-energy hydrogen bonds between the stacked bases are quasi-statistical unions that continuously break apart and form again; such a situation poses the risk that the nucleotide bases may gyrate away from the double-helix axis and become exposed. DNA naturally solves this structural-stress problem by further coiling upon its own axis, thus avoiding the exposure of the nucleotide bases, but becoming negatively supercoiled in a similar fashion to a pulled house-telephone cord.<sup>35,36</sup> Thus, the naked DNA loops display a gradient of supercoiling that goes from lower to higher from tip to base of the loop,<sup>36</sup> save for the fact that the structural properties of MARs are such that they also function as buffers or sinks of negative supercoiling<sup>37,38</sup> thus avoiding maximal supercoiling at the

base of the loops. The NM plus the naked DNA loops anchored to it constitute a nucleoid. Under the conditions of lysis employed to generate nucleoids, the DNA remains essentially intact, although it lacks the nucleosome structure because of the dissociation of histones and most other nuclear proteins usually associated with DNA; yet, the DNA loops remain topologically constrained and supercoiled as depicted in Fig. 1. Indeed, nucleoids are also known as nuclear halos since the exposure of such structures to DNA-intercalating agents like ethidium bromide leads to unwinding of the DNA loops that form a DNA halo around the NM periphery (Fig. 1C). A typical DNA loop can be divided into four topological zones according to their relative proximity to the NM. Each of these zones would manifest an identifiable behaviour when exposed to non-specific nucleases that are sensitive to the local DNA topology (Fig. 1A). We have previously shown that in nucleoid preparations, the relative resistance of a given loop-DNA sequence to a limited concentration of DNase I is directly proportional to its proximity to the NM anchoring point.<sup>31,39</sup> Two main factors determine this property. (i) Steric hindrance resulting from the proteinaceous NM that acts as a physical barrier relatively protecting the naked loop DNA that is closer to the NM from endonuclease action. (ii) The local degree of loop DNA supercoiling that is lower in the distal portions of the loop and higher in the regions proximal to the NM. Supercoiling is a structural barrier against the action of non-specific endonucleases, such as DNase I, that hydrolyze the DNA backbone by a single-strand cleavage (nicking) mechanism.<sup>40</sup> Both factors only confer relative but not

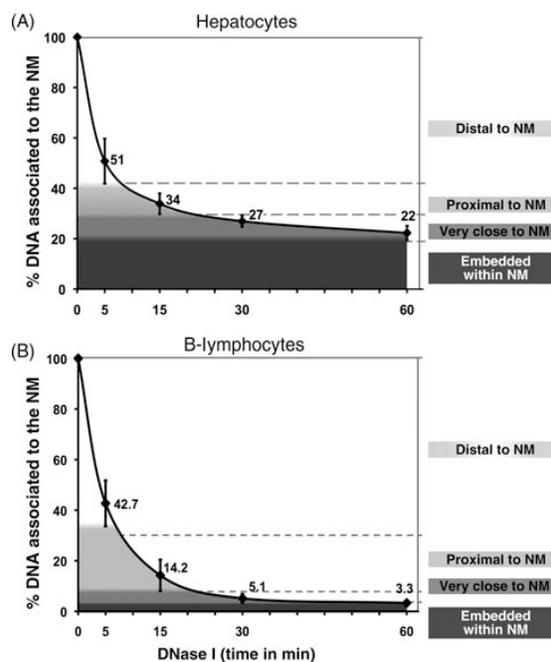


**Figure 1.** Properties of naked DNA loops attached to the NM. (A) Drawing illustrating the local topology along a typical supercoiled DNA loop that correlates with both distance relative to the NM and sensitivity to DNase I. (B) Phase contrast micrograph showing the NM of a hepatocyte nucleoid. (C) Fluorescence micrograph showing the DNA halo around the NM of a hepatocyte nucleoid caused by the unwinding of the supercoiled DNA loops by treatment of the nucleoid with the DNA-intercalating agent ethidium bromide (80 μg/ml). Scale bars 10 μm.

absolute DNase I resistance to loop DNA. However, in a large sample of nucleoids exposed to a limited concentration of DNase I, there is a consistent trend in which the loop-DNA sensitivity to the enzyme is inversely proportional to its distance relative to the NM and so distal regions of the loop are digested first whereas the regions closer to the NM are digested later. Indeed, it is known that the DNA embedded within the NM is very resistant to DNase I action, and there is a fraction corresponding to some 2% the total DNA that is basically non-digestible even when exposed to high concentrations of the enzyme. This fraction corresponds to fragments with an average length of 1.6 kb in rat hepatocytes,<sup>12</sup> likely to represent the regions that include the actual MARs (LARs) anchored to the NM. This pattern of sensitivity to DNase I holds provided that the DNA is basically devoid of histones and most other proteins that form chromatin. Indeed, whole chromatin attached to the NM shows an inverse pattern of nuclease sensitivity compared with that of naked loop DNA. In looped chromatin, those sequences closer to the matrix attachment point are preferentially cleaved by nucleases.<sup>41</sup>

### 3.2. Differential kinetics of loop DNA digestion as a function of proximity to the NM

Treatment of nucleoids from quiescent, freshly isolated rat hepatocytes, with a limited concentration of DNase I (0.5 U/ml) produces a highly reproducible kinetics of digestion of loop DNA (Fig. 2A). It is possible to identify three different phases in the digestion curve: the first corresponds to a very fast kinetics of digestion that removes almost 60% the total DNA associated with the NM within the first 5 min. Such a DNA corresponds to the loop fraction distal to the NM; in such a fraction, relatively minor DNA supercoiling is the only barrier to the endonuclease action. Moreover, as the DNase I nicks the loop DNA, each nick becomes a point of further DNA unwinding, thus increasing the reduction in loop supercoiling in time and so making more accessible the loop DNA to the action of the endonuclease. The second phase that lasts ~10 min shows a reduced kinetics of digestion in which some further 10% loop DNA is removed. This slower kinetics is the result of the slower rate of supercoiling loss in the loop DNA proximal to the NM (originally highly supercoiled) that slows down the action of the enzyme. The third and slowest phase, lasting 45 min, shows the removal of some further 10% total DNA associated with the NM. This very slow kinetics results from two factors: the effect of any residual DNA supercoiling and principally of the proximity between the loop DNA and the NM proteins that act as physical barriers against the action of



**Figure 2.** Kinetics of nucleoid DNA digestion. Nucleoids were digested with DNase-I (0.5 U/ml). Each time-point value is the average of separate experiments with samples obtained from separate animals ( $n = 9$  for hepatocytes,  $n = 4$  for naïve B-lymphocytes). Bars indicate the corresponding SD. The topological zones relative to the NM correspond to decreasing percentages of total DNA bound to the NM. **(A)** For hepatocytes: distal to NM (100–42% total DNA), proximal to NM (42–30% total DNA), very close to NM (30–19% total DNA) and embedded within NM (19–0% total DNA). The corresponding slopes are the following: 0–5 min =  $-9.80$ ; 5–15 min =  $-1.70$ ; 15–30 min =  $-0.47$  and 30–60 min =  $-0.17$ . Hence, the slope of the digestion curve became close to zero by 60 min of DNase I treatment and remained like that even after 120 min of incubation with the enzyme (slope 60–120 min =  $-0.17$ ). **(B)** For naïve B-lymphocytes: distal to NM (100–33% total DNA), proximal to NM (33–7% total DNA), very close to NM (7–4% total DNA) and embedded within NM (4–0% total DNA). The corresponding slopes are the following: 0–5 min =  $-11.46$ ; 5–15 min =  $-2.84$ ; 15–30 min =  $-0.61$  and 30–60 min =  $-0.06$  (slope 60–120 min =  $-0.03$ ). Hence, the slope of the digestion curve also became close to zero by 60 min of DNase I treatment.

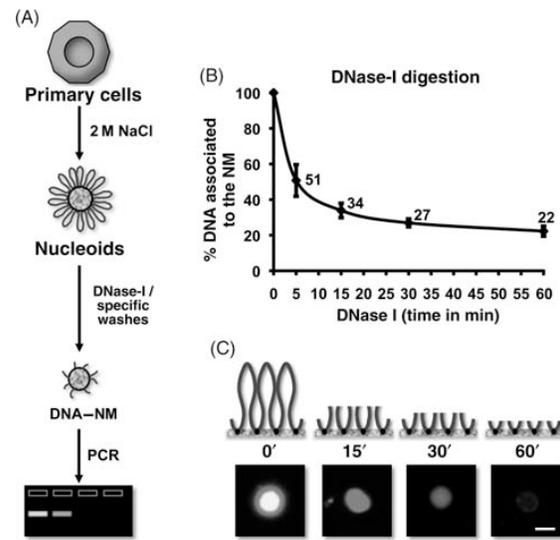
DNase I on the loop DNA that is very close to the NM. Finally, there is about 20% total DNA that remains bound to the NM even after 60 min of treatment with DNase I. This fraction corresponds to the DNA that is actually embedded within the NM, and so it is rather inaccessible to the limited concentration of DNase I used.

Nucleoids from naïve B-lymphocyte treated with the same limited concentration of DNase I display a faster kinetics of loop-DNA digestion, and so after 60 min of treatment with the enzyme, the amount of total DNA embedded within the NM is very small

( $\leq 4.0\%$ ), yet the digestion of further loop DNA stalls and becomes negligible afterwards (Fig. 2B). The average DNA loop size in naïve B-lymphocytes is rather similar to that in hepatocytes, yet the DNA–NM interactions are more fragile in B-lymphocytes when compared with hepatocytes, and comparative PAGE analysis shows that the relative amount of typical NM proteins is significantly reduced in naïve B-lymphocytes, in particular the three nuclear lamins (A, B and C) that are major components of standard NM preparations (our unpublished results). Hence, the presence of a less dense NM in the nucleoids from naïve B-lymphocytes explains why the fraction of total DNA that is relatively protected from DNase I action is significantly smaller than that in nucleoids from hepatocytes. Depending on the cell type of the nucleoids studied, preliminary experiments must be carried out so as to define the concentration of DNase I suitable to produce consistent tri-phasic digestion curves (Fig. 2A and B). On the basis of our experience working with several cell lines<sup>31</sup> and different types of primary cells, the range of DNase I concentrations to be considered is between 1.0 and 0.05 U/ml. Indeed, extensive damage to DNA due to incorrect nucleoid preparation and handling, or the natural presence of nicked DNA in some terminally differentiated cell types (such as non-naïve, activated lymphocytes) produce bi-phasic nucleoid-DNA digestion curves since the loop-DNA supercoiling is either absent or severely reduced. Nevertheless, in all nucleoid preparations treated with a limited amount of DNase I, there is a fraction of total DNA that is resistant to the enzyme by being embedded within the NM, such a DNA is easily identifiable in the digestion curves as the fraction that is digested very slowly so that the local slope becomes close to zero and remains like that even after very long incubation times (Fig. 2A and B).

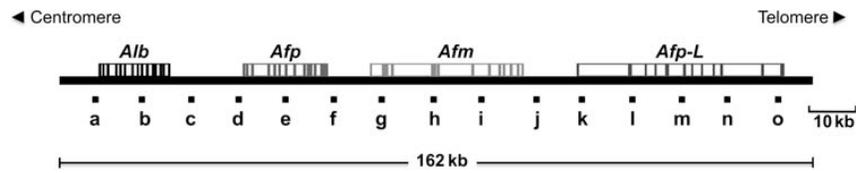
### 3.3. Mapping the relative position to the NM of DNA sequences along the genomic region containing the rat albumin locus

On the basis of the above considerations and results, we used the general strategy depicted in Fig. 3 in order to map the position relative to the NM of 15 small DNA sequences located along a region corresponding to 162 kb of chromosome 14 in the rat, which includes the loci of the following gene members of the albumin gene family: albumin (*Alb*), alpha-fetoprotein (*Afp*), afamin (*Afm*) and the pseudo-gene similar to *Afp* (*Afp-L*). Such small DNA sequences were spaced some 10 kb apart (Fig. 4). Therefore, nucleoids prepared from freshly isolated hepatocytes or naïve B-lymphocytes (Fig. 3A) were incubated with DNase I (0.5 U/ml) for different

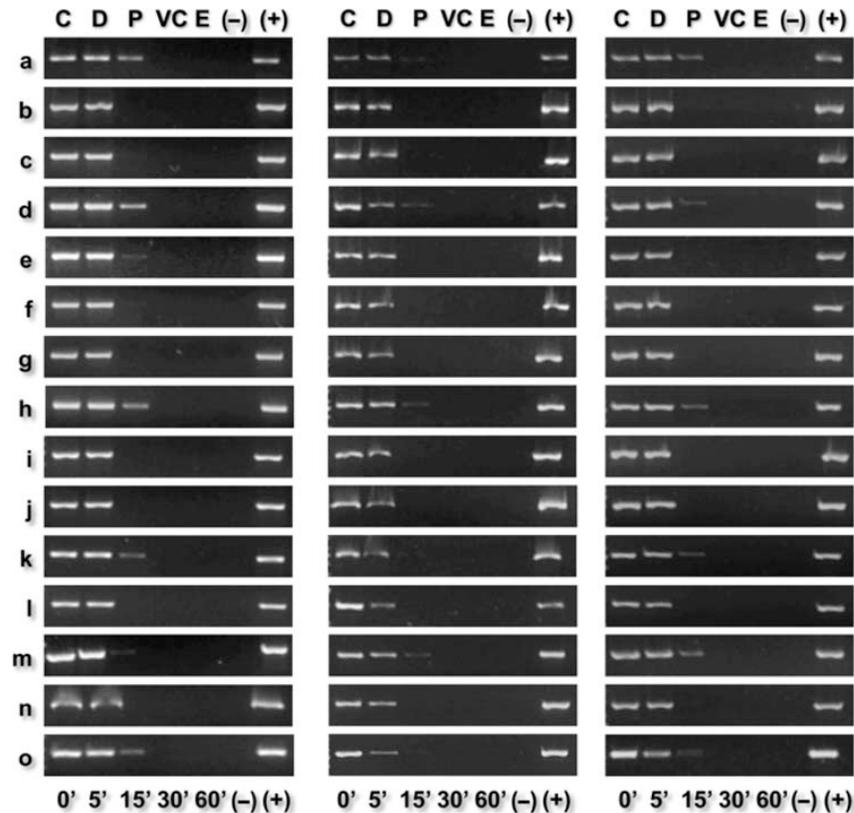


**Figure 3.** Procedure for mapping the position of DNA sequences relative to the NM. (A) Nucleoids prepared from freshly isolated rat primary cells were incubated with DNase I so as to progressively digest the loop DNA, obtaining a tri-phasic kinetics of digestion (B). Nucleoid samples with partially digested NM-bound DNA, as shown in the drawing and fluorescent micrographs, (C) were used for PCR amplification of target DNA sequences located along the genomic region containing members of the rat albumin gene family. The amplicons were run in agarose gels and scored as present (+) or absent (–) by an image-analysis software (A) as a function of nucleoid-sample digestion time (C).

times so as to obtain nucleoid samples with differential amounts of DNA associated with the NM (Fig. 3B and C), and such samples with partially digested NM-bound DNA were used for PCR amplification of the chosen target sequences located along the 162-kb genomic region under study (Fig. 3A). By correlating the amplification data (Fig. 3A) with the kinetics of the nucleoid-DNA digestion (Fig. 3B), it is possible to locate each target sequence within a topological zone relative to the NM (Fig. 2). Previous studies have shown that the average size of the nuclear DNA fragments liberated by non-specific nucleases in rat hepatocytes is 0.8 kb.<sup>12</sup> Thus, the DNA sequences to be mapped are  $< 550$  bp in length (Table 1), and so likely to be cut as whole units by the endonuclease instead of being progressively eroded by partial digestions. Therefore, in our mapping protocol, we score the specific templates as either present (amplifiable) or absent (non-amplifiable) as a function of endonuclease-digestion time (Fig. 5 and Supplementary Fig. S1). This was scored without considering the intensity of the amplicon signals, but just whether such signals are detected or not by an image-analysis program (Kodak 1D Image Analysis Software 3.5), using the default settings. We established these criteria



**Figure 4.** The 162-kb genomic region containing members of the rat albumin gene family (chromosome 14): *Alb* (albumin), *Afp* (alpha-fetoprotein), *Afm* (afamin), *Afp-L* (pseudo-gene similar to *Afp*). The letters indicate the location of the target DNA sequences to be positionally mapped relative to the NM.



**Figure 5.** Positional mapping relative to the NM of specific target DNA sequences by PCR. Rat-hepatocyte nucleoids were treated with DNase-I (0.5 U/ml) for different times. The residual NM-bound DNA was directly used as template for PCR amplification of the target sequences (a–o). The specific amplicons were resolved in 2% agarose gels stained with ethidium bromide (0.5  $\mu$ l/ml). C, control. Topological zones with respect to NM: D, distal; P, proximal; VC, very close; E, embedded within NM. (–), negative control (no template); (+), positive control (pure genomic DNA as template). The amplification patterns were consistently reproduced in separate experiments with samples from independent animals ( $n = 4$ ).

because in our topological-mapping approach, it is the average relative position to the NM anchoring point and not the actual template length the critical parameter that determines the average sensitivity to DNase I of each sequence mapped. Nevertheless, the chosen amplicons were also selected on the basis that all of them may be amplified with similar efficiency using the same amplification program (see Section 2). Thus, the absence of amplified product

at a given digestion time-point indicates that the relative abundance of the target template has fallen to a non-amplifiable level within the large nucleoid population analysed in each sample.<sup>6</sup>

It is important to emphasize that the method described here is not intended for identification and characterization of actual MARs (LARs) in a given genomic region. Indeed, some general properties of MARs such as the presence of A-T tracts and repetitive

sequences make them unsuitable for efficient PCR amplification under stringent conditions for achieving highly specific amplification of most other non-repetitive genomic sequences. Thus, primer-design programs will grant a low score to any set of primers targeting amplicons containing potential MARs, even more if such amplicons are meant to be highly specific and small-sized ( $\leq 500$  bp), as those targeted in the present protocol.

#### 3.4. Determination of the structural DNA loop organization in the region of the rat albumin locus

By coupling the highly reproducible amplification experiments (Fig. 5 and Supplementary Fig. S1), together with the consistent kinetics of loop DNA digestion by DNase I (Fig. 2), we were able to locate each mapped sequence within a given topological zone relative to the NM (Tables 2 and 3). Such data were used to draw the most likely DNA loop organization relative to the NM of the 162-kb region studied, by considering the distance (in kb) between the separate sequences mapped and the topological positions of such sequences relative to the NM. The data suggest that in the hepatocytes, the region is organized in five loops anchored to the NM

**Table 2.** Location of the target sequences (amplicons) in the specific topological zones relative to the NM from rat hepatocytes

Amplicon	Topological zones relative to the NM			
	Distal to NM	Proximal to NM	Very close to NM	Embedded within NM
a	+	+	-	-
b	+	-	-	-
c	+	-	-	-
d	+	+	-	-
e	+	-	-	-
f	+	-	-	-
g	+	-	-	-
h	+	+	-	-
i	+	-	-	-
j	+	-	-	-
k	+	+	-	-
l	+	-	-	-
m	+	+	-	-
n	+	-	-	-
o	+	+	-	-

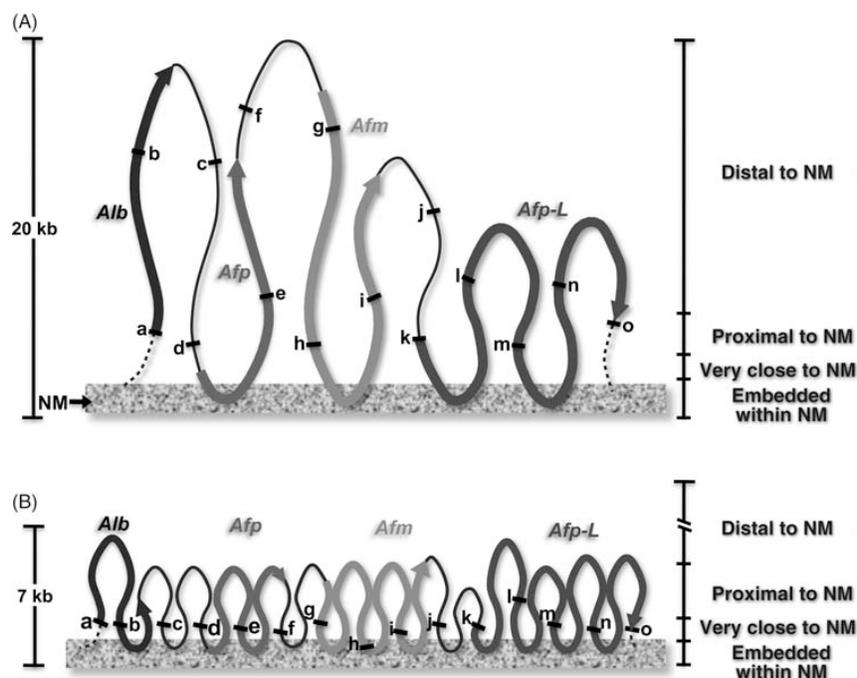
The amplicons were scored either as positive or as negative as a function of nuclease digestion time and for each topological zone relative to the NM, depending on whether or not they were detected by a digital image-analysis system (Kodak 1D Image Analysis Software 3.5) using the default settings.

**Table 3.** Location of the target sequences (amplicons) in the specific topological zones relative to the NM in naïve B-lymphocytes

Amplicon	Topological zones relative to NM in B-lymphocytes			
	Distal to NM	Proximal to NM	Very close to NM	Embedded within NM
a	+	+	+	-
b	+	+	+	-
c	+	+	+	-
d	+	+	+	-
e	+	+	+	-
f	+	+	+	-
g	+	+	+	-
h	+	+	+	+
i	+	+	+	-
j	+	+	+	-
k	+	+	+	-
l	+	+	-	-
m	+	+	+	-
n	+	+	+	-
o	+	+	+	-

The amplicons were scored either as positive or as negative as a function of nuclease digestion time and for each topological zone relative to the NM, depending on whether or not they were detected by a digital image-analysis system (Kodak 1D Image Analysis Software 3.5) using the default settings.

(Fig. 6A). The resulting size from tip to base of such loops is not bigger than 20 kb; thus, the largest loop of the set, containing both *Afp* and *Afm* sequences, would be some 40 kb in length. The genomic region studied is a high-gene-density region. Through evolution, a series of duplications formed the genes within the *Alb* family that includes the vitamin D-binding protein (*DBP*) gene located almost 1 Mb upstream of the *Alb* gene.<sup>42</sup> Nevertheless, such a gene family has been travelling as a cluster within the mammalian genomes. The fact that the region studied is organized into five rather compact structural DNA loops whose size (40–20 kb) is smaller than the estimated average rat-hepatocyte DNA loop size (80 kb) may be relevant to the functionality of such a genomic region, since fundamental processes of nuclear physiology occur at macromolecular complexes organized on the NM.<sup>17–19</sup> It remains to be explored whether high-gene-density regions are usually organized into relatively small-sized structural DNA loops; at least another report suggests that such may be the case.<sup>26</sup> However, despite the fact that the average DNA loop size in naïve B-lymphocytes is quite similar to that in hepatocytes (our unpublished results), in naïve B-lymphocytes the corresponding



**Figure 6.** Experimentally determined structural DNA loop organization of the 162-kb region containing members of the rat albumin gene family in hepatocytes (A) and naïve B-lymphocytes (B). The letters indicate the position of the target sequences within the DNA loops. The bold lines indicate the position of the whole named genes. The dashed lines indicate projected loop regions outside of the region studied. The left bar indicates the relative DNA loop size from tip to base; hence the whole DNA loop length is approximately the double of such value. The right bar indicates the topological zones relative to the NM according to the kinetics of nucleoid DNA digestion. The illustration is according to scale in kb along the x and y axis.

