



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN DE LOS BUCLES ESTRUCTURALES DEL DNA EN LA REGIÓN GENÓMICA
DEL LOCUS *C-MYC* DEL GENOMA DE LA RATA Y ESTABLECIMIENTO DE UNA
CORRELACIÓN FÍSICA Y FUNCIONAL ENTRE TALES BUCLES Y LAS UNIDADES DE
REPLICACIÓN (REPLICONES) *IN VIVO***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

REBECA COYOLXAUHQI CASTILLO MORA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ARMANDO ARANDA ANZALDO
FACULTAD DE MEDICINA, UAEMéx

COMITÉ TUTOR: DR. ROLANDO EFRAÍN HERNÁNDEZ MUÑOZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. MAYO, 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/134/13

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **18 de junio de 2012**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **CASTILLO MORA REBECA COYOLXAUHQUI** con número de cuenta **506021460** con la tesis titulada: "**Caracterización de los bucles estructurales del DNA en la región genómica del locus *c-myc* del genoma de la rata y establecimiento de una correlación física y funcional entre tales bucles y las unidades de replicación (replicones) *in vivo***", realizada bajo la dirección del (la) **DR. ARMANDO ARANDA ANZALDO**:

Presidente:	DR. FÉLIX RECILLAS TARGA
Vocal:	DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ
Secretario:	DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES
Suplente:	DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Suplente	DR. ROLANDO EFRAÍN HERNÁNDEZ MUÑOZ

De acuerdo con lo anterior, el(a) alumno(a) se acogió a la nueva normatividad, con base en el artículo QUINTO TRANSITORIO en apego a lo establecido en el Artículo 31 del Reglamento General de Estudios de Posgrado (9 octubre de 2006).

Sin otro particular me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 15 de marzo de 2013.

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa



DIVISION DE ESTUDIOS
DE POSGRADO

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada.

Al tutor principal, Dr. Armando Aranda Anzaldo.

A los miembros del comité tutorial, Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz y Dr. Federico Martínez Montes.

AGRADECIMIENTOS

A todos los miembros pasados y presentes del Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México.

A mi familia por su apoyo durante todos mis estudios.

A Camilo, mi familia chiquita.

A mi familia.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	7
I. Organización del DNA en el núcleo celular	7
II. La Matriz Nuclear	12
III. Regiones de anclaje a la Matriz Nuclear	15
IV. Los bucles estructurales como unidades funcionales del genoma	23
a) El papel de la MN en la replicación y la transcripción.....	23
b) Unidades funcionales representadas por los bucles estructurales.....	26
V. Regeneración hepática.....	31
HIPÓTESIS.....	34
OBJETIVO GENERAL	35
OBJETIVOS PARTICULARES	35
MÉTODO	36
I. Animales experimentales.....	36
II. Hepatectomía parcial	36
III. Aislamiento de hepatocitos	36
IV. Preparación de nucleoides	37
V. Resistencia del DNA de los nucleoides a la digestión con DNasa I.....	37
VI. Ensayo <i>pellet</i> -sobrenadante	38
a) Digestión de nucleoides con enzimas de restricción	38
VII. Mapeo topológico de secuencias con respecto a la MN	38
a) Digestión de nucleoides con DNasa I y protocolo de lavados	38
b) Primers.....	39
c) PCR.....	39
VIII. RT-PCR convencional / punto final	40
IX. RT-PCR en tiempo real	40
RESULTADOS.....	42
I. Contexto cromosómico de la región estudiada	42
II. Predicción <i>in silico</i> de MARs en la región estudiada	42
a) MAR-Finder.....	42
b) SMARTest.....	43
c) MARScan	43
III. Corroboración experimental de MARs identificadas por algoritmos	44
a) Resistencia de los MARs predichos por los algoritmos a la digestión con DNasa I.....	44
b) Ensayo <i>pellet</i> -sobrenadante de regiones MAR	48
IV. Mapeo topológico de secuencias con respecto a la MN: quiescencia	54
V. Mapeo topológico de secuencias con respecto a la MN durante la replicación y retorno a la quiescencia	58
VI. Mapeo topológico de secuencias con respecto a la MN posterior a la finalización del proceso de regeneración hepática post-hepatectomía.....	67
DISCUSIÓN	78
I. Los algoritmos de predicción de secuencias MAR	78
II. El ensayo <i>pellet</i> -sobrenadante	79
III. Organización en bucles estructurales en quiescencia	81
IV. Organización en bucles estructurales durante la replicación y retorno a la quiescencia	83
V. Mecanismo general de replicación: variantes del modelo de carrete.....	87
VI. Organización en bucles estructurales posterior a la finalización del proceso de regeneración hepática post-hepatectomía.....	93
CONCLUSIONES	94
REFERENCIAS	96
ANEXO	108

RESUMEN

El DNA de una célula diploide humana está ordenado en bucles constreñidos topológicamente (superenrollados), anclados en interfase a una estructura proteica llamada matriz nuclear (MN), que se define operacionalmente como la entidad bioquímica que puede ser aislada después de extracciones secuenciales del núcleo con detergentes, nucleasas y altas concentraciones de sal. La formación de cada bucle depende de un segmento de DNA que debe funcionar como un anclaje; estas regiones son referidas como regiones de anclaje a la matriz (MARs). El conjunto de las interacciones DNA-MN definen un orden superior de organización en el núcleo (OSON).

Se ha propuesto que los bucles de DNA pueden constituir dominios funcionales independientes del genoma, que corresponden ya sea a las unidades individuales de transcripción o de replicación. Inicialmente se apoyó la hipótesis de que los bucles de DNA están constituyendo las unidades de transcripción, por experimentos en los que se determinó que los genes transcripcionalmente activos se encuentran en la fracción de DNA estrechamente asociada con la MN. Sin embargo, actualmente se considera que esta asociación refleja su “encauzamiento” hacia los focos de transcripción.

Por otra parte, observaciones experimentales como la correlación entre el tamaño promedio de los bucles y el tamaño promedio de los replicones en células de diferentes especies, la conservación de la organización en bucles en células transcripcionalmente inactivas, la colocalización de varios orígenes de replicación con secuencias MARs, el enriquecimiento del DNA de la MN con secuencias en replicación, y la organización de unidades transcripcionales en varios bucles estructurales, son consistentes con la hipótesis de que los bucles anclados a la MN representan las unidades fundamentales de la replicación eucariótica. Asimismo, con el empleo de diversas estrategias experimentales, se ha demostrado que las enzimas involucradas con la síntesis de DNA se asocian a la subestructura nuclear. Por lo tanto se ha propuesto que la organización topológica del DNA en forma de bucles anclados a la MN es el factor que establece las unidades de replicación de los metazoarios, y que el mecanismo de replicación *in vivo* se asemeja a un sistema en carrete en el cual el templado de DNA se mueve en forma secuencial hacia las fábricas de replicación que están fijadas sobre la MN y el DNA recién sintetizado es extruído de dichas fábricas formando nuevos bucles complementarios a los originales.

Consistente con este modelo, se ha determinado en hepatocitos de rata sincronizados en fase S *in vivo* que muchas secuencias génicas ubicadas en diferentes

cromosomas se acercan a la MN, y luego regresan a sus posiciones originales cuando ha concluido la replicación. Estos movimientos también se observaron, por medio de un método topológico desarrollado en nuestro laboratorio, en una región genómica de 162 kilobases (kb) rica en genes (el *cluster* de la familia albúmina): durante la replicación *in vivo* las secuencias se acercaron a la MN de forma secuencial, para una vez terminado el proceso de replicación, regresar a sus posiciones originales en las nuevas células quiescentes. Sin embargo, es probable que la función de los bucles estructurales como unidades de replicación esté restringida a zonas ricas en genes, dada la prioridad biológica de preservar a los elementos funcionales del genoma, por lo cual es necesario examinar también la estructura y función de los bucles estructurales en regiones pobres en genes para establecer si el modelo de replicación en carrete es aplicable a todo el genoma.

En este trabajo se determinó la organización en bucles estructurales de la región genómica de 210 kb centrada en *c-myc*, región pobre en genes, durante la quiescencia y la fase S del ciclo celular. En quiescencia, la región se organiza en al menos seis bucles estructurales con tamaños de entre ~10 y ~40 kb, con *c-myc* ubicado en el mayor bucle estructural, de ~40 kb, con su 5' orientado hacia la MN. Durante la fase S del ciclo celular, se observa un acercamiento de las secuencias a la MN que se lleva a cabo de forma secuencial, lo que es consistente con un modelo de replicación de carrete, y por otro lado, se observa la actualización de un anclaje a la MN que produce el re-ordenamiento de la región genómica de 210 kb centrada en *c-myc* en al menos siete bucles estructurales, de entre ~10 y ~30 kb en tamaño. La organización original en bucles estructurales del DNA en la región genómica de 210 kb centrada en *c-myc* no se restablece ni cuando ha terminado el proceso de replicación ni en una ventana temporal posterior al retorno de las células a la quiescencia. Sin embargo, los cambios más dramáticos en la organización en bucles estructurales se observan en zonas no codificantes de la región genómica estudiada. En contraste, la ubicación de los anclajes del bucle estructural que contiene a *c-myc*, así como la polaridad del gen con respecto a la MN, se conservan tanto en la fase S del ciclo celular como en quiescencia, una vez terminado el proceso de replicación. Nuestros resultados sugieren que la configuración local de la cromatina que contiene genes activos o potencialmente activos podría estar determinando la conservación de la organización en bucles estructurales de las regiones codificantes.

ABSTRACT

The DNA of a human diploid cell is arranged in topologically constrained (supercoiled) loops anchored in interphase, to a proteinaceous structure called the nuclear matrix (NM), which is operationally defined as the biochemical entity that can be isolated after sequential extractions of the nucleus with detergents, nucleases and high salt. The formation of each loop depends on a DNA segment that should serve as an attachment, these regions are referred to as matrix attachment regions (MARs). The set of DNA-MN interactions define the nuclear higher-order structure (NHOS).

It has been proposed that DNA loops are independent functional domains of the genome, that may correspond either to individual units of transcription or replication. Initially, the hypothesis that DNA loops are individual units of transcription was reinforced by experiments that determined that transcriptionally active genes are in the fraction of DNA that is closely associated to the NM. However, currently this association is understood as a result of the relocation of transcriptionally active genes to transcription foci.

On the other hand, many experimental observations, as the correlation between the average loop size and the average replicon size in cells of different species, the conservation of the loop organization in transcriptionally inactive cells, the colocalization of several origins of replication with MARs sequences, the enrichment of nuclear matrix DNA with replicating sequences, and the organization of a single transcriptional unit in many structural loops, are consistent with the hypothesis that DNA loops represent the fundamental units of eukaryotic replication. Using different experimental approaches, it has been shown that enzymes involved in DNA synthesis are associated with the nuclear substructure. Therefore it has been proposed that the topological organization of DNA is the factor that determines the metazoan replication units, and that the mechanism of replication *in vivo* is similar to a reel process in which the spooled DNA template moves sequentially towards the replication factories, fixed on the NM, and the newly synthesized DNA is extruded from these factories, forming new loops complementary to the originals.

Consistent with this model, using rat hepatocytes synchronized in S phase *in vivo*, it has been shown that a number of gene sequences, located on different chromosomes, get closer to the MN and return to their positions when replication has been completed. These movements were also observed, by means of a topological method developed in our laboratory, in a high-gene-density, 162-kb genomic region (the albumin family cluster): during replication DNA sequences got closer to the NM, in a sequential fashion. Once the

replication process was over, the sequences returned to their original positions in the newly quiescent cells. However, the functionality of structural loops as replication units could be restricted to gene-rich DNA regions, given the biological priority of preserving functional elements of the genome. Therefore it is also necessary the examination of the structure and function of structural DNA loops in gene-poor regions, in order to establish whether the reeling mechanism of replication is applicable to the entire genome

In this study we determined the organization into structural DNA loops of a 210 kb gene-poor genomic region centered on *c-myc*, during quiescence and S phase of the cell cycle. In quiescence, the region is organized in at least six structural loops ranging in size between ~10 and ~40 kb, with *c-myc* located within the largest (~40 kb) structural loop, with its 5' oriented towards the NM. During the S phase of the cell cycle, the DNA sequences move towards NM in a sequential fashion, consistent with a reeling mechanism of replication. On the other hand, the actualization of one MAR produces a rearrangement of the 210 kb region centered on *c-myc*, in at least seven structural loops ranging in size from ~10 to ~30 kb. The original organization of structural DNA loops in the 210-kb genomic region centered on *c-myc* is not re-established neither after completion of the replication process, nor in a subsequent time window after the cells return to quiescence. The most dramatic changes in the organization of the structural loops were observed in the noncoding zones of the studied genomic region. In contrast, the attachments of the structural loop containing *c-myc*, as well as the polarity of the gene relative to the NM, are conserved both in the S phase of cell cycle as in quiescence, once the replication process is over. Our results suggest that the local configuration of chromatin containing active or potentially active genes could be determining the conserved organization in structural loops of the coding regions.

INTRODUCCIÓN

El núcleo celular está estructurado intrincadamente, y el metabolismo nuclear tiene una organización espacial compleja. Está emergiendo una nueva visión del núcleo celular basada en la dinámica funcional de la estructura nuclear. En el núcleo en interfase de los eucariontes superiores el ácido desoxirribonucleico (DNA) está organizado en bucles topológicamente constreñidos y anclados a una subestructura proteica llamada matriz nuclear (MN). Los bucles de DNA se anclan a la MN por medio de secuencias no codificantes conocidas como regiones de anclaje a la matriz (MARs). De la totalidad de regiones de anclaje a la matriz potenciales, sólo un subconjunto se encuentra involucrado en el anclaje de los bucles.

Las relaciones topológicas entre las secuencias génicas localizadas en los bucles y la matriz nuclear son importantes para el funcionamiento nuclear apropiado. Muchos procesos importantes de la fisiología nuclear, como la replicación, la transcripción y el procesamiento de transcritos primarios ocurren en complejos macromoleculares localizados en dominios discretos que se organizan en la MN. Por lo tanto, se ha propuesto que los bucles constituyen dominios autónomos de organización del genoma, y se ha intentado correlacionarlos con entidades funcionales como las unidades de transcripción o las unidades de replicación.

La noción de que los bucles de DNA están constituyendo las unidades de transcripción estuvo en boga gracias a experimentos en los que se determinó que los genes transcripcionalmente activos se encuentran en la fracción de DNA estrechamente asociada con la MN. Sin embargo, las asociaciones entre genes activos y la MN parecen depender de anclajes de tipo funcional-transitorio que reflejan el “encauzamiento” de los genes hacia los focos de transcripción.

Por otra parte, muchas observaciones experimentales, como la correlación entre el tamaño promedio de los bucles y el tamaño promedio de los replicones en células de diferentes especies, la conservación de la organización en bucles en células transcripcionalmente inactivas, la colocalización de muchos orígenes de replicación con secuencias MARs, el enriquecimiento del DNA de la MN con secuencias en replicación, y la organización de unidades transcripcionales en varios bucles estructurales, son consistentes con la hipótesis de que los bucles anclados a la MN representan las unidades fundamentales de la replicación eucariótica. Asimismo, con el empleo de diversas estrategias experimentales, se ha demostrado que enzimas involucradas con la síntesis de DNA, como la DNA polimerasa α , primasa, PCNA y RPA, se asocian a la

subestructura nuclear. Por lo tanto se plantea que la organización topológica del DNA en forma de bucles anclados a la MN es el factor que determina las unidades de replicación de los metazoarios. Se ha propuesto que el mecanismo de replicación *in vivo* se asemeja a un carrete en el cual el templado de DNA se mueve en forma secuencial hacia las fábricas de replicación que están fijadas sobre la MN y el DNA recién sintetizado es extruído de dichas fábricas formando nuevos bucles complementarios a los originales.

Consistente con este modelo, se ha determinado que muchas secuencias génicas ubicadas en diferentes cromosomas se acercan a la MN en hepatocitos de rata sincronizados en fase S *in vivo*. Estas secuencias regresan a sus posiciones originales cuando se ha concluido la replicación. Estos movimientos también se observaron, por medio de un método topológico desarrollado en nuestro laboratorio, en una región genómica de 162 kilobases (kb) rica en genes (el *cluster* de la familia albúmina): durante la replicación *in vivo* las secuencias se acercaron a la MN de forma secuencial, para, una vez terminado el proceso de replicación, regresar a sus posiciones originales. Sin embargo, es probable que la función de los bucles estructurales como unidades de replicación esté restringida a zonas ricas en genes, dada la prioridad biológica de preservar a los elementos funcionales del genoma, por lo que es necesario también examinar la estructura y función de los bucles estructurales en regiones pobres en genes, en función de los diferentes estadios del ciclo celular, para establecer si el modelo de replicación en carrete es aplicable a todo el genoma.

ANTECEDENTES

I. Organización del DNA en el núcleo celular

El núcleo de una célula diploide humana contiene DNA que agrupa aproximadamente 6×10^7 pares de bases (pb) que, extendidas, podrían alcanzar los 2 metros de longitud (Jackson, 1991) y que debe empacarse en un núcleo de 10 micrómetros (μm) de diámetro en promedio (Nelson, *et al.*, 1986). El DNA nuclear está organizado en una jerarquía de estructuras. En el primer nivel de organización de la cromatina, el DNA se une a un octámero de histonas para formar una larga fibra de nucleosomas, la unidad básica de la cromatina. Inicialmente se había establecido que un nucleosoma típico constaba de aproximadamente 200 pb de DNA enrollados alrededor de un octámero proteico formado por dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, pero estudios bioquímicos más finos permitieron establecer que la unidad central del nucleosoma consta de 146 pb enrollados 1.75 veces alrededor del octámero de histonas (Arents y Moudrianakis, 1993). Por su parte, la histona H1 se posiciona en el sitio donde el DNA entra y sale de la unidad central del nucleosoma, formando así la subunidad estructural llamada cromatosoma, que corresponde a 166 pb de DNA enrollados alrededor del octámero proteico y mantenidos en su lugar por la histona H1 (Aranda-Anzaldo, *et al.*, 1998). Vistos por microscopía electrónica, los nucleosomas son cuentas de ~ 10 nanómetros (nm) de diámetro (Kornberg, 1974; Olins y Olins, 1974).

En presencia de la histona H1 la cromatina asume un mayor grado de empacamiento: la estructura helicoidal o en zigzag llamada solenoide organiza seis nucleosomas por cada vuelta, y tiene un diámetro de 30 nm (Alberts, *et al.*, 1994). Aún en la ausencia de la histona H1, las cadenas de nucleosomas se ensamblan de manera espontánea en una fibra de orden superior de 30 nm de diámetro. La naturaleza exacta de esta estructura aún es materia de debate, pero podría estar representada por una doble hélice con *linkers* cruzados, en donde los *linkers* hacen zigzag atravesando el centro de la fibra, o alternativamente como un solenoide simple que consta de seis nucleosomas por vuelta, en donde los nucleosomas se interdigitan entre vueltas adyacentes. Estudios micrográficos del núcleo en interfase revelan que la mayoría del genoma está ensamblado en grados de condensación muy superiores a la fibra de 30 nm. Por microscopía electrónica, las fibras típicamente tienen 110-170 nm de diámetro durante la interfase (Cockerill, 2011)

El siguiente nivel de organización de la cromatina es el ordenamiento de los solenoides en bucles constreñidos topológicamente (superenrollados), anclados en

metafase a un andamio cromosómico central y en interfase a una estructura llamada matriz nuclear (MN; Aranda-Anzaldo, 1989; figuras 1 y 2). El conjunto de las interacciones DNA-MN definen un orden superior de organización en el núcleo (OSON; Aranda-Anzaldo, 2009; Alva-Medina, *et al.*, 2010).

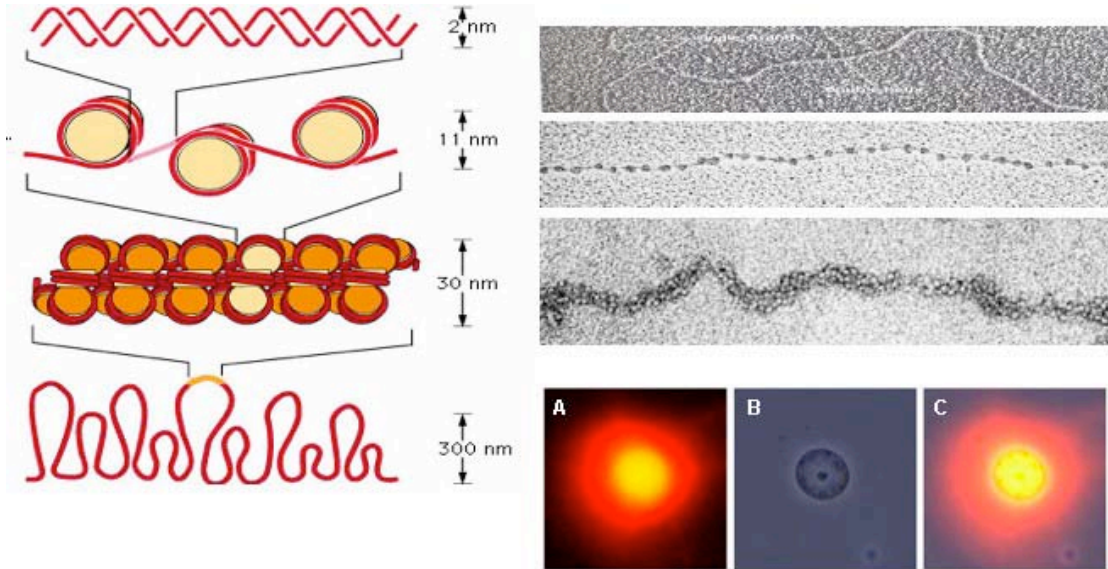


Figura 1. Niveles de organización de la cromatina. En el panel izquierdo se muestra un esquema de la organización del DNA, que va desde el DNA desnudo hasta los bucles de DNA extendidos (tomado y modificado de Alberts, *et al.*, 1994). En el panel derecho, micrografías de las estructuras correspondientes. En el panel inferior se muestra un nucleoside, que consta de la matriz nuclear mas los bucles de DNA tratado con el agente intercalante bromuro de etidio. A, halo formado por los bucles de DNA, en microscopia de epifluorescencia; B, matriz nuclear visible en contraste de fases; C, imagen compuesta.

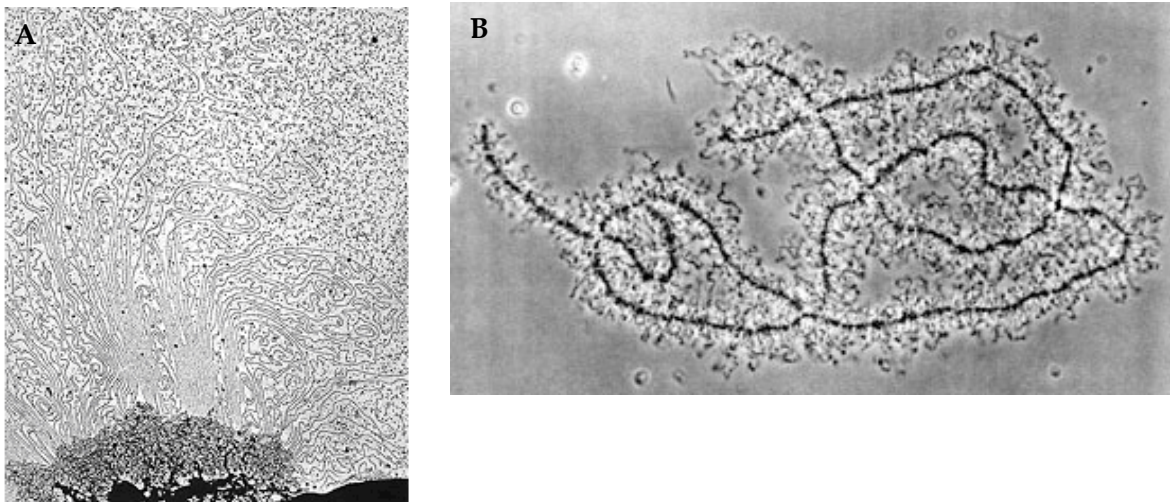


Figura 2. Bucles de DNA en cromosomas metafásicos. A, Micrografía electrónica de los bucles de DNA de cromosomas metafásicos carentes de histonas (Paulson y Laemmli, 1977); B, cromosomas *lampbrush* de oocitos de rana en microscopía de contraste de fases (Alberts, *et al.*, 1994). En ambas imágenes se observan los bucles de DNA anclados a un andamio cromosómico central.

Una de las principales evidencias de que el DNA forma bucles anclados a un andamio o esqueleto cromosómico es la observación directa de los bucles en los cromosomas de cepillo en oocitos de rana por microscopía de contraste de fases (**Figura 2, B**). Se ha obtenido amplia evidencia de la existencia de bucles de DNA bajo condiciones fisiológicas de extracción (Cook, 1995), o bien sin extracción alguna, por lo que se propone que estos bucles simplemente se extienden cuando el núcleo es tratado con altas concentraciones de sal (Byrd y Corces, 2003). Al lisar células HeLa con altas concentraciones de sal se obtuvieron estructuras que se parecen a los núcleos celulares pero que no tienen proteínas solubles asociadas con el DNA. El comportamiento de sedimentación de estos llamados nucleoides es igual al del DNA sin rupturas, superenrollado y circular en el ensayo de titulación con bromuro de etidio (BrEt), molécula que se intercala en el DNA (Cook y Brazell, 1975; Cook, *et al.*, 1976; Aranda-Anzaldo y Dent, 1997; Aranda-Anzaldo, *et al.*, 1999). Este comportamiento puede ser eliminado casi completamente introduciendo rupturas en el DNA con desoxirribonucleasas o radiación ionizante (Mattern, 1984), por lo que se concluye que el DNA de los nucleoides está sujeto al mismo tipo de impedimento topológico que restringe la rotación de una hebra del dúplex alrededor de la otra en moléculas circulares de DNA.

Se ha estimado que el tamaño de los bucles varía desde 10 hasta 200 kb (Vogelstein, *et al.*, 1980; Jackson, *et al.*, 1990). El tamaño promedio estimado del bucle es de 86 kb para células HeLa (Jackson, *et al.*, 1990). El protocolo para determinar el tamaño del bucle se basa en el porcentaje de DNA asociado a la subestructura nuclear después de que éste se corta con enzimas específicas, de tal manera que se determina la longitud de los fragmentos de DNA asociados y se correlaciona con el porcentaje de corte. Por ejemplo, el tamaño promedio de los fragmentos de DNA residuales determinado por electroforesis en células HeLa es de 8.6 kb; el porcentaje de DNA asociado después de la digestión es del 10%, por lo que el tamaño promedio del bucle es de 86 kb (Jackson, *et al.*, 1990). Otro procedimiento para medir el tamaño del bucle es la medición del halo formado por los bucles de DNA. Esta estrategia utiliza el factor de conversión de 1000 pb por cada 0.34 μm de DNA relajado (Smith y Wood, 1992; Razin, *et al.*, 1995). Se ha propuesto que la organización en bucles sufre cambios dinámicos durante el desarrollo post-natal de la rata (Maya-Mendoza, *et al.*, 2005).

La organización en bucles estructurales es el único aspecto de la estructura cromatínica que está presente en todos los estadios de espermatogénesis y

embriogénesis (Klaus, *et al.*, 2001). Durante la espermatogénesis, las histonas de las células precursoras de los espermatozoides se reemplazan por protaminas, que organizan al DNA en toroides altamente condensados, estructuras que son muy diferentes de los nucleosomas de las células somáticas. Sin embargo, los espermatozoides maduros retienen la organización del DNA en bucles anclados a la MN (Shaman, *et al.*, 2007). Dada esta conservación de la organización en bucles estructurales tanto en células somáticas como en germinales, es razonable concluir que la configuración local espacial *in vivo* del DNA en bucles estructurales constituye un punto de inicio para cualquier modificación por proteínas de la cromatina o mecanismos epigenéticos (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010).

El material genético que compone un cromosoma individual no está distribuido de manera aleatoria a través del núcleo en interfase. En cambio, cada cromosoma ocupa una fracción finita del volumen nuclear, mutuamente excluyente, y representa una unidad estructural referida como territorio cromosómico. Los territorios cromosómicos pueden ser visualizados directamente *in situ*, por medio de sondas marcadas con fluorescencia diseñadas para un solo cromosoma. Los estudios de hibridación fluorescente *in situ* (FISH, **F**luorescent **I**n **S**itu **H**ybridization) han establecido inequívocamente la existencia de cromosomas como territorios individuales en organismos superiores (**Figura 3**; Parada y Misteli, 2002). En células normales los territorios cromosómicos se caracterizan por posiciones radiales específicas (Petrova, *et al.*, 2007), además otros estudios muestran que la organización de los territorios cromosómicos dentro del núcleo es específica del tipo celular (Neusser, *et al.*, 2007).

Las razones para la distribución no aleatoria de los territorios cromosómicos dentro del espacio nuclear no son del todo claras. Una idea arraigada en el campo de los territorios cromosómicos es el llamado modelo de auto-organización, en la cual la posición de cada cromosoma está determinada por las propiedades físicas que le confiere a cada cromosoma la distribución lineal de su grado de actividad genómica y de regiones activas (eucromatínicas) e inactivas (heterocromatínicas). Se cree que estas propiedades también podrían determinar la probabilidad de interacción de los cromosomas entre sí, afectando su arreglo relativo (Meaburn y Misteli, 2007). Sin embargo, se ha observado que después de la división celular, los cromosomas tienden a tener las mismas posiciones relativas en las células hijas, y permanecen estables durante la mayor parte del ciclo celular, lo que sugiere que debe existir un mecanismo molecular que establezca y mantenga las posiciones de los cromosomas. Un modelo sugiere que las posiciones de los territorios

cromosómicos están determinadas por su asociación con “elementos nucleares inmóviles”; de hecho, existen registros que sugieren que la matriz nuclear es la estructura responsable del mantenimiento de los territorios cromosómicos (Petrova, *et al.*, 2005). En un estudio se reportó que la organización de los territorios cromosómicos se mantiene a pesar de la extracción de más del 90% de las histonas y otras proteínas nucleares solubles en células humanas en cultivo. Estos resultados sugieren que los componentes de la matriz nuclear no sólo están involucrados en el anclaje de la cromatina en dominios de bucles, sino que también se encuentran limitando la estructura de los territorios cromosómicos (Ma, *et al.*, 1999).

Por otro lado, en un principio se había propuesto que los territorios cromosómicos no se traslapan (Meaburn y Misteli, 2007; Petrova, *et al.*, 2007). Sin embargo, actualmente existe una amplia literatura que documenta un fenómeno llamado “beso cromosómico” (*chromosome kissing*), en el cual muchos loci de diferentes cromosomas entran en contacto cercano. Algunos de estos contactos pueden originarse por simple vecindad o por compartir maquinarias metabólicas, como las fábricas de transcripción y/o replicación (Cavalli, 2007).

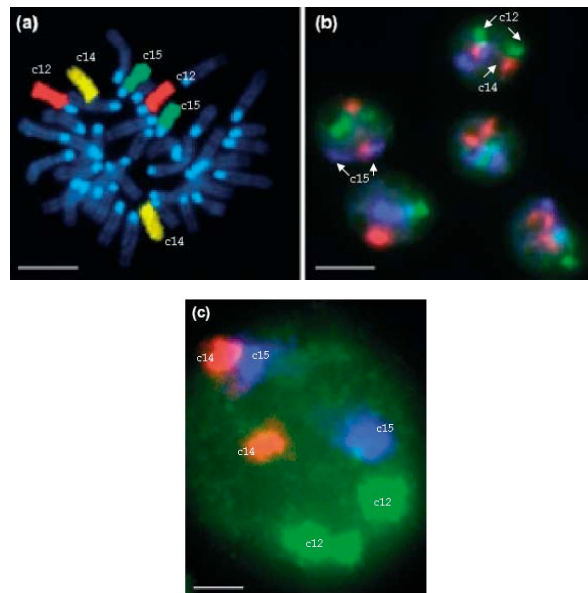


Figura 3. Naturaleza física de los cromosomas. (a) Naturaleza física individual de cada cromosoma evidente en células mitóticas, cuando los cromosomas se condensan. La hibridación fluorescente *in situ* permite la visualización de diferentes cromosomas (c12, cromosoma 12; c14, cromosoma 14; c15, cromosoma 15) en linfocitos de ratón. En (b) y (c) núcleos en interfase, en donde los cromosomas están organizados en territorios cromosómicos en fibroblastos de ratón. En (a) y (c), barra $\sim 2 \mu\text{m}$; en b, $\sim 10 \mu\text{m}$ (Parada y Misteli, 2002).

II. La Matriz Nuclear

De acuerdo al modelo de la matriz nuclear, la función nuclear no depende solamente de la difusión pasiva de moléculas, sino también de una plataforma organizadora que establece dominios estructurales y funcionales en el núcleo (Albrethsen, *et al.*, 2009).

El material genético en el espacio nuclear está compartimentalizado en dominios estructurales y funcionales distintos (Jackson, 2003). Mientras que los dominios funcionales incluyen los focos de replicación, los focos de transcripción, los cuerpos de Cajal, los cuerpos PML (**ProMyelocytic Leukemia**), *speckles* nucleares, etc., los dominios estructurales incluyen heterocromatina, nucleolo, las láminas nucleares y los territorios nucleares (Lanctot, *et al.*, 2007). Los diferentes niveles de empaquetamiento no-aleatorio y el plegamiento del mismo genoma resulta en varios territorios y dominios de cromatina (Cremer, *et al.*, 2004). Todos estos parámetros nucleares en conjunto contribuyen a la arquitectura nuclear de orden superior. El establecimiento y mantenimiento de estos dominios estructurales y funcionales y en consecuencia la interacción entre la arquitectura y función nucleares durante procesos biológicos variados que involucran el desarrollo y la diferenciación, permanecen poco entendidos. Se hipotetiza que es esta interacción se lleva a cabo en la estructura no cromatínica del núcleo llamada matriz nuclear (Berezney y Wei, 1998).

Hace ya más de medio siglo que el núcleo celular se extrajo con soluciones de alta concentración de sal para obtener una subestructura residual (Zbarskii y Debov, 1948), pero no fue sino hasta 1974 que se acuñó el término “matriz nuclear” (MN) para nombrar a esta estructura (Berezney y Coffey, 1974). La MN se define como la entidad bioquímica que se puede aislar después de extracciones secuenciales del núcleo celular con detergentes no iónicos, nucleasas y altas concentraciones de sal (Verheijen, *et al.*, 1988). La presencia de esta estructura se ha verificado en diversos tipos celulares y en tejidos en cultivo.

La observación directa por microscopía electrónica de estructuras fibrogranulares no cromatínicas en el núcleo de células en cultivo, y el descubrimiento de dominios funcionales espacialmente distintos que permanecen en su lugar después de la remoción de proteínas solubles y cromatina (Nickerson, 2001) y que no muestran movimiento browniano sustancial (Hendzel, *et al.*, 1999), son fuertes evidencias de la existencia de la MN. Se ha visualizado la estructura de la MN *in vivo*, es decir, bajo ningún tipo de extracción, utilizando la proteína verde fluorescente (GFP, **Green Fluorescent Protein**)

fusionada a una proteína que se había reportado como nucleolar, la Cdc14B. La señal de fluorescencia se extendía en filamentos de hasta 7 μm de longitud, desplegándose desde el nucleolo hasta la periferia nuclear. La técnica de recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueado (FRAP, **F**luorescence **R**ecovery **A**fter **P**hotobleaching) usada en este mismo sistema, revela que existen dos poblaciones de GFP-Cdc14B en el núcleo celular: una difusa que recupera la fluorescencia rápidamente en el campo fotoblanqueado, y otra asociada a los filamentos nucleares, cuya movilidad está reducida. Estos filamentos llenan el espacio nuclear intrínseco y son consistentes con las características morfológicas tridimensionales de la MN (**Figura 4**; Nalepa y Harper, 2004).