162 kb region is very close to the NM as most sequences map within the VC topological region. Moreover, the target sequence h consistently maps to the DNase-resistant fraction of NM-bound DNA, and so it must be embedded within the NM. Only the l sequence remains proximal to the NM (Table 3 and Supplementary Fig. S1). This means that in naïve B-lymphocytes the 162-kb region is organized in numerous but tiny (<14 kb) DNA loops (Table 3 and Fig. 6B). This is quite interesting since the genes within the region studied are not known to be expressed in B-lymphocytes as it was confirmed by RT-PCR (data not shown), suggesting that packaging of genes in truly small DNA loops may be correlated with the stable transcriptional silencing of such genes (see below).

### 3.5. Predicted MARs *in silico* do not fully correspond to actual MARs *in vivo*

We used four different available computer programs for predicting the location of potential MARs along the 162-kb region studied. All these programs have been quoted as MAR-prediction or even as MAR-identifying devices in several published

papers.<sup>27,28</sup> However, each program uses different criteria so as to define the respective MAR-searching algorithms. This can be appreciated as not all programs coincide in their predictions (Table 4). Moreover, the mapping results in hepatocytes indicate that loop-DNA regions containing actual MARs (LARs) are located next to the following sequences mapped: a, d, h, k, m, o. However, only the region next to the d sequence is consistently identified as a MAR-containing region by the four programs, whereas the other experimentally defined LAR-containing regions are only partially identified by some of the four MAR-searching programs used and all programs predict rather inconsistently the presence of MARs in regions that according to the experimental results are unlikely to be bound to the NM in hepatocytes (Supplementary Fig. S2). The programs detect potential MARs close to most of the sequences mapped along the region studied, but even sequences such as b and c that lack any program-identified MAR nearby (Supplementary Fig. S2) are located very close to the NM in naïve B-lymphocytes, suggesting that there are actual MARs (LARs) that cannot be detected by any of the MAR-identifying programs. Only the sequence l that also lacks any program-identified

**Table 4.** Location of potential MARs in the 162-kb genomic region studied as predicted by four different MAR-searching computer programs

MarFinder			MARScan			ChrClass			SMARTest		
Start	End	Length (bp)	Start	End	Length (bp)	Start	End	Length (bp)	Start	End	Length (bp)
36 380	36 580	201	1762	1824	63	5035	5595	561	36 686	37 120	435
62 080	62 580	501	2980	3002	23	35 884	36 384	501	47 786	48 090	305
76 480	76 880	401	36 939	37 003	65	51 284	51 584	301	51 306	51 640	335
88 480	89 580	1101	55 573	55 589	17	59 884	60 284	401	78 281	78 580	300
102 380	102 980	601	69 392	69 513	122	88 984	89 884	901	88 811	89 300	490
141 901	142 601	701	84 791	84 806	16	90 784	91 084	301	108 916	109 295	380
			88 179	88 232	54	102 561	102 861	301	138 866	139 280	415
			102 643	102 669	27	141 301	141 801	501	141 341	141 650	310
			131 451	131 487	37	142 101	142 601	501	142 106	142 570	465
			142 475	142 491	17	153 801	154 601	801			
			142 773	142 788	16						

The numbers indicate the nucleotide start and ending position number along the genomic region studied. The length of the predicted MARs is indicated in bp.

MAR nearby is consistently far from the NM in naïve B-lymphocytes. These results suggest that MAR-finding programs are highly unreliable tools for actual MAR identification, a fact that has already been shown by others.<sup>28</sup>

### 3.6. Conclusions

The method described in this paper makes it possible to determine the organization in structural DNA loops of any long segment of genomic DNA with known sequence, provided that such a DNA is attached to the NM as is the case in nucleoid preparations of freshly isolated hepatocytes and naïve B-lymphocytes. The procedure used for isolating the nucleoids only preserves DNA–NM interactions that are resistant to high-salt extraction, therefore, facultative non-structural attachments to the NM that may result from some transient functional process such as active transcription are eliminated.<sup>43</sup> Our method exploits the topological properties of naked DNA attached to the NM as well as elementary topological principles such as that points in a deformable string (DNA) can be positionally mapped relative to a position-reference invariant (NM), and from such mapping, it can be deduced the configuration of the string in third dimension. Moreover, both the intrinsic persistence length of mixed-sequence DNA, estimated at some 240 bp, and negative supercoiling confer relative rigidity to the naked DNA loops,<sup>36</sup> thus limiting their deformability in such a way that the determined positions of loop-DNA sequences relative to the NM are highly reproducible among experiments, indicating limited fluctuation of the DNA loop morphology over time. Nevertheless, some sequences

that happen to lie close to the boundary between two topological zones may display some variability in their relative position to the NM, such is the case of sequence e in hepatocytes that in one of four experiments it was detected in the proximal zone, whereas in three experiments it was only detectable in the distal zone relative to the NM (Fig. 5). It must be stressed that the presence of the corresponding amplicons in a given topological zone was determined by an image-analysis system using its default settings independently of the apparent intensity of the amplicon signal in the corresponding gel photograph. Thus, for example, in one of four experiments with hepatocytes, the k amplicon was barely apparent in the proximal region; nevertheless, it was consistently detected in such a region by the image-analysis software in the four separate experiments (Fig. 5).

The present protocol works with NM-bound DNA templates and so the actual MARs (LARs) present in such preparations are deeply embedded within the NM, thus being poorly available to the action of any externally added enzyme. Most LAR-identifying protocols depend on the proteolytic destruction of the NM so as to liberate the NM-bound DNA fragments that may be further characterized by a number of techniques.<sup>22,24,26,30,44</sup> Thus, our protocol addresses the problem of determining the configuration of structural DNA loops in a given, large enough genomic region without the need of mapping or characterizing the actual MARs (LARs) present in such a region as a precondition for determining the possible loop configuration. Nevertheless, our protocol delimits the genomic regions where such LARs are more likely to be found. Yet, pinpointing the actual extension of such LARs depends on applying further techniques

beyond the present protocol. So far, there is only one published protocol that directly maps LARs on NM-bound DNA; this protocol depends on the activation of endogenous, NM-bound topoisomerase II that releases DNA loops by cutting along MARs embedded within the NM.<sup>23,45</sup>

The *in vivo*, local spatial configuration of DNA into structural loops, as determined by the present protocol, constitutes the starting point for any further refinement or modification of such a configuration by chromatin proteins and epigenetic mechanisms affecting chromatin structure. However, chromatin as such plays no role in determining the structural DNA loop organization since chromatin proteins are completely eliminated by the high-salt extraction, and yet stable DNA–NM interactions persist. In any case, the organization of the genome into structural DNA loops must be highly relevant for the nuclear physiology. Indeed, current evidence suggest that the structural DNA loops may correspond to the actual replicons,<sup>5,6,19,39</sup> yet the pattern of such structural loops may also determine the limits of further local structural changes that may be related to transient chromatin modifications resulting in functional interactions (related to transcription) between loop DNA and protein complexes located upon the NM.<sup>18,46,47</sup> The genomic region studied contains classical examples of developmentally regulated genes. Indeed, *Alb*, *Afp* and *Afm* are primarily expressed in the liver, yet while *Afp* and *Alb* are highly expressed in the fetal liver, the transcription of *Afp* is rapidly reduced after birth, but *Alb* and *Afm* continue to be expressed in the adult liver.<sup>42,48</sup> There are three enhancers in the intergenic region between *Alb* and *Afp* whose action is required for *Afp* and *Alb* activation early in liver development and for *Afp* reactivation during liver regeneration, yet later during fetal development *Alb* expression becomes independent of such enhancers due to the action of an *Alb*-specific enhancer that lies between 8.5 and 10 kb upstream the *Alb* transcription-start site.<sup>42,49</sup> Interestingly, the intergenic enhancers are located in the region between the sequences corresponding to amplicons c and d<sup>48</sup> which is clearly detached from the NM in the adult rat (Fig. 6A). We actually mapped the position relative to the NM of enhancer 1 (E1) which is located 2 kb upstream of sequence d that belongs to the *Afp* promoter region (Fig. 4). E1 mapped within the region proximal to the NM (data not shown) the same as d (Table 2). So far the *Alb*-specific enhancer has not been formally characterized in the rat. However, comparison of the mouse *Alb*-enhancer sequence indicates that a closely related sequence is present in the rat in a 1.3-kb region located 8.3 kb upstream of the *Alb* transcription-start site. Our results suggest the presence of a LAR some 5 kb upstream of

sequence a that belongs to the *Alb* promoter (Figs 4 and 6A and Supplementary Fig. S2). Hence the putative rat *Alb*-enhancer is located some 2 kb upstream of the possible LAR and so the enhancer could be very close to the NM, although this needs to be experimentally verified.

It is known that replication and transcription occur at factories organized upon the NM.<sup>18,50</sup> However, replication and transcription factories never co-localize since they occupy distinct but rather fixed sites that are conserved throughout several cell generations.<sup>17,51,52</sup> In mammalian lymphocytes it is known that genes separated by tens of mega-bases in *cis* and genes that belong to separate chromosomes somehow migrate to preassembled transcription factories for their actual transcription.<sup>50,53</sup> Such a process requires that the genes undergoing active transcription loop out away from their respective chromosome territories so that distant genomic regions are brought together within one nuclear complex for transcription.<sup>54</sup> Hence the fact that in naïve B-lymphocytes the genomic region studied is very close to the NM, suggests that the genes present in the region are prevented from looping out towards a transcription factory, since the genes are included into numerous tiny loops tightly bound to the NM (Fig. 6B).

The high-salt-resistant LARs that determine structural attachments to the NM constitute long-term interactions between DNA and the NM. Nevertheless, as predicted by some models, there is evidence that under the influence of a combination of mechanical, biochemical and thermodynamical factors the pattern of such attachments may be modified during development and aging leading to stable changes in cell differentiation.<sup>10,13,55,56</sup> Varied and important evidence suggests that the high-salt resistant structural DNA loops correspond to the actual replicons *in vivo*.<sup>5,19</sup> Thus it is remarkable that in totipotent blastomeres the cell cycle consists of overlapping S and M phases with no G1 or G2, the rapid DNA replication observed involves the use of high numbers of closely spaced attachments between DNA and the NM and so the average DNA loops are very small, yet this is compatible with very active DNA replication but not with active transcription as genes in the chromosomes of blastomeres are largely inactive during cleavage.<sup>57</sup> Therefore in naïve B-lymphocytes the presence of tiny loops in the region studied may contribute to the transcriptional silencing of the corresponding genes without preventing such a region from being replicated after B-lymphocyte activation.

The nucleotype has been defined as those characters of nuclear DNA that may affect the phenotype independently of the information encoded in such a

DNA,<sup>58</sup> and it has been suggested that besides species-specific nucleotypic characters such as karyotype, and the C-value for nuclear DNA that correlates with overall cell-cycle length, there could be tissue-specific nucleotypic characters, such as the pattern of structural DNA loops, that correlate with cell differentiation.<sup>10</sup> Our results support the existence of such tissue specific nucleotypic characters.

**Supplementary Data:** Supplementary data are available at [www.dnaresearch.oxfordjournals.org](http://www.dnaresearch.oxfordjournals.org).

### Funding

This work was sponsored by CONACYT, Mexico, grant 48447-Q (25506) and UAEM, Mexico, grant 2212/2006, both awarded to A.A.-A. J.C.R.-M. is a CONACYT Research Scholar within the Graduate Program in Biomedical Sciences at IFC-UNAM, México.

### References

- Nickerson, J.A. 2001, Experimental observations of a nuclear matrix, *J. Cell Sci.*, **114**, 463–74.
- Tsutsui, K.M., Sano, K. and Tsutsui, K. 2005, Dynamic view of the nuclear matrix, *Acta Med. Okayama*, **59**, 113–20.
- Mika, S. and Rost, B. 2005, NMPdb: database of nuclear matrix proteins, *Nucleic Acids Res.*, **33**, D160–3.
- Ottaviani, D., Lever, E., Takousis, P. and Sheer, D. 2008, Anchoring the genome, *Genome Biol.*, **9**, 2011.
- Razin, S.V. 2001, The nuclear matrix and chromosomal DNA loops: is there any correlation between partitioning of the genome into loops and functional domains?, *Cell Mol. Biol. Lett.*, **6**, 59–69.
- Maya-Mendoza, A., Hernández-Muñoz, R., Gariglio, P. and Aranda-Anzaldo, A. 2003, Gene positional changes relative to the nuclear substructure correlate with the proliferating status of hepatocytes during liver regeneration, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 6168–79.
- Heng, H.H.Q., Goetze, S., Ye, J.C., et al. 2004, Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions, *J. Cell Sci.*, **117**, 999–1008.
- Petrova, N.V., Iarovaia, O.V., Verbovoy, V.A. and Razin, S.V. 2005, Specific radial positions of human chromosomes X, 1 and 19 remain unchanged in chromatin depleted nuclei of primary human fibroblasts: evidence for the organizing role of the nuclear matrix, *J. Cell. Biochem.*, **96**, 850–7.
- Berezney, R. 1979, Dynamic properties of the nuclear matrix, In: Busch, H. (ed.), *The Cell Nucleus*, Academic Press: Orlando, pp. 413–56.
- Aranda-Anzaldo, A. 1989, On the role of chromatin higher-order structure and mechanical interactions in the regulation of gene expression, *Speculations Sci. Technol.*, **12**, 163–76.
- Hakes, D.J. and Berezney, R. 1991, DNA binding properties of the nuclear matrix and individual nuclear matrix proteins, *J. Biol. Chem.*, **266**, 11131–40.
- Berezney, R. and Buchholtz, L.A. 1981, Dynamic association of replicating DNA fragments with the nuclear matrix of regenerating liver, *Exp. Cell Res.*, **132**, 1–13.
- Maya-Mendoza, A., Hernández-Muñoz, R., Gariglio, P. and Aranda-Anzaldo, A. 2005, Natural ageing in the rat liver correlates with progressive stabilisation of DNA-nuclear matrix interactions and withdrawal of genes from the nuclear substructure, *Mech. Ageing Dev.*, **126**, 767–82.
- Bode, J., Ríos-Ramírez, M., Mielke, C., Stengert, M., Kay, V. and Klehr-Wirth, D. 1995, Scaffold/matrix-attached regions: structural properties creating transcriptionally active loci, *Int. Rev. Cytol.*, **162A**, 389–454.
- Zhang, Y., Xi, Z., Hedge, R.S., Shakked, Z. and Crothers, D.M. 2004, Predicting indirect readout effects in protein-DNA interactions, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 8337–41.
- Tsutsui, K., Tsutsui, K. and Muller, M.T. 1988, The nuclear scaffold exhibits DNA-binding sites selective for supercoiled DNA, *J. Biol. Chem.*, **263**, 7235–41.
- Wei, X., Samarabandu, J., Devdhar, R.S., Siegel, A.J., Acharya, R. and Berezney, R. 1998, Segregation of transcription and replication sites into higher order domains, *Science*, **281**, 1502–5.
- Cook, P.R. 1999, The organization of replication and transcription, *Science*, **282**, 1790–5.
- Anachkova, B., Djeliova, V. and Russev, G. 2005, Nuclear matrix support of DNA replication, *J. Cell Biochem.*, **96**, 951–61.
- Aranda-Anzaldo, A. and Dent, M.A.R. 1997, Loss of DNA-loop supercoiling and organization in cells infected by herpes simplex virus type 1, *Res. Virol.*, **148**, 397–408.
- Aranda-Anzaldo, A., Orozco-Velasco, F., García-Villa, E. and Gariglio, P. 1999, p53 is a rate-limiting factor in the repair of higher-order DNA structure, *Biochim. Biophys. Acta*, **1446**, 181–92.
- Gombert, W.M., Farris, S.D., Rubio, E.D., Morey-Rosler, K.M., Schubach, W.H. and Krumm, A. 2003, The c-myc insulator element and matrix attachment region define the c-myc chromosomal domain, *Mol. Cell Biol.*, **23**, 9338–48.
- Iarovaia, O.V., Bystritsky, A., Ravcheev, D., Hancock, R. and Razin, S.V. 2004, Visualization of individual DNA loops and a map of loop domains in the human dystrophin gene, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 2079–86.
- Petrov, A., Pirozhkova, I., Carnac, G., Laoudj, D., Lipinski, M. and Vassetzky, Y.S. 2006, Chromatin loop domain organization within the 4q35 locus in facioscapulohumeral dystrophy patients versus normal human myoblasts, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 6982–7.
- Hair, A. and Vassetzky, Y. 2007, Determination of the chromatin domain structure in arrayed repeated regions: organization of the somatic 5S RNA domain during embryogenesis in *Xenopus laevis*, *J. Cell Biochem.*, **102**, 1140–8.
- Kumar, P., Bischof, O., Purbey, P., et al. 2007, Functional interaction between PML and SATB1 regulates

- chromatin-loop architecture and transcription of the MHC class 1 locus, *Nat. Cell Biol.*, **9**, 45–56.
27. Frisch, M., Frech, K., Klingenhoff, A., Cartharius, K., Liebich, I. and Werner, T. 2002, In silico prediction of scaffold/matrix attachment regions in large genomic sequences, *Genome Res.*, **12**, 349–54.
  28. Evans, K., Ott, S., Hansen, A., Koentges, G. and Wernisch, L. 2007, A comparative study of S/MAR prediction tools, *BMC Bioinformatics*, **8**, 71.
  29. Ottaviani, D., Lever, E., Mitter, R., et al. 2008, Reconfiguration of genomic anchors upon transcriptional activation of the human major histocompatibility complex, *Genome Res.*, **18**, 1778–1786.
  30. Linnemann, A.K., Platts, A.E. and Krawetz, S.A. 2009, Differential nuclear scaffold/matrix attachment marks expressed genes, *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 645–54.
  31. Maya-Mendoza, A. and Aranda-Anzaldo, A. 2003, Positional mapping of specific DNA sequences relative to the nuclear substructure by direct polymerase chain reaction on nuclear matrix-bound templates, *Anal. Biochem.*, **313**, 196–207.
  32. Singh, G.B., Kramer, J.A. and Krawetz, S.A. 1997, Mathematical model to predict regions of chromatin attachment to the nuclear matrix, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 1419–25.
  33. van Drunen, C.M., Sewalt, R.G.A.B., Oosterling, R.W., Weisbeek, P.J., Smeekens, S.C.M. and van Driel, R. 1999, A bipartite sequence element associated with matrix/scaffold attachment regions, *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2924–30.
  34. Glazko, G.V., Rogozin, I.B. and Glazkov, M.V. 2001, Comparative study and prediction of DNA fragments associated with various elements of the nuclear matrix, *Biochim. Biophys. Acta*, **1517**, 351–64.
  35. Nelson, D.L. and Cox, M.M. 2000, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3rd edition, Worth Publishers: New York, pp. 915–8.
  36. Calladine, C.R., Drew, H.R., Luisi, B.F. and Travers, A.A. 2004, *Understanding DNA*, 3rd edition, Elsevier-Academic Press: London, pp. 94–138.
  37. Bode, J., Kowhi, Y., Dickinson, L., et al. 1992, Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs, *Science*, **255**, 195–7.
  38. Benham, C., Kohwi-Shigematsu, T. and Bode, J. 1997, Stress-induced duplex destabilization in scaffold/matrix attachment regions, *J. Mol. Biol.*, **274**, 181–96.
  39. Maya-Mendoza, A., Hernández-Muñoz, R., Gariglio, P. and Aranda-Anzaldo, A. 2004, Gene positional changes relative to the nuclear substructure during carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats, *J. Cell Biochem.*, **93**, 1084–98.
  40. Lewin, B. 1980, *Gene Expression 2*, 2nd edition, John Wiley and Sons: New York, pp. 360–2.
  41. Gromova, I.I., Nielsen, O.F. and Razin, S.V. 1995, Long-range fragmentation of the eukaryotic genome by exogenous and endogenous nucleases proceeds in a specific fashion via preferential DNA cleavage at matrix attachment sites, *J. Biol. Chem.*, **270**, 18685–90.
  42. Jin, L., Long, L., Green, M.A. and Spear, B.T. 2009, The alpha-fetoprotein enhancer region activates the albumin and alpha-fetoprotein promoters during liver development, *Dev. Biol.*, doi:10.1016/j.dbio.2009.09.026.
  43. Razin, S.V. 1987, DNA interaction with the nuclear matrix and spatial organization of replication and transcription, *BioEssays*, **6**, 19–23.
  44. Rollini, P., Namciu, S.J., Marsden, M.D. and Fournier, R.E.K. 1999, Identification and characterization of nuclear matrix-attachment regions in the human serpin gene cluster at 14q32.1, *Nucleic Acids Res.*, **27**, 3779–91.
  45. Gromova, I.I., Thomsen, B. and Razin, S.V. 1995, Different topoisomerase II antitumor drugs direct similar specific long-range fragmentation of an amplified c-myc gene locus in living cells and in high-salt-extracted nuclei, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 102–6.
  46. Davie, J.R. 1996, Histone modifications, chromatin structure and the nuclear matrix, *J. Cell Biochem.*, **62**, 149–57.
  47. Kantidze, O.L. and Razin, S.V. 2009, Chromatin loops, illegitimate recombination and genome evolution, *BioEssays*, **31**, 278–86.
  48. Lazarevich, N.L. 2000, Molecular mechanisms of alpha-fetoprotein gene expression, *Biochemistry (Mosc.)*, **65**, 117–33.
  49. Pinkert, C.A., Ornitz, D.M., Brinster, R.L. and Palmiter, R.D. 1987, An albumin enhancer located 10 kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice, *Genes Dev.*, **1**, 268–76.
  50. Mitchell, J.A. and Fraser, P. 2008, Transcription factories are nuclear subcompartments that remain in the absence of transcription, *Genes Dev.*, **22**, 20–5.
  51. Jackson, D.A. and Pombo, A. 1998, Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells, *J. Cell Biol.*, **140**, 1285–95.
  52. Dimitrova, D.S. and Berezney, R. 2002, The spatio-temporal organization of DNA replication sites is identical in primary, immortalized and transformed mammalian cells, *J. Cell Sci.*, **115**, 4037–51.
  53. Osborne, C.S., Chakalova, L., Mitchell, J.A., et al. 2007, Myc dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by Igh, *PLoS Biol.*, **5**, e192.
  54. Linnemann, A.K. and Krawetz, S.A. 2009, Maintenance of a functional higher order chromatin structure: the role of the nuclear matrix in normal and disease states, *Gene Ther. Mol. Biol.*, **13**, 231–43.
  55. Martínez-Ramos, I., Maya-Mendoza, A., Gariglio, P. and Aranda-Anzaldo, A. 2005, A global but stable change in HeLa cell morphology induces reorganization of DNA structural loop domains within the cell nucleus, *J. Cell Biochem.*, **96**, 79–88.
  56. Aranda-Anzaldo, A. 2009, A structural basis for cellular senescence, *Aging*, **1**, 598–607.
  57. Lemaitre, J-M., Danis, E., Pasero, P., Vassetzky, Y. and Mechali, M. 2005, Mitotic remodelling of the replicon and chromosome structure, *Cell*, **123**, 787–801.
  58. Bennett, M.D. 1977, The time and duration of meiosis, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.*, **277**, 201–26.

**ANEXO II**

**RIVERA-MULIA, J. C. Y ARANDA-ANZALDO, A., 2008**

# Estructura y función de la unidad fundamental de replicación del DNA (el replicón) en eucariontes

Juan Carlos Rivera Mulia\* y Armando Aranda Anzaldo\*

Recepción: 16 de mayo de 2008  
Aceptación: 11 de agosto de 2008

\*Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México.

Apartado postal 428, C.P. 50000, Toluca, Estado de México.

Correo electrónico:

riveramjc@gmail.com y aarandaa@uaemex.mx

Este trabajo ha sido patrocinado por la UAEMéx, proyecto 2212/2006, y el

CONACYT, proyecto 48447-Q (Responsable Armando Aranda Anzaldo). Juan Carlos Rivera Mulia es becario CONACYT y candidato a Doctor en Ciencias registrado en el programa en

Ciencias Biomédicas con sede en el Instituto de Fisiología Celular (IFC), UNAM, programa del Padrón Nacional de Posgrado Competente a Nivel Internacional.