La MN, que resulta de la extracción secuencial de núcleos aislados a partir de hepatocitos de rata con altas concentraciones de sal, detergentes no iónicos y nucleasas, está constituida por un 97.6% de proteínas, 1.2% de RNA, 1.1% de fosfolípidos y <1% de DNA (Berezney y Coffey, 1977). Morfológicamente, la MN representa el núcleo en su forma y organización tridimensional y se constituye por los componentes residuales del nucleolo, los componentes residuales de la envoltura nuclear y una red fibrogranular que se extiende a través del núcleo, frecuentemente llamada matriz interna (**Figura 4**; Nakayasu y Berezney, 1991). En contraste a lo que pueden sugerir las imágenes del microscopio, la MN *in vivo* no es un esqueleto rígido e invariante, sino un andamio con estructura altamente dinámica (Tsutsui, *et al.*, 2005; Albrethsen, *et al.*, 2009). Estudios clásicos del proteoma de la MN, que utilizan la electroforesis en gel de dos dimensiones, típicamente revelan 200-300 puntos correspondientes a proteínas, y casi 400 proteínas se han clasificado como proteínas de la MN de mamíferos por análisis computarizado semi-automático de artículos publicados (Mika y Rost, 2005).

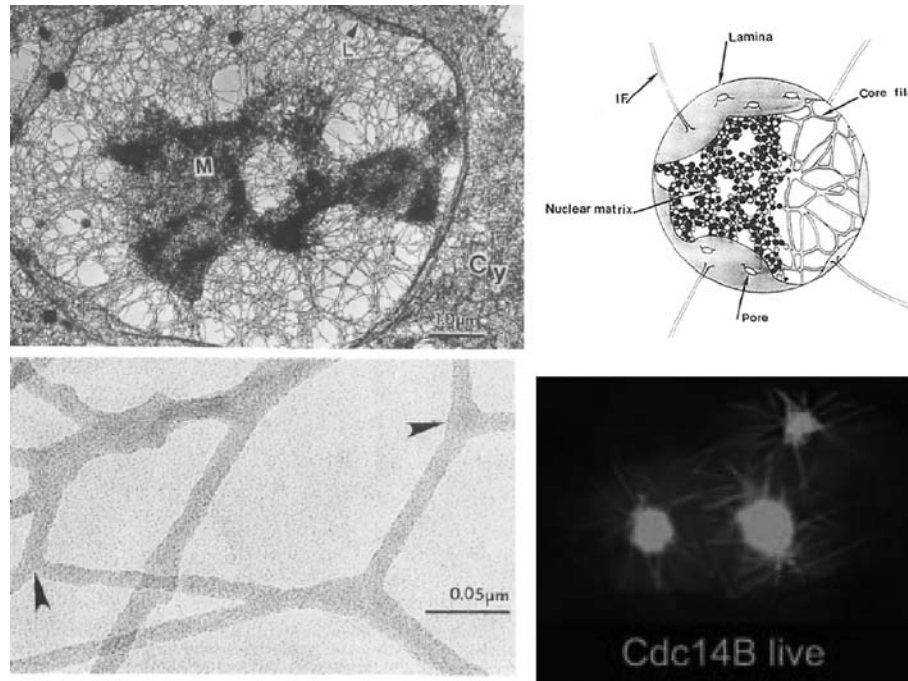


Figura 4. Filamentos centrales de la MN de células HeLa. En las micrografías de la derecha se muestran los filamentos centrales de la MN. En la parte superior derecha se muestra el modelo de la MN propuesto por He, Nickerson y Penman (He, *et al.*, 1990). Las láminas nucleares forman el límite exterior de la MN. La matriz interna está compuesta de fibras gruesas, cuya composición proteica es específica de cada tipo celular. La extracción posterior con altas concentraciones de sal remueve muchas de estas proteínas y pone en evidencia los filamentos centrales, más delgados, compuestos principalmente por ribonucleoproteínas. En la parte inferior derecha se muestran filamentos de la MN *in vivo* (Nalepa y Harper, 2004).

Un estudio reciente refleja un vínculo entre la arquitectura nuclear y una variedad de procesos como la replicación (Anachkova, *et al.*, 2005), transcripción y procesamiento de hnRNA. Un análisis extensivo de la composición del proteoma de la MN ha reflejado la rica variedad de categorías funcionales de proteínas asociadas con la MN (Varma y Mishra, 2011), que incluye proteínas nucleares, proteínas de choque de calor, chaperonas, proteínas de unión al DNA, proteínas del andamio mitótico, proteínas de remodelación de cromatina, proteínas asociadas a la transcripción y traducción y proteínas ribosomales (Kallappagoudar, *et al.*, 2010). De forma interesante, una proporción significativa de proteínas de la MN son específicas de tejido, y se ha demostrado que un conjunto de proteínas de la MN sufren cambios con la diferenciación y la progresión a la malignidad (Albrethsen, *et al.*, 2009). Por ejemplo, un estudio del proteoma de la MN durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster* reveló que existen 147 proteínas comunes a dos estadios de desarrollo, pero 120 proteínas únicas corresponden a un estadio, mientras que 148 son únicas a un estadio diferente. La

interpretación de este fenómeno es que existen constituyentes proteicos mínimos o centrales de la MN, pero que existe una fracción significativa que no es estática y cambia en el contexto del estadio de desarrollo (Varma y Mishra, 2011).

Por su capacidad de ensamblaje en filamentos y estructuras de brazos múltiples, tanto *in vivo* como *in vitro*, así como su abundancia (10^6 copias por núcleo) y ubicuidad en el núcleo celular, NuMa (**Nuclear Matrix Apparatus**) es tal vez el candidato más atractivo a componente estructural del andamio nuclear (Radulescu y Cleveland, 2010). Otros componentes estructurales propuestos incluyen la lámina nuclear (Albrethsen, *et al.*, 2009) y proteínas que interactúan con las láminas asociadas a la membrana (Radulescu y Cleveland, 2010). Sin embargo, estudios biomecánicos del núcleo revelan propiedades mecánicas complejas, incluyendo compresibilidad y elasticidad, que no podrían ser explicadas solamente por las propiedades de proteínas filamentosas como las láminas. Como un concepto análogo al citoesqueleto, se propone el término “nucleoesqueleto”, que se refiere a todas las estructuras basadas en proteínas en el núcleo en interfase, muchas de las cuales también funcionan en mitosis como la matriz del huso mitótico. El nucleoesqueleto confiere formas específicas, propiedades mecánicas y funcionalidad al núcleo y al genoma a través de mecanismos que permanecen desconocidos (Simon y Wilson, 2011).

III. Regiones de anclaje a la Matriz Nuclear

La formación de cada bucle depende de un segmento de DNA que debe asociarse con la MN (Heng, *et al.*, 2004); estas regiones se conocen como regiones de anclaje a la matriz (MARs, **Matrix Attachment Regions**), regiones de anclaje al andamio (SARs, **Scaffold Attachment Regions**) o MARs/SARs.

Las regiones de anclaje a la MN puede definirse operacionalmente por dos criterios:

1. **Fragmentos de DNA endógeno que co-purifican con la MN**, es decir, permanecen asociados a la MN después de la remoción de las histonas y otras proteínas nucleares solubles con una solución con 2 M de NaCl y un tratamiento con nucleasas; posterior a este tratamiento el porcentaje de DNA asociado con la MN es de 0.1%, (Jackson, *et al.*, 1984). La fracción de DNA que no puede ser solubilizada de las matrices nucleares por tratamiento con nucleasas consta de fragmentos relativamente cortos de DNA (50-200 pb) que representan las bases de los bucles, inmersas en la MN y, por lo tanto, protegidas de la acción de las nucleasas (Razin, *et al.*, 1995). Recientemente, y

tomando en cuenta la disponibilidad de los genomas completos de diferentes organismos modelo, se han hecho modificaciones a éste método para determinar la configuración de los bucles: a núcleos extraídos con altas concentraciones de sal y detergentes se les somete a digestión con enzimas de restricción y los fragmentos de DNA cortados son separados por centrifugación. Los fragmentos cortados se recuperan en el sobrenadante y el DNA de la MN se recupera después de digerir a la MN con proteinasa K; tanto el DNA del sobrenadante (*Loop-DNA*) como el de la MN (*NM-DNA*) se utilizan como templado para PCR cuantitativa con *primers* que abarcan el locus a estudiar, y se estima en qué fracción se encuentra enriquecida la señal de los diferentes amplicones. Se determinó, por ejemplo, la organización en bucles de una región de 300 kb que comprende al locus de MHC clase I (Kumar, *et al.*, 2007), una región de 160 kb que contiene a *c-myc* (Gombert, *et al.*, 2003), ambos en células humanas en cultivo; una región de 30 kb que contiene al gen de la triptófano oxigenasa (TO; Kaneoka, *et al.*, 2009) en hepatocitos de rata; y en células en cultivo de *Arabidopsis thaliana* se usó esta técnica para determinar la configuración en bucles de tres regiones, de 35, 25 y 19 kb cada una (Tachiki, *et al.*, 2009).

2. **Fragmentos de DNA exógeno agregado que se unen a la MN purificada en presencia de DNA competidor** (Michalowski, *et al.*, 1999). El ensayo *in vitro* de unión de secuencias con una MN huésped, consiste en incubar, en una MN huésped o con proteínas del andamio, una mezcla de fragmentos de restricción de DNA de un gen clonado; los fragmentos asociados con la MN se separan, por centrifugación, de aquellos que no se asocian (Cockerill y Garrard, 1986a). Garrard y colaboradores (Cockerill y Garrard, 1986b; Cockerill y Garrard, 1986a) encontraron que una subpoblación de secuencias clonadas podían ser retenidas en sitios de afinidad de MNs aisladas. Las secuencias de DNA retenidas de forma selectiva, es decir, en presencia de un competidor no específico, fueron llamadas regiones de anclaje a la matriz (**MARs, Matrix Attachment Regions**). Sin embargo, no existe una distinción clara entre MAR-DNA y no MAR-DNA determinados por unión *in vitro* (Michalowski, *et al.*, 1999).

Existen otros métodos para el estudio de las regiones de anclaje a la MN. El ensayo de escisión de bucles por topoisomerasa II endógena, diseñado por Razin y colaboradores (Razin, *et al.*, 1993; Gromova, *et al.*, 1995b; Iarovaia, *et al.*, 1995; Razin, *et al.*, 1995), consiste en la caracterización de los bucles individuales después de su escisión de los sitios de anclaje con la MN. Después de permeabilizar las células con un detergente no iónico, los núcleos se extienden con 2 M de NaCl para obtener nucleoides con

los bucles de DNA extendidos anclados a la MN, la cual tiene como componente estructural a la DNA topoisomerasa II (Berrios, *et al.*, 1985; Earnshaw, *et al.*, 1985). Los nucleoides se incuban en condiciones que favorecen el corte del DNA por topoisomerasa II y con un inhibidor (VM-26, VP16 o m-AMSA; Gromova, *et al.*, 1995b) que bloquea el paso de re-ligación catalizado por la enzima. Al término de la incubación, los bucles escindidos y sus oligómeros pueden ser separados por electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) y sometidos a análisis por *western blot*. Este protocolo se ha usado para la caracterización de los bucles estructurales del locus del gen *c-myc* en humanos (Gromova, *et al.*, 1995a), el locus 14B-15B del cromosoma X de *Drosophila melanogaster* (larovaia, *et al.*, 1996), la región que contienen a los genes de lamina B2 y ppv1 (Lagarkova, *et al.*, 1998) y el gen de la distrofina (larovaia, *et al.*, 2004; larovaia, *et al.*, 2006), ambos en células humanas. En todos los casos la distribución de los cortes por topoisomerasa II insoluble es específica y tiene características comunes: los cortes ocurren en regiones definidas, aunque relativamente largas (~5 kb; Gromova, *et al.*, 1995a), a las cuales se les llamó “áreas de corte”. Es probable que interacciones múltiples y relativamente débiles del DNA con la MN, distribuidas a lo largo de las áreas de corte, constituyan juntas un sitio de anclaje resistente a la extracción con alta concentración de sal, o más precisamente, un “área de anclaje a la matriz” (Razin, *et al.*, 1995).

Por otro lado, el desarrollo reciente de la hibridación fluorescente *in situ* abre la posibilidad de estudiar la distribución de secuencias únicas en los bucles de DNA por la hibridación directa de sondas fluorescentes en halos de DNA nuclear (Gerdes, *et al.*, 1994; Bickmore y Oghene, 1996). Aunque la resolución de este método es limitada, tiene una ventaja obvia sobre el aislamiento y caracterización del DNA de la MN: excluye la posibilidad de una re-distribución artificial de secuencias asociadas con la MN en el paso de tratamiento con nucleasas y la subsiguiente separación de DNA asociado con la MN y el DNA cortado (Razin, 1997). Esta estrategia se ha utilizado para corroborar los resultados obtenidos en el mapeo de los bucles por el método de escisión por topoisomerasa II, específicamente, del gen de la distrofina humana; los halos, obtenidos a partir de la extracción de los núcleos con altas concentraciones de sal, se hibridaron con sondas correspondientes a los anclajes y al DNA de los bucles (**Figura 5**). Las secuencias que corresponden a los anclajes se visualizaron en el *core* del halo, mientras que las correspondientes al DNA del bucle se localizaron en el halo. Estos resultados confirman la validez del método de escisión de los bucles por topoisomerasa II (larovaia, *et al.*, 2004; larovaia, *et al.*, 2005).

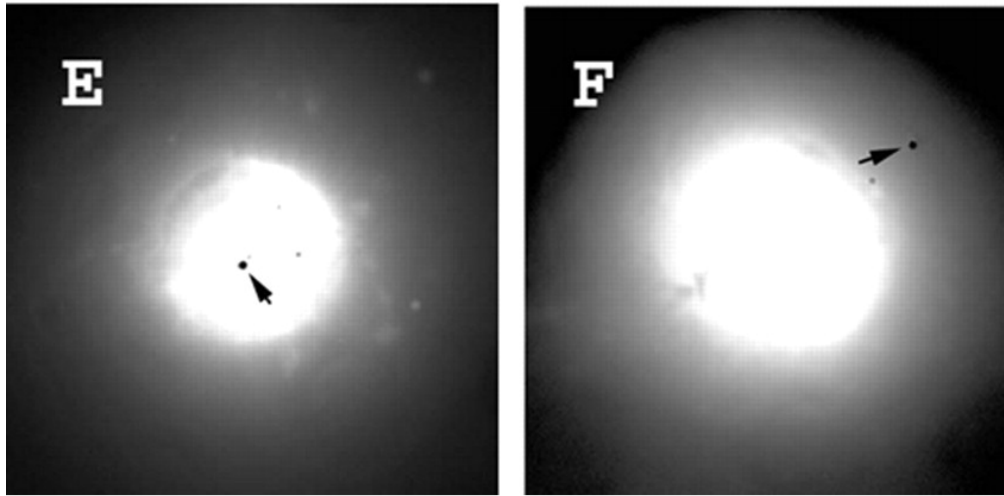


Figura 5. Hibridación fluorescente *in situ* de secuencias correspondientes a anclajes con la MN (E) y secuencias ubicadas en los bucles (F) del gen de la distrofina humana, en halos obtenidos a partir de la extracción de núcleos con altas concentraciones de sal (tomado de Iarovaia et al., 2005).

En años recientes, la técnica de captura de la conformación cromosómica (3C) se ha utilizado en diversos estudios para determinar la proximidad de los límites de los bucles en el espacio nuclear (Cai, *et al.*, 2006; Kumar, *et al.*, 2007; Gavrilov y Razin, 2008b; Eivazova, *et al.*, 2009). Esta técnica detecta interacciones DNA-DNA introduciendo *crosslinks* con paraformaldehído; los extremos de los bucles que se encuentran en vecindad son sometidos a digestión con enzimas de restricción, y se ligan diluyendo la reacción, para favorecer la ligación intra-molecular. Las moléculas ligadas, es decir, circularizadas, se utilizan como templado para la PCR con *primers* posicionados en direcciones opuestas en cualquier extremo de los fragmentos de restricción, y los productos son analizados de manera cuantitativa (**Figura 6**). Con esta técnica se analizó la configuración del dominio de la α -globina en células embrionarias eritroides y linfoides de pollo; esta configuración en células linfoides que no expresan α -globina, es relativamente extendida, mientras que en células eritroides existe una interacción simultánea de varios elementos del dominio, incluyendo elementos regulatorios a varias kb de distancia. Se concluye que esta interacción es necesaria para darle al gen un estatus de activación transcripcional (Gavrilov y Razin, 2008a). En otro estudio, utilizando esta misma técnica, se determinó la configuración en bucles del dominio del gen de interferón γ (*Ifn γ*) en cultivos primarios de linfocitos de ratón; este dominio está configurado en un sólo bucle, y sus extremos se encuentran interactuando de manera

cercana en el espacio nuclear (Eivazova, *et al.*, 2009). Del mismo modo, estudiando el locus del MHC clase I en células Jurkat de origen humano, se determinó que el locus está configurado en seis bucles, cuya configuración cambia al sobre-expresarse proteínas de la MN, como SATB1 (Kumar, *et al.*, 2007). Sin embargo, los autores de este método plantean que para interpretar correctamente los resultados, es necesario tener en consideración que la técnica de la 3C permite la estimación cuantitativa de la probabilidad de interacción entre dos fragmentos del locus en estudio, pero que podría haber configuraciones alternas de vida corta en una misma célula, o diversas configuraciones en las diferentes células presentes en la población, lo que introduce ruido en los resultados (Gavrilov y Razin, 2008a).