**Resumen.** La replicación del DNA es indispensable para la transmisión de la información genética y permite copiar el genoma con gran exactitud. Desde el siglo pasado se propuso el modelo del replicón para explicar el mecanismo general de duplicación del genoma en bacterias. Estudios posteriores en la levadura permitieron identificar proteínas y secuencias de DNA que participan en el inicio de la replicación en forma similar a lo descrito en procariontes, esto condujo a intentar generalizar el modelo del replicón a los eucariontes. Se han descrito algunos factores clave en el proceso de replicación que están conservados desde la levadura hasta el humano. Sin embargo, todavía no se comprende cómo se determinan los sitios de inicio de la replicación y cuál es la estructura del replicón en los metazoarios. En este artículo se sugiere que la organización topológica del DNA en el núcleo celular determina la estructura y función de los replicones en los eucariontes superiores.

**Palabras claves:** ADN, bucles de ADN, bucles de DNA, cromatina, matriz nuclear, DNA MARS, origen de replicación, ORC.

## Structure and Function of the Fundamental Unit of DNA Replication (the Replicon) in Eukaryotes

**Abstract.** DNA replication is necessary for the transmission of genetic information and thus such a process must achieve accurate copying of the genome. Since the last century the replicon model has been proposed in order to explain the general mechanism of genome duplication in bacteria. Later work in yeast led to identifying proteins and DNA sequences that participate in the initiation of replication in a similar fashion to what has been observed in prokaryotes. This led to attempts for generalizing the replicon model to eukaryotes. Several key factors involved in replication and conserved from yeast to man have been described to date. However, as yet, it is not understood how are determined the sites for the start of replication nor the structure of actual replicons in metazoans. In this article it is suggested that the topological organization of DNA within the cell nucleus determines the structure and function of replicons in higher eukaryotes.

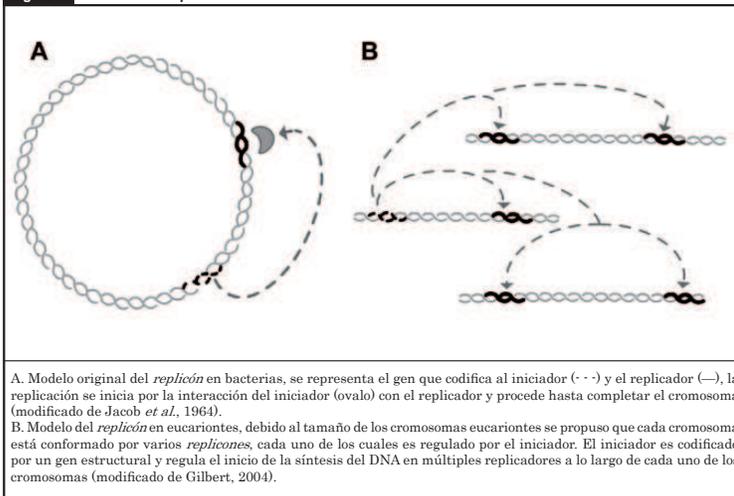
**Key words:** chromatin, DNA loops, nuclear matrix, MARS, DNA ORC.

## Introducción

La generación de nuevas células, desde los organismos procariontes hasta los humanos, requiere de mecanismos que dupliquen con exactitud el material genético antes de cada división celular. La *replicación* es el proceso mediante el cual se copia el genoma, constituido fundamentalmente por el ácido desoxirribonucleico (DNA) y consiste en una serie de pasos regulados durante el ciclo celular. Con el propósito de comprender los mecanismos de duplicación del genoma en las bacterias se propuso el modelo del *replicón*. Este modelo plantea la existencia de unidades funcionales de replicación, las cuales están reguladas por elementos proteicos y secuencias de DNA

específicas que determinan los sitios de arranque de la síntesis del DNA. A pesar del descubrimiento de diversos factores moleculares involucrados en la replicación y de los distintos pasos requeridos para su inicio, elongación y terminación, aún no se conocen los factores estructurales que establecen las unidades de replicación en los organismos pluricelulares. En este artículo se discuten las evidencias experimentales a favor y en contra de la generalización del modelo del replicón a los metazoarios. Además, se propone un modelo en el cual la organización topológica del DNA en el interior del núcleo celular constituye el soporte estructural de la replicación y por lo tanto determina la distribución funcional de las unidades de replicación en los eucariontes superiores.

Figura 1. El modelo del replicón.



## 1. El modelo del replicón

Diez años después del descubrimiento de la estructura del DNA y poco después de sugerir los mecanismos de control de la expresión génica en procariontes (Jacob y Monod, 1961), Jacob y colaboradores propusieron el modelo del replicón (Jacob *et al.*, 1964; Jacob, 1993); el cual trataba de explicar los mecanismos de regulación de la síntesis del DNA en las bacterias. En este modelo el replicón es una molécula circular de DNA (como los cromosomas bacterianos) que contiene dos elementos específicos determinados genéticamente. El primero se expresa a partir de un gen estructural y es un

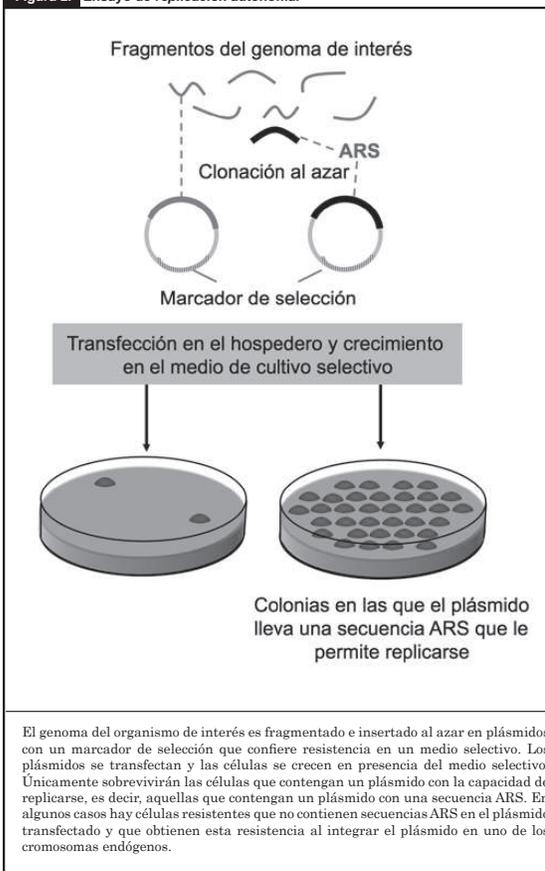
componente que difunde y regula el inicio de la polimerización: el *iniciador*, el cual interactúa con el segundo elemento, que es una secuencia específica de nucleótidos en el DNA que determina el sitio en el que comienza la síntesis: el *replicador* (figura 1A).

A pesar de que el modelo del replicón se planteó originalmente para comprender la síntesis del DNA de las bacterias, pronto se extendió como posible mecanismo de la replicación de los eucariotes (Gilbert, 2004). De esta manera, se visualizó a cada cromosoma eucariote como un conjunto de unidades de replicación (replicones), en cada uno de los cuales podría regularse el inicio de la polimerización a través de la interacción del iniciador y del replicador (figura 1B).

El valor heurístico del modelo se hizo evidente con el desarrollo de nuevas estrategias experimentales que permitieron la identificación en *Escherichia coli* de la secuencia de inicio de replicación OriC (Yasuda e Hirota, 1977) y de la proteína *dnaA* (Chakraborty *et al.*, 1982) como replicador e iniciador, respectivamente, del cromosoma bacteriano. Más tarde, se encontró que tanto el replicador como el iniciador están muy conservados entre los procariontes por lo que pronto comenzó la búsqueda del replicador e iniciador eucariote (Fujita *et al.*, 1989; 1990; 1992).

La estrategia que permitió la identificación de replicadores en bacterias fue el *ensayo de replicación autónoma* (Yasuda e Hirota, 1977), que consiste en clonar fragmentos del genoma en estudio en vectores no replicantes, por lo que los replicadores se identifican en aquellos plásmidos que adquieren la capacidad de duplicarse dentro de la célula transfectada (figura 2). Además, la localización y caracterización del replicador permitió identificar fácilmente al iniciador como aquella

Figura 2. Ensayo de replicación autónoma.



proteína con la capacidad de unirse de manera específica a la secuencia del replicador (Chakraborty *et al.*, 1982).

Las primeras evidencias experimentales que mostraban el arreglo en tándem de los replicones eucariontes derivaron de ensayos autoradiográficos sobre moléculas de DNA replicadas (Hand, 1975; Edenberg y Huberman, 1975; Berezney *et al.*, 2000). Estos ensayos consisten en cultivar células en presencia de análogos radioactivos de nucleótidos por un breve tiempo (pulso); posteriormente, las células se lisan y el DNA se extrae y extiende sobre laminillas para someterlo a autoradiografía. Así, además de observar múltiples sitios de arranque de la replicación (*orígenes de replicación*) a lo largo del DNA extendido, se encontró que la duplicación del genoma eucarionte se lleva a cabo por horquillas de replicación adyacentes que progresan de manera bidireccional (figura 3).

Los experimentos de autoradiografía revelaron que cada cromosoma eucarionte se duplica mediante el disparo de cientos a miles de orígenes de replicación y que el tamaño de los replicones de mamífero es muy heterogéneo, de 30 a 450 kilobases (kb) medido en la señal de autoradiografía del extremo de una horquilla a la otra (Huberman y Riggs, 1968; Taylor, 1968; Gilbert, 2004; Berezney *et al.*, 2000). Además, se observó que normalmente replicones adyacentes muestran patrones similares de marcaje, lo que sugiere que las unidades de replicación de los eucariontes podrían estar organizadas en grupos y que cada agrupamiento dispara de manera sincronizada en tiempos particulares durante la fase S (Edenberg y Huberman, 1975; Berezney *et al.*, 2000). Experimentos posteriores corroboraron el agrupamiento de los replicones mediante la detección del DNA recién replicado por fluorescencia en fibras de DNA extendidas (Jackson y Pombo, 1998). Por otra parte, se ha demostrado que el número de sitios de arranque de la replicación a lo largo de los cromosomas eucariontes puede variar en función de la etapa del desarrollo (Stambrook y Flickinger, 1970; Blumenthal *et al.*, 1974). Esto indica que la duplicación del genoma eucarionte implica un mayor grado de complejidad difícilmente ajustable al modelo del replicón en su propuesta original.

## 2. El replicón de la levadura

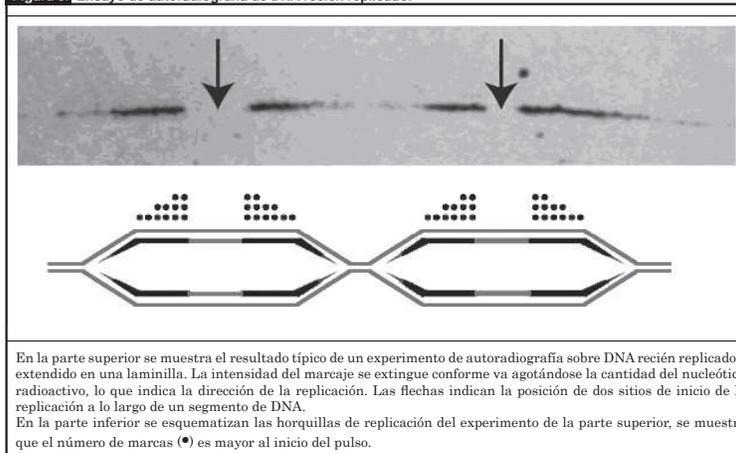
Poco después de la identificación de los elementos del replicón en bacterias se realizó el ensayo de replicación autónoma en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, uno de los organismos más

estudiados como modelo de los eucariontes. Así, se obtuvo la clonación de secuencias autónomas replicantes (ARS por sus siglas en inglés). Los elementos ARS, además de permitir la replicación de los plásmidos, dependen de secuencias específicas (Celniker *et al.*, 1984; Marahrens y Stillman, 1992) y funcionan como sitios de inicio de la síntesis del DNA en su contexto nativo por lo que constituyen los replicadores de la levadura (Huberman *et al.*, 1988).

Las ARSS de la levadura se conforman por tres o cuatro repeticiones de una secuencia consenso ACS (*ARS consensus sequence*) y varios elementos "B". La secuencia ACS es rica en A-T y consiste en 11 pb ([A/T] TTTAT [A/G] TTT [A/T]), mientras que los elementos B son secuencias conservadas que probablemente contribuyen al desenrollamiento de la doble hélice en el inicio de la replicación, al funcionar como secuencias de fácil desenrollamiento denominadas elementos DUE: DNA Unwinding Element (Bell y Dutta, 2002; Biamonti *et al.*, 2003).

Una vez caracterizado el replicador de la levadura, las investigaciones se enfocaron en la identificación del iniciador. Así, se descubrió un complejo proteico que se une de manera específica a la secuencia ACS y que fue denominado complejo de reconocimiento del origen de replicación, ORC por sus siglas en inglés (Bell y Stillman, 1992). Además, se ha demostrado que el complejo ORC se une preferentemente a secuencias que contienen orígenes de replicación (Lee y Bell, 1997). El ORC es un hetero-hexámero compuesto por las proteínas Orc1-Orc6 e interactúa específicamente con los elementos ACS y B de la levadura en una región de aproximadamente 30 pb. La unión del ORC con el DNA requiere al menos de las proteínas Orc1-Orc5 y aunque la Orc6 sólo parece requerirse durante la replicación; la interacción del ORC con el DNA permanece

Figura 3. Ensayo de autoradiografía de DNA recién replicado.



estable durante todo el ciclo celular. Al comienzo de la fase G1 la proteína Cdc6 se asocia al ORC y entonces recluta seis proteínas Mcm (proteínas de mantenimiento de minicromosomas). Posteriormente, Cdc6 es reemplazada por Cdc4 por medio de la actividad de la kinasa Cdk1/Ckb5 para formar el complejo de pre-replicación (pre-RC), que es activado por la kinasa Cdc7/Dbf4 para iniciar la replicación (DePamphilis, 1998; Bell y Dutta, 2002).

A pesar de la evidente complejidad de la replicación en eucariontes, el descubrimiento del replicador de levadura (Struhl *et al.*, 1979) y más tarde la identificación de su iniciador (Bell y Stillman, 1992) apoyaron la generalización del modelo no sólo a los eucariontes inferiores, sino a los vertebrados superiores con la expectativa incluso de llegar a comprender el mecanismo de duplicación del genoma humano.

### 3. El replicón de los metazoarios

Al demostrar que las predicciones del modelo del replicón se cumplían en eucariontes inferiores, como la levadura, las investigaciones se enfocaron en la búsqueda del replicador y del iniciador de los metazoarios. Sin embargo, el ensayo de replicación autónoma no produjo los resultados esperados, ya que durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster* existen múltiples orígenes de replicación que no dependen de secuencia específica (Blumenthal *et al.*, 1974); asimismo, los primeros experimentos realizados en ovocitos de *Xenopus laevis* demostraron que cualquier secuencia podría funcionar como origen de replicación, incluso secuencias de origen bacteriano (Harland y Laskey, 1980; Mechali y Kearsey, 1984; Hyrien y Mechali, 1992; Mahbubani *et al.*, 1992). En el caso de los mamíferos se observó una escasa actividad de replicación en los plásmidos transfectados que era poco reproducible (Gilbert y Cohen, 1989; Masukata *et al.*, 1993). Además, se observó que al integrarse el plásmido transfectado de manera estable en cromosomas endógenos la replicación puede iniciar de manera aleatoria dentro de la secuencia del plásmido (Krysan y Calos, 1991). Estas evidencias sugieren que la determinación del sitio de inicio de la replicación en el genoma de los metazoarios no depende de secuencias específicas.

Más tarde se realizaron observaciones que iniciaron una controversia sobre la necesidad de secuencias específicas para el replicador metazoario. El análisis de la replicación de una región amplificada en una línea celular derivada de células de ovario de hámster (células CHO), logró establecer que el inicio de la replicación podía localizarse en sitios discretos sugiriendo la existencia de secuencias específicas que funcionan como replicadores en los mamíferos (Heintz y Hamlin, 1982). Estudios subsecuentes en las células CHO

produjeron resultados contradictorios. Por un lado, se generaron evidencias que sugieren que la iniciación de la replicación ocurre en sitios específicos (Burhans *et al.*, 1990; Kobayashi *et al.*, 1998); mientras que en otros ensayos se demostró que la replicación puede iniciar en cualquier sitio (Vaughn *et al.*, 1990; Dijkwel *et al.*, 2002). Debido a estas discrepancias, se ha propuesto que algunos de los métodos de mapeo son menos sensibles y únicamente detectan los sitios que se activan con mayor frecuencia (Gilbert, 2001; Dijkwel *et al.*, 2002; Gilbert, 2004).

Por otro lado, estudios en *D. melanogaster* demostraron que los orígenes de replicación pueden cambiar de acuerdo con la etapa de desarrollo de la mosca (Blumenthal *et al.*, 1974) orientándose a sitios más discretos conforme avanza la ontogenia del organismo (Sasaki *et al.*, 1999). Asimismo, en el caso de *X. laevis* se demostró que existe aleatoriedad en el uso de los orígenes de replicación en embriones tempranos (Hyrien y Mechali, 1992), la cual es sustituida por un patrón de inicio de la síntesis de DNA más localizado después de la etapa de blástula (Hyrien *et al.*, 1995). Considerando estas observaciones se planteó que existen mecanismos que establecen el patrón de replicación en función del desarrollo.

#### 3.1 El iniciador

A pesar de las dificultades para caracterizar el replicador de los metazoarios, parece que la estructura y función del iniciador están conservadas en todos los eucariontes (Bell y Dutta, 2002; Diffley y Labib, 2002). Se han encontrado homólogos del ORC de levadura que son necesarios para la iniciación de la replicación en *X. laevis* (Romanowski *et al.*, 1996; Rowles *et al.*, 1996; Carpenter *et al.*, 1996), en *D. melanogaster* (Pflum y Botchman, 2001; Landis *et al.*, 1997; Chesnokov *et al.*, 1999) y en células de humano el homólogo del ORC es necesario para la replicación del genoma de virus infecciosos (Dahr *et al.*, 2001).

En la levadura, además del ORC, existen cerca de 20 proteínas involucradas en la regulación del inicio de la replicación y hasta ahora se han identificado homólogos para la mayoría de éstas en eucariontes superiores. Mediante mutaciones genéticas se ha demostrado que los homólogos son requeridos para iniciar la replicación en todos los eucariontes analizados (DePamphilis, 1998; 2003). No obstante, existen diferencias entre los metazoarios y la levadura: en *X. laevis* y en mamíferos el ORC únicamente se asocia con el DNA en G1 y es liberado de la cromatina en la mitosis (Romanowski *et al.*, 1996; Abdurashidova *et al.*, 1998). En *X. laevis* la unión de las proteínas Mcm requiere otro componente para ensamblar el complejo pre-RC: el RLF-B. Además, en los metazoarios el pre-RC se forma por la actividad del complejo de la cinasa

Cdk2/Ciclina A, E en lugar de Cdk1/Clb5 (DePamphilis, 1998; Diffley y Labib, 2002).

Por otro lado, se ha observado en todos los eucariontes que la iniciación de la replicación está restringida a una vez por origen de replicación y por ciclo celular. El control de replicación que evita que un origen se active más de una vez por ciclo celular depende de modificaciones en el ORC que desestabilizan su interacción con el origen de replicación. En levaduras estas modificaciones consisten en la fosforilación del ORC por medio de la actividad de la cinasa Cdk1/Clb5; además Cdc6 es fosforilada al liberarse del pre-RC y posteriormente se ubiquitina y degrada. En *X. laevis* el ensamblaje del pre-RC libera al ORC que es fosforilado y degradado. En mamíferos el CDC6 fosforilado es exportado del núcleo durante la fase S y el ORC es degradado después de su ubiquitinación (DePamphilis, 2003).

### 3.2 La búsqueda del replicador metazoario

Al fallar el ensayo de replicación autónoma, surgió la necesidad de desarrollar nuevas herramientas para llevar a cabo el mapeo de los orígenes de replicación en metazoarios (DePamphilis, 1993). Sin embargo, los resultados infructuosos en la búsqueda de ARS parecían indicar de manera clara que el replicador de eucariontes superiores no depende de una secuencia particular y que la elección del sitio de arranque de la replicación es al azar.

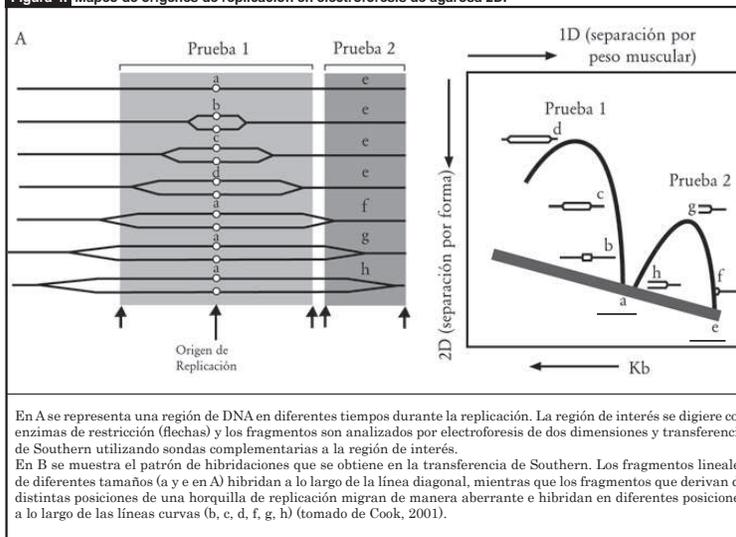
Una de las primeras técnicas utilizadas para detectar los sitios de arranque de la replicación fue la identificación del DNA recién sintetizado en un locus de interés (de secuencia conocida), asumiendo que el replicador debe estar cerca de estas regiones. Para ello, las células se cultivan en presencia de análogos radioactivos de nucleótidos, el DNA purificado es digerido con enzimas de restricción y posteriormente se analiza por autoradiografía cuáles fragmentos incorporaron el marcaje. Al dar pequeños pulsos del nucleótido radioactivo en células sincronizadas es posible identificar las regiones de inicio de la replicación (Heintz y Hamlin, 1982; Dijkwel y Hamlin, 1996).

Más tarde surgieron diversas estrategias experimentales, entre las cuales una de las más utilizadas fue el mapeo de orígenes de replicación por electroforesis en dos dimensiones en agarosa. Este ensayo consiste en aislar DNA de células proliferantes, digerirlo con enzimas

de restricción y separar los fragmentos por peso molecular en un gel de agarosa (1D). El DNA que no se ha replicado producirá fragmentos lineales que en la segunda separación (2D) forman una línea diagonal; mientras que el DNA replicado tendrá formas no lineales (formas de "Y" o "burbujas" dependiendo del sitio del corte en la horquilla de replicación) que migran de manera aberrante (figura 4). Los patrones de migración son identificados mediante transferencia e hibridación tipo *Southern* utilizando como sondas regiones del locus de interés (Brewer y Fangman, 1987). La sensibilidad de esta técnica únicamente permite identificar regiones muy grandes de arranque de la replicación (~50 kb), por lo que el inicio preciso podría estar en cualquier sitio del fragmento (Dijkwel y Hamlin, 1996; Huberman, 1997; DePamphilis, 1998; Cook, 2001).

El descubrimiento del iniciador de *S. cerevisiae* y de sus homólogos en eucariontes superiores, desde la mosca *D. melanogaster* hasta el humano, proporcionó una prometedora estrategia para identificar al replicador de los metazoarios al analizar las secuencias a las que el ORC se une. Así, surgieron evidencias que mostraban una asociación preferencial del ORC con ciertas secuencias en *D. melanogaster* (Austin *et al.*, 1999) y en humano (Abdurashidova *et al.*, 2003). Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que en ambas especies el ORC no se une de manera específica a alguna secuencia en particular, sino que depende de la topología del DNA ya que se une preferentemente a regiones con hiperenrollamiento negativo. Asimismo, existen evidencias de interacciones del ORC con diferentes proteínas involucradas en la remodelación

Figura 4. Mapeo de orígenes de replicación en electroforesis de agarosa 2D.



de la cromatina, por lo que se sugiere un papel del ORC en el establecimiento de las diferentes configuraciones de la cromatina (Vashee *et al.*, 2003; Remus *et al.*, 2004).

Con el surgimiento de nuevas herramientas de la biología molecular se han diseñado diversas técnicas para el mapeo de los orígenes de replicación, esto ha hecho mucho más sensible la detección (Bielinsky y Gerbi, 2001); sin embargo, hasta ahora no se ha tenido éxito en la búsqueda del replicador de los metazoarios. Más aun, se han observado notables diferencias en la identificación de los orígenes de replicación de acuerdo con los métodos utilizados (Gilbert, 2004).

### 3.3 Replicadores en mamíferos

A pesar de la intensa búsqueda del replicador de los metazoarios, hasta ahora sólo se han logrado caracterizar unos cuantos sitios de inicio de la replicación relativamente específicos. El locus del gen que codifica para la dihidrofolatoreductasa (DHFR) es uno de ellos y se ha estudiado en una cepa peculiar de las células CHO. Estas células se han seleccionado por su resistencia al metotrexato, conferida por la amplificación de uno de los alelos de la DHFR que se conforma por 1 000 copias arregladas en tándem (Mildbrant *et al.*, 1981; Dijkwel y Hamlin, 1996). La caracterización de esta región a nivel de secuencia permitió el análisis de los sitios de inicio de la síntesis del DNA. Así, se ha identificado una zona de 55 kb en la cual comienza la polimerización de manera deslocalizada, pero con tres sitios más frecuentes de arranque de la replicación que se han denominado *ori-β*, *ori-β'* y *ori-γ* (Anachkova y Hamlin, 1989; Dijkwel y Hamlin, 1996; Kobayashi *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2000). Además, se encontró que diferentes segmentos de esta región pueden funcionar como replicadores de manera ectópica al integrarlos de manera estable en otros cromosomas (Handeli *et al.*, 1989; Altman y Fanning, 2001). No obstante, al realizar deleciones dentro de esta región eliminando los sitios de arranque *ori-β*, *ori-β'* y *ori-γ* de manera independiente, e incluso en su totalidad, no se altera el inicio de la replicación del locus (Kalejta *et al.*, 1998; Mesner *et al.*, 2003).

Otro de los sitios de arranque de la replicación identificados en mamíferos se encuentra en el locus de la *β-globina* humana, el cual consiste en cinco genes de expresión eritroide específica. Este locus presenta un patrón de expresión finamente regulado durante el desarrollo y contiene elementos de regulación transcripcional distantes; por ello se ha convertido en uno de los dominios génicos mejor caracterizados en el humano (Li *et al.*, 2002). Uno de los elementos de regulación transcripcional, la región de control del locus (LCR), participa también en la regulación de la replicación ya que al eliminarlo se inhibe la expresión en las células eritroides y la replicación del locus

se retrasa durante la fase S (Forrester *et al.*, 1990; Aladjem *et al.*, 1995). Posteriormente, se estableció el sitio de inicio de la replicación en una región de 8 kb (denominada IR) entre los genes de expresión adulta del locus y se observó que su deleción suprime la replicación por completo (Kitsberg *et al.*, 1993; Aladjem *et al.*, 1995). Al igual que las secuencias replicadoras del locus de la DHFR, la secuencia IR puede funcionar como sitio de inicio de la síntesis del DNA de manera ectópica (Aladjem *et al.*, 1998). No obstante, el ortólogo murino del locus de la *β-globina* parece presentar múltiples sitios de inicio de la replicación y la deleción de la región IR no afecta la duplicación del locus (Aladjem *et al.*, 2002), lo que indica que, a pesar del alto grado de conservación del locus, la función del replicador no se comparte entre estos organismos. Estudios recientes en el locus de la *β-globina* humana indican que existen elementos distantes involucrados en el control de la replicación de esta región, y que tales elementos no residen en la región del LCR (Cimbora *et al.*, 2000).

Uno de los sitios de inicio de la replicación más específicos, en cuanto a la longitud de la secuencia, identificados en metazoarios es el del locus de la lámina B2. El origen de replicación fue identificado en una región de 1.2 kb (Giacca *et al.*, 1994; Abdurashidova *et al.*, 2000) y es activo en líneas celulares de diferentes orígenes, así como en células primarias de humano (Kumar *et al.*, 1996). Además, se ha observado la interacción de este origen de replicación con proteínas que conforman el ORC humano (Abdurashidova *et al.*, 2003); asimismo, la región de 1.2 kb puede funcionar como replicador en otros sitios del genoma y parece contener varios elementos que en conjunto regulan el arranque de la síntesis del DNA (Paixao *et al.*, 2004).

Investigaciones más recientes han identificado orígenes de replicación en el locus del *c-myc* humano en una región de 2.4 kb (Tao *et al.*, 2000). En vectores transitorios o integrados se ha observado que esta región funciona como replicador con múltiples sitios de inicio (Trivedi *et al.*, 1998; Malott *et al.*, 1999). Se ha propuesto que esta región está conformada por diversos elementos que cooperan para regular el inicio de la replicación (Liu *et al.*, 2003).

Hasta ahora se han descrito cerca de 20 orígenes de replicación en mamíferos y, aunque se ha demostrado que algunos de ellos pueden funcionar como replicadores, no se ha observado alguna secuencia consenso que los defina. Debido a que en replicadores identificados en mamíferos se observa la cooperación de distintas secuencias para regular el origen de la replicación (Liu *et al.*, 2003; Paixao *et al.*, 2004; Altman y Fanning, 2004), se ha planteado que el replicador de los metazoarios depende de secuencias específicas divididas en módulos no redundantes que cooperativamente dirigen la iniciación de la

replicación a regiones localizadas en sitios discretos (Aladjem y Fanning, 2004; Aladjem, 2007). Sin embargo, la única característica compartida entre todos los replicadores de eucariontes es la riqueza en nucleótidos A y T.

#### 4. El contexto de la replicación

El proceso de la replicación en los organismos vivos no ocurre como en el tubo de ensaye. Las bacterias tienen que replicar su cromosoma de una manera coordinada al crecimiento de la membrana y la pared celular para poder segregarse el genoma duplicado de manera adecuada en la siguiente generación (Dingman, 1974; Jacob, 1993). En los eucariontes la replicación tiene lugar sobre un templado que está muy organizado en el interior del núcleo; más aun, la interacción del DNA con el octámero de histonas debe removerse conforme avanza la polimerización, lo cual reduce notablemente la tasa de replicación. Además, el genoma de los eucariontes se replica siguiendo un patrón temporal regulado durante la fase S del ciclo celular; esta fase puede dividirse al menos en dos períodos, durante la primera mitad se replican las regiones ricas en genes que normalmente son regiones abiertas de la cromatina (eucromatina), mientras que la heterocromatina se replica en la fase S tardía (Berezney *et al.*, 2000; Woodfine *et al.*, 2004).

Por otro lado, se ha planteado que el modelo comúnmente aceptado del mecanismo de replicación implica problemas topológicos para las cadenas recién sintetizadas; esto debido a que involucra el movimiento de las polimerasas sobre el templado. Sin embargo, ello generaría estrés torsional en el templado en ambos lados de la horquilla que podría generar que las cadenas resultantes se enredaran entre sí siendo imposible separarlas. El estrés torsional es resuelto por la acción de las topoisomerasas, nucleasas que cortan de manera transitoria el DNA para permitir su rotación. No obstante, el movimiento de una maquinaria de replicación de enorme tamaño implicaría un elevado gasto energético, más aun si se consideran dos maquinarias por horquilla sintetizando en direcciones opuestas sobre el templado. Por ello se sugiere que las enzimas de copiado permanecen inmóviles en grandes complejos macromoleculares denominados *fábricas de replicación*, mientras que el DNA es el que se mueve hacia estas fábricas de manera progresiva y las abandona conforme va siendo duplicado (Dingman, 1974; Cook, 1999 y 2001).

Desde que se propuso el modelo original del replicón de las bacterias se sugirió que las DNA polimerasas debían estar fijas, probablemente unidas a la membrana, para facilitar el control de la iniciación de la polimerización y la distribución de las copias del genoma en las nuevas células (Jacob *et al.*, 1964; Dingman, 1974; Jacob, 1993). Pronto surgieron

evidencias experimentales que señalaban el anclaje del cromosoma bacteriano a la membrana, así como de proteínas involucradas en la iniciación de la replicación (Dingman, 1974; Jacob, 1993). Recientemente, se ha comprobado *in vivo*, mediante la fusión de las polimerasas con proteínas fluorescentes, que la maquinaria de replicación de las bacterias está fija (Lemon y Grossman, 1998) y que es el templado el que se mueve hacia ella para ser duplicado (Lemon y Grossman, 2000). Experimentos similares en levadura han revelado que también es el DNA el que se mueve para ser replicado, mientras que la maquinaria de replicación permanece fija (Kitamura *et al.*, 2006).

#### 4.1. La replicación en los eucariontes

Las primeras evidencias que indicaban que la polimerización del DNA se lleva a cabo en sitios fijos provinieron de una línea de investigación diferente. Estudios de la década de 1940 mostraron la existencia de una estructura que aparentemente era la responsable de mantener la forma y el volumen nuclear (Zbarskii, 1998). Sin embargo, fue hasta 1974 que se denominó *matriz nuclear* (MN) a la estructura que se obtenía al lisar las células utilizando detergentes, sales y nucleasas (Berezney y Coffey, 1974). La MN está constituida por las láminas nucleares, complejos residuales del poro, una red interna de ribonucleoproteínas y el nucleolo residual (Berezney *et al.*, 1995; Nickerson, 2001).

Casi al mismo tiempo, estudios independientes demostraron que la cromatina presenta un comportamiento helicoidal similar al de las moléculas circulares de DNA (como los cromosomas bacterianos y mitocondriales), es decir, que el DNA humano está dividido en subunidades superenrolladas en forma de asas o bucles (Cook y Brazell, 1975; Cook y Brazell 1976). Este comportamiento sugirió que el DNA está formando bucles anclados a la MN, lo que es consistente con las observaciones por microscopía de fluorescencia de *nucleoides* (MNs extraídas sin el uso de nucleasas para conservar el DNA). Al teñir estas estructuras con agentes intercalantes del DNA los bucles se desenrollan formando halos fluorescentes que rodean a la MN (Cook *et al.*, 1976; Vogelstein *et al.*, 1980).

Poco después, se estableció una asociación del DNA recién sintetizado con la MN, ya que el marcaje de la cromatina en replicación con isótopos radioactivos reveló que el DNA recién replicado se encuentra estrechamente asociado a la MN (Berezney y Coffey, 1975; Smith *et al.*, 1984; Razin *et al.*, 1986). Más aun, al progresar la síntesis del DNA el marcaje se va extendiendo de la subestructura nuclear a la periferia, lo que sugiere que el DNA se mueve a través de complejos de replicación fijos en la MN (Pardoll *et al.*, 1980; Vogelstein *et al.*, 1980; McCready *et al.*, 1980). El anclaje de la maquinaria de

replicación a la MN es apoyada por evidencias que muestran la asociación de diversos componentes de la maquinaria de replicación con la MN, como DNA polimerasas, primasas, el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y la topoisomerasa-II (Tubo y Berezney, 1987; Hozak *et al.*, 1994; Anachkova *et al.*, 2005). Se ha establecido una correlación entre el tamaño promedio de los bucles con el tamaño típico de los replicones (Buongiorno-Nardelli *et al.*, 1982). Esto sugiere que la organización del genoma en bucles anclados a la MN establece regiones independientes de DNA, las cuales podrían constituir las unidades funcionales de replicación en eucariontes superiores, es decir que cada bucle corresponde a un replicón (Razin, 2001). Con el desarrollo de métodos que permiten establecer la posición de diferentes secuencias con respecto a la MN (Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo, 2003), se han obtenido evidencias que apoyan la idea de que cada bucle constituye un replicón. Así se ha observado que todas las secuencias examinadas se acercan a la MN durante la fase de síntesis del DNA y que posteriormente regresan a sus posiciones originales una vez concluida la replicación (Maya-Mendoza *et al.*, 2003).

Al igual que los orígenes de replicación los sitios de anclaje a la MN no muestran una secuencia consenso, son regiones ricas en nucleótidos A y T y se unen específicamente a MN aisladas. Así, se han denominado regiones de anclaje a la matriz (MARS) a todas aquellas secuencias que tienen el potencial de unirse a la MN (Boulikas, 1995). Existe un gran número de MARS pero sólo un subconjunto de ellos forma los anclajes reales de un bucle de DNA en un tiempo determinado (Boulikas, 1995; Razin, 2001). De este modo, se han definido como regiones de anclaje del bucle (LARS) a las secuencias que constituyen los anclajes de los bucles observados al extraer las células con detergentes y altas concentraciones de sal para obtener los llamados nucleoides, constituidos por la MN y el DNA anclado a esta matriz (Hakes y Berezney, 1991; Razin, 2001; Anachkova *et al.*, 2005).

Las regiones caracterizadas en mamífero como replicadores no presentan homología a nivel de secuencia; sin embargo, se propone que comparten elementos funcionales requeridos para regular el inicio de la replicación. Estos elementos incluyen regiones ricas en A y T, sitios de unión a factores de transcripción, elementos DUE (regiones del DNA cuya secuencia permite una fácil separación de la doble hebra) y secuencias MARS (Aladjem y Fanning, 2004; Anachkova *et al.*, 2005; Aladjem 2007). Se han obtenido evidencias experimentales del papel de las secuencias MARS en la iniciación de la replicación al lograr la replicación extracromosomal de un vector flanqueado por regiones de anclaje a la MN; además, se demostró *in vivo* que el vector se asocia con la MN (Jenke *et al.*, 2004; Stehle *et al.*, 2007).

Para determinar si los orígenes de replicación están anclados a la MN se realizó el marcaje del DNA recién replicado en células sincronizadas y se analizó su asociación a la MN. Diversos experimentos en células distintas aportaron evidencias que sugieren que los orígenes de replicación permanecen unidos a la MN (Aelen *et al.*, 1983; van der Velden *et al.*, 1984; Dijkwel *et al.*, 1986; Razin *et al.*, 1986; Lagarkova *et al.*, 1998). Por lo que se propuso que los LARS son los orígenes de replicación de los metazoarios. Sin embargo, estudios posteriores indicaban que los orígenes de replicación no se unen preferencialmente a la MN (Ortega y DePamphilis, 1998). Más tarde, se demostró que los orígenes de replicación están en una región del bucle que se une a la MN en la fase G1 tardía y que es liberada después de la síntesis del DNA. Además, al utilizar el *ori-β* de la DHFR que replica en la fase S temprana y el origen de replicación de la *β-globina* que se dispara en la fase S tardía (en células no-eritroides) se demostró que los orígenes se asocian con la MN antes de que inicien la replicación (fase G1 tardía) y se separan después de que se han activado (fase S temprana para el *ori-β* y S tardía para el origen de la *β-globina*) (Djeliova *et al.*, 2001; Djeliova *et al.*, 2001b).

Segmentos de DNA purificado inyectados en óvulos de *X. laevis* pueden ser replicados de una forma reminiscente del ciclo celular del embrión normal. La replicación de estos segmentos depende de la formación *in vitro* de estructuras denominadas *pseudonúcleos*, en las que el DNA se organiza en el interior de vesículas de doble membrana que contienen poros y láminas nucleares (Forbes *et al.*, 1983). El ensamblaje de estos pseudonúcleos puede observarse también en extractos celulares y su caracterización ha demostrado que son capaces de importar proteínas. Más aun, se ha observado que, aunque sólo la mitad de los fragmentos de DNA forman estas estructuras, la replicación únicamente ocurre en los pseudonúcleos (Blow y Sleeman, 1990). La replicación de moléculas de DNA en pseudonúcleos depende del ensamblaje de un núcleo-esqueleto y la realización de extracciones salinas sugiere que los pseudonúcleos son capaces de formar estructuras similares a la MN (Jenkins *et al.*, 1993). Asimismo, la eliminación de la lámina B3 (uno de los componentes de la MN; Hozak *et al.*, 1995) de los extractos celulares no afecta el ensamblaje de pseudonúcleos con doble membrana (Newport *et al.*, 1990); pero inhibe completamente la replicación de los fragmentos de DNA que contienen (Jenkins *et al.*, 1993). Estas observaciones son consistentes con experimentos que demuestran que la replicación del DNA se puede llevar a cabo *in vitro* utilizando preparaciones de MN y medios suplementados con nucleótidos (Jackson y Cook, 1986); incluso se ha demostrado que la replicación *in vitro* sobre la MN es dependiente del ciclo celular y no requiere la estructura de la cromatina (Radichev *et al.*, 2005).

Por otro lado, se ha demostrado en mamíferos que la cantidad de la proteína Orc1 oscila durante el ciclo celular, comienza a acumularse en G1, alcanza un máximo en el límite G1/S y posteriormente empieza a decaer. En contraste, la cantidad de las demás proteínas que conforman el ORC (Orc2-5) permanece constante en todo el ciclo celular (Tatsumi *et al.*, 2003; DePamphilis, 2003). En células humanas las proteínas Orc2-5 permanecen unidas a la cromatina durante todo el ciclo celular y en G1 se establece el complejo ORC completo al asociarse con Orc1. Además, extracciones nucleares con 0.3 – 0.5 M de NaCl (la MN se extrae con 2 M NaCl) sugieren que las proteínas Orc2-5 se asocian con la MN en G1 durante la formación del complejo ORC completo (Ohta *et al.*, 2003).

Una de las evidencias más notable que sugiere que la replicación tiene lugar en sitios fijos sobre la MN es el descubrimiento de las fábricas de replicación en el interior del núcleo. En un principio los experimentos se enfocaron en determinar la estructura espacial de los agrupamientos de replicones que se observaron al analizar las fibras de DNA replicado extendidas en laminillas (Jackson y Pombo, 1998); para ello se marcó el DNA recién sintetizado con análogos de nucleótidos, los cuales podían analizarse con anticuerpos fluorescentes; así se observó que la replicación ocurre en cientos de pequeños focos discretos, cuyo número permanece constante pero su tamaño e intensidad fluorescente se incrementa conforme progresa la replicación (Nakamura *et al.*, 1986). Con base en el tamaño de cada foco de replicación y la intensidad de la fluorescencia, se propuso que cada uno debía contener aproximadamente 1 Mpb de DNA y por lo tanto ~6 replicones que disparan simultáneamente (Nakamura *et al.*, 1986; Ma *et al.*, 1998; Berezney *et al.*, 2000). Estudios posteriores demostraron que los focos de replicación permanecen fijos aún después de la extracción de la MN y a pesar de remover el 90% del DNA. Además, al realizar la replicación *in vitro* en MN extraídas se formaron focos de replicación similares a los observados *in vivo* (Nakayasu y Berezney, 1989).

Estudios por microscopía electrónica de ensayos de replicación *in vitro* sobre MN muestran que el DNA recién sintetizado está asociado a grandes aglomerados proteicos anclados a la MN y que la DNA polimerasa- $\alpha$  y el PCNA son algunas de las proteínas que conforman estos aglomerados; esto plantea que los focos de replicación están sobre estos complejos macromoleculares que constituyen las fábricas de replicación (Hozak *et al.*, 1993; Hozak *et al.*, 1994). Actualmente se han identificado diversos factores que están asociados a las fábricas de replicación como el PCNA, la proteína de replicación A (RPA), las DNA polimerasas  $\alpha$  y  $\epsilon$ , la DNA ligasa I, la topoisomerasa II- $\alpha$ , metiltransferasas, desacetilasas de

histonas y otros factores relacionados con el inicio de la fase S (Hozak *et al.*, 1993; Cardoso *et al.*, 1993; Fuss y Linn, 2002; Montecucco *et al.*, 1998; Niimi *et al.*, 2001; Chuang *et al.*, 1997; Rountree *et al.*, 2000).

Posteriormente, se demostró que el patrón espacial de los focos de replicación persiste sin cambios en su intensidad de fluorescencia durante las fases siguientes del ciclo celular. Más aun, este patrón es mantenido por numerosas generaciones celulares, aunque el número de focos disminuye a la mitad en cada mitosis debido a la duplicación semiconservativa del genoma (Jackson y Pombo, 1998; Ma *et al.*, 1998). Esto sugiere que los cromosomas poseen una organización específica preexistente a la fase S y que se hereda a las siguientes generaciones. La asociación durante todo el ciclo celular de estos dominios indica que son unidades cromosomales estables que muy probablemente corresponden a los bucles de DNA anclados a la MN.

Por otro lado, existen diferentes tipos de focos de replicación en función del patrón temporal en el que se activan. Al marcar el DNA recién sintetizado en la fase S temprana se observan numerosos focos de replicación, que son pequeños y están distribuidos por todo el núcleo celular (a excepción del nucleolo y regiones de heterocromatina). A la mitad de esta fase S y en el periodo tardío se observan mucho menos focos pero de mayor tamaño asociados a la periferia nuclear y a la heterocromatina. Asimismo, al marcar el DNA recién sintetizado de manera diferencial con respecto al patrón temporal de la fase S, se observa que los focos tempranos nunca se mezclan con los tardíos (Ma *et al.*, 1998).

Finalmente, evidencias experimentales con elementos de las fábricas de replicación fusionados a proteínas fluorescentes, demuestran que estos complejos se ensamblan y desensamblan durante la fase S (Leonhardt *et al.*, 2000; Somanathan *et al.*, 2001; Sporbert *et al.*, 2002). Más aun, se ha demostrado que las fábricas ensambladas sobre los focos de replicación se disocian al completar su duplicación. Posteriormente, los complejos proteicos se establecen *de novo* en focos de replicación adyacentes que disparan en tiempos posteriores durante la fase S (Sadoni *et al.*, 2004).

## 5. Hacia un modelo del replicón metazoario

A pesar de que el ORC no muestra una preferencia por secuencias específicas, los esfuerzos por sostener el paradigma del replicón en su propuesta original han llevado a sugerir que son otras proteínas las que dirigen al ORC a sitios definidos (Bell, 2002). Esto se ha fundamentado en algunas evidencias de proteínas que interactúan con el ORC y que parecen tener influencia sobre la eficiencia del inicio de la replicación. En

la replicación del virus de Epstein-Barr el ORC humano que se une al origen de replicación del virus interactúa con la proteína viral EBNA1 (Schepers *et al.*, 2001). En *D. melanogaster* existe una asociación del ORC con factores de transcripción E2F que parece requerirse para la replicación durante el desarrollo (Bosco *et al.*, 2001). Sin embargo, diversas evidencias sugieren que el número de sitios en los que se ensambla el pre-RC es mucho mayor que el número de orígenes de replicación que se activa en cada ciclo celular. En la levadura, muchas de las secuencias ARS no se activan, o bien rara vez son utilizadas en diferentes ciclos celulares (Yamashita *et al.*, 1997; Friedman *et al.*, 1997). Asimismo, se han detectado pre-RCs en orígenes de replicación inactivos (Santocanale y Diffley, 1996).

En el caso de los mamíferos se ha observado que el ensamblaje del pre-RC en el DNA no es suficiente para iniciar la replicación (Okuno *et al.*, 2001). Así, se ha planteado que existen más orígenes potenciales de replicación de los que se necesitan (Gilbert, 2001). Además, la replicación del DNA en los embriones de *D. melanogaster* y *X. laevis* muestra que la iniciación de la polimerización puede llevarse a cabo independientemente de la secuencia.