Combinando esta técnica con el ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), se han detectado interacciones con SATB1 (Cai, *et al.*, 2006; Kumar, *et al.*, 2007), PML (Kumar, *et al.*, 2007) y topoisomerasa II (Eivazova, *et al.*, 2009), por lo que se concluye que estas proteínas tienen un papel importante en la interacción del DNA con la MN y por lo tanto en la organización de los bucles de DNA.

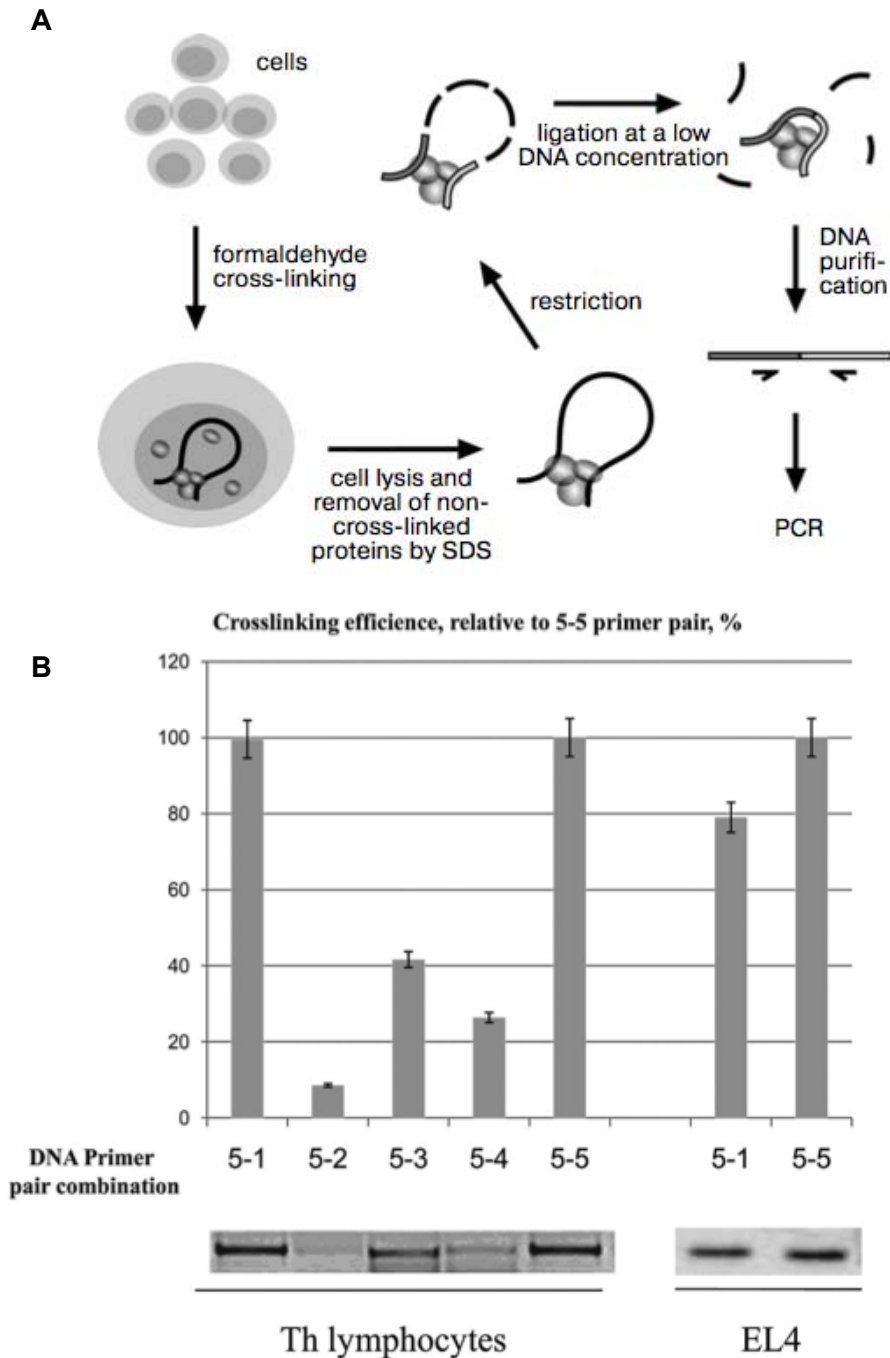


Figura 6. Captura de la conformación cromosómica (3C). A, pasos principales del procedimiento: en células intactas se introducen *crosslinks* con paraformaldehído, que “fijan” interacciones entre moléculas de DNA o entre moléculas de DNA y proteínas. El DNA se somete a digestión con enzimas de restricción, y se liga a bajas concentraciones para favorecer las interacciones intramoleculares. Las proteínas de los complejos se digieren y el DNA se utiliza como templado para la amplificación, utilizando *primers* ubicados en los diferentes sitios de restricción (Gavrilov y Razin, 2008a). B, en el locus de *Irfn γ* , la eficiencia del *crosslink* es mayor entre pares de *primers* ubicados en dos fragmentos de restricción distantes (columna 5-1), lo que indica una interacción entre dos regiones ubicadas a ~18 kb (Eivazova, *et al.*, 2009).

La propuesta de que el DNA está organizado en bucles, por su anclaje periódico a la MN, y que estos dominios tienen un significado funcional, ha generado interés en la naturaleza de las secuencias de DNA que se encuentran en las bases de los bucles. Las MARs, en cualquiera de sus definiciones funcionales, tienen alguna de estas características:

1. Alto contenido de A-T (generalmente el 70%; Boulikas, 1995).
2. DNA intrínsecamente curvo
3. Una secuencia corta que tiene el potencial de desaparecer bajo condiciones de tensión superhelicoidal. Algunas actividades en las cuales las MARs/SARs han sido involucradas, como la replicación y la transcripción, pueden estar directamente relacionadas con su susceptibilidad de transformarse en molécula de cadena sencilla bajo tensión superhelicoidal negativa (Cockerill, *et al.*, 1987; Bode, *et al.*, 1992; Bode, *et al.*, 2006).

A pesar de los esfuerzos de varios grupos de investigación, no se ha encontrado una sola secuencia consenso, patrón o motivo, que se asocie con la actividad MAR; de este modo, las propiedades de unión deben estar determinadas por otros factores, probablemente estructurales, por ejemplo la tendencia a desenrollarse y la tendencia a formar DNA doblado y cruciformes (Benham, *et al.*, 1997).

La pregunta clave, y que no ha sido contestada de manera satisfactoria, es si al menos algunos elementos MAR/SAR participan en la organización en bucles del DNA (Razin, 1997). Existen observaciones experimentales paradójicas a este respecto: la organización en bucles del DNA nuclear parece no estar afectada por la extracción con altas concentraciones de sal, pero algunos complejos de MARs/SARs con MNs aisladas no persisten después de un tratamiento con 0.5 M de NaCl (Vassetzky, *et al.*, 1989); examinando el cromosoma X de *Drosophila melanogaster* se llegó a la conclusión de que una porción de MARs/SARs participan en la organización de los anclajes de los bucles de DNA, pero existe un exceso de MARs/SARs que están localizadas en el DNA del bucle (Razin, 1997). Por otro lado insertando experimentalmente MARs/SARs en *tandem* para crear nuevos bucles, se ha demostrado que no todos los MARs/SARs funcionan como anclajes, aun cuando todos estos MARs/SARs son idénticos a nivel de secuencia y poseen las mismas propiedades bioquímicas y biofísicas, así como actividad de unión idéntica *in vitro* a una MN huésped (Heng, *et al.*, 2004). Es razonable concluir que la presencia de una MAR/SAR no es suficiente para producir un anclaje resistente a las altas concentraciones de sal; es probable que las MARs sólo constituyan una parte de los

anclajes resistentes a la extracción con altas concentraciones de sal normalmente estabilizadas por otras interacciones (Razin, *et al.*, 1995). Una posibilidad es que las SARs presentes en los bucles sean sitios de anclaje potencial (Razin, 1997). Se propone que, junto con asociaciones del DNA con la MN que son transitorias y dependientes de función, existen asociaciones con la MN que son estructurales o permanentes, y estas asociaciones delimitan los bucles superenrollados de DNA en los nucleoides. Si esta suposición es correcta, las asociaciones del DNA relacionadas con la transcripción, y otras asociaciones transitorias, pueden ser las responsables del anclaje de la mayoría de los fragmentos de DNA asociados con la MN (Razin, 1997; Iarovaia, *et al.*, 2005; Cook, 2010). Por lo tanto, es posible definir operacionalmente los anclajes estructurales (LARs, **Loop Attachment Regions**) como aquellos que permanecen después de la extracción de los núcleos con altas concentraciones de sal (Razin, 2001), mientras que se ha demostrado que los anclajes dependientes de transcripción no resisten a la extracción con altas concentraciones de sal (**Figura 7**; Razin, *et al.*, 1985).

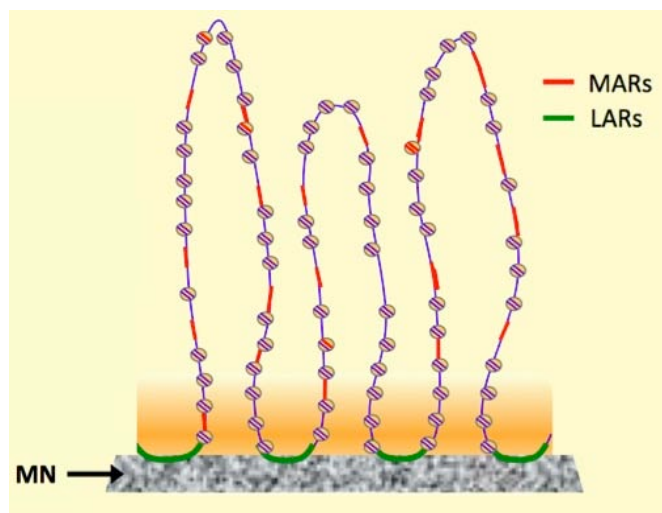


Figura 7. Secuencias de anclaje a la MN. Las secuencias MARs están distribuidas a lo largo de los bucles de DNA. Los puntos de anclaje constitutivo (LARs) establecen bucles estructurales (tomado de Rivera-Mulía, 2010)

Parece probable que una combinación compleja (y aún por caracterizar) de MARs/SARs y otros elementos genómicos, incluyendo secuencias ricas en G-C, DNA doblado, y sitios de reconocimiento por proteínas que se unen al DNA, entre otros, sea necesaria dentro de las LARs para mantener la organización topológica apropiada del DNA. Esta organización compleja puede ilustrarse tomando como ejemplo una región de anclaje del bucle localizada aproximadamente a 3 kb río arriba del primer gen del *cluster* de α -globina en pollo. La región, que se extiende desde 2.5 a 6 kb río arriba del *cluster*,

contiene un origen de replicación (Razin, *et al.*, 1986; Razin, 1997), un sitio de anclaje permanente mapeado por el método de escisión por topoisomerasa II (Razin, *et al.*, 1991b) y por aislamiento del DNA asociado a la MN en núcleos de eritrocitos maduros (Farache, *et al.*, 1990); en esta misma región se pueden encontrar dos elementos MAR (Razin, *et al.*, 1991a), dos zonas de DNA curvo (Krajewski y Razin, 1992), una región rica en G-C con repetidas imperfectas (Kalandadze, *et al.*, 1990), y un número de sitios de reconocimiento para diferentes proteínas nucleares, así como para corte *in vitro* por DNA topoisomerasa II (Razin, *et al.*, 1991b). Esta organización compleja, aunada al tamaño considerable de las LARs pueden explicar el hecho de que no se haya podido identificar una secuencia consenso por el simple análisis de el DNA asociado con la MN aislado después de la digestión con nucleasas (Razin, 1997).

IV. Los bucles estructurales como unidades funcionales del genoma

a) El papel de la MN en la replicación y la transcripción

Los modelos de replicación y transcripción descritos en algunos libros muestran un complejo, que incluye a las polimerasas, que se une a un origen o promotor en el DNA y se mueve a lo largo de éste utilizándolo como templado para formar la nueva cadena. Esta idea no surge de evidencia experimental directa, sino de la noción del tamaño relativo: el objeto más pequeño -la polimerasa- es el que debe moverse. Sin embargo, ahora se sabe que las máquinas de polimerización pueden ser enormes, ya que involucran a un número de enzimas que reconocen secuencias específicas o motivos estructurales en el DNA, desenrollan la doble hélice, protegen el DNA de cadena sencilla y reclutan enzimas que se requieren para la síntesis de DNA o RNA, y estos componentes deben estar ensamblados de manera ordenada antes de que se incorpore el primer nucleótido (Mendez y Stillman, 2003), de modo que la maquinaria de polimerización supera en tamaño al templado. Además, en estos modelos surgen dos problemas topológicos. El primero es la generación de estrés torsional (**Figura 8, A**). Este ha sido ampliamente discutido, y se plantea que es resuelto por la acción de las topoisomerasas. El segundo problema surge cuando la polimerasa “viaja” a lo largo del templado helicoidal. El transcrito se “enrolla” sobre el templado, una vez cada 10 pb transcritas. En una unidad eucariótica de transcripción de 10^6 pb, el transcrito se enrollaría unas 10^5 veces (**Figura 8, B**). El mecanismo que desenrolla el transcrito debe funcionar a la perfección, ya que una sola vuelta del transcrito sobre el templado podría impedir su salida hacia el citoplasma. Recientemente han surgido modelos de transcripción y replicación que contrastan con los

antiguos modelos. En estos nuevos modelos se plantea que las polimerasas se encuentran ancladas a una subestructura nuclear, resolviendo los problemas topológicos descritos (Cook, 1999; **Figura 9**).

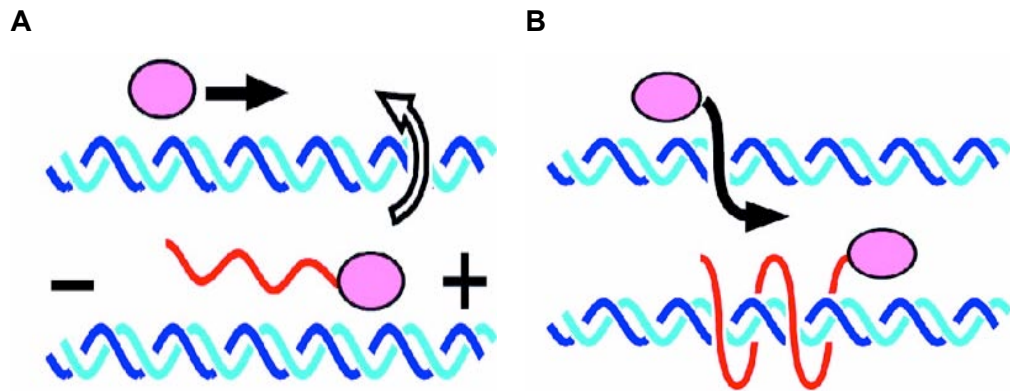


Figura 8. Representación esquemática de los problemas topológicos que se originan cuando la RNA polimerasa se mueve a lo largo del DNA. A. Si la polimerasa se mueve y el DNA gira, se produce un superenrollamiento positivo en uno de los extremos de la hebra de DNA; B. Si la polimerasa se mueve y el DNA permanece fijo, el transcrito se enrolla en el templado (Cook, 1999).

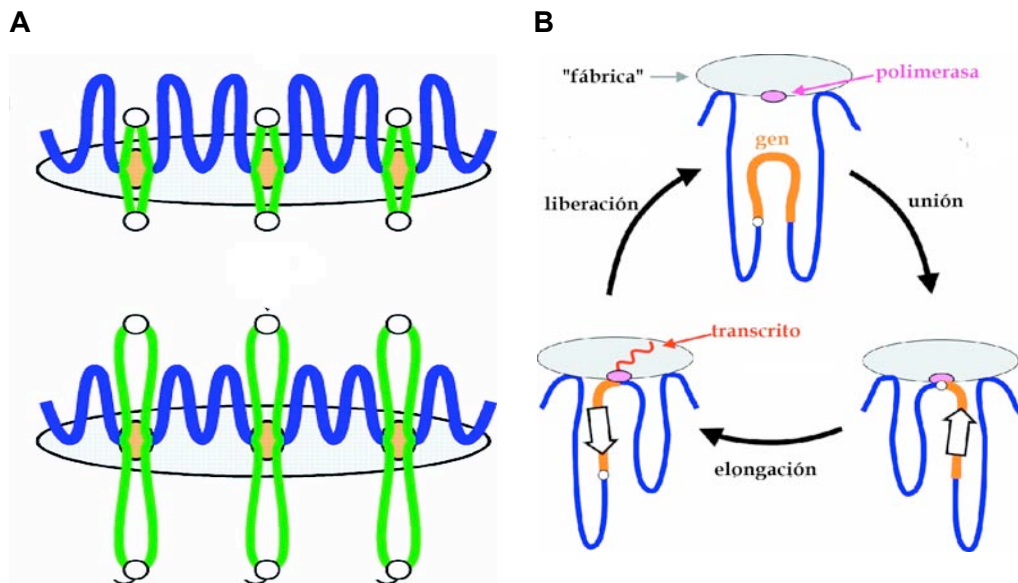


Figura 9. Representación esquemática de los modelos de replicación y transcripción en sitios fijos. A. El DNA templado (azul) se acerca a la "fábrica" de replicación que contiene a las polimerasas (círculos amarillos); el DNA recién sintetizado (verde) sale de estas fábricas; B. Los genes que se transcriben se acercan a las fábricas de transcripción, que se encuentran fijas y asociadas a una subestructura. El transcrito naciente se expulsa de la fábrica de transcripción, evitando los problemas topológicos representados en la **Figura 8** (Cook, 1999).