Debido a la extensa discrepancia en las evidencias experimentales, sobre todo en cuanto a la necesidad de secuencias específicas que determinen el sitio de arranque de la replicación, es necesario desarrollar nuevos esquemas que permitan comprender los mecanismos de duplicación del genoma de los metazoarios y el establecimiento de las unidades de replicación. De esta manera, tomando en cuenta la evidencia experimental disponible hasta ahora, proponemos un modelo en el que la organización de la cromatina con respecto a la MN constituye la base estructural sobre la que se llevan a cabo los mecanismos de duplicación del genoma (figura 5). Durante la interfase, el DNA se organiza en bucles anclados a la MN. Agrupamientos de bucles relajados (eucromatina) pueden constituir un foco de replicación temprana, mientras que los agrupamientos de heterocromatina forman focos de replicación de la fase S tardía. Secuencias ricas en A-T están en múltiples sitios a lo largo de cada bucle de DNA (tanto en eucromatina como heterocromatina). Cada una de las secuencias ricas en A-T tienen el potencial de unirse a la MN y al ORC, por lo que todas estas secuencias son sitios potenciales de anclaje a la MN y a su vez *oris* potenciales. Sin embargo, los anclajes actuales a la MN (LARS) sólo son un subconjunto de los anclajes potenciales. Así, el complejo de las proteínas Orc2-Orc5 se asocia en múltiples sitios de la eucromatina (secuencias MARS/*oris* potenciales) durante todo el ciclo celular (DePamphilis, 2003), mientras que con la heterocromatina se asocia únicamente el Orc2. Esto de acuerdo con las observaciones que sugieren que el Orc2 está involucrado en

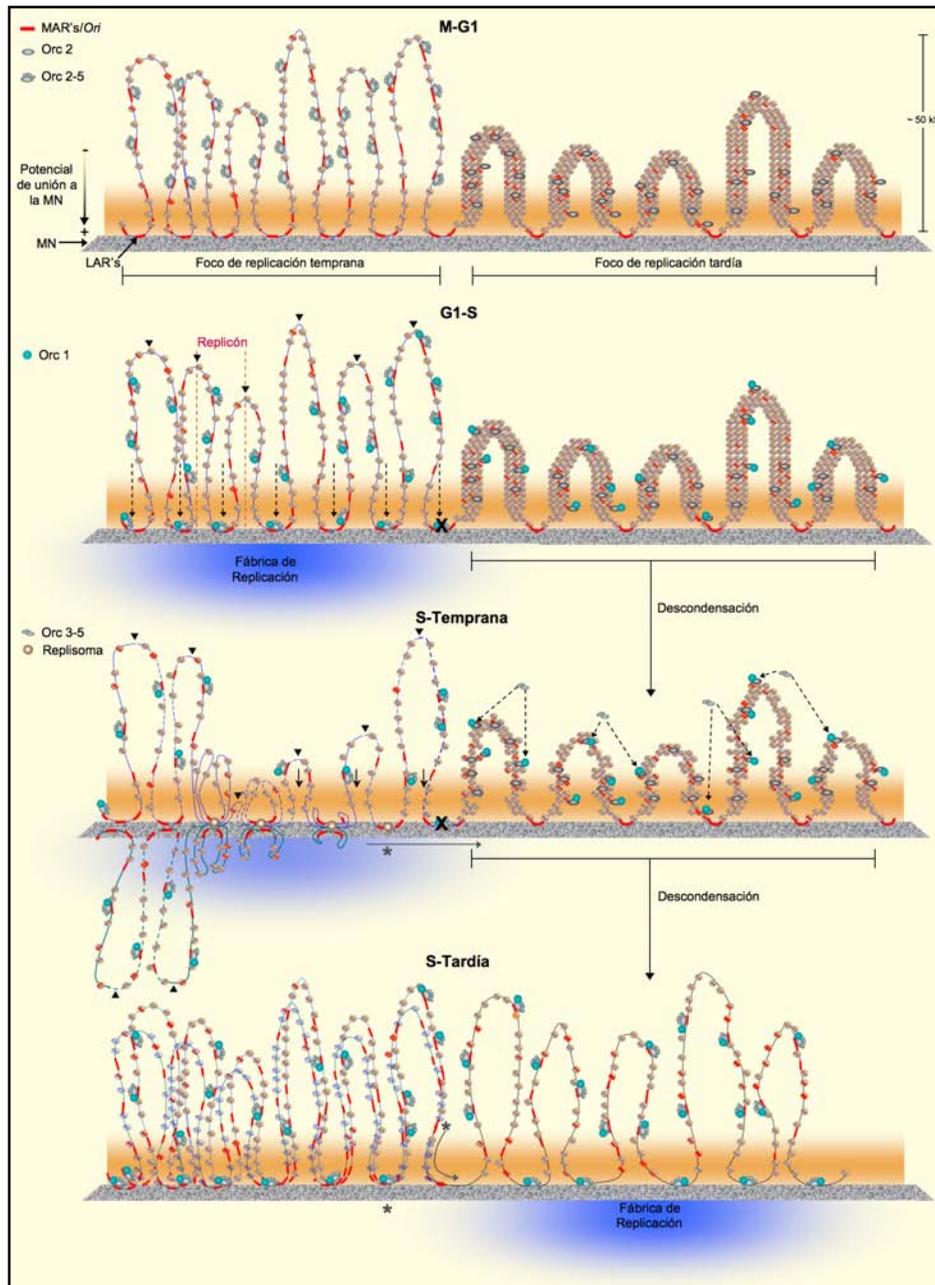
el establecimiento y mantenimiento de la heterocromatina (Pak *et al.*, 1997; Shareef *et al.*, 2001; Prasanth *et al.*, 2004) ya que existe una interacción del Orc2 con la proteína de heterocromatina Hp1 (figura 5 M-G1).

Con fundamento en la similitud entre los orígenes de replicación (*Ori*) y los MARS (riqueza en A-T), en las evidencias de la proximidad física de los *ori* a los MARS y en la dependencia del hiperenrollamiento para la unión del ORC con el DNA (Remus *et al.*, 2004), planteamos que la replicación inicia en regiones muy próximas a los LARS (sitios cercanos a la MN donde se ensambla el ORC indicados con las flechas punteadas en la figura 5 G1-S). Para ello, durante la fase G1 tardía y hasta el límite de G1/S, el incremento de la concentración del Orc1 permite la formación del ORC completo en la eucromatina y la interacción Orc1-2 en la heterocromatina. En la eucromatina la interacción con el Orc1 permite al complejo relocalizarse a regiones próximas a los sitios de anclaje a la MN (LARS) para determinar el sitio de inicio de la replicación que, de acuerdo con este modelo, no requiere de ninguna secuencia específica y por lo tanto no habría un replicador que lo determinara. La localización del ORC en regiones próximas a los LARS puede deberse a la interacción directa o indirecta del Orc1 con la MN (Ohta *et al.*, 2003).

Así, el pre-RC se establece en la base de los bucles y posteriormente la fábrica de replicación se ensambla sobre la MN al interactuar con el ORC. La fábrica de replicación duplica un grupo de bucles, el proceso se inicia cerca de los LARS y se lleva a cabo bidireccionalmente, por lo que cada replicación abarca de la punta de un bucle a la punta del siguiente (figura 5 G1-S). El distinto tamaño de los bucles explicaría las diferencias encontradas en el tamaño de las horquillas de algunos replicones, así como la observación de horquillas asimétricas (Berezney *et al.*, 2000). Además, un sitio de arranque de la replicación ubicado en el punto de transición entre la eucromatina y la heterocromatina puede bloquearse durante el disparo del foco temprano ("X" en la figura 5). Una vez terminada la duplicación de los bucles que conforman el foco de replicación temprana, la fábrica de replicación se desensambla y sus componentes se establecen en una nueva fábrica de replicación que duplicará al grupo de bucles de heterocromatina (figura 5 S-Temprana/ S-Tardía).

Por otro lado, la interacción del Orc1 con el Orc2 en el foco de replicación tardía puede desestabilizar la interacción del Orc2 con proteínas de la heterocromatina y con ello permitir el inicio de la descondensación y más tarde el ensamblaje del ORC completo. Así, la descondensación de la heterocromatina puede ocurrir en forma gradual durante la replicación de la eucromatina (figura 5 S-Temprana/S-Tardía). Posteriormente, el ORC se asocia con las regiones próximas a los LARS del foco

Figura 5. Modelo de la replicación de los metazoarios.



Se representan dos agrupamientos de replicones que forman los focos de replicación temprana y tardía. En el foco de replicación temprana se representan bucles de euromatina; mientras que en el de replicación tardía se muestran bucles de DNA más condensados que simbolizan la heterocromatina. Asimismo, se esquematiza la configuración de los bucles y sus interacciones con la maquinaria de replicación en diferentes periodos del ciclo celular: de la salida de la mitosis hasta G1 temprana (M-G1), de G1 tardía hasta el límite G1/S (G1-S), y durante diferentes tiempos de la fase S (S-Temprana y S-Tardía). Los triángulos negros (●) señalan las puntas de los bucles. En cada foco de replicación los replicones disparan de manera sincronizada; sin embargo, con el objeto de ejemplificar el proceso de síntesis del DNA se representan diferentes tiempos de síntesis para cada bucle durante la fase S-Temprana en el foco de replicación temprana. (X) sitio de inicio de la replicación bloqueado por la presencia de la heterocromatina; (\*) sitio de inicio cuya elongación replicará la región de transición entre la euromatina y heterocromatina. Para más detalles ver texto.

de replicación tardía y se ensambla una nueva fábrica de replicación mediante el traslado de los componentes que replicaron al agrupamiento de la fase S temprana (figura 5 s-Tardía). Se ha comprobado que el ensamble y desensamble de las fábricas de replicación ocurre de manera dinámica y que sus componentes se desplazan para formar nuevas fábricas en los agrupamientos de replicones adyacentes (Sadoni *et al.*, 2004).

Finalmente, el sitio de inicio de la replicación que permanecía bloqueado en la transición de la eucromatina y heterocromatina, ("X" en la figura 5) puede ser replicado por la elongación de la horquilla del foco de replicación temprana adyacente. De esta manera, una de las horquillas del sitio de arranque (\* en la figura 5) sería mucho más larga que la otra y se dispararía en la fase S temprana pero terminaría en la fase tardía (figura 5 S-Tardía). Esto explicaría la observación de horquillas asimétricas con una de ellas muy larga y la evidencia de horquillas activas durante toda la fase S (Emarkova *et al.*, 2004).

Debido a que durante la duplicación del genoma existe un recambio incompleto del octámero de histonas (las nuevas cadenas se empaquetan con una mezcla de histonas recién sintetizadas e histonas viejas de las cadenas madre) (Lucchini *et al.*, 2001), las modificaciones de las histonas pueden heredarse fácilmente y la interacción del Orc2 con las proteínas de heterocromatina puede permitir la condensación inmediatamente después de la replicación. En el caso de la eucromatina, la ausencia de esta modificaciones de histonas puede permitir el ensamblaje del complejo Orc2-5, cuya función podría ser la de mantener la descondensación de la eucromatina al impedir la interacción del Orc2 con las proteínas de heterocromatina.

## Conclusiones

La replicación del material genético de los metazoarios requiere la subdivisión del genoma en subunidades estables e involucra la organización de la maquinaria de replicación en dominios funcionales dentro del núcleo celular. De acuerdo con las evidencias experimentales, se sugiere que la organización topológica del DNA en forma de bucles anclados a la MN es el factor que establece las unidades de replicación de las metazoarios. De esta manera se propone un modelo del replicón metazoario en el cual el iniciador (ORC) se une de manera inespecífica al DNA, con cierta preferencia a secuencias ricas en AT ubicadas en regiones con hiperenrollamiento negativo y así es relocalizado a regiones cercanas a los sitios de anclaje a la MN (LARS) donde inicia la replicación de manera bidireccional. De esta manera, se propone que a diferencia de los procariontes en los metazoarios no existe un replicador que determine el sitio de inicio de la replicación.

Asimismo, se plantea que el establecimiento del tiempo de replicación depende del grado de condensación de la cromatina, el cual a su vez puede establecerse a partir de modificaciones epigenéticas preexistentes. Sin embargo, la validez del modelo depende del análisis de la replicación en conjunto con el establecimiento de los patrones de asociación del DNA con la MN. Asimismo, el modelo parte de un patrón de organización preestablecido, por lo que surge la incógnita de cómo es que se establecen los patrones diferenciales de organización de la cromatina que determinarían los sitios de inicio de la replicación, el tamaño de los replicones y el tiempo en el que se replica cada región del genoma.

cabe

## Bibliografía

- Abdurashidova, G.; S. Riva; G. Biamonti; M. Giacca; A. Falaschi (1998). "Cell cycle Modulation of Protein-DNA Interactions at Human Replication Origin", *EMBO J.* 17: 2961-2969.
- Abdurashidova, G.; M. Deganuto; R. Klima; S. Riva; G. Biamonti; M. Giacca; A. Falaschi (2000). "Start Sites of Bidirectional DNA Synthesis at the Human Lamin B2 origin", *Science.* 287: 2023-2026.
- Abdurashidova, G.; M. B. Danailov; A. Ochem; G. Triolo; V. Djeliova; S. Radulescu; A. Vindigni; S. Riva; A. Falaschi (2003). "Localization of Proteins Bound to a Replication Origin of Human DNA along the Cell Cycle", *EMBO J.* 22: 4294-4303.
- Aelen, J. M.; R. J. Opstelten; F. Wanka (1983). "Organization of DNA Replication in *Physarum polycephalum*. Attachment of Origins of Replication and Replication Forks to the Nuclear Matrix", *Nucl. Acid Res.* 11: 1181-1195.
- Aladjem, M. I. \_\_\_\_\_; M. Groudine; L. L. Brody; E. S. Dieken; R. E. Fournier; G. M. Wahl; E. M. Epner (1995). "Participation of the Human  $\beta$ -globin locus Control Region in Initiation of DNA Replication", *Science.* 270: 815-819.
- \_\_\_\_\_ ; L. W. Rodewald; J. L. Kolman; G. M. Wahl (1998). "Genetic dissection of a Ma-

- malian Replicator in the Human  $\beta$ -globin Locus", *Science*. 281: 1005–1009.
- \_\_\_\_\_; L. W. Rodewald; C. M. Lin; S. Bowman; D. M. Cimbora; L. L. Brody; E. M. Epner; M. Groudine; G. M. Wahl (2002). "Replication Initiation Patterns in the  $\beta$ -globin loci of Totipotent and Differentiated Murine cells: evidence for Multiple Initiation Regions", *Mol Cell Biol*. 22: 442–452.
- \_\_\_\_\_; E. Fanning (2004). "The replicon Revisited: an Old Model Learns New Tricks in Metazoan Chromosomes", *EMBO Reports*. 5: 686–691.
- \_\_\_\_\_; (2007). "Replication in Context: Dynamic Regulation of DNA Replication Patterns in Metazoans", *Nat Rev Genet*. 8: 588–600.
- Altman, A. L.; E. Fanning (2001). "The Chinese Hamster Dihydrofolate Reductase Replication Origin Beta is Active at Multiple Ectopic Chromosomal Locations and Requires Specific DNA Sequence Elements for Activity", *Mol Cell Biol*. 21: 1098–1110.
- Altman, A. L.; E. Fanning (2004). "Defined Sequence Modules and an Architectural Element Cooperate to promote Initiation at an Ectopic Mammalian Chromosomal Replication Origin", *Mol Cell Biol*. 24: 4138–4150.
- Anachkova, B.; J. L. Hamlin (1989). "Replication in the Amplified Dihydrofolate Reductase Domain in CHO Cells may Initiate at Two distinct Sites, one of Which is a Repetitive sequence Element", *Mol Cell Biol*. 9: 523–531.
- Anachkova, B.; V. Djeliova; G. Russev (2005). "Nuclear Matrix Support of DNA Replication", *J Cell Biochem*. 96: 951–961.
- Austin, R. J.; T. L. Orr-Weaver; S. P. Bell (1999). "Drosophila ORC Specifically Binds to ACE 3, an Origin of DNA Replication Control Element", *Genes Dev*. 13: 2639–2649.
- Bell, S. P.  
\_\_\_\_\_; (2002). "The Origin Recognition Complex: from Simple Origins to Complex Functions", *Genes Dev*. 16: 659–672.  
\_\_\_\_\_; A. Dutta (2002). "DNA Replication in Eukaryotic cells", *Annu Rev Biochem*. 71: 333–374.
- \_\_\_\_\_; B. Stillman (1992). "ATP-Dependent Recognition of Eukaryotic Origins of DNA Replication by a Multiprotein Complex", *Nature*. 357: 128–134.
- Berezney, R.  
\_\_\_\_\_; D. Coffey (1974). "Identification of a Nuclear Protein Matrix", *Biochem Biophys Res Commun* 60:1410–1417.
- \_\_\_\_\_; D. Coffey (1975). "Nuclear Matrix: Association With Newly Synthesized DNA", *Science*. 189: 291–293.
- \_\_\_\_\_; M. J. Mortillaro; H. Ma; X. Wei; J. Samarabandu (1995). "The Nuclear Matrix: a Structural Milieu for Genomic Function", *Int Rev Cytol*. 162A: 1–65.
- \_\_\_\_\_; D. D. Dubey; J. A. Huberman (2000). "Heterogeneity of Eukaryotic Replicons, Replicon Clusters, and Replication Foci", *Chromosoma*. 108: 471–484.
- Biamonti, G.; S. Paixao; A. Montecucco; F. A. Peverali; S. Riva; A. Falaschi (2003). "Is DNA Sequence Sufficient to Specify DNA Replication Origins in Metazoan Cells?", *Chrom Res*. 11: 403–412.
- Bielsky, A. K.; S. A. Gerbi (2001). "Where it all Starts: Eukaryotic Origins of DNA Replication", *J Cell Sci*. 114: 643–651.
- Blow, J. J.; A. M. Sleeman (1990). "Replication of Purified DNA in Xenopus egg Extract is Dependent on Nuclear Assembly", *J Cell Sci*. 95:383–391.
- Blumenthal, A. B.; H. J. Kriegstein; D. S. Hogness (1974). "The units of DNA Replication in *Drosophila melanogaster* Chromosomes", *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 38: 205–223.
- Bosco, G.; W. Du; T. L. Orr-Weaver (2001). "DNA Replication Control Through Interaction of E2F-RB and the Origin Recognition Complex", *Nat Cell Biol*. 3: 289–295.
- Boulikas, T. (1995). "Chromatin Domains and Prediction of MAR Sequences. In: Nuclear Matrix. Structural and Functional Organization", *Academic Press*. USA. pp. 279–366.
- Brewer, B. J.; W. L. Fangman (1987). "The Localization of Replication Origins on ARS Plasmids in *S. cerevisiae*", *Cell*. 51:463–471.
- Buongiorno-Nardelli, M.; G. Micheli; M. T. Carri; M. A. Marilley (1982). "A Relationship Between Replicon size and Supercoiled Loop Domains in the Eukaryotic Genome", *Nature*. 298: 100–102.
- Burhans, W. C.; L. T. Vassilev; M. S. Caddle; N. H. Heintz; M. L. DePamphilis (1990). "Identification of an Origin of Bidirectional DNA Replication in Mammalian Chromosomes", *Cell*. 62: 955–965.
- Cardoso, M. C.; H. Leonhardt; B. Nadal-Guinard (1993). "Reversal of Terminal Differentiation and Control of DNA Replication: Cyclin A and cdk2 Specifically Localize at Subnuclear Sites of DNA Replication", *Cell*. 74: 979–992.
- Carpenter, P. B.; P. R. Mueller; W. G. Dunphy (1996). "Role for a Xenopus Orc2-Related Protein in Controlling DNA Replication", *Nature*. 379: 357–360.
- Celniker, S. E.; K. Sweder; F. Srien; J. E. Bailey; J. L. Campbell (1984). "Deletion Mutations Affecting Autonomously Replicating Sequence ARS1 of *Saccharomyces cerevisiae*", *Mol Cell Biol*. 4: 2455–2466.
- Chakraborty, T.; K. Yoshinaga; H. Lother; W. Messer (1982). "Purification of the *E. coli* dnaA Gene Product", *EMBO J*. 1:1545–1549.
- Chesnokov, I.; M. Gossen; D. Remus; M. Botchan (1999). "Assembly of Functionally Active *Drosophila* Origin Recognition Complex from Recombinant Proteins", *Genes Dev*. 13: 1289–1296.
- Chuang, L. S. H.; H. I. Ian; T. W. Koh; H. H. Ng; G. Xu; B. F. L. Li (1997). "Human DNA-(cytosine-5) Methyltransferase-PCNA Complex as a Target for p21WAF1", *Science*. 277: 1996–2000.