Existen evidencias de que tanto la replicación como la transcripción se llevan a cabo en complejos inmovilizados en la MN (Cook, 1999). En células humanas las fábricas de transcripción son focos discretos, cada uno con un diámetro de 71 nm, que concentran a los transcritos nacientes (Cook, *et al.*, 1982; Jackson y Cook, 1985a; Jackson y Cook, 1985b) y a enzimas de transcripción, tales como las RNA polimerasas. Estas fábricas, que no tienen la libertad de viajar a través de la eucromatina (Iborra, *et al.*, 1996) sorprendentemente, retienen su actividad después de la remoción de la cromatina en condiciones suaves (Razin, *et al.*, 2011).

Por otro lado, con el empleo de diversas estrategias experimentales, se ha demostrado que las DNA polimerasas activas y el DNA recién sintetizado se asocian a la subestructura nuclear y resisten a la elución y corte por nucleasas (**Figura 10**, B; McCready, *et al.*, 1980; Jackson y Cook, 1986b; Jackson y Cook, 1986a; Nakayasu y Berezney, 1989; Hassan y Cook, 1993; Hozak, *et al.*, 1993). Asimismo, el DNA recién sintetizado está concentrado en sitios granulares discretos, implicando que las polimerasas no se encuentran libres en toda la hebra de DNA (Ma, *et al.*, 1998). Utilizando la regeneración hepática post-hepatectomía en ratas, se aislaron matrices nucleares que tienen asociada una enzima replicativa, la DNA polimerasa α (Smith, *et al.*, 1984), y esta asociación es dependiente del ciclo celular, ya que dicha enzima es resistente a la extracción con altas concentraciones de sal durante la fase S y soluble durante el resto de las fases del ciclo celular. La síntesis de fragmentos de Okazaki se realiza por una primasa que se asocia con la DNA polimerasa α y con la MN (Smith y Berezney, 1983; Tubo y Berezney, 1987b; Tubo y Berezney, 1987a). Otras proteínas involucradas en la síntesis del DNA se clasifican como asociadas a la MN, como es el caso de PCNA y RPA (Anachkova, *et al.*, 2005). Las fábricas de replicación concentran a todos estos factores, y se visualizan con microscopia de fluorescencia como cuerpos ovoides que contienen ~20 horquillas de replicación (**Figura 10**, A). Estas fábricas permanecen asociadas con la MN después de la remoción del 90% de la cromatina (Hozak, *et al.*, 1994).

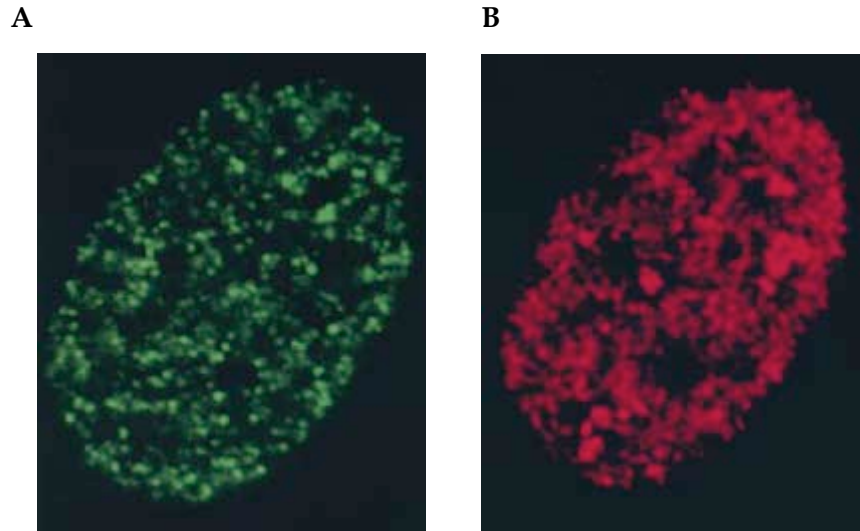


Figura 10. A. Sitios de replicación; B. Sitios de transcripción que fueron marcados simultáneamente en células 3T3. Los sitios de transcripción y replicación se mantienen después de la extracción de la MN (Wei, *et al.*, 1999)

b) Unidades funcionales representadas por los bucles estructurales

Se ha propuesto que los bucles de DNA pueden constituir dominios funcionales independientes del genoma, como las unidades individuales de transcripción o de replicación (Razin, 2001).

La hipótesis de que los bucles de DNA están constituyendo las unidades de transcripción se vio fomentada por experimentos en los que se determinó que los genes transcripcionalmente activos se encuentran en la fracción de DNA estrechamente asociada con la MN, mientras que los inactivos se aíslan a partir de fracciones que pueden separarse fácilmente de la MN (Cook, *et al.*, 1982; Robinson, *et al.*, 1982; Ciejek, *et al.*, 1983; Robinson, *et al.*, 1983; Jost y Seldran, 1984; Small, *et al.*, 1985; Small y Vogelstein, 1985). En un cierto número de estudios se indujo la expresión de genes específicos de los diferentes tipos celulares maduros por medio de tratamiento con hormonas; posterior a esta inducción, y en correlación con el aumento de los mRNAs (Robinson, *et al.*, 1982; Ciejek, *et al.*, 1983; Robinson, *et al.*, 1983; Jost y Seldran, 1984; Small, *et al.*, 1985; Small y Vogelstein, 1985) o proteínas (Montazer-Torbati, *et al.*, 2008) respectivos, los genes se encontraban asociados con la MN. Estudiando la expresión de genes específicos de las glándulas mamarias de conejo, se llegó a la conclusión de que el primer nivel de regulación de estos genes puede estar determinado por su anclaje a la MN (Montazer-Torbati, *et al.*, 2008).

Sin embargo, existen varias líneas de evidencia de que la transcripción no es la causa de la retención de los genes activos en la MN:

1. La inhibición de la transcripción con diferentes compuestos, como la actinomicina D o la α -amanitina (Small, *et al.*, 1985) no causa el desprendimiento de los genes activos de la MN; de igual modo, la afidicolina no causa la desorganización de los bucles que se observan en los halos de DNA (Iarovaia, *et al.*, 2005).

2. El arresto de la transcripción de la mayoría de los genes normalmente activos bajo condiciones de choque de calor, con la consecuente disociación de los complejos transcripcionales de la MN, tampoco causa el desprendimiento de los genes de la MN (Small, *et al.*, 1985).

3. En el curso de la diferenciación celular inducida por hormonas, la asociación de los genes específicos a la MN de cada tipo celular ocurre antes del inicio de la transcripción (Jost y Seldran, 1984).

4. Reportes recientes muestran que en hepatocitos quiescentes pero con potencial de proliferación la mayoría de los genes están localizados en una estrecha región topológica, cercana a la MN, independientemente de su actividad transcripcional (Maya-Mendoza, *et al.*, 2003; Maya-Mendoza, *et al.*, 2004). Por otro lado, la organización en bucles estructurales del gen *Fyn*, de ~193 kb, es notablemente diferente en dos tipos celulares de rata (hepatocitos y linfocitos), sin que esta organización impida que el gen se exprese de manera similar en ambos tipos celulares (Trevilla-Garcia y Aranda-Anzaldo, 2012).

5. El fenómeno de asociación de los genes activos con la MN también ha sido observado usando condiciones isotónicas de extracción (Jackson, *et al.*, 1998). Debe mencionarse que una pre-incubación de los núcleos con una solución de muy baja fuerza iónica anula la posibilidad de observar la asociación de los genes activos con MNs aisladas con una posterior solución de alta concentración de sal (Razin, *et al.*, 1985).

6. En múltiples experimentos, Razin y colaboradores no han observado una correlación clara entre la distribución de las áreas de anclaje a la MN y la distribución de las unidades de transcripción; en algunos casos, éstas áreas se traslapan parcialmente las unidades de transcripción. Por ejemplo, los dos primeros exones del gen *c-myc* humano se localizan dentro del área de anclaje a la MN (Gromova, *et al.*, 1995a). Algunos genes largos, como el de la distrofina humana, se organizan en más de un bucle (Iarovaia, *et al.*, 2004) y por lo tanto, muchos LARs caen dentro de una unidad de transcripción

Todos estos resultados apoyan la conclusión de que la transcripción *per se* no es esencial para la asociación de los genes activos con la matriz nuclear. Es probable que esta asociación sea una condición para la activación transcripcional, más que una consecuencia de la transcripción (Razin, *et al.*, 1995). Con base en resultados más recientes se podría sugerir que la asociación de los genes activos con la MN refleja su “encauzamiento” hacia los focos de transcripción (Jackson, *et al.*, 1993; Mitchell y Fraser, 2008).

Por otra parte, existen numerosas observaciones experimentales que son consistentes con la hipótesis de que los bucles anclados a la MN representan las unidades fundamentales de la replicación eucariótica (Razin, 1997; Razin, 2001).

La replicación del DNA es el proceso por el cual las células hacen una copia completa de su información genética antes de la división celular (Gilbert, 2001). Este proceso no se inicia en los extremos del cromosoma, sino en sitios internos múltiples a lo largo del cromosoma conocidos como orígenes de replicación (Dimitrova y Berezney, 2002), que definen los límites de las unidades funcionales de la replicación: los replicones. La hipótesis de que los bucles anclados a la MN representan las unidades fundamentales de la replicación eucariótica se apoya en diversas observaciones experimentales, como la correlación entre el tamaño promedio de los bucles y el tamaño promedio de los replicones en células de diferentes especies (Buongiorno-Nardelli, *et al.*, 1982), la conservación de la organización en bucles en células transcripcionalmente inactivas, como el espermatozoide maduro (Ward, *et al.*, 1989) y el hecho de que muchos orígenes de replicación colocalizan con secuencias MAR, incluyendo el origen de replicación de la α -globina de pollo (Razin, *et al.*, 1986), el origen de replicación localizado hacia arriba del gen *c-myc* en células humanas en cultivo (Gromova, *et al.*, 1995a), el origen de replicación ori- β del gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la secuencia replicadora del gen de la β -globina en células CHO y células HeLa (Djeliova, *et al.*, 2001). La información disponible sobre orígenes de replicación apunta a que éstos se encuentran dentro de las áreas de anclaje a la MN en el gen de la distrofina humana (Razin, *et al.*, 1993; Gromova, *et al.*, 1995b), de acuerdo con observaciones previas que indicaban una asociación permanente de los orígenes de replicación con la MN.

Por otro lado, en experimentos que involucraban el aislamiento de la MN, se encontró que el DNA de la MN estaba enriquecido de manera significativa con secuencias en replicación (Berezney y Coffey, 1975). Después de un periodo corto de incubación de las células en presencia de precursores de DNA marcados con radiactividad, se observó

que el DNA radiactivo se concentraba en la fracción asociada con la MN. Incrementando el tiempo del pulso, o con la posterior incubación de precursores “fríos”, el DNA marcado pudo ser separado de la MN, por extracciones combinadas de alta y baja concentración de sal (Berezney y Coffey, 1975; Berezney y Buchholtz, 1981). En otros experimentos se visualizó, por autoradiografía, el DNA recién sintetizado en los bucles de DNA (McCready, *et al.*, 1980; Vogelstein, *et al.*, 1980). Después de un pulso corto, casi toda la marca radiactiva se encuentra dentro de los confines de la MN; con un incremento en el tiempo de marcaje, fue posible observar la migración del DNA marcado hacia el halo correspondiente a los bucles relajados. Con esta estrategia se calculó la velocidad aproximada del movimiento del DNA marcado desde la MN hasta las partes distales de los bucles de DNA, velocidad que debía, en teoría, de aproximarse a la velocidad de la progresión de las horquillas de replicación a lo largo del templado de DNA. El valor obtenido, 1 $\mu\text{m}/\text{min}$, concuerda con otras estimaciones de velocidad de movimiento de las horquillas de replicación.

En eucariontes inferiores el inicio de la replicación tiene lugar en secuencias específicas ubicadas a lo largo del genoma. En eucariontes superiores el inicio de la síntesis de DNA parece estar determinado con baja precisión, de modo que sitios de iniciación preferidos parecen estar rodeados por sitios de iniciación secundarios (DePamphilis, 1996). Bajo ciertas condiciones, la replicación del DNA puede iniciar virtualmente en cualquier secuencia de DNA. Por ejemplo, la replicación de los cromosomas de células en división de *Xenopus* y *Drosophila* comienza aparentemente en sitios aleatorios. Dada esta evidencia, se ha propuesto que criterios estructurales influyen en la eficiencia de activación en células individuales (Jackson y Pombo, 1998), y una hipótesis establece que la organización topológica del DNA en forma de bucles anclados a la MN es el factor que establece las unidades de replicación de los metazoarios. Un modelo propone que cada bucle estructural contiene un origen de replicación en la parte apical del bucle. Durante la replicación, el origen se asocia con la MN y la duplicación del bucle comienza a partir de este punto de manera bidireccional; mientras es replicado, las cadenas recién sintetizadas son expulsadas de la fábrica de replicación (Anachkova, *et al.*, 2005; Ottaviani, *et al.*, 2008). Otro modelo para el replicón metazoario propone que la proteína iniciadora, representada por el complejo de reconocimiento del origen (ORC, **O**ri**R**igin **R**ecognition **C**omplex), se une de manera inespecífica al DNA, y preferencialmente 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, por lo que cada replicón abarca de la punta de un bucle a la punta del siguiente (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2008). En este modelo no es necesaria una secuencia replicadora que determina el sitio de inicio de la replicación y las diferencias en el tiempo de replicación de las diferentes secuencias depende del grado de condensación de la cromatina: agrupamientos de bucles relajados (eucromatina) constituyen un foco de replicación temprana, mientras que los agrupamientos de heterocromatina forman focos de replicación tardía, lo que es consistente con el patrón de las etapas de la fase S observadas en células en cultivo (Wei, *et al.*, 1998). Es interesante la observación de que, al igual que las áreas de anclaje a la MN, los orígenes de replicación de los eucariotes superiores también son regiones relativamente largas, en las cuales el inicio de la replicación ocurre con una probabilidad preferencial (Hamlin, 1992). Consistente con este modelo, se ha determinado en hepatocitos de rata sincronizados en fase S *in vivo* que muchas secuencias génicas ubicadas en diferentes cromosomas se acercan a la MN, y regresan a sus posiciones cuando se ha concluido la replicación (Maya-Mendoza, *et al.*, 2003). Estos movimientos también se observaron, por medio de un método topológico desarrollado en nuestro laboratorio (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010) en una región genómica de 162 kb rica en genes (el *cluster* de la familia albúmina): durante replicación *in vivo* las secuencias se acercaron a la MN de forma secuencial, es decir, manteniendo las relaciones topológicas con respecto a la MN y con respecto a su ubicación a lo largo de los bucles estructurales. Luego las secuencias regresaron a sus posiciones originales una vez terminado el proceso de replicación (Rivera-Mulia, *et al.*, 2011), reconstituyendo la organización original en bucles estructurales de la región de 162 kb. Estos datos son consistentes con el modelo de replicación en carrete propuesto por Cook (1999) según el cual el templado de DNA se mueve en forma secuencial hacia las fábricas de replicación que están fijadas sobre la MN y el DNA recién sintetizado es extruído de dichas fábricas formando nuevos bucles complementarios a los originales, así como con los datos experimentales que asocian a la MN con el proceso de replicación (Anachkova, *et al.*, 2005). Sin embargo, es probable que la función de los bucles estructurales como unidades de replicación esté restringida a zonas ricas en genes, dada la prioridad biológica de preservar a los elementos funcionales del genoma, por lo que es necesario examinar la estructura y función de los bucles estructurales en regiones pobres en genes para establecer si el modelo de replicación en carrete es aplicable a todo el genoma.

V. Regeneración hepática

La estrategia de mapeo topológico de secuencias con respecto a la MN, utilizada para determinar la organización de los bucles estructurales con respecto a la MN (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010) requiere del análisis de posiciones de distintas secuencias a lo largo de la región de estudio en poblaciones celulares homogéneas en fase S y en quiescencia, después de la fase S. Estas poblaciones se obtienen a las 24 horas y a los 7 días post-hepatectomía, respectivamente (Rivera-Mulia, 2010).

El hígado es un órgano heterogéneo formado por varios tipos celulares. Las células epiteliales hepáticas se derivan de los hepatoblastos, de origen endodérmico, que son precursores bipotenciales del hígado fetal (Laperche, 2003).

El parénquima hepático está organizado en unidades llamadas lóbulos, los cuales están constituidos alrededor de las triadas portales y las venas centrales. El hígado adulto está constituido por aproximadamente 80% de hepatocitos, organizados en hileras unicelulares, separadas por capilares sinusoidales, que contienen a las células de Kupffer, y los cuales están revestidos por células endoteliales fenestradas. La bilis es secretada por los hepatocitos en los canaliculos biliares, que convergen en el canal de Hering en la periferia del lóbulo, y la bilis se drena hacia los canaliculos biliares (**Figura 11**; Laperche, 2003).

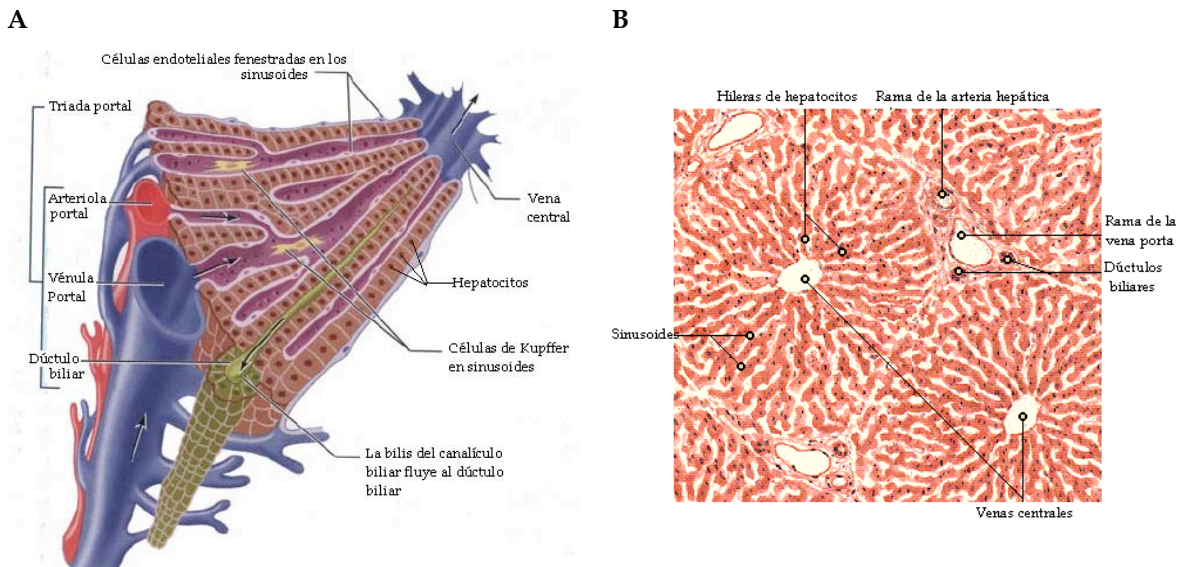


Figura 11. Unidad estructural y funcional del hígado de los mamíferos. A. Representación esquemática; B. Micrografía en microscopía de luz de un corte histológico del hígado, mostrando los vasos que componen las triadas portales, las venas centrales, las hileras de hepatocitos y los sinusoides.