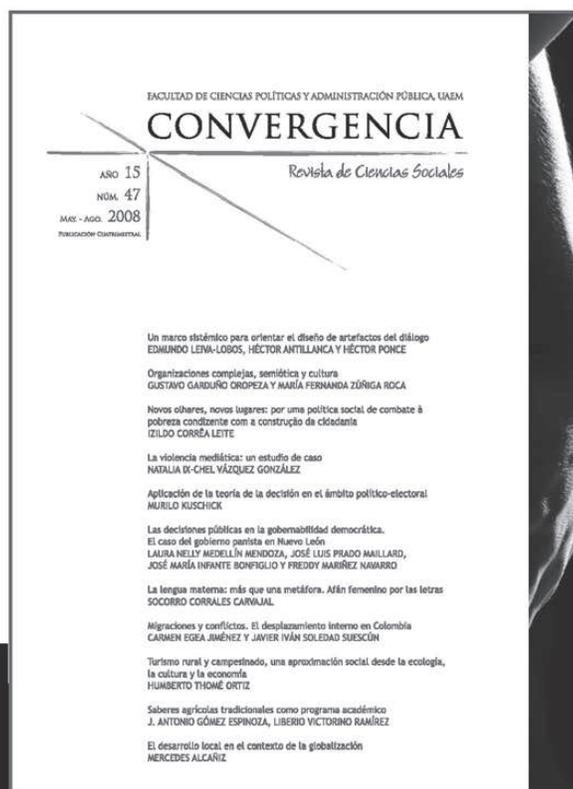
- Cimbora, D. M.; D. Schübeler; A. Reik; J. Hamilton; C. Francastel; E. M. Epner; M. Groudine (2000). "Long-Distance Control of Origin Choice and Replication Timing in the Human  $\beta$ -Globin locus are Independent of the Locus Control Region", *Mol Cell Biol.* 20: 5581–5591.
- Cook, P. R.; I. Brazell (1975). "Supercoils in Human DNA". *J Cell Sci.* 19: 261-279.
- Cook, P. R.  
 \_\_\_\_\_; I. Brazell (1976). "Conformational Constraints in Nuclear DNA", *J Cell Sci.* 22: 287-302.
- \_\_\_\_\_; I. Brazell; E. Jost (1976). "Characterization of Nuclear Structures Containing Superhelical DNA", *J Cell Sci.* 22:303-324.
- \_\_\_\_\_ (1999). "The Organization of Replication and Transcription", *Science.* 284: 1790-1795.
- \_\_\_\_\_ (2001). *Principles of Nuclear Structure and Function.* Wiley-Liss, New York. 368 pp.
- Danis, E.; K. Brodolin; S. Menut; D. Maiorano; C. Girard-Reydet; M. Méchali (2004). "Specification of a DNA Replication Origin by a Transcription Complex", *Nat Cell Biol.* 6: 721–730.
- DePamphilis, M. L.  
 \_\_\_\_\_ (1993). "Origins of DNA replication in metazoan chromosomes", *J Biol Chem.* 268: 1-4.
- \_\_\_\_\_ (1998). "Initiation of DNA Replication in Eukaryotic Chromosomes", *J Cell Biochem Suppl.* 30-31: 8-17.
- \_\_\_\_\_ (2003). "The 'ORC cycle': a Novel Pathway for Regulating Eukaryotic DNA Replication", *Gene.* 310: 1-15.
- Dhar, S. K.; K. Yoshida; Y. Machida; P. Khaira; B. Chaudhuri; J. A. Wohlschlegel; M. Leffak; J. Yates; A. Dutta (2001). "Replication from OriP of Epstein-Barr virus Requires Human ORC and is Inhibited by Geminin," *Cell.* 106: 287–296.
- Diffley, J. F.; K. Labib (2002). "The Chromosome Replication Cycle", *J Cell Sci.* 115: 869-872.
- Dijkwel, P. A.;  
 \_\_\_\_\_; P. W. Wennink; J. Poddighe (1986). "Permanent Attachment of Replication Origins to the Nuclear Matrix in BHK cells", *Nucleic Acids Res.* 14: 3241-3249.
- \_\_\_\_\_; J. L. Hamlin (1996). "Sequence and Context Effects on Origin Function in Mammalian cells", *J Cell Biochem.* 62: 210-222.
- \_\_\_\_\_; S. Wang; J. L. Hamlin (2002). "Initiation Sites are Distributed at Frequent Intervals in the Chinese Hamster Dihydrofolate Reductase Origin of Replication But are Used With Very Different Efficiencies", *Mol Cell Biol.* 22: 3053–3065.
- Dingman, C. W. (1974). "Bidirectional Chromosome Replication: Some Topological Considerations", *J Theor Biol.* 43: 187-195.
- Djeliova, V.; G. Russev; B. Anachkova (2001). "Distribution of DNA Replication Origins Between Matrix-Attached and Loop DNA in Mammalian cells", *J Cell Biochem.* 80: 353-359.
- Djeliova, V.; G. Russev; B. Anachkova (2001b). "Dynamics of Association of Origins of DNA Replication With the Nuclear Matrix During the Cell Cycle", *Nucleic Acids Res.* 29(15):3181-7.
- Edenberg, H. J.; J. A. Huberman (1975). "Eucaryotic Chromosome Replication", *Annu Rev Genet.* 9: 245-284.
- Emarkova, O. V.; L. H. Nguyen; R. D. Little; C. Chevillard; R. Riblet; N. Ashouian; B. K. Birshtein; C. L. Schildkraut (2004). "Evidence that a Single Replication fork Proceeds from Early to Late Replication Domains in the IgH Locus in a Non B-cells line", *Mol Cell.* 3: 321-330.
- Forbes, D. J.; M. W. Kirschner; J. W. Newport (1983). "Spontaneous Formation of Nucleus-Like Structures Around Bacteriophage DNA Microinjected Into Xenopus Eggs", *Cell.* 34: 13-23.
- Forrester, W. C.; E. Epner; M. C. Driscoll; T. Enver; M. Brice; T. Papayannopoulou; M. Groudine (1990). "A deletion of the Human Beta-Globin Locus Activation Region Causes a Major Alteration in Chromatin Structure and Replication Across the Entire Beta-Globin Locus", *Genes Dev.* 4: 1637-49. 37.
- Friedman, K. L.; B. J. Brewer; W. L. Fangman (1997). "Replication Profile of Saccharomyces cerevisiae Chromosome VI Genes", *Cells.* 2: 667-678.
- Fujita, M. Q.  
 \_\_\_\_\_; H. Yoshikawa; N. Ogasawara (1989). "Structure of the dnaA Region of Pseudomonas putida: Conservation Among three Bacteria, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *P. putida*", *Mol Gen Genet.* 215: 381–387.
- \_\_\_\_\_; H. Yoshikawa; N. Ogasawara (1990). "Structure of the dnaA Region of *Micrococcus luteus*: Conservation and Variations Among Eubacteria", *Gene.* 93 (1): 73-78.
- \_\_\_\_\_; H. Yoshikawa; N. Ogasawara (1992). "Structure of the dnaA and DnaA-box Region in the Mycoplasma Capricolum Chromosome: Conservation and Variations in the Course of Evolution", *Gene.* 110 (1): 17-23.
- Fuss, J.; S. Linn (2002). "Human DNA Polymerase  $\epsilon$  Colocalizes With Proliferating Cell Nuclear Antigen and DNA Replication Late, But not Early, in S phase", *J Biol Chem.* 277: 8658-8666.
- Giacca, M., L.; Zentilin; P. Norio; S. Diviacco; D. Dimitrova; G. Contreas; G. Biamonti; G. Perini; F. Weighardt; S. Riva; A. Falaschi (1994). Fine Mapping of a Replication Origin of Human DNA", *Proc Natl Acad Sci USA.* 91: 7119-7123.
- Gilbert, D. M.  
 \_\_\_\_\_ (2001). "Making Sense of Eukaryotic DNA Replication Origins", *Science.* 294: 96–100.
- \_\_\_\_\_ (2004). "In Search of the Holy Replicator", *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5: 848–855.
- \_\_\_\_\_; H. Miyazawa; M. L. DePamphilis (1995). "Sites-Specific Initiation of DNA Replication in Xenopus egg Extract Requires Nuclear Structure", *Mol Cell Biol.* 15: 2942–2954.

- \_\_\_\_\_; S. N. Cohen (1989). "Autonomous Replication in Mouse Cells: a Correction", *Cell*. 56: 143-144.
- Hakes, D. J.; R. Berezney (1991). "DNA Binding Properties of the Nuclear Matrix and Individual Nuclear Matrix Protein: Evidence for Salt-Resistant DNA Binding Sites", *J Biol Chem*. 266: 11131-11140.
- Hand, R. (1975). "Regulation of DNA Replication on Subchromosomal Units of Mammalian Cells", *J Cell Biol*. 64: 89-97.
- Handeli, S.; A. Klar; M. Meuth; H. Cedar (1989). "Mapping Replication Units in Animal Cells", *Cell*. 57: 909-920.
- Harland, R. M.; R. A. Laskey (1980). "Regulated Replication of DNA Microinjected Into Eggs of *Xenopus laevis*", *Cell*. 21:761-771.
- Heintz, N. H.; J. L. Hamlin (1982). "An Amplified Chromosomal Sequence that Includes the Gene for Dihydrofolate Reductase Initiates Replication Within Specific Restriction Fragments", *Proc Natl Acad Sci USA*. 79: 4083-4087.
- Hozak, P.  
\_\_\_\_\_; A. B. Hassan; D. A. Jackson; P. R. Cook (1993). "Visualization of Replication Factories Attached to Nucleoskeleton", *Cell*. 1993. 73 (2): 361-73.
- \_\_\_\_\_; A. M. J. Sasseville; Y. Raymond; P. R. Cook (1995). "Lamin Proteins form an Internal Nucleoskeleton as Well as a Peripheral Lamina in Human Cells", *J Cell Sci*. 108: 635-644.
- \_\_\_\_\_; D. A. Jackson; P. R. Cook (1994). "Replication Factories and Nuclear Bodies: the Ultrastructural Characterization of Replication Sites During the Cell Cycle", *J Cell Sci*. 107 (Pt 8): 2191-202.
- Huberman, J. A.  
\_\_\_\_\_; A. D. Riggs (1968). "On the Mechanism of DNA Replication in Mammalian Chromosomes", *J Mol Biol*. 32:327-341.
- Huberman, J. A.; J. Zhu; L. R. Davis; C. S. Newlon (1988). "Close Association of a DNA Replication Origin and an ARS Element on Chromosome III of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *Nucleic Acids Res*. 16: 6373-6384.
- \_\_\_\_ (1997). "Mapping Replication Origins, Pause Sites, and Termini by Neutral/Alkaline Two-Dimensional Gel Electrophoresis", *Methods*. 13: 247-257.
- Hyrien, O.; M. Mechali (1992). "Plasmid Replication in *Xenopus* Eggs and Egg Extracts: a 2D Gel Electrophoretic Analysis", *Nucleic Acids Res*. 20: 1463-1469.
- Hyrien, O.; C. Maric; M. Mechali (1995). "Transition in Specification of Embryonic Metazoan DNA Replication Origins", *Science*. 270: 994-997.
- Jackson, D. A.; P. R. Cook (1986). "Replication Occurs at The Nucleoskeleton", *EMBO J*. 5: 1403-1410.
- Jackson, D. A.; A. Pombo (1998). "Replicon Clusters are Stable Units of Chromosome Structure: Evidence that Nuclear Organization Contributes to the Efficient Activation and Propagation of Sphase in Human Cells", *J Cell Biol*. 140: 1285-1295.
- Jacob, F.; J. Monod. (1961). "Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins", *J Mol Biol*. 3: 318-356.
- Jacob, F.; S. Brenner; F. Cuzin (1964). "On the Regulation of DNA in Bacteria", *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 28: 329-348.
- Jacob, F. (1993). "The Replicon: Thirty Years Later", *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 58: 383-387.
- Jenke, A. C.; I. M. Stehle; F. Herrmann; T. Eisenberger; A. Baiker; J. Bode; F. O. Fackelmayer; H. J. Lipps (2004). "Nuclear Scaffold/Matrix Attached Region Modules Linked to Transcription Unit are Sufficient for Replication and Maintenance of a Mammalian Episome", *Proc Natl Acad Sci USA*. 101: 11322-11327.
- Jenkins, H.; T. Holman; C. Lyon; B. Lane; R. Stick; C. Hutchison (1993). "Nuclei that Lack a Lamina Accumulate Karyophilic Proteins and Assemble a Nuclear Matrix", *J Cell Sci*. 106: 275-285.
- Kalejta, R. F.; X. Li; L. D. Mesner; P. A. Dijkwel; H. B. Lin; J. L. Hamlin (1998). "Distal Sequences, But not ori- $\beta$ /OBR-1, are Essential for Initiation of DNA Replication in the Chinese Hamster DHFR origin", *Mol Cell*. 2: 797-806.
- Kitamura, E.; J. J. Blow; T. U. Tanaka (2006). "Live-cell Imaging Reveals Replication of Individual Replicons in Eukaryotic Replication Factories", *Cell*. 125: 1297-1308.
- Kitsberg, D.; S. Selig; J. Keshet; H. Cedar (1993). "Replication Structure of the Human  $\beta$ -globin Gene Domain", *Nature*. 368:588-590.
- Kobayashi, T.; T. Rein; M. DePamphilis (1998). "Identification of Primary Initiation Sites for DNA Replication in the Hamster DHFR Gene Initiation Zone", *Mol Cell Biol*. 18: 3266-3277.
- Krysan, P. J.; M. P. Calos (1991). "Replication Initiates at Multiple Locations on an Autonomously Replicating Plasmid in Human Cells", *Mol Cell Biol*. 11: 1464-1472.
- Kumar, S.; M. Giacca; P. Norio; G. Biamonti; S. Riva; A. Falaschi (1996). "Utilization of the same DNA replication origin by human cells of different derivation", *Nucleic Acid Res*. 24: 3289-3294.
- Lagarkova, M. A.; E. Svetlova; M. Giacca; A. Falaschi; S. V. Razin (1998). "DNA Loop Anchorage Region Colocalizes with the Replication Origin Located Downstream to the Human Gene Encoding Lamin B2", *J Cell Biochem*. 69: 13-18.
- Landis, G.; R. Kelley; A. C. Spradling; J. Tower (1997). "The k43 gene, Required for Chorion Gene Amplification and Diploide Cell Chromosome Replication, Encodes the Drosophila Homo Log of Yeast Origin Recognition Complex Subunit 2", *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 3888-3892.
- Lee, D. G.; S. P. Bell (1997). "Architecture of the Yeast Origin Recognition Complex Bound to Origins of DNA Replication", *Mol Cell Biol*. 17: 7159-7168.

- Lemon, K. P.; A. D. Grossman (1998). "Localization of Bacterial DNA Polymerase: Evidence for a Factory Model of Replication", *Science*. 282: 1516-1519.
- Lemon, K. P.; A. D. Grossman (2000). "Movement of Replicating DNA Through a Stationary Replisome", *Mol Cell*. 6: 1321- 1330.
- Leonhardt, H.; H.P. Rahn; P. Weinzierl; A. Sporbert; T. Cremer; D. Zink; M.C. Cardoso (2000). "Dynamics of DNA Replication Factories in Living Cells", *J Cell Biol*. 149: 271-280.
- Li, C. J.; J. A. Bogan; D. A. Natale; M. L. DePamphilis (2000). "Selective Activation of Pre-replication Complexes *in vitro* at Specific Sites in Mammalian Nuclei", *J Cell Sci*. 113: 887-898.
- Li, Q.; K. R. Peterson; X. Fang; G. Stamatoyan-Nopoulos (2002). "Locus Control Regions", *Blood*. 100: 3077-3086.
- Liu, G.; M. Malott; M. Leffak (2003). "Multiple Functional Elements Comprise a Mammalian Chromosomal Replicator", *Mol Cell Biol*. 23: 1832-1842.
- Lucchini, R.; R. E. Wellinger; J. M. Sogo (2001). "Nucleosome Positioning at the Replication fork", *EMBO J*. 20: 7294-7302.
- Ma, H.; J. Samarabandu; R.S. Devdhar; R. Acharya; P. Cheng; C. Meng; R. Berezney (1998). "Spatial and Temporal Dynamics of DNA Replication Sites in Mammalian Cells", *J Cell Biol*. 143, 1415-1425.
- Mahubani, H. M.; T. Paull; J. K. Elder; J. J. Blow (1992). "DNA Replication Initiates at Multiple sites on Plasmid DNA in Xenopus Egg Extracts", *Nucleic Acids Res*. 20: 1457-1462.
- Malott, M.; M. Leffak (1999). "Activity of the C-myc Replicator at an Ectopic Chromosomal Location", *Mol Cell Biol*. 19:5685-5695.
- Marahrens, Y.; B. Stillman (1992). "A Yeast Chromosomal Origin of DNA Replication Defined by Multiple Functional Element", *Science*. 255: 817-823.
- Masukata, H.; H. Satoh; C. Obuse; T. Okazaki (1993). "Autonomous Replication of Human Chromosomal DNA Fragments in Human Cells". *Mol Biol Cell*. 4: 1121-1132.
- Maya-Mendoza, A.; A. Aranda-Anzaldo (2003). "Positional Mapping of Specific DNA Sequences Relative to the Nuclear Substructure by Direct Polymerase Chain Reaction on Nuclear Matrix-Bound Templates", *Anal Biochem*. 313: 196-207
- Maya-Mendoza, A.; R. Hernández-Muñoz; P. Gariglio; A. Aranda-Anzaldo (2003). "Genetic Changes Relative to the Nuclear Substructure Correlates with the Proliferating Status of Hepatocytes During Liver Regeneration", *Nucleic Acids Res*. 31 (21): 6168-6179.
- McCready, S.; J. Godwin; D. Mason; I. Brazell; P. R. Cook (1980). "DNA is Replicated at the Nuclear cage", *J Cell Sci*. 46:365-386.
- Mechali, M.; S. Kearsy (1984). "Lack of Specific sequence Requirement for DNA Replication in Xenopus Eggs Compared With High Sequence Specificity in Yeast", *Cell*. 38: 55-64.
- Mesner, L. D.; X. Li; P. A. Dijkwel; J. L. Hamlin (2003). "The Dihydrofolate Reductase Origin of Replication Does not Contain any Non-redundant Genetic Elements Required for Origin Activity", *Mol Cell Biol*. 23: 804-814.
- Mildbrant, J. D.; N. H. Heintz; W. C. White; S. M. Rothman; J. L. Hamlin (1981). "Methotrexate-Resistant Chinese Hamster Ovary Cells have Amplified a 135-kilobase-Pair region that Includes the Dihydrofolate Reductase Gene", *Proc Natl Acad Sci USA*. 78: 6043-6047.
- Montecucco, A.; R. Rossi; D. S. Levin; R. Gary; M. S. Park; T. A. Motycka; T. A. Ciarrocchi; A. Villa; G. Biamonti; A. E. Tomkinson (1998). "DNA ligase I is Recruited to Sites of DNA Replication by an Interaction With Proliferating Cell Nuclear Antigen: Identification of a Common Targeting Mechanism for the Assembly of Replication Factories", *EMBO J*. 17: 3786-3795.
- Nakamura, H.; T. Morita; C. Sato (1986). "Structural Organizations of Replicon Domains During DNA synthetic phase in the Mammalian Nucleus", *Exp Cell Res*. 165: 291-297.
- Nakayasu, H.; R. Berezney (1989). "Mapping Replicational Sites in the Eukaryotic Cell Nucleus", *J Cell Biol*. 108: 1-11.
- Newport, J.W.; K.L. Wilson; W.G. Dunphy (1990). "A Lamin Independent Pathway for Nuclear Envelope Assembly", *J Cell Biol*. 111: 2247-2259.
- Nickerson, J. A. (2001). "Experimental Observations of a Nuclear Matrix", *J Cell Sci*. 114: 463-474.
- Nümi, A.; N. Suka; M. Harata; A. Kikuchi; S. Mizuno (2001). "Colocalization of chicken DNA topoisomerase II $\alpha$ , but not  $\beta$ , with sites of DNA Replication and Possible Involvement of a C-terminal Region of a Through its Binding to PCNA", *Chromosoma*. 110: 102-114.
- Ohta, S.; Y. Tatsumi; M. Fujita; T. Tsurimoto; C. Obuse (2003). "The Orc1 Cycle in Human Cells: II. Dynamics Changes in the Human ORC Complex During the Cell Cycle", *J Biol Chem*. 278: 41535-41540.
- Okuno, Y.; A. J. McNairn; N. den Elzen; J. Pines; D. M. Gilbert (2001). "Stability, Chromatin Association and Functional Activity of Mammalian pre-replication Complex Proteins During the Cell Cycle", *EMBO J*. 20: 4263-4277.
- Ortega, J. M.; M. L. DePamphilis (1998). "Nucleoskeleton and Initiation of DNA Replication in Metazoan Cells", *J Cell Sci*. 111: 3663-3673.
- Pack, D. T.; M. Pflumm; I. Chesnokov; D. W. Huang; R. Kellum; J. Marr; P. Romanowski; M.R. Botchan (1997). "Association of the Origin Recognition Complex with Heterochromatin and HP1 in Higher Eukaryotes", *Cell* 91, 311 - 323.
- Paixao, S.; I. N. Colaluca; M. Cubells; F. A. Peverali; A. Destro; S. Giadrossi; M. Giacca;

- A. Falaschi; S. Riva; G. Biamonti (2004). "Modular Structure of the Human Lamin B2 replicator", *Mol Cell Biol.* 24: 2958–2967.
- Pardoll, D.; B. Vogelstein; D. Coffey (1980). "A fixed Site of DNA Replication in Eucaryotic Cells", *Cell.* 19: 527–536.
- Pflum y Botchman (2001). "Orc Mutants Arrest in Metaphase with Abnormally Condensed Chromosomes", *Development.* 128:1697–1707.
- Prasanth, S. G.; K. V. Prasanth; K. Siddiqui; D. L. Spector; B. Stillman (2004). "Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance", *EMBO J.* 23: 2651–2663.
- Radichev, I.; A. Parashkevova; B. Anachkova (2005). "Initiation of DNA Replication at a Nuclear Matrix-Attached Chromatin Fraction", *J Cell Physiol.* 203: 71–77.
- Razin, S. V.; M. G. Kekelidze; E. M. Lukanidin; K. Scherrer; G. P. Georgiev (1986). "Replication Origins are Attached to the Nuclear Skeleton", *Nucleic Acid Res.* 14: 8189–8207.
- Razin, S.V. (2001). "The nuclear Matrix and Chromosomal DNA Loops: Is here any Correlation Between Partitioning of the Genome Into Loops and Functional Domains?", *Cell Mol Biol Lett.* 6: 59–69.
- Remus, D.; E. L. Beall; M. R. Botchan (2004). "DNA Topology, not DNA Sequence, is a Critical Determinant for Drosophila ORC–DNA Binding", *EMBO J.* 23: 897–907.
- Romanowski, P.; M. A. Madine; A. Rowles; J. J. Blow; R. A. Laskey (1996). "The Xenopus Origin Recognition Complex is Essential for DNA Replication and MCM Binding to Chromatin", *Curr Biol.* 6: 1416–1425.
- Rountree, M. R.; K. E. Bachman; S. B. Baylin (2000). "DNMT1 Binds HDAC2 and a New Co-Repressor, DMAP1, to form a Complex at Replication Foci". *Nat Genet.* 25: 269–277.
- Rowles, A.; J. P. Chong; L. Brown; M. Howell; G. I. Evan; J. J. Blow (1996). "Interaction Between the Origin Recognition Complex and the Replication Licensing System in Xenopus", *Cell.* 87: 287–296.
- Sadoni, N.; M. C. Cardoso; E. H. K. Stelzer; H. Leonhardt; D. Zink (2004). "Stable Chromosomal Units Determine the Spatial and Temporal Organization of DNA Replication", *J Cell Sci.* 117: 5353–5365.
- Santocanale, C.; J. F. X. Diffley (1996). "ORC- and Cdc6-dependent Complexes at Active and Inactive Chromosomal Replication Origins in Saccharomyces cerevisiae", *EMBO J.* 15: 6671–6679.
- Sasaki, T.; T. Sawado; M. Yamaguchi; T. Shinomiya (1999). "Specification of Regions of DNA Replication Initiation Turing Embryogenesis in the 65-kilobase DNA pol $\alpha$ -dE2F locus of Drosophila melanogaster", *Mol Cell Biol.* 19: 547–555.
- Schepers, A.; M. Ritz; K. Bousset; E. Kremmer; J. L. Yates; J. Harwood; J. F. Diffley; W. Hammerschmidt (2001). "Human Origin Recognition Complex Binds to the Region of the Latent Origin of DNA Replication of Epstein–Barr Virus", *EMBO J.* 20:4588–4602.
- Shareef, M. M.; C. King; M. Damaj; R. Badagu; D. W. Huang; R. Kellum (2001). "Drosophila Heterochromatin Protein 1 (HP1)/Origin Recognition Complex (ORC) Protein is Associated with HP1 and ORC and Functions in Heterochromatin-induced Silencing", *Mol Biol Cell.* 12: 1671–1685.
- Smith, H. C.; E. Puvion; L. A. Buchholtz; R. Berezney (1984). "Spatial Distribution of dna Loop Attachment and Replicational Sites in the Nuclear Matrix", *J Cell Biol.* 99: 1794–1802.
- Somanathan, S.; T.M. Suchyna; A.J. Siegel; R. Berezney (2001). "Targeting of PCNA to Sites of DNA Replication in the Mammalian Cell Nucleus", *J Cell Biochem.* 81: 56–67.
- Sporbert, A.; A. Gahl; R. Ankerhold; H. Leonhardt; M. C. Cardoso (2002). "DNA Polymerase Clamp Shows Little Turnover at Established Replication Sites but Sequential de Novo Assembly at Adjacent Origin Clusters", *Mol Cell.* 10: 1355–1365.
- Stambrook, P. J.; R. A. Flickinger (1970). "Changes in Chromosomal DNA Replication Patterns in Developing frog Embryos", *J Exp Zool.* 174: 101–113.
- Stehle, I. M.; J. Postberg; S. Rupprecht; T. Cremer; D. A. Jackson; H. J. Lipps (2007). "Establishment and Mitotic Stability of an Extra-Chromosomal Mammalian Replicon", *BMC Cell Biology.* 8: 33–45.
- Struhl, K.; D. T. Stinchcomb; S. Scherer; R. W. Davis (1979). "High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules", *Proc Natl Acad Sci USA.* 76: 1035–1039.
- Tao, L.; Z. Dong; M. Leffak; M. Zannis-Hadjopoulos; G. Price (2000). "Major DNA Replication Initiation Sites in the c-myc Locus in Human Cells", *J Cell Biochem.* 78:442–457.
- Tatsumi, Y.; S. Ohta; H. Kimura; T. Tsurimoto; C. Obuse (2003). "The Orc1 Cycle in Human Cells: I. Cell cycle-regulated Oscillation of Human Orc1", *J Biol Chem.* 278: 41528–41534.
- Taylor, J. H. (1968). "Rates of Chain Growth and Units of Replication in DNA of Mammalian Chromosomes", *J Mol Biol.* 31:579–594.
- Trivedi, A.; S. E. Waltz; S. Kamath; M. Leffak (1998). "Multiple Initiations in the c-myc Replication Origin Independent of Chromosomal Location", *DNA Cell Biol.* 17:885–896.
- Tubo, R. A.; R. Berezney (1987). "Nuclear Matrix-Bound DNA Primase. Elucidation of an RNA Priming System in Nuclear Matrix Isolated from Regenerating rat Liver", *J Biol Chem.* 262(14): 6637–6642.
- Van der Velden, H. M.; G. Van Willigen; R. H. W. Wetzels; F. Wanka (1984). "Attachment of Origins of Replication to the Nuclear Matrix and the Chromosomal Scaffold", *FEBS Lett.* 171: 13–16.
- Vashee, S.; C. Cvetic; W. Lu; P. Simacek; T. J. Kelly; J. C. Walter (2003). "Sequence-In-

- dependent DNA Binding and Replication Initiation by the Human Origin Recognition Complex", *Genes Dev.* 17: 1894–1908.
- Vaughn, J. P.; P. A. Dijkwel; J. L. Hamlin (1990). "Replication Initiates in a Broad Zone in the Amplified CHO Dihydrofolate Reductase Domain", *Cell.* 61: 1075–1087.
- Vogelstein, B.; D. Pardoll; D. Coffey (1980). "Supercoiled Loops and Eukaryotic DNA Replication". *Cell.* 22: 79-85. 157.
- Woodfine, K.; H. Fiegler; D. M. Beare; J. E. Collins; O. T. McCann; B. D. Young; S. Debernardi; R. Mott; I. Dunham; N. P. Carter (2004). "Replication Timing of the Human Genome", *Hum Mol Genet.* 13: 191-202.
- Yamashita, M.; Y. Hori; T. Shinomiya; C. Obuse; T. Tsurimoto; H. Yoshi Kawa; K. Shirahige (1997). "The Efficiency and Timing of Initiation of Replication of Multiple Replicons of *Saccharomyces cerevisiae* Chromosome VI", *Genes Cells* 2:655-665.
- Yasuda, S.; Y. Hirota (1977). "Cloning and Mapping of the Replication Origin of *Escherichia coli*", *Proc. Natl Acad Sci USA.* 74: 5458–5462.
- Zbarskii, I. B. (1998). "On the History of Nuclear Matrix Manifestation", *Cell Res.* 8 (2): 99-103.