Los hepatocitos en roedores y humanos adultos tienen una esperanza de vida relativamente larga; su tasa basal de síntesis de DNA es baja, y muy pocos hepatocitos (~1/20000) pueden encontrarse en mitosis en cualquier momento (Rozga, 2002). Aunque en condiciones normales los hepatocitos del hígado adulto rara vez se dividen, el hígado tiene una habilidad notable de regenerarse en respuesta a la remoción quirúrgica del tejido o a daños ocasionados por agentes químicos o biológicos (Michalopoulos y DeFrances, 1997; Greenbaum, *et al.*, 1998; Wang, *et al.*, 2001; Rozga, 2002).

El mejor modelo experimental para el estudio de la regeneración hepática fue presentado por Higgins y Anderson (Higgins y Anderson, 1931): una operación simple (hepatectomía parcial) en la cual dos terceras partes del hígado, representadas por lóbulos específicos, se remueven sin dañar a los lóbulos remanentes. La hepatectomía parcial es el estímulo más frecuentemente usado para estudiar la regeneración hepática. A diferencia de otros métodos que usan toxinas hepáticas, como el CCl₄, la hepatectomía no se asocia con daño al tejido ni inflamación en el tejido remanente, y el inicio del estímulo regenerativo está definido de manera precisa. En contraste con otros tejidos que también se regeneran, como la piel y la médula ósea, la regeneración hepática no depende sólo de un grupo de células progenitoras, sino que se lleva a cabo por la proliferación de todas las poblaciones celulares maduras existentes. Típicamente los hepatocitos son los primeros en proliferar. En ratas, el intervalo entre la hepatectomía y el inicio de la síntesis de DNA es de 10 a 12 horas. El primer pico de síntesis de los hepatocitos ocurre cerca de las 24 horas, con un pico más pequeño entre 36 y 48 horas (**Figura 12**; Fabrikant, 1968; Michalopoulos y DeFrances, 1997). A las 72 horas post-hepatectomía se observa una “ventana temporal”, en la cual los hepatocitos regulan la transición del ciclo celular hacia la fase G₀, caracterizada por cambios globales en la fisiología del hepatocito. En este periodo se registra el periodo de sobrecarga de energía (Corbin, *et al.*, 2002). En el lapso de 5-7 días posteriores a la hepatectomía, la restauración de la masa hepática es completa y los hepatocitos retornan a la quiescencia (Michalopoulos y DeFrances, 1997).

Dado que dos tercios del tejido hepático son removidos, la restauración del número original de hepatocitos requiere, teóricamente, 1.66 ciclos proliferativos por hepatocito residual. La mayoría de los hepatocitos (95% en ratas jóvenes y ≤70% en ratas viejas) participan en uno o dos eventos proliferativos.

La proliferación de los hepatocitos comienza en las áreas del lóbulo que rodean las triadas portales (zona periportal) y luego procede hacia las áreas pericentrales. Los otros

tipos celulares hepáticos entran en síntesis de DNA 24 horas después que los hepatocitos. La cinética de la proliferación y los factores de crecimiento producidos por los hepatocitos sugieren que éstos proporcionan el estímulo mitogénico que induce la proliferación de los demás tipos celulares. Después de 2 ó 3 días, durante los cuales todos los elementos celulares del hígado proliferan, la histología del mismo se caracteriza por agrupamientos pequeños de hepatocitos que rodean a los capilares. Eventualmente, estos agrupamientos se reorganizan en las hileras de células que se observan en el hígado maduro (Michalopoulos y DeFrances, 1997).

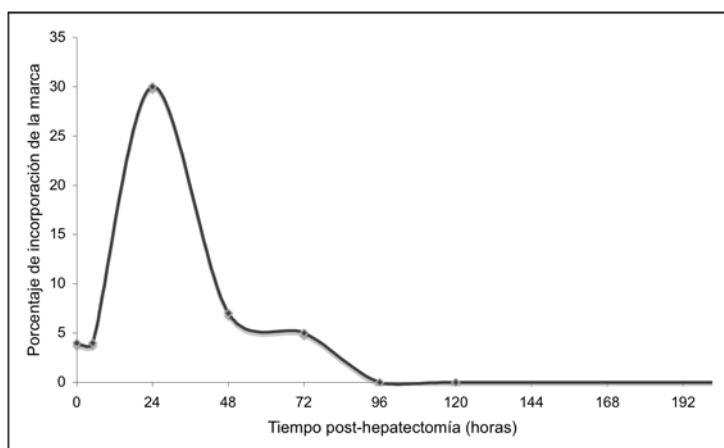


Figura 12. Cinética de la síntesis de DNA post-hepatectomía en hepatocitos, mostrando el pico mayor de síntesis en dichas células a las 24 horas (Tomado y modificado de Michalopoulos y DeFrances, 1997).

Las diferencias en la intensidad de la respuesta post-hepatectomía entre animales de la misma especie parecen ser el resultado de la edad del animal cuando es retado, de tal manera que el resultado de la mitosis de los hepatocitos para reconstituir la masa hepática normal y el número de elementos celulares funcionales varía con la edad (Becker, 1974). El efecto de la edad en la regeneración hepática en ratas y ratones ha sido sujeto de numerosas investigaciones, mostrando que la respuesta proliferativa a la hepatectomía parcial en ratas más viejas está reducida, retrasada y es muy heterogénea en comparación con las ratas jóvenes. En los animales viejos se observa un solo pico de replicación de DNA que inicia entre las 30 y las 36 horas, y el restablecimiento de la masa hepática no se lleva a término sino hasta después de 14-21 días post-hepatectomía (Castillo-Mora, 2005).

HIPÓTESIS

Los bucles estructurales (no transitorios) de DNA corresponden a los replicones y por lo tanto, el orden superior de organización estructural del DNA al interior del núcleo no sólo resulta de resolver un problema de empacamiento, sino está determinado en forma primaria por la necesidad de organizar y regular el proceso de copiado del genoma.

OBJETIVO GENERAL

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

OBJETIVOS PARTICULARES

Caracterizar la organización en bucles estructurales de la región genómica de 210 kb centrada en *c-myc* en hepatocitos de rata.

Establecer las posiciones relativas con respecto a la matriz nuclear de secuencias ubicadas en dicha región 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 *in vivo*.

MÉTODO

I. Animales experimentales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 200 a 250 g de peso para ser hepatectomizadas; el grupo control lo constituyeron ratas del mismo peso que no fueron sometidas a la hepatectomía. Las ratas se mantuvieron en jaulas de acrílico (5-6 ratas por jaula), provistas con alimento estándar para ratas de laboratorio y agua *ad libitum*.

II. Hepatectomía parcial

Previo a la hepatectomía parcial, las ratas se pesaron y anestesiaron con éter etílico. La hepatectomía parcial se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Higgins y Anderson (1931). A través de una incisión abdominal, se exteriorizaron los lóbulos medio y lateral izquierdo (los cuales en conjunto constituyen aproximadamente el 70% del total de la masa hepática) y se les colocó una ligadura alrededor de la base; estos lóbulos se removieron, dejando intactos los lóbulos remanentes. Finalmente, la incisión se suturó y a los animales en recuperación se les permitió alimentarse y tomar agua. Las hepatectomías se realizaron entre las 9 y las 11 de la mañana y los hepatocitos se obtuvieron a las 24 horas, 7 y 21 días post-hepatectomía para obtener los nucleoides.

III. Aislamiento de hepatocitos

Los hepatocitos se aislaron mediante el protocolo descrito por (Freshney, 1994) y modificado por Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo (2003). Tanto las ratas hepatectomizadas como las ratas control no hepatectomizadas se anestesiaron con éter etílico. Mediante una incisión ventral se dejó expuesta la cavidad abdominal; la vena porta se canuló con una aguja calibre 18 conectada a una bomba peristáltica. Se perfundió el hígado con una solución fisiológica (PBS-A sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}) a 37°C por 5 min, o hasta que la sangre era casi completamente eluida del hígado, a una velocidad de 15 ml/min. Al inicio de la perfusión se cortó la vena cava a la altura de los riñones. Posteriormente se retiró el hígado y se perfundió mediante los vasos principales con una solución de colagenasa tipo IV (0.025% colagenasa IV y 0.075% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en solución HEPES, que contiene 160.8 mM NaCl, 3.15 mM KCl, 0.7 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 33 mM HEPES, pH 7.65) por aproximadamente 8 minutos en ratas control, 7 y 21 d post-hepatectomía y 2 minutos en ratas a las 24 horas post-hepatectomía. Los hepatocitos se disociaron mecánicamente con una espátula sobre un tamiz con poros de 400 μm y se colectaron en un tubo cónico, en donde se les permitió sedimentar por 20 minutos a 4°C. Los

hepatocitos se contaron usando un hemocitómetro y se utilizaron inmediatamente para la obtención de nucleoides.

IV. Preparación de nucleoides

Los nucleoides son agregados nucleoproteicos muy grandes constituidos por la MN y los bucles de DNA desnudo (desprovistos de proteínas de cromatina) asociados a esta estructura, y resultan de tratar a las células con altas concentraciones de sal y un detergente no iónico. Estas estructuras constituyen la materia prima para el estudio de los bucles estructurales de DNA. El método de aislamiento de nucleoides se basa en el reportado por Rivera Mulia y Aranda Anzaldo (2010). Alícuotas de 50 μ l, conteniendo 3×10^5 células, se mezclaron con 150 μ l de solución de lisis (2.6 M NaCl, 1.3 mM EDTA, 2.6 mM Tris, y 0.6% Triton X-100, pH 8) durante 20 minutos a 4°C. Los nucleoides se lavaron con 14 ml de PBS-A a 4°C, se centrifugaron a 1500 g durante 4 min, y se recuperaron en un volumen de 300 μ l.

Para determinar la organización en bucles estructurales de la región genómica de *c-myc* se utilizaron dos protocolos; el primero se basa en la premisa de que las regiones asociadas con la MN son resistentes a la digestión con nucleasas y por lo tanto una secuencia blanco (amplicón) que se encuentre formando parte de un anclaje o se localice muy cerca de uno, puede ubicarse en la fracción asociada con la MN después de la digestión exhaustiva de los nucleoides. Esta estrategia se complementa con la búsqueda de tales secuencias blanco en la fracción sensible a digestión con las enzimas de restricción (sobrenadante). De este modo pueden determinarse las regiones asociadas a la MN y por lo tanto la configuración de los bucles de DNA. El segundo protocolo explota las propiedades topológicas del bucle de DNA anclado a la MN y se basa en el principio topológico elemental que dice que los puntos (amplicones) en una fibra deformable (DNA) pueden ser mapeados con respecto a un invariante de posición (la MN) y que de este mapeo puede deducirse la configuración tridimensional de la fibra (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010).

V. Resistencia del DNA de los nucleoides a la digestión con DNasa I

Se recuperaron 2×10^6 nucleoides en 1200 μ l de PBS-A y se mezclaron con 6.3 μ l de DNasa I a una concentración de 4.6 U/ μ l, en 5.1 ml de buffer de digestión para DNasa I (10mM MgCl₂, 0.1 mM mercaptoetanol, 50mM Tris, pH 7.2). Los nucleoides se digirieron por diferentes tiempos (90 min - 20 horas); posteriormente se lavaron una vez con PBS-A

y dos veces con agua ultrapura, siguiendo el mismo protocolo de centrifugación después de cada lavado (9000 g por 10 minutos a 4°C). La concentración de DNA de los nucleoides antes y después de la digestión se determinó por absorbancia de luz ultravioleta (260 nm) en un espectrofotómetro BioPhotometer 6131 (Eppendorf). El DNA asociado con la MN se utilizó como templado para PCR, usando diferentes pares de *primers*, como se menciona más abajo.

VI. Ensayo *pellet*-sobrenadante

a) Digestión de nucleoides con enzimas de restricción

Los nucleoides lavados (5×10^5) se recuperaron en 50 μ l de PBS-A y se mezclaron con 6.3 μ l de buffer de enzimas de restricción proporcionado por el fabricante. Se utilizaron dos cocteles de restricción (EcoRI, EcoRV y HindIII; EcoRI, ClaI y HindIII), diseñados para que ninguno de los amplicones fuera cortado por las enzimas, a una concentración de 25 y 50 U. La digestión se llevó a cabo a 37°C durante 16-20 horas. Para obtener la fracción correspondiente al DNA resistente a la digestión (*pellet* o fracción P) los nucleoides se lavaron una vez con PBS-A y dos veces con agua ultrapura, siguiendo el mismo protocolo de centrifugación después de cada lavado (9000 g por 10 minutos a 4°C). El DNA de los sobrenadantes (fracción S) se recuperó siguiendo un protocolo estándar de extracción con fenol-cloroformo e isopropanol. Se determinó la concentración DNA de ambas fracciones, y se utilizó como templado PCR usando diferentes pares de *primers*, como se menciona más abajo.

En los experimentos donde se indica, las proteínas de la MN se digirieron con proteinasa K (Roche), a una concentración de 50 μ g/ml, en buffer de digestión para proteinasa K (10 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 0.5% SDS, pH 8), a 55°C durante 5 horas. El DNA se recuperó siguiendo un protocolo estándar de extracción con fenol-cloroformo e isopropanol.

VII. Mapeo topológico de secuencias con respecto a la MN

a) Digestión de nucleoides con DNasa I y protocolo de lavados

Los nucleoides lavados (1.5×10^6) se recuperaron en 1.5 ml de PBS-A y se mezclaron con 6.3 ml de *buffer* de digestión (10mM MgCl₂, 0.1 mM mercaptoetanol, 50mM Tris, pH 7.2); se agregaron 7.8 μ l de DNasa I *stock* 460 U/ml, para lograr una concentración final de DNasa de 0.5 U/ml de mezcla de digestión. Las digestiones se llevaron a cabo a 37°C. En cada tiempo de digestión (0, 5, 15, 30, y 60 minutos) se

obtuvieron alícuotas de 1 ml conteniendo aprox. 3×10^5 nucleoides; la acción de la DNasa I se detiene agregando 200 μ l de *buffer* de paro (0.2 M EDTA y 10 mM Tris, pH 7.5), para lograr una concentración final de 30 mM de EDTA. Los tubos con las alícuotas de la digestión se centrifugaron a 9000 *g* por 10 minutos a 4°C y se decantaron. El *pellet* se lava una vez con PBS-A y dos veces con agua ultrapura, siguiendo el mismo protocolo de centrifugación después de cada lavado (9000 *g* por 10 minutos a 4°C). El *pellet* final se resuspendió en 200 μ l de agua ultrapura para ser usado directamente como templado para PCR. La concentración de DNA en cada tiempo de digestión se determinó por absorbancia de luz ultravioleta (260 nm) en un espectrofotómetro BioPhotometer 6131 (Eppendorf).

b) Primers

Se diseñaron pares de *primers* situados regularmente (cada 10 kb, aproximadamente) a lo largo de la región genómica de *c-myc*, para establecer, mediante su amplificación por PCR, si las secuencias blanco (amplicones) son resistentes a la digestión con nucleasas de restricción (protocolo *pellet*-sobrenadante) o su posición dentro de las diferentes zonas topológicas establecidas por las cinéticas de digestión (protocolo de mapeo topológico). Los pares de *primers* se diseñaron con el programa Vector NTI 11.0 (Invitrogen), y para todos los pares se consideraron los mismos parámetros de longitud (20-25 pb), contenido de G-C (50-55%), diferencia en el contenido de G-C (<5%), temperatura de fusión (T_m , 55-60°C), diferencia en la T_m (<2°) y longitud del amplicón (entre 250 y 400 pb). El uso de *primers* que potencialmente formaban dímeros o estructuras secundarias fuertes, tanto entre sí como con el *primer* complementario, fue descartado. Los *primers* fueron alineados contra el genoma de la rata usando el algoritmo en línea BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **T**ool) para comprobar su especificidad. La identidad de los amplicones fue corroborada mediante ensayos de restricción con enzimas específicas.

c) PCR

Se utilizaron 10 ng de DNA de los nucleoides, parcialmente digerido con enzimas de restricción o con DNasa I, como templado para la PCR. Cada reacción de PCR se llevó a cabo con 0.625 U de GoTaq DNA polimerasa (Promega), 1.0 mM de $MgCl_2$, 0.1 mM de cada dNTP y 10 pmol de cada uno de los *primers*, en un volumen final de 50 μ l, en un termociclador GeneAmp PCR System 2720 de Applied Biosystems. Como control positivo

se usó DNA genómico obtenido a partir de hepatocitos con el reactivo DNAzol (Invitrogen). Se utilizó el mismo programa de amplificación para todos los pares de *primers* (5 minutos de desnaturalización inicial a 94 °C, 45 segundos de desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de alineamiento de *primers* a 56 °C, 1 minuto de extensión a 72 °C por 35 ciclos, con una extensión final de 10 minutos a 72°C). Los productos se separaron en geles de agarosa al 2% en *buffer* TAE (40 mM Tris-acetato y 1 mM EDTA, pH 8.3) o TBE (0.89 mM Tris, 89 mM borato y 2 mM EDTA, pH 7.8) teñidos con BrEt (0.5 µg/ml), a 100 V y 450 mA, visualizados con un transiluminador de luz ultravioleta a 302 nm de longitud de onda y fotografiados y analizados con el *software* Kodak 1D Image Analysis Software 3.5, utilizando los parámetros por *default* del programa.

VIII. RT-PCR convencional / punto final

Para llevar a cabo el estudio de expresión relativa se obtuvo RNA total con el kit RNAqueous-4 PCR (Ambion), usando 2X10⁶ hepatocitos aislados, tanto de ratas control no hepatectomizadas como a los diferentes tiempos post-hepatectomía, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para sintetizar cDNA se incubaron 500 ng de RNA total con 0.25 µg de *random primers*, a 75°C durante 5 minutos; posteriormente a la reacción se le agregaron 0.25 mM de cada dNTP, 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (Promega) y DTT para 8 mM; la transcripción reversa se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, durante 1 hora, a 37°C. Se utilizaron 2 µl de este cDNA para hacer PCR convencional, con *primers* diseñados sobre la secuencia de mRNA de los genes *β-actina*, *PCNA* y *c-myc*, usando el mismo programa de amplificación que se empleó para los *primers* de PCR, y los productos de amplificación se separaron y analizaron de la misma manera.

IX. RT-PCR en tiempo real

El estudio de expresión también se llevó a cabo en tiempo real usando el *kit* LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche), 0.25 µM de cada *primer* y cDNA recién sintetizado como se describió previamente, en un instrumento Light-Cycler ver. 3.5 (Roche), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En cada reacción se utilizaron 2 µl de cDNA diluido a razón de 1:10, ya que una cantidad muy elevada de templado captura al SYBR Green I, produciendo una cantidad elevada de fluorescencia de fondo (*background*) y dejando cantidades insuficientes de SYBR Green I para monitorear el incremento de la señal de fluorescencia durante la amplificación. El

programa incluye un paso inicial de pre-incubación (95°C, 10 min) y 45 ciclos de amplificación *touch-down* (10 segundos de desnaturalización a 95 °C; 10 segundos de alineamiento: en los dos primeros ciclos la temperatura de alineamiento fue de 65°C, descendiendo 1°C cada dos ciclos hasta alcanzar 60°C; finalmente 25 segundos de extensión a 72°C). Finalmente se incluyó en el programa una curva de fusión (*melting*) para corroborar la identidad del producto amplificado y realizar el análisis de la cantidad relativa de templado.

RESULTADOS

I. Contexto cromosómico de la región estudiada

c-myc se localiza en el cromosoma 7q33 del cromosoma de la rata en una zona considerada pobre en genes (es el único gen confirmado en 3.35 Mb). Aproximadamente a 1.15 Mb hacia el 5' de *c-myc* se encuentra el gen *alpha-1-B glycoprotein* y el gen *gasdermin C* a ~ 2.15 Mb hacia el 3'.

Para la caracterización de los bucles estructurales se delimitó una región genómica de 210 kb, utilizando al gen *c-myc* como referencia central (**Figura 13**). Esta región es lo suficientemente grande para formar más de un bucle estructural, dado que se ha reportado que el tamaño promedio de los bucles es de 80 kb en células HeLa (Jackson, *et al.*, 1990) y otros tipos celulares de mamífero (Berezney y Buchholtz, 1981).

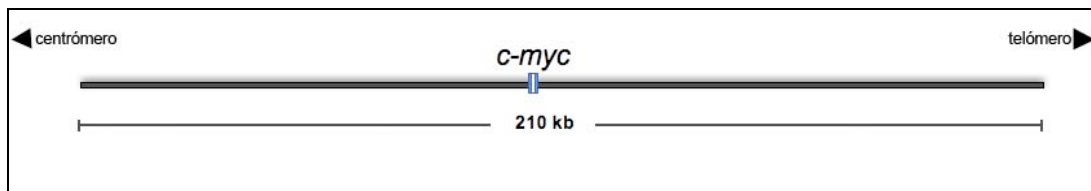


Figura 13. Región genómica utilizada para la caracterización de los bucles estructurales, que comprende 210 kb (100 kb hacia el 5' y 110 kb hacia el 3' de *c-myc*) de una región del cromosoma 7 pobre en genes.

II. Predicción *in silico* de MARs en la región estudiada

Con el fin de guiar la caracterización experimental de los bucles estructurales del locus de *c-myc*, la secuencia de la región estudiada fue introducida en tres diferentes algoritmos de predicción de MARs (MAR-Finder, SMARTest y MARSCAN). A continuación se presenta una breve descripción de cada algoritmo.

a) *MAR-Finder*

El programa MAR-Finder se basa en la frecuencia en la que se identifican diferentes secuencias con potencial MAR en la región genómica de interés. Este programa se apoya de diferentes reglas (origen de replicación, riqueza en T-G, DNA curvo, DNA doblado, reconocimiento por topoisomerasa II y riqueza en A-T), basadas en propiedades de secuencias presentes en MARs que han sido determinadas de manera experimental.

Los patrones detectados en la región se usan para asociar una significancia estadística del potencial de la región para funcionar como región de anclaje a la matriz (fuerza media). Una región S/MAR se define por la presencia de tres o más ventanas sucesivas con una significancia estadística alta. Los valores de la fuerza media del MAR-

Finder están normalizados para caer entre 0 y 1. Este parámetro especifica el potencial mínimo normalizado arriba del cual existe una alta probabilidad de que esta región contenga una S/MAR. El valor por *default* es de 0.6. Si una región tiene una probabilidad inusualmente alta de ser una MAR, los valores estadísticamente significativos de otras MAR potenciales tienen a atenuarse. Para evitar este problema, la región estudiada se subdividió en regiones de 50 kb para su análisis con este programa.

Los resultados que arroja este programa se presentan en forma de gráfica, indicando el número de nucleótidos en la secuencia de forma lineal en el eje X y los valores de fuerza media en el eje Y (Singh, *et al.*, 1997).

b) SMARTest

Se utilizaron algunos datos experimentales para el desarrollo de la herramienta de predicción de S/MARs llamada SMARTest. Este programa se basa en una biblioteca de patrones ricos en A-T, asociados con las S/MARs, derivada del análisis comparativo de secuencias S/MAR definidas experimentalmente (Frisch, *et al.*, 2002).

Este programa genera un cuadro en el que se enlistan las regiones que representan MARs potenciales y la longitud de las mismas, y estadísticas acerca de la representación, en porcentaje, de las regiones MAR con respecto a la región genómica estudiada.

c) MARScan

El programa MARSCAN busca un elemento bipartita en la secuencia de nucleótidos analizada que se supone es única para los S/MARs. Esta firma de reconocimiento MAR/SAR (MRS, **MAR/SAR Recognition Signature**) comprende dos elementos individuales, que están separados por <200 pb y pueden estar alineados en los nucleosomas que se encuentran en la S/MAR. La MRS puede ser usada para predecir la posición de S/MARs en plantas y animales, basándose en la información de la secuencia de DNA genómico. La evidencia experimental del análisis de secuencias de >300 pb de varios eucariotes muestra que cuando se observa una MRS en la secuencia, el fragmento correspondiente es una S/MAR bioquímicamente identificable.

La MRS es un elemento de secuencia bipartita que consiste en dos secuencias individuales de 8 (AATAAYAA) y 16 pb (AWWRTAANNWWGNNNC, en donde R=A ó G, Y= C ó T, W=A ó T, N=G, A, T, o C) dentro de una zona de 200 pb. Una vez que se identifica la MRS, no se buscarán más sitios a menos de 200 pb de esa MRS. Sin embargo, no todas las S/MARs contienen una MRS. El análisis de secuencias de >300 kb

del bucle, propiedad que resulta de la cercanía o asociación de estas regiones con las proteínas de la MN y el impedimento estérico que estas ejercen a la digestión por nucleasas. Así, se diseñaron *primers* específicos para dos de las regiones que predijeron los tres algoritmos, la primera ubicada a ~78 kb hacia el 5' de *c-myc*, y a ~58 kb hacia el 3'. También se diseñaron *primers* para una tercera región predicha sólo por los algoritmos SMARTest y MARSCAN, ubicada a aprox. 18 kb hacia el 5' de *c-myc*. Se escogió esta región para la corroboración experimental del MAR, y no la que se ubica a ~42 kb hacia el 5' de *c-myc* y que fue predicha por los tres algoritmos, debido a estudios previos en los cuales se había determinado la ubicación de *c-myc* dentro del 23-28% del DNA más cercano a la MN (Maya-Mendoza, *et al.*, 2005). Por lo tanto, si las dos regiones predichas por los tres algoritmos formaran un anclaje, *c-myc* se encontraría en la punta de un bucle y debería ser muy sensible a la digestión por DNasa I, lo cual no es el caso.

Los *primers* se utilizaron para amplificar secuencias blanco en el DNA asociado con la MN después de la digestión exhaustiva con nucleasas. En una primera estrategia, las digestiones se llevaron a cabo por 24 horas con una concentración de DNasa I de 100 U/ml, de modo que el porcentaje de DNA asociado a la MN sea <15% de DNA total, que sería la fracción que debe contener a los anclajes estructurales. Después de esta digestión, el DNA asociado con la MN fue de 11.0%, y éste se utilizó como templado para PCR usando pares de *primers* ubicados dentro, o muy cercanos a, los MARs predichos por los tres diferentes algoritmos usados. Como control, se incluyó un par de *primers* correspondiente a la región 3' de *c-myc*, que resultó negativa en todos los algoritmos de predicción de MARs.

En la **Figura 15** se muestran los amplicones correspondientes a las regiones predichas por los algoritmos, tanto en nucleoides sin digerir como en nucleoides digeridos exhaustivamente, por 24 horas con 100 U/ml de DNasa I. Mientras que la señal de amplificación en nucleoides sin digerir es evidente para todos los marcadores, dicha señal está ausente en los nucleoides después de 24 horas de digestión.

Sin embargo, al tratarse de una digestión exhaustiva, existía la posibilidad de que aunque las secuencias se encontraran cercanas a la MN, fueran parcialmente digeridas o dañadas por la DNasa I. Por lo tanto, se llevaron a cabo digestiones por 120 min con una concentración menor de DNasa I (4.6 U/ml), obteniendo un porcentaje de DNA asociado con la MN de entre 8.6 y 9.0%. La señal de amplificación fue negativa en el DNA digerido asociado con la MN (**Figura 15**). Reduciendo a 90 min el tiempo de digestión, con la misma concentración de DNasa I, se obtuvo un 10.3% de DNA total residual y los

resultados fueron similares. Cabe señalar que en esta serie de experimentos sólo se tomó en cuenta la presencia o ausencia del producto amplificado asociado con la MN después de la digestión de los nucleoides, de acuerdo con el *software* de análisis de imágenes Kodak 1D 3.5, usando los parámetros por *default* para este efecto.

b) Ensayo pellet-sobrenadante de regiones MAR

El ensayo *pellet*-sobrenadante se ha utilizado con frecuencia para la determinar si una región genómica está asociada o no con la MN, y consiste en la digestión del DNA de los bucles anclados a la MN con enzimas de restricción, la recuperación del DNA digerido y del *pellet* que contiene a la MN y al DNA residual asociado, seguido por la utilización de ambas fracciones como templado para la amplificación de las secuencias blanco. Dado que se requiere digerir tanto DNA como sea posible, el cóctel de enzimas de restricción se diseñó con base en la frecuencia de la secuencia consenso, así como que estas secuencias consenso estuvieran ausentes de las regiones en donde se sitúan los amplicones. Por lo tanto, se utilizó un cóctel de enzimas de restricción (EcoRI+EcoRV+HindIII) a una concentración de 25 U para digerir 5×10^5 nucleoides, durante 24 horas, obteniendo un porcentaje de DNA residual asociado con la MN de entre 3.9 y 4.1%. El DNA de los sobrenadantes se precipitó usando acetato de sodio e isopropanol. El DNA de la fracción asociada con la MN (*pellet*) y el escindido con las enzimas de restricción (sobrenadante) se utilizaron como templado para la amplificación por PCR con los pares de *primers* mencionados con anterioridad. En la **Figura 16** se puede observar que, aunque existe señal de amplificación en los *pellets* para los diferentes marcadores, ésta es significativamente mayor en los sobrenadantes, indicando que las secuencias MARs predichas por los algoritmos son sensibles a la digestión y por lo tanto es poco probable que se encuentren constituyendo anclajes del DNA a la MN.

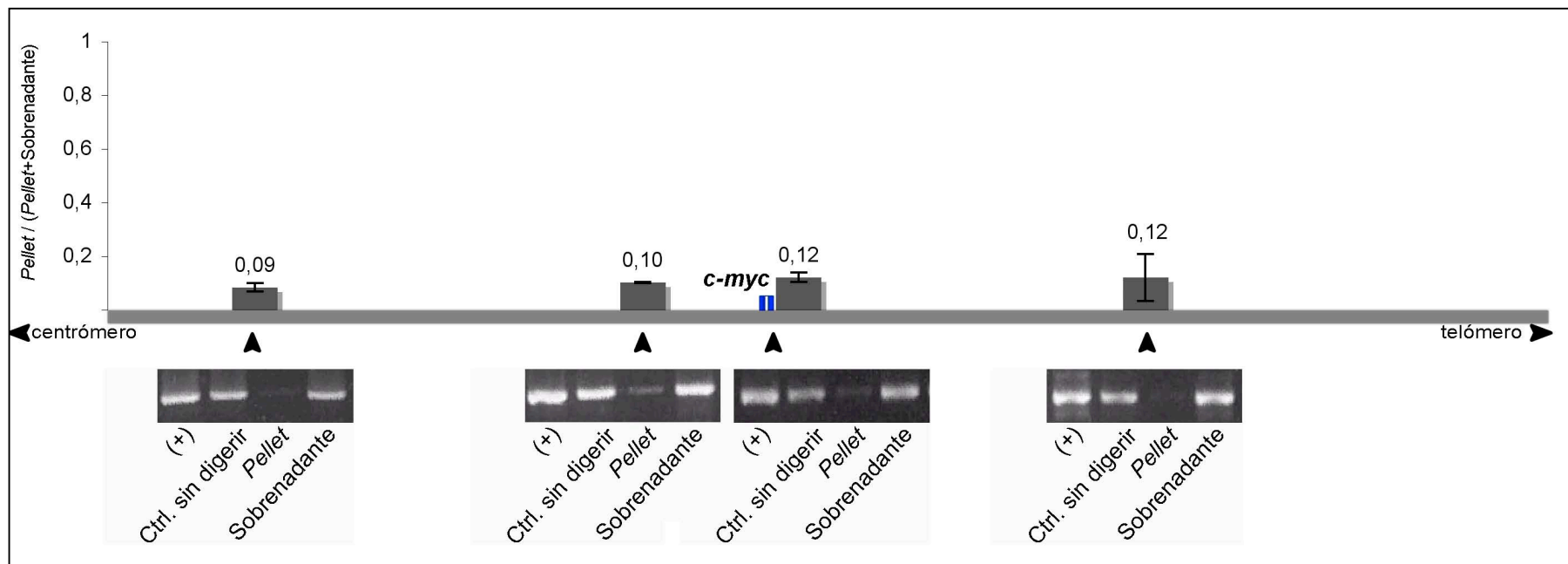


Figura 16. Ensayo *pellet*-sobrenadante de regiones MAR potenciales. Se muestra la señal de amplificación correspondiente a secuencias blanco ubicadas en vecindad con las MARs predichas por los algoritmos, así como la región 3' de *c-myc*. Puede observarse que en todos los casos la señal es más intensa en el sobrenadante que en el *pellet*.

Para complementar esta estrategia experimental, y dado que las secuencias utilizadas tienen una cobertura poco representativa de la región en estudio, se diseñaron *primers* para amplificar secuencias blanco situadas regularmente (cada ~10 kb) a lo largo de la región de estudio, y se realizó el ensayo *pellet*-sobrenadante para todas estas secuencias blanco, asumiendo lo siguiente: si un amplicón está contenido dentro de un LAR (o en una zona muy cercana con la MN) no será digerido por las nucleasas y por lo tanto la señal de amplificación será positiva en la fracción del DNA asociada con la MN; si por el contrario, la señal de amplificación se detecta en el sobrenadante pero no en el *pellet*, se asume que esta región forma parte del bucle, y dado que se conoce la distancia entre los amplicones diseñados de forma precisa, se puede reconstruir la organización en bucles estructurales del DNA en esta región. Para llevar a cabo esta estrategia se utilizó otro cóctel de enzimas de restricción (EcoRI, ClaI, Hind III) previamente reportado (Gombert, *et al.*, 2003) a una concentración de 50 U para obtener un porcentaje de DNA residual asociado a la MN del 2.9%. Se verificó que este cóctel de enzimas cumpliera con los criterios de frecuencia de secuencia consenso en la región estudiada, así como de ausencia de esta secuencia consenso en las regiones correspondientes a los amplicones. En la **Figura 17** se observa que la señal de amplificación se encuentra significativamente enriquecida en los sobrenadantes, en contraste con la señal en los *pellets*, por lo que existe la posibilidad de que ninguna de estas secuencias se encuentre cercana o incluida en un anclaje a la MN en la región estudiada.