CONVERGENCIA Revista de Ciencias Sociales.

Año 15 Número 47 mayo-agosto de 2008.

Publicación del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Ciencias Políticas y  
Administración Pública, de la Universidad Autónoma del Estado de México.  
Telfax (722) 215 9280

<http://convergenzia.uamex.mx> • [www.redalyc.com.mx](http://www.redalyc.com.mx) • [revistaconvergenzia@yahoo.com.mx](mailto:revistaconvergenzia@yahoo.com.mx)

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aelen, J.M., Opstelten, R.J. and Wanka, F. (1983) Organization of DNA replication in *Physarum polycephalum*. Attachment of origins of replicons and replication forks to the nuclear matrix. *Nucleic Acids Res*, 11, 1181-1195.
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell* 4th edition ed. Garland Science, New York
3. Anachkova, B., Djeliova, V. and Russev, G. (2005) Nuclear matrix support of DNA replication. *J Cell Biochem*, 96, 951-961.
4. Aranda-Anzaldo, A. (1992) Early induction of DNA single-stranded breaks in cells infected by herpes simplex virus type 1. *Arch Virol*, 122, 317-330.
5. Aranda-Anzaldo, A. (1998) The normal association between newly replicated DNA and the nuclear matrix is abolished in cells infected by herpes simplex virus type 1. *Res Virol*, 149, 195-208.
6. Aranda-Anzaldo, A. (2009). A structural basis for cellular senescence. *Aging* 1(1): 598-607.
7. Aranda-Anzaldo, A. and M. A. Dent (1997). Loss of DNA loop supercoiling and organization in cells infected by herpes simplex virus type 1. *Res Virol* 148(6): 397-408.
8. Aranda-Anzaldo, A., Orozco-Velasco, F., Garcia-Villa, E. and Gariglio, P. (1999) p53 is a rate-limiting factor in the repair of higher-order DNA structure. *Biochim Biophys Acta*, 1446, 181-192.
9. Banfalvi, G. (2008). Chromatin fiber structure and plectonemic model of chromosome condensation in *Drosophila* cells. *DNA Cell Biol* 27(2): 65-70.
10. Barrack, E. R. and D. S. Coffey (1982). Biological properties of the nuclear matrix: steroid hormone binding. *Recent Prog Horm Res* 38: 133-95.
11. Beggs, A. H. and B. R. Migeon (1989). Chromatin loop structure of the human X chromosome: relevance to X inactivation and CpG clusters. *Mol Cell Biol* 9(6): 2322-31.
12. Benham, C., Kohwi-Shigematsu, T. and Bode, J. (1997) Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *J Mol Biol*, 274, 181-196.
13. Berezney, R. and D. S. Coffey (1974). Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 60(4): 1410-7.
14. Berezney, R. and D. S. Coffey (1975). Nuclear protein matrix: association with newly synthesized DNA. *Science* 189 (4199): 291-3.
15. Berezney, R. and L. A. Buchholtz (1981). Isolation and characterization of rat liver nuclear matrices containing high molecular weight deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 20(17): 4995-5002.
16. Berezney, R. and X. Wei (1998). The new paradigm: integrating genomic function and nuclear architecture. *J Cell Biochem Suppl* 30-31: 238-42.
17. Berezney, R., Dubey, D.D. and Huberman, J.A. (2000) Heterogeneity of eukaryotic replicons, replicon clusters, and replication foci. *Chromosoma*, 108, 471-484.
18. Berezney, R., Mortillaro, M.J., Ma, H., Wei, X. and Samarabandu, J. (1995) The nuclear matrix: a structural milieu for genomic function. *Int Rev Cytol*, 162A, 1-65.
19. Berrios, M., Osheroff, N. and Fisher, P.A. (1985) In situ localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of the *Drosophila* nuclear matrix fraction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82, 4142-4146.
20. Blencowe, B.J., Bauren, G., Eldridge, A.G., Issner, R., Nickerson, J.A., Rosonina, E. and Sharp, P.A. (2000) The SRm160/300 splicing coactivator subunits. *RNA*, 6, 111-120.
21. Blencowe, B.J., Nickerson, J.A., Issner, R., Penman, S. and Sharp, P.A. (1994) Association of nuclear matrix antigens with exon-containing splicing complexes. *J Cell Biol*, 127, 593-607.
22. Blow, J. J. and A. M. Sleeman (1990). Replication of purified DNA in *Xenopus* egg extract is dependent on nuclear assembly. *J Cell Sci* 95 ( Pt 3): 383-91.
23. Bode, J., Kohwi, Y., Dickinson, L., Joh, T., Klehr, D., Mielke, C. and Kohwi-Shigematsu, T. (1992) Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. *Science*, 255, 195-197.
24. Boulikas, T. (1995). Chromatin domains and prediction of MAR sequences. *Int Rev Cytol* 162A: 279-388.
25. Braem, C., Recolin, B., Rancourt, R.C., Angiolini, C., Barthes, P., Branchu, P., Court, F., Cathala, G., Ferguson-Smith, A.C. and Forne, T. (2008) Genomic matrix attachment region and chromosome conformation capture quantitative real time PCR assays identify novel putative regulatory elements at the imprinted *Dlk1/Gtl2* locus. *J Biol Chem*, 283, 18612-18620.
26. Buongiorno-Nardelli, M., Micheli, G., Carri, M.T. and Marilley, M. (1982) A relationship between replicon size and supercoiled loop domains in the eukaryotic genome. *Nature*, 298, 100-102.
27. Calladine, C., Drew, H., Luisi, B.F. and Travers, A.A. (2004) *Understanding DNA*. 3rd ed. Elsevier-Academic Press.

28. Cardoso, M.C., Leonhardt, H. and Nadal-Ginard, B. (1993) Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: cyclin A and Cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell*, 74, 979-992.
29. Carter, D.R., Eskiw, C. and Cook, P.R. (2008) Transcription factories. *Biochem Soc Trans*, 36, 585-589.
30. Chakalova, L., Debrand, E., Mitchell, J.A., Osborne, C.S. and Fraser, P. (2005) Replication and transcription: shaping the landscape of the genome. *Nat Rev Genet*, 6, 669-677.
31. Chuang, L.S., Ian, H.I., Koh, T.W., Ng, H.H., Xu, G. and Li, B.F. (1997) Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science*, 277, 1996-2000.
32. Chubb, J.R., Boyle, S., Perry, P. and Bickmore, W.A. (2002) Chromatin motion is constrained by association with nuclear compartments in human cells. *Curr Biol*, 12, 439-445.
33. Ciejek, E.M., Nordstrom, J.L., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1982) Ribonucleic acid precursors are associated with the chick oviduct nuclear matrix. *Biochemistry*, 21, 4945-4953.
34. Ciejek, E.M., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1983) Actively transcribed genes are associated with the nuclear matrix. *Nature*, 306, 607-609.
35. Cockerill, P. N. and W. T. Garrard (1986). Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell* 44(2): 273-82.
36. Conti, C., Sacca, B., Herrick, J., Lalou, C., Pommier, Y. and Bensimon, A. (2007) Replication fork velocities at adjacent replication origins are coordinately modified during DNA replication in human cells. *Mol Biol Cell*, 18, 3059-3067.
37. Cook, P. R. (1988). The nucleoskeleton: artefact, passive framework or active site? *J Cell Sci* 90 : 1-6.
38. Cook, P. R. (1999). The organization of replication and transcription. *Science* 284(5421): 1790-5.
39. Cook, P. R. (2001). Principles of Nuclear Structure and Function. New York, Wiley-Liss.
40. Cook, P. R. (2010). A model for all genomes: the role of transcription factories. *J Mol Biol* 395(1): 1-10.
41. Cook, P. R. and I. A. Brazell (1975). Supercoils in human DNA. *J Cell Sci* 19(2): 261-79.
42. Cook, P. R. and I. A. Brazell (1976). Conformational constraints in nuclear DNA. *J Cell Sci* 22(2): 287-302.
43. Cook, P. R. and I. A. Brazell (1980). Mapping sequences in loops of nuclear DNA by their progressive detachment from the nuclear cage. *Nucleic Acids Res* 8(13): 2895-906.
44. Cook, P.R. (1991) The nucleoskeleton and the topology of replication. *Cell*, 66, 627-635.
45. Cook, P.R., Brazell, I.A. and Jost, E. (1976) Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J Cell Sci*, 22, 303-324.
46. Cook, P.R., Lang, J., Hayday, A., Lania, L., Fried, M., Chiswell, D.J. and Wyke, J.A. (1982) Active viral genes in transformed cells lie close to the nuclear cage. *EMBO J*, 1, 447-452.
47. Cooke, N.E., McLeod, J.F., Wang, X.K. and Ray, K. (1991) Vitamin D binding protein: genomic structure, functional domains, and mRNA expression in tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 40, 787-793.
48. Cremer, T. and C. Cremer (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* 2(4): 292-301.
49. Cremer, T. and C. Cremer (2006a). Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part I. The rise of chromosome territories. *Eur J Histochem* 50(3): 161-76.
50. Cremer, T. and C. Cremer (2006b). Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part II. Fall and resurrection of chromosome territories during the 1950s to 1980s. Part III. Chromosome territories and the functional nuclear architecture: experiments and models from the 1990s to the present. *Eur J Histochem* 50(4): 223-72.
51. Cremer, T., Kreth, G., Koester, H., Fink, R.H., Heintzmann, R., Cremer, M., Solovei, I., Zink, D. and Cremer, C. (2000) Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 10, 179-212.
52. Cremer, T., Baumann, H., Nakanishi, K. and Cremer, C. (1984) Correlation between interphase and metaphase chromosome arrangements as studied by laser-uv-microbeam experiments. *Chromosomes today*, 8, 203-212.
53. Croft, J.A., Bridger, J.M., Boyle, S., Perry, P., Teague, P. and Bickmore, W.A. (1999) Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol*, 145, 1119-1131.
54. Dai, B., Ying, L., Cai, R., Li, Y., Zhang, X., Lu, J. and Qian, G. (2006) Identification of a nuclear matrix attachment region like sequence in the last intron of PI3K-gama. *Biochem Biophys Res Commun*, 341, 583-590.
55. Dickinson, P., Cook, P.R. and Jackson, D.A. (1990) Active RNA polymerase I is fixed within the nucleus of HeLa cells. *EMBO J*, 9, 2207-2214.
56. Dijkwel, P.A. and Hamlin, J.L. (1988) Matrix attachment regions are positioned near replication initiation sites, genes, and an interamplicon junction in the amplified dihydrofolate reductase domain of Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol*, 8, 5398-5409.

57. Dijkwel, P.A., Wenink, P.W. and Poddighe, J. (1986) Permanent attachment of replication origins to the nuclear matrix in BHK-cells. *Nucleic Acids Res*, 14, 3241-3249.
58. Dimitrova, D. S. and R. Berezney (2002). The spatio-temporal organization of DNA replication sites is identical in primary, immortalized and transformed mammalian cells. *J Cell Sci* 115(Pt 21): 4037-51.
59. Dingman, C. W. (1974). Bidirectional chromosome replication: some topological considerations. *J Theor Biol* 43(1): 187-95.
60. Djeliova, V., Russev, G. and Anachkova, B. (2001a) Dynamics of association of origins of DNA replication with the nuclear matrix during the cell cycle. *Nucleic Acids Res*, 29, 3181-3187.
61. Djeliova, V., Russev, G. and Anachkova, B. (2001b) Distribution of DNA replication origins between matrix-attached and loop DNA in mammalian cells. *J Cell Biochem*, 80, 353-359.
62. Earnshaw, W.C., Halligan, B., Cooke, C.A., Heck, M.M. and Liu, L.F. (1985) Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds. *J Cell Biol*, 100, 1706-1715.
63. Edenberg, H. J. and J. A. Huberman (1975). Eukaryotic chromosome replication. *Annu Rev Genet* 9: 245-84.
64. Elcock, L. S. and J. M. Bridger (2008). Exploring the effects of a dysfunctional nuclear matrix. *Biochem Soc Trans* 36(Pt 6): 1378-83.
65. Ermakova, O.V., Nguyen, L.H., Little, R.D., Chevillard, C., Riblet, R., Ashouian, N., Birshtein, B.K. and Schildkraut, C.L. (1999) Evidence that a single replication fork proceeds from early to late replicating domains in the IgH locus in a non-B cell line. *Mol Cell*, 3, 321-330.
66. Evans, K., Ott, S., Hansen, A., Koentges, G. and Wernisch, L. (2007) A comparative study of S/MAR prediction tools. *BMC Bioinformatics*, 8, 71.
67. Fabrikant, J. (1968). The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. *Exp Cell Res* 36: 551-565.
68. Fiorini, A., Gouveia Fde, S. and Fernandez, M.A. (2006) Scaffold/Matrix Attachment Regions and intrinsic DNA curvature. *Biochemistry (Mosc)*, 71, 481-488.
69. Fisher, P. A. (1989). Chromosomes and chromatin structure: the extrachromosomal karyoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 1(3): 447-53.
70. Flegg, H.G. (2001) From geometry to topology. Dover Publications.
71. Forbes, D.J., Kirschner, M.W. and Newport, J.W. (1983) Spontaneous formation of nucleus-like structures around bacteriophage DNA microinjected into *Xenopus* eggs. *Cell*, 34, 13-23.
72. Freshney, I. (1994). *Liver. Culture of animal cells*. USA, Wiley-Liss: 320-322.
73. Frisch, M., Frech, K., Klingenhoff, A., Cartharius, K., Liebich, I. and Werner, T. (2002) In silico prediction of scaffold/matrix attachment regions in large genomic sequences. *Genome Res*, 12, 349-354.
74. Fuss, J. and S. Linn (2002). Human DNA polymerase epsilon colocalizes with proliferating cell nuclear antigen and DNA replication late, but not early, in S phase. *J Biol Chem* 277(10): 8658-66.
75. Gasser, S. M. and U. K. Laemmli (1986). Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell* 46(4): 521-30.
76. Gerdes, M., Carter, K., Moen, P. Jr. and Lawrence, J.B. (1994) Dynamic changes in the higher-level chromatin organization of specific sequences revealed by in situ hybridization to nuclear halos. *J Cell Biol*, 126, 289-304.
77. Gilbert, D. M. (2004). In search of the holy replicator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(10): 848-55.
78. Gimenes, F., Takeda, K.I., Fiorini, A., Gouveia, F.S. and Fernandez, M.A. (2008) Intrinsically bent DNA in replication origins and gene promoters. *Genet Mol Res*, 7, 549-558.
79. Glazko, G.V., Rogozin, I.B. and Glazkov, M.V. (2001) Comparative study and prediction of DNA fragments associated with various elements of the nuclear matrix. *Biochim Biophys Acta*, 1517, 351-364.
80. Goetze, S., Mateos-Langerak, J. and van Driel, R. (2007) Three-dimensional genome organization in interphase and its relation to genome function. *Semin Cell Dev Biol*, 18, 707-714.
81. Gombert, W., Farris, S., Rubio, E., Morey-Rosler, K., Schubach, W. and Krumm, A. (2003) The c-myc insulator element and matrix attachment regions define the c-myc chromosomal domain. *Mol Cell Biol*, 23, 9338-9348.
82. Gromova, II, Thomsen, B. and Razin, S.V. (1995) Different topoisomerase II antitumor drugs direct similar specific long-range fragmentation of an amplified c-MYC gene locus in living cells and in high-salt-extracted nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 102-106.
83. Hair, A. and Y. Vassetzky (2007). Determination of the chromatin domain structure in arrayed repeat regions: organization of the somatic 5S RNA domain during embryogenesis in *Xenopus laevis*. *J Cell Biochem* 102 (5): 1140-8.
84. Hand, R. (1975). Regulation of DNA replication on subchromosomal units of mammalian cells. *J Cell Biol* 64(1): 89-97.

85. Hendzel, M.J., Delcuve, G.P. and Davie, J.R. (1991) Histone deacetylase is a component of the internal nuclear matrix. *J Biol Chem*, 266, 21936-21942.
86. Hendzel, M.J., Sun, J.M., Chen, H.Y., Rattner, J.B. and Davie, J.R. (1994) Histone acetyltransferase is associated with the nuclear matrix. *J Biol Chem*, 269, 22894-22901.
87. Heng, H., Goetze, S., Ye, C., Liu, G., Stevens, J.B., Bremer, S.W., Wykes, S.M., Bode, J. and Krawetz, S.A. (2004) Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. *J Cell Sci*, 117, 999-1008.
88. Hozak, P. and P. R. Cook (1994). Replication factories. *Trends Cell Biol* 4(2): 48-52.
89. Hozak, P., Hassan, A.B., Jackson, D.A. and Cook, P.R. (1993) Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton. *Cell*, 73, 361-373.
90. Hozak, P., Jackson, D.A. and Cook, P.R. (1994) Replication factories and nuclear bodies: the ultrastructural characterization of replication sites during the cell cycle. *J Cell Sci*, 107(8), 2191-2202.
91. Huberman, J. A. and A. D. Riggs (1968). On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J Mol Biol* 32(2): 327-41.
92. Iarovaia, O., Hancock, R., Lagarkova, M., Miassod, R. and Razin, S.V. (1996) Mapping of genomic DNA loop organization in a 500-kilobase region of the *Drosophila* X chromosome by the topoisomerase II-mediated DNA loop excision protocol. *Mol Cell Biol*, 16, 302-308.
93. Iarovaia, O.V., Bystritskiy, A., Ravcheev, D., Hancock, R. and Razin, S.V. (2004) Visualization of individual DNA loops and a map of loop domains in the human dystrophin gene. *Nucleic Acids Res*, 32, 2079-2086.
94. Iborra, F.J., Pombo, A., Jackson, D.A. and Cook, P.R. (1996) Active RNA polymerases are localized within discrete transcription factories' in human nuclei. *J Cell Sci*, 109 ( Pt 6), 1427-1436.
95. Ioudinkova, E., Petrov, A., Razin, S.V. and Vassetzky, Y.S. (2005) Mapping long-range chromatin organization within the chicken alpha-globin gene domain using oligonucleotide DNA arrays. *Genomics*, 85, 143-151.
96. Izaurralde, E., Mirkovitch, J. and Laemmli, U.K. (1988) Interaction of DNA with nuclear scaffolds *in vitro*. *J Mol Biol*, 200, 111-125.
97. Jackson, D. A. and A. Pombo (1998). Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. *J Cell Biol* 140(6): 1285-95.
98. Jackson, D. A. and P. R. Cook (1985). Transcription occurs at a nucleoskeleton. *EMBO J* 4(4): 919-25.
99. Jackson, D. A. and P. R. Cook (1986). A cell-cycle-dependent DNA polymerase activity that replicates intact DNA in chromatin. *J Mol Biol* 192(1): 65-76.
100. Jackson, D. A. and P. R. Cook (1986). Replication occurs at a nucleoskeleton. *EMBO J* 5(6): 1403-10.
101. Jackson, D. A., Dickinson, P. and Cook, P.R. (1990) The size of chromatin loops in HeLa cells. *EMBO J*, 9, 567-571.
102. Jackson, D. A., Balajee, A., Mullenders, L. and Cook, P.R. (1994) Sites in human nuclei where DNA damaged by ultraviolet light is repaired: visualization and localization relative to the nucleoskeleton. *J Cell Sci*, 107 ( Pt 7), 1745-1752.
103. Jackson, D.A., Iborra, F.J., Manders, E.M. and Cook, P.R. (1998) Numbers and organization of RNA polymerases, nascent transcripts, and transcription units in HeLa nuclei. *Mol Biol Cell*, 9, 1523-1536.
104. Jackson, D.A., McCreedy, S.J. and Cook, P.R. (1981) RNA is synthesized at the nuclear cage. *Nature*, 292, 552-555.
105. Jacob, F. (1964). On the Regulation of DNA in Bacteria. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 28: 329-348.
106. Jacob, F. (1993). The Replicon: Thirty Years Later. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58: 383-387.
107. Jenkins, H., Holman, T., Lyon, C., Lane, B., Stick, R. and Hutchison, C. (1993) Nuclei that lack a lamina accumulate karyophilic proteins and assemble a nuclear matrix. *J Cell Sci*, 106 ( Pt 1), 275-285.
108. Jin, L., Long, L., Green, M.A. and Spear, B.T. (2009) The alpha-fetoprotein enhancer region activates the albumin and alpha-fetoprotein promoters during liver development. *Dev Biol*, 336, 294-300.
109. Kaneoka, H., Miyake, K. and Iijima, S. (2009) Interactions between the nuclear matrix and an enhancer of the tryptophan oxygenase gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 387, 717-722.
110. Kohwi-Shigematsu, T. and Y. Kohwi (1990). Torsional stress stabilizes extended base unpairing in suppressor sites flanking immunoglobulin heavy chain enhancer. *Biochemistry* 29(41): 9551-60.
111. Kramer, J.A., Adams, M.D., Singh, G.B., Doggett, N.A. and Krawetz, S.A. (1998) A matrix associated region localizes the human SOCS-1 gene to chromosome 16p13.13. *Somat Cell Mol Genet*, 24, 131-133.
112. Kramer, J.A., Adams, M.D., Singh, G.B., Doggett, N.A. and Krawetz, S.A. (1998) Extended analysis of the region encompassing the PRM1-->PRM2-->TNP2 domain: genomic organization, evolution and gene identification. *J Exp Zool*, 282, 245-253.

113. Kumar, P.P., Bischof, O., Purbey, P.K., Notani, D., Urlaub, H., Dejean, A. and Galande, S. (2007) Functional interaction between PML and SATB1 regulates chromatin-loop architecture and transcription of the MHC class I locus. *Nat Cell Biol*, 9, 45-56.
114. Lagarkova, M., Svetlova, E., Giacca, M., Falaschi, A. and Razin, S. (1998) DNA loop anchorage region colocalizes with the replication origin located downstream to the human gene encoding lamin B2. *J Cell Biochem*, 69, 13-18.
115. Lazarevich, N. L. (2000). Molecular mechanisms of alpha-fetoprotein gene expression. *Biochemistry (Mosc)* 65(1): 117-33.
116. Lemaitre, J.M., Danis, E., Pasero, P., Vassetzky, Y. and Mechali, M. (2005) Mitotic remodeling of the replicon and chromosome structure. *Cell*, 123, 787-801.
117. Leonhardt, H., Rahn, H.P., Weinzierl, P., Sporbert, A., Cremer, T., Zink, D. and Cardoso, M.C. (2000) Dynamics of DNA replication factories in living cells. *J Cell Biol*, 149, 271-280.
118. Lewin, B. (1980) *Gene Expression* 2. 2nd ed. John Wiley and Sons, New York.
119. Linnemann, A. K. and S. A. Krawetz (2009). Maintenance of a functional higher order chromatin structure: the role of the nuclear matrix in normal and disease states. *Gene Ther. Mol. Biol.* 13: 231-243.
120. Linnemann, A.K., Platts, A.E., Doggett, N., Gluch, A., Bode, J. and Krawetz, S.A. (2007) Genomewide identification of nuclear matrix attachment regions: an analysis of methods. *Biochem Soc Trans*, 35, 612-617.
121. Ma, H., Siegel, A.J. and Berezney, R. (1999) Association of chromosome territories with the nuclear matrix. Disruption of human chromosome territories correlates with the release of a subset of nuclear matrix proteins. *J Cell Biol*, 146, 531-542.
122. Ma, H., Samarabandu, J., Devdhar, R.S., Acharya, R., Cheng, P.C., Meng, C. and Berezney, R. (1998) Spatial and temporal dynamics of DNA replication sites in mammalian cells. *J Cell Biol*, 143, 1415-1425.
123. Malhas, A., Lee, C.F., Sanders, R., Saunders, N.J. and Vaux, D.J. (2007) Defects in lamin B1 expression or processing affect interphase chromosome position and gene expression. *J Cell Biol*, 176, 593-603.
124. Mancini, M.G., Liu, B., Sharp, Z.D. and Mancini, M.A. (1999) Subnuclear partitioning and functional regulation of the Pit-1 transcription factor. *J Cell Biochem*, 72, 322-338.
125. Marilley, M. and M. Buongiorno-Nardelli (1984). Relationship between the organization of DNA loop domains and of replicons in the eukaryotic genome. *Adv Exp Med Biol* 179: 163-8.
126. Marshall, W., Straight, A., Marko, J., Swedlow, J., Dernburg, A., Belmont, A., Murray, A.W., Agard, D.A. and Sedat, J.W. (1997) Interphase chromosomes undergo constrained diffusional motion in living cells. *Curr Biol*, 7, 930-939.
127. Maya-Mendoza, A. and A. Aranda-Anzaldo (2003). Positional mapping of specific DNA sequences relative to the nuclear substructure by direct polymerase chain reaction on nuclear matrix-bound templates. *Anal Biochem* 313(2): 196-207.
128. Maya-Mendoza, A., Hernandez-Munoz, R., Gariglio, P. and Aranda-Anzaldo, A. (2003) Gene positional changes relative to the nuclear substructure correlate with the proliferating status of hepatocytes during liver regeneration. *Nucleic Acids Res*, 31, 6168-6179.
129. Maya-Mendoza, A., Hernandez-Munoz, R., Gariglio, P. and Aranda-Anzaldo, A. (2004) Gene positional changes relative to the nuclear substructure during carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *J Cell Biochem*, 93, 1084-1098.
130. Maya-Mendoza, A., Hernandez-Munoz, R., Gariglio, P. and Aranda-Anzaldo, A. (2005) Natural ageing in the rat liver correlates with progressive stabilisation of DNA-nuclear matrix interactions and withdrawal of genes from the nuclear substructure. *Mech Ageing Dev*, 126, 767-782.
131. McCready, S.J., Godwin, J., Mason, D.W., Brazell, I.A. and Cook, P.R. (1980) DNA is replicated at the nuclear cage. *J Cell Sci*, 46, 365-386.
132. McLeod, J. F. and N. E. Cooke (1989). The vitamin D-binding protein, alpha-fetoprotein, albumin multigene family: detection of transcripts in multiple tissues. *J Biol Chem* 264(36): 21760-9.
133. Mechali, M. (2001). DNA replication origins: from sequence specificity to epigenetics. *Nat Rev Genet* 2(8): 640-5.
134. Michalopoulos, G. K. (2007). Liver regeneration. *J Cell Physiol* 213(2): 286-300.
135. Michalopoulos, G. K. (2009). Liver regeneration: Alternative epithelial pathways. *Int J Biochem Cell Biol*. doi:10.1016/j.biocel.2009.09.014
136. Michalopoulos, G. K. and M. C. DeFrances (1997). Liver regeneration. *Science* 276(5309): 60-6.
137. Mika, S. and B. Rost (2005). NMPdb: Database of Nuclear Matrix Proteins. *Nucleic Acids Res* 33(Database issue): D160-3.
138. Mirkovitch, J., Mirault, M.E. and Laemmli, U.K. (1984) Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell*, 39, 223-232.

139. Mladenov, E.V., Kalev, P.S. and Anachkova, B.B. (2009) Nuclear matrix binding site in the Rad51 recombinase. *J Cell Physiol*, 219, 202-208.
140. Montecucco, A., Rossi, R., Levin, D.S., Gary, R., Park, M.S., Motycka, T.A., Ciarrocchi, G., Villa, A., Biamonti, G. and Tomkinson, A.E. (1998) DNA ligase I is recruited to sites of DNA replication by an interaction with proliferating cell nuclear antigen: identification of a common targeting mechanism for the assembly of replication factories. *EMBO J*, 17, 3786-3795.
141. Mortillaro, M. J. and R. Berezney (1998). Matrinx CYP, an SR-rich cyclophilin that associates with the nuclear matrix and splicing factors. *J Biol Chem* 273(14): 8183-92.
142. Nakamura, H., Morita, T. and Sato, C. (1986) Structural organizations of replicon domains during DNA synthetic phase in the mammalian nucleus. *Exp Cell Res*, 165, 291-297.
143. Nakayasu, H. and R. Berezney (1989). Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus. *J Cell Biol* 108(1): 1-11.
144. Nelkin, B.D., Pardoll, D.M. and Vogelstein, B. (1980) Localization of SV40 genes within supercoiled loop domains. *Nucleic Acids Res*, 8, 5623-5633.
145. Nelson, C.M., Jean, R.P., Tan, J.L., Liu, W.F., Sniadecki, N.J., Spector, A.A. and Chen, C.S. (2005) Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 11594-11599.
146. Newport, J.W., Wilson, K.L. and Dunphy, W.G. (1990) A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly. *J Cell Biol*, 111, 2247-2259.
147. Nickerson, J. (2001). Experimental observations of a nuclear matrix. *J Cell Sci* 114(Pt 3): 463-74.
148. Niimi, A., Suka, N., Harata, M., Kikuchi, A. and Mizuno, S. (2001) Co-localization of chicken DNA topoisomerase IIalpha, but not beta, with sites of DNA replication and possible involvement of a C-terminal region of alpha through its binding to PCNA. *Chromosoma*, 110, 102-114.
149. Ortega, J. M. and M. L. DePamphilis (1998). Nucleoskeleton and initiation of DNA replication in metazoan cells. *J Cell Sci* 111 ( Pt 24): 3663-73.
150. Osborne, C.S., Chakalova, L., Brown, K.E., Carter, D., Horton, A., Debrand, E., Goyenechea, B., Mitchell, J.A., Lopes, S., Reik, W. and P. Fraser. (2004) Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat Genet*, 36, 1065-1071.
151. Osborne, C.S., Chakalova, L., Mitchell, J.A., Horton, A., Wood, A.L., Bolland, D.J., Corcoran, A.E. and Fraser, P. (2007) Myc dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by Igh. *PLoS Biol*, 5, e192.
152. Ostermeier, G.C., Liu, Z., Martins, R.P., Bharadwaj, R.R., Ellis, J., Draghici, S. and Krawetz, S.A. (2003) Nuclear matrix association of the human beta-globin locus utilizing a novel approach to quantitative real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 31, 3257-3266.
153. Ottaviani, D., Lever, E., Takousis, P. and Sheer, D. (2008) Anchoring the genome. *Genome Biol*, 9, 201.
154. Pardoll, D.M., Vogelstein, B. and Coffey, D.S. (1980) A fixed site of DNA replication in eucaryotic cells. *Cell*, 19, 527-536.
155. Paszek, M.J., Zahir, N., Johnson, K.R., Lakins, J.N., Rozenberg, G.I., Gefen, A., Reinhart-King, C.A., Margulies, S.S., Dembo, M., Boettiger, D., Hammer, D. A. and Weaver, V. M. (2005) Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, 8, 241-254.
156. Paulson, J. and U. Laemmli (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12(3): 817-28.
157. Petrov, A., Pirozhkova, I., Carnac, G., Laoudj, D., Lipinski, M. and Vassetzky, Y.S. (2006) Chromatin loop domain organization within the 4q35 locus in facioscapulohumeral dystrophy patients versus normal human myoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 6982-6987.
158. Petrova, N.V., Iarovaia, O.V., Verbovoy, V.A. and Razin, S.V. (2005) Specific radial positions of centromeres of human chromosomes X, 1, and 19 remain unchanged in chromatin-depleted nuclei of primary human fibroblasts: evidence for the organizing role of the nuclear matrix. *J Cell Biochem*, 96, 850-857.
159. Petrova, N.V., Yarovaya, O.V. and Razin, S.V. (2006) Specific spatial organization of chromosomes in nuclei of primary human fibroblasts is maintained by nuclear matrix. *Dokl Biochem Biophys*, 406, 4-6.
160. Philimonenko, A.A., Jackson, D.A., Hodny, Z., Janacek, J., Cook, P.R. and Hozak, P. (2004) Dynamics of DNA replication: an ultrastructural study. *J Struct Biol*, 148, 279-289.
161. Purbowasito, W., Suda, C., Yokomine, T., Zubair, M., Sado, T., Tsutsui, K. and Sasaki, H. (2004) Large-scale identification and mapping of nuclear matrix-attachment regions in the distal imprinted domain of mouse chromosome 7. *DNA Res*, 11, 391-407.
162. Radichev, I., Parashkevova, A. and Anachkova, B. (2005) Initiation of DNA replication at a nuclear matrix-attached chromatin fraction. *J Cell Physiol*, 203, 71-77.

163. Razin, S. V. (2001). The nuclear matrix and chromosomal DNA loops: is there any correlation between partitioning of the genome into loops and functional domains?" *Cell Mol Biol Lett* 6(1): 59-69.
164. Razin, S. V. and Gromova, I. (1995). The channels model of nuclear matrix structure. *Bioessays* 17(5): 443-50.
165. Razin, S.V., Iarovaia, O.V., Sjakste, N., Sjakste, T., Bagdoniene, L., Rynditch, A.V., Eivazova, E.R., Lipinski, M. and Vassetzky, Y.S. (2007) Chromatin domains and regulation of transcription. *J Mol Biol*, 369, 597-607.
166. Razin, S.V., Kekelidze, M.G., Lukanidin, E.M., Scherrer, K. and Georgiev, G.P. (1986) Replication origins are attached to the nuclear skeleton. *Nucleic Acids Res*, 14, 8189-8207.
167. Razin, S.V., Yarovaya, O.V. and Georgiev, G.P. (1985) Low ionic strength extraction of nuclease-treated nuclei destroys the attachment of transcriptionally active DNA to the nuclear skeleton. *Nucleic Acids Res*, 13, 7427-7444.
168. Reyes, J.C., Muchardt, C. and Yaniv, M. (1997) Components of the human SWI/SNF complex are enriched in active chromatin and are associated with the nuclear matrix. *J Cell Biol*, 137, 263-274.
169. Rivera-Mulia, J. C. and A. Aranda-Anzaldo (2008). Estructura y función de la unidad fundamental de replicación del DNA (el replicón) en eucariontes. *Ciencia Ergo Sum* 15(3): 269-286.
170. Rivera-Mulia, J. C. and A. Aranda-Anzaldo (2010). Determination of the *in vivo* structural DNA loop organization in the genomic region of the rat albumin locus by means of a topological approach. *DNA Research* 2010 17(1): 23-35. First published January 4, 2010, doi:10.1093/dnares/dsp027.
171. Robinson, S.I., Nelkin, B.D. and Vogelstein, B. (1982) The ovalbumin gene is associated with the nuclear matrix of chicken oviduct cells. *Cell*, 28, 99-106.
172. Rogozin, I.B., Glazko, G.V. and Glazkov, M.V. (2000) Computer prediction of sites associated with various elements of the nuclear matrix. *Brief Bioinform*, 1, 33-44.
173. Rollini, P., Namciu, S.J., Marsden, M.D. and Fournier, R.E. (1999) Identification and characterization of nuclear matrix-attachment regions in the human serpin gene cluster at 14q32.1. *Nucleic Acids Res*, 27, 3779-3791.
174. Rountree, M.R., Bachman, K.E. and Baylin, S.B. (2000) DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet*, 25, 269-277.
175. Sadoni, N., Cardoso, M.C., Stelzer, E.H., Leonhardt, H. and Zink, D. (2004) Stable chromosomal units determine the spatial and temporal organization of DNA replication. *J Cell Sci*, 117, 5353-5365.
176. Sexton, T., Schober, H., Fraser, P. and Gasser, S.M. (2007a) Gene regulation through nuclear organization. *Nat Struct Mol Biol*, 14, 1049-1055.
177. Sexton, T., Umlauf, D., Kurukuti, S. and Fraser, P. (2007b) The role of transcription factories in large-scale structure and dynamics of interphase chromatin. *Semin Cell Dev Biol*, 18, 691-697.
178. Shewchuk, B.M., Cooke, N.E. and Liebhaber, S.A. (2001) The human growth hormone locus control region mediates long-distance transcriptional activation independent of nuclear matrix attachment regions. *Nucleic Acids Res*, 29, 3356-3361.
179. Schoenfelder, S., Sexton, T., Chakalova, L., Cope, N.F., Horton, A., Andrews, S., Kurukuti, S., Mitchell, J.A., Umlauf, D., Dimitrova, D.S., C. H. Eskiw, Y. Luo, C. L. Wei, Y. Ruan, J. J. Bieker and P. Fraser. (2010) Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells. *Nat Genet*, 42, 53-61.
180. Sigal, S.H., Gupta, S., Gebhard, D.F., Jr., Holst, P., Neufeld, D. and Reid, L.M. (1995) Evidence for a terminal differentiation process in the rat liver. *Differentiation*, 59, 35-42.
181. Sigal, S.H., Rajvanshi, P., Gorla, G.R., Sokhi, R.P., Saxena, R., Gebhard, D.R., Jr., Reid, L.M. and Gupta, S. (1999) Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *Am J Physiol*, 276, G1260-1272.
182. Simon, M., Chang, H.C. and Laskowski, M., Sr. (1971) Action of pancreatic deoxyribonuclease I on crab d (A-T) polymer. *Biochim Biophys Acta*, 232, 462-471.
183. Singh, G.B., Kramer, J.A. and Krawetz, S.A. (1997) Mathematical model to predict regions of chromatin attachment to the nuclear matrix. *Nucleic Acids Res*, 25, 1419-1425.
184. Smith, H. C. and R. Berezney (1983). Dynamic domains of DNA polymerase alpha in regenerating rat liver. *Biochemistry* 22(13): 3042-6.
185. Smith, H.C., Puvion, E., Buchholtz, L.A. and Berezney, R. (1984) Spatial distribution of DNA loop attachment and replicational sites in the nuclear matrix. *J Cell Biol*, 99, 1794-1802.
186. Somanathan, S., Suchyna, T.M., Siegel, A.J. and Berezney, R. (2001) Targeting of PCNA to sites of DNA replication in the mammalian cell nucleus. *J Cell Biochem*, 81, 56-67.

187. Sporbert, A., Gahl, A., Ankerhold, R., Leonhardt, H. and Cardoso, M.C. (2002) DNA polymerase clamp shows little turnover at established replication sites but sequential de novo assembly at adjacent origin clusters. *Mol Cell*, 10, 1355-1365.
188. Stein, G.S., van Wijnen, A.J., Stein, J., Lian, J.B. and Montecino, M. (1995) Contributions of nuclear architecture to transcriptional control. *Int Rev Cytol*, 162A, 251-278.
189. Stenoien, D.L., Mancini, M.G., Patel, K., Allegretto, E.A., Smith, C.L. and Mancini, M.A. (2000) Subnuclear trafficking of estrogen receptor-alpha and steroid receptor coactivator-1. *Mol Endocrinol*, 14, 518-534.
190. Sumer, H., Craig, J.M., Sibson, M. and Choo, K.H. (2003) A rapid method of genomic array analysis of scaffold/matrix attachment regions (S/MARs) identifies a 2.5-Mb region of enhanced scaffold/matrix attachment at a human neocentromere. *Genome Res*, 13, 1737-1743.
191. Sun, J., Chen, H., Moniwa, M., Samuel, S. and Davie, J. (1999) Purification and characterization of chicken erythrocyte histone deacetylase 1. *Biochemistry*, 38, 5939-5947.
192. Sutherland, H. and W. A. Bickmore (2009). Transcription factories: gene expression in unions?" *Nat Rev Genet* 10(7): 457-66.
193. Tachiki, K., Kodama, Y., Nakayama, H. and Shinmyo, A. (2009) Determination of the *in vivo* distribution of nuclear matrix attachment regions using a polymerase chain reaction-based assay in *Arabidopsis thaliana*. *J Biosci Bioeng*, 108, 11-19.
194. Taylor, J. H. (1968). Rates of chain growth and units of replication in DNA of mammalian chromosomes. *J Mol Biol* 31(3): 579-94.
195. Trevilla-García, C. and Aranda-Anzaldo, A. (2010) Personal communication. En preparación.
196. Tsutsui, K., Sano, K. and Tsutsui, K. (2005) Dynamic view of the nuclear matrix. *Acta Med Okayama*, 59, 113-120.
197. Tubo, R. A. and R. Berezney (1987a). Identification of 100 and 150 S DNA polymerase alpha-primase megacomplexes solubilized from the nuclear matrix of regenerating rat liver. *J Biol Chem* 262(12): 5857-65.
198. Tubo, R. A. and R. Berezney (1987b). Nuclear matrix-bound DNA primase. Elucidation of an RNA priming system in nuclear matrix isolated from regenerating rat liver. *J Biol Chem* 262(14): 6637-42.
199. Tubo, R. A. and R. Berezney (1987c). Pre-replicative association of multiple replicative enzyme activities with the nuclear matrix during rat liver regeneration. *J Biol Chem* 262(3): 1148-54.
200. Tubo, R.A., Martelli, A.M. and Berezney, R. (1987) Enhanced processivity of nuclear matrix bound DNA polymerase alpha from regenerating rat liver. *Biochemistry*, 26, 5710-5718.
201. van der Velden, H.M., van Willigen, G., Wetzels, R.H. and Wanka, F. (1984) Attachment of origins of replication to the nuclear matrix and the chromosomal scaffold. *FEBS Lett*, 171, 13-16.
202. van Drunen, C.M., Sewalt, R.G., Oosterling, R.W., Weisbeek, P.J., Smeekens, S.C. and van Driel, R. (1999) A bipartite sequence element associated with matrix/scaffold attachment regions. *Nucleic Acids Res*, 27, 2924-2930.
203. van Wijnen, A.J., Bidwell, J.P., Fey, E.G., Penman, S., Lian, J.B., Stein, J.L. and Stein, G.S. (1993) Nuclear matrix association of multiple sequence-specific DNA binding activities related to SP-1, ATF, CCAAT, C/EBP, OCT-1, and AP-1. *Biochemistry*, 32, 8397-8402.
204. Visser, A.E., Jaunin, F., Fakan, S. and Aten, J.A. (2000) High resolution analysis of interphase chromosome domains. *J Cell Sci*, 113 ( Pt 14), 2585-2593.
205. Visser, A.E., Eils, R., Jauch, A., Little, G., Bakker, P.J., Cremer, T. and Aten, J.A. (1998) Spatial distributions of early and late replicating chromatin in interphase chromosome territories. *Exp Cell Res*, 243, 398-407.
206. Vogelstein, B., Pardoll, D. and Coffey, D. (1980) Supercoiled loops and eucaryotic DNA replication. *Cell*, 22, 79-85.
207. von Kries, J.P., Phi-Van, L., Diekmann, S. and Stratling, W.H. (1990) A non-curved chicken lysozyme 5' matrix attachment site is 3' followed by a strongly curved DNA sequence. *Nucleic Acids Res*, 18, 3881-3885.
208. Wachsmuth, M., Caudron-Herger, M. and Rippe, K. (2008) Genome organization: balancing stability and plasticity. *Biochim Biophys Acta*, 1783, 2061-2079.
209. Wagner, S., Chiosea, S. and Nickerson, J.A. (2003) The spatial targeting and nuclear matrix binding domains of SRm160. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 3269-3274.
210. Wansink, D.G., Schul, W., van der Kraan, I., van Steensel, B., van Driel, R. and de Jong, L. (1993) Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *J Cell Biol*, 122, 283-293.
211. Wansink, D.G., Sibon, O.C., Cremers, F.F., van Driel, R. and de Jong, L. (1996) Ultrastructural localization of active genes in nuclei of A431 cells. *J Cell Biochem*, 62, 10-18.

212. Wei, X., Samarabandu, J., Devdhar, R.S., Siegel, A.J., Acharya, R. and Berezney, R. (1998) Segregation of transcription and replication sites into higher order domains. *Science*, 281, 1502-1506.
213. Wei, X., Somanathan, S., Samarabandu, J. and Berezney, R. (1999) Three-dimensional visualization of transcription sites and their association with splicing factor-rich nuclear speckles. *J Cell Biol*, 146, 543-558.
214. Woodfine, K., Fiegler, H., Beare, D.M., Collins, J.E., McCann, O.T., Young, B.D., Debernardi, S., Mott, R., Dunham, I. and Carter, N.P. (2004) Replication timing of the human genome. *Hum Mol Genet*, 13, 191-202.
215. Xing, Y. G. and J. B. Lawrence (1991). Preservation of specific RNA distribution within the chromatin-depleted nuclear substructure demonstrated by in situ hybridization coupled with biochemical fractionation. *J Cell Biol* 112(6): 1055-63.
216. Zbarskii, I. B. (1998). On the history of nuclear matrix manifestation. *Cell Res* 8(2): 99-103.
217. Zehnbaauer, B. and B. Vogelstein (1985). Supercoiled loops and the organization of replication and transcription in eukaryotes. *BioEssays* 2(2): 52-54.
218. Zeitlin, S., Parent, A., Silverstein, S. and Efstratiadis, A. (1987) Pre-mRNA splicing and the nuclear matrix. *Mol Cell Biol*, 7, 111-120.
219. Zeitlin, S., Wilson, R.C. and Efstratiadis, A. (1989) Autonomous splicing and complementation of *in vivo*-assembled spliceosomes. *J Cell Biol*, 108, 765-777.
220. Zeng, C., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Meyers, S., Sun, W., Shopland, L., Lawrence, J.B., Penman, S., Lian, J.B., Stein, G.S. and Hiebert, S. W. (1997) Identification of a nuclear matrix targeting signal in the leukemia and bone-related AML/CBF-alpha transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 6746-6751.