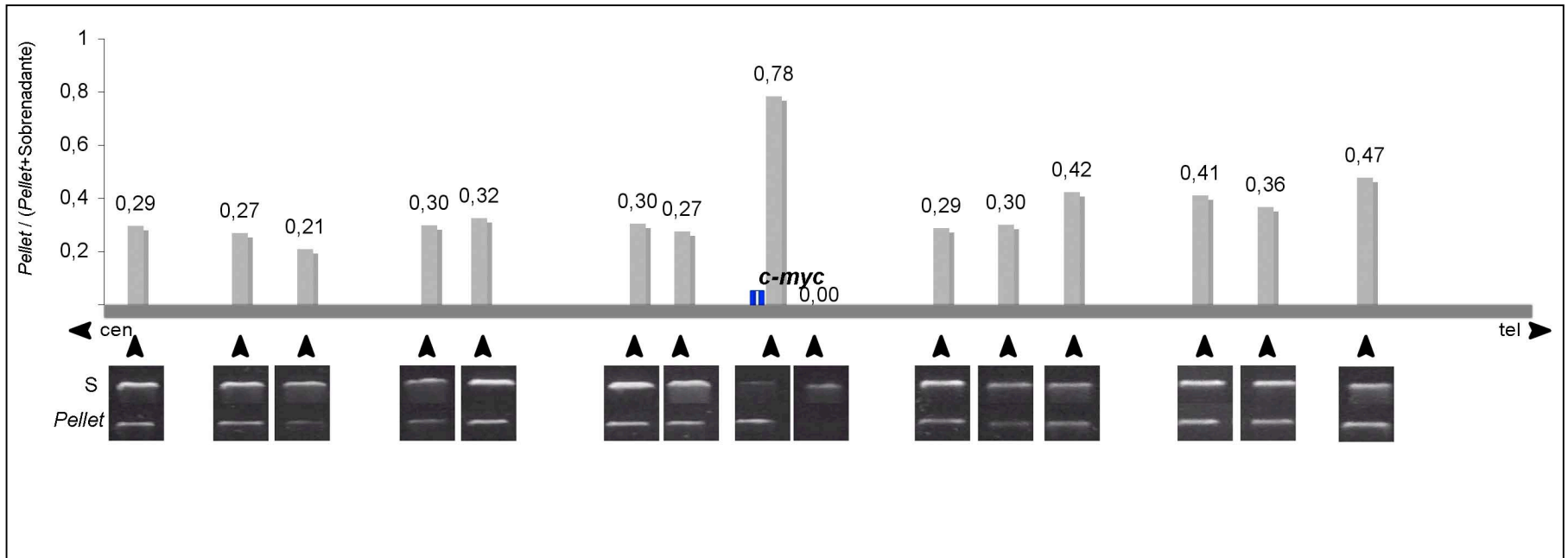


Figura 17. Ensayo *pellet*-sobrenadante. Se muestra la señal de amplificación correspondiente a secuencias blanco situadas regularmente cada ~10 kb a lo largo de la zona de estudio, señaladas por las flechas. En prácticamente todos los casos se observa que la señal de amplificación en el *pellet* es significativamente menor que en el sobrenadante.

Otra posibilidad es que las regiones que se encuentren formando parte de los anclajes, embebidos en la estructura de la MN, no sean amplificables por la misma razón por la cual estas regiones están protegidas de la digestión con nucleasas: el impedimento estérico que ejercen las proteínas de la MN impedirían la actividad de la Taq polimerasa en estas regiones. Para comprobar esta hipótesis se realizó la digestión de las proteínas de la MN con proteinasa K, posterior a la digestión parcial del DNA de los nucleoides con enzimas de restricción, y la recuperación del DNA correspondiente a la fracción asociada con la MN para usarlo como templado para PCR con los diferentes pares de *primers*, con base en la predicción de que si una secuencia se encuentra realmente embebida en la MN, una vez eliminado este impedimento estérico, la señal de amplificación de tal secuencia será más evidente.

Como se puede observar en **Figura 18**, el enriquecimiento de la señal de amplificación en la fracción de DNA asociada a la MN (16.8 - 9.9% del DNA total) es significativamente menor a la del sobrenadante después de la digestión de las proteínas de la MN con proteinasa K, lo que pone en evidencia que ninguna de las secuencias blanco examinadas se encuentra formando anclajes con la MN.

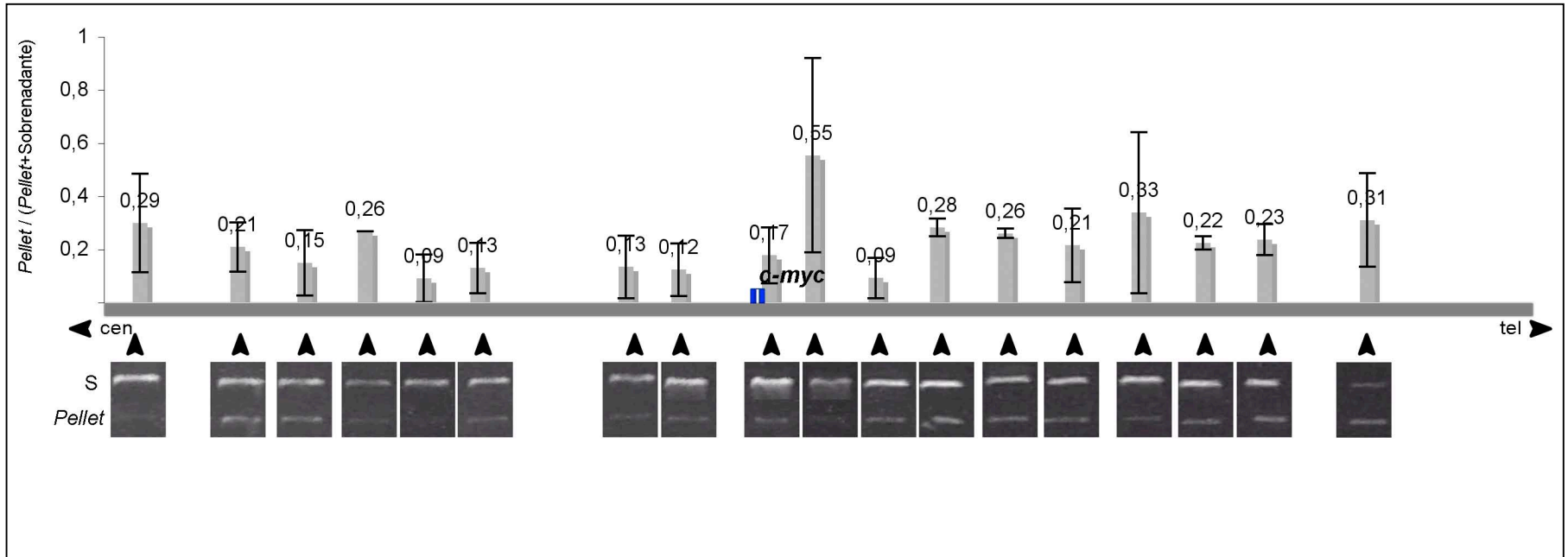


Figura 18. Ensayo *pellet*-sobrenadante después de la digestión de las proteínas de la MN con proteinasa K. Se muestra la señal de amplificación correspondiente a secuencias blanco situadas regularmente cada ~10 kb a lo largo de la zona de estudio, señaladas por las flechas.

IV. Mapeo topológico de secuencias con respecto a la MN: quiescencia

El ensayo *pellet*-sobrenadante no produjo resultados que conduzcan a la determinación de la organización de los bucles estructurales del DNA en la región genómica de *c-myc*. Por lo tanto utilizamos un nuevo método desarrollado en nuestro laboratorio: los nucleoides se digieren con DNasa I, una nucleasa inespecífica sensible a la topología local del DNA, para producir una curva de digestión, cuyo comportamiento describe zonas topológicas con respecto a la MN. En cada zona pueden ubicarse secuencias blanco de acuerdo a la presencia o ausencia de la señal de amplificación, y de este modo puede hacerse una reconstrucción de los bucles, sin necesidad de determinar los anclajes de manera puntual, que permite determinar la organización en bucles estructurales de cualquier región genómica de secuencia conocida (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010). Después de un número reducido de experimentos preliminares se determinó que podría existir un anclaje en una región ubicada a ~110 kb hacia el 3' de *c-myc*, por lo que se diseñaron dos pares adicionales de *primers* en esta región; también se diseñó otro par de *primers* en una región de ~22 kb que se omitió en los ensayos *pellet*-sobrenadante. En total se diseñaron 22 pares de *primers*, correspondientes a 22 secuencias blanco (amplicones) a lo largo de la zona de estudio, cada una designada con una letra del alfabeto (**a-u**). como se muestra en la **Figura 19**. Las secuencias que flanquean al gen *c-myc* se denominaron **j** (hacia el 5') y **j'** (hacia el 3').

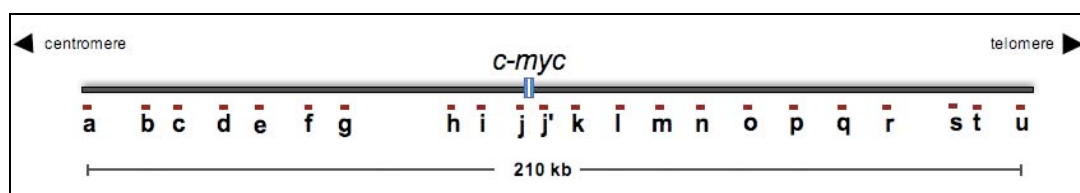


Figura 19. Ubicación a lo largo de la zona de estudio de las diferentes secuencias blanco (amplicones) que se usaron en el mapeo topológico para la determinación de la organización en bucles estructurales del DNA de la región centrada en *c-myc*.

Se realizaron cinéticas de digestión con DNasa I de nucleoides obtenidos a partir de hepatocitos de ratas control sin hepatectomizar (quiescentes). En la **Figura 20**, se muestra la cinética promedio de digestión en la cual se observan tres fases: en la primera, que dura 5 minutos, la digestión es muy rápida, ya que se remueve cerca del 54% del DNA de los bucles, que corresponde a su parte más distal; en la fase siguiente, que dura 10 minutos, la cinética se ralentiza digiriendo un 20% adicional de DNA; la siguiente fase, entre los 30 y los 60 minutos de digestión, la cinética es muy lenta y después de los 60

minutos la digestión progresa muy poco con esta concentración de DNasa I. Esta fracción del DNA corresponde al embebido en la MN, que es muy resistente a la acción de la DNasa I al estar relativamente protegida por las proteínas de la MN.

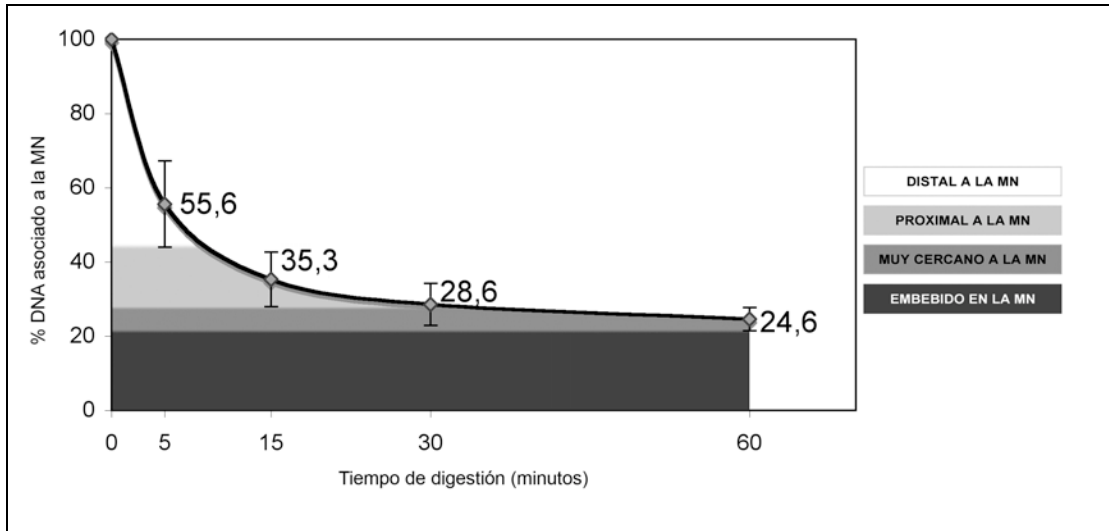


Figura 20. Cinética promedio de digestión con 0.46 U/ml de DNasa I (n= 8) de nucleoides obtenidos a partir de hepatocitos de ratas control no hepatectomizadas. Las barras representan la desviación estándar de cada uno de los puntos de tiempo.

Las zonas topológicas relativas a la MN se obtienen al establecer las pendientes entre dos puntos de tiempo y sus porcentajes de DNA residual tomando en cuenta la cota inferior de la desviación estándar correspondiente (**Tabla 1**); las más pronunciadas constituyen los límites de las zonas topológicas. De este modo, se establecieron cuatro zonas topológicas distal (D; entre el 100 y el 44% del DNA total asociado a la MN), proximal (P; del 44 al 27%), muy cercana (MC; entre el 27 y el 21%) y embebida en la MN (E; entre el 21 y >0%).

Tiempo de digestión (min)	Pendiente	Zona topológica
0-5	-8,88	Distal
5-15	-2,03	Proximal
15-30	-0,45	Muy cercana
30-60	-0,13	

Tabla 1. Pendientes entre los diferentes puntos de tiempo de la digestión con DNasa I del DNA de nucleoides obtenidos a partir de hepatocitos de ratas control no hepatectomizadas.

Los nucleoides parcialmente digeridos con DNasa I de cada punto de tiempo de la digestión se usaron como templado para la amplificación por PCR. En la **Figura 21** se muestra un gel representativo de la zona topológica en la que amplifican cada una de las secuencias blanco.

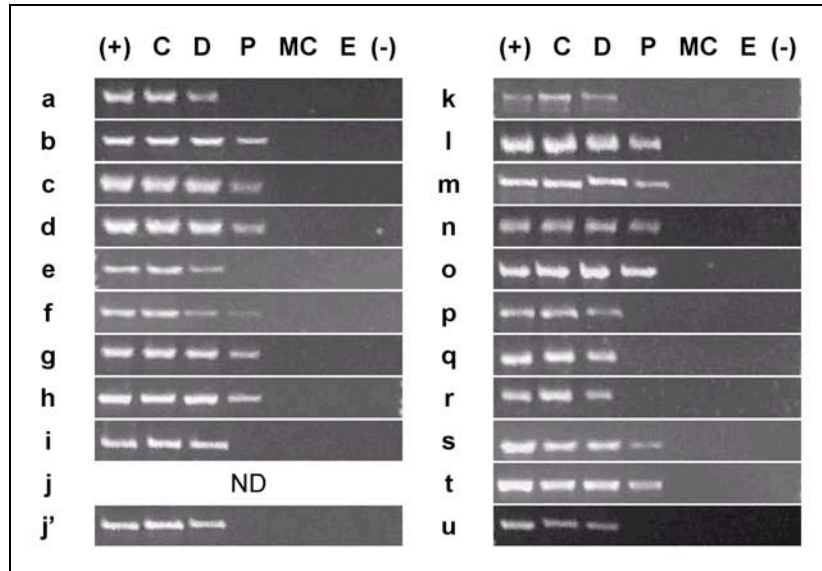


Figura 21. Patrón de amplificación de las diferentes secuencias blanco (a-u) en ratas control no hepatectomizadas. (+), amplificación con DNA genómico; C, control sin digerir; D, distal; P, proximal; MC, muy cercana; E, embebida en la MN; (-) control negativo, sin DNA. ND= no determinado.

La amplificación de las diferentes secuencias blanco se correlacionó con la curva de digestión para establecer en qué zona topológica se encuentra cada secuencia, de modo que se obtuvo la **Tabla 2**, en donde se indica en qué zona topológica se encuentra presente la señal de amplificación de cada una de las secuencias blanco. En los experimentos se observaron secuencias que amplificaron consistentemente en la zona topológica distal (como los amplicones **k**, **p**, **q** y **u**), mientras que otras secuencias amplificaron alternativamente en la zona distal y en la zona proximal (amplicones **a**, **e**, **i**, **j'** y **r**). El resto de las secuencias blanco amplifican consistentemente en la zona proximal. Ninguna de las secuencias amplifica en las zonas muy cercana o embebida en la MN. Cabe mencionar que el mapeo topológico toma en consideración la presencia o ausencia del producto amplificado en un punto de tiempo de la digestión y no la intensidad de la señal de amplificación.

ZONAS TOPOLÓGICAS CON RESPECTO A LA MN

AMPLICON	C	D	P	MC	E	AMPLICON	C	D	P	MC	E
a	+	+*	+*	-	-	k	+	+	-	-	-
b	+	+	+-	-	-	l	+	+	+	-	-
c	+	+	+	-	-	m	+	+	+	-	-
d	+	+	+	-	-	n	+	+	+	-	-
e	+	+*	+*	-	-	o	+	+	+	-	-
f	+	+	+	-	-	p	+	+	-	-	-
g	+	+	+	-	-	q	+	+	-	-	-
h	+	+	+	-	-	r	+	+*	+*	-	-
i	+	+*	+*	-	-	s	+	+	+	-	-
j			ND			t	+	+	+	-	-
j'	+	+*	+*	-	-	u	+	+	-	-	-

Tabla 2. Ubicación de las secuencias blanco (**a-u**) en cada una de las zonas topológicas determinadas con base en la cinética de digestión de los nucleoides obtenidos a partir de hepatocitos quiescentes de ratas control sin hepatectomizar. El símbolo + indica amplificación positiva para la zona topológica indicada en la columna; el símbolo - indica ausencia de señal de amplificación. El * indica que el marcador amplifica alternativamente en las dos zonas topológicas señaladas. El símbolo +- indica un marcador con tres experimentos, dos de los cuales son positivos para la zona topológica indicada. D, distal; P, proximal; MC, muy cercana; E, embebida en la MN; ND= No determinado.

Dado que se conoce la distancia lineal, en pares de bases, entre dos secuencias blanco, y la ubicación de cada una de las secuencias blanco con respecto al invariante topológico que representa la MN, y asumiendo que el DNA es una fibra continua y flexible, es posible establecer la organización espacial de la región genómica bajo estudio. Como se puede observar en la **Figura 22** esta región genómica se encuentra formando al menos seis bucles estructurales, cuyo tamaño varía desde 10 hasta 40 kb. Es necesario hacer notar que entre las secuencias **g** y **h** hay un segmento de ~23 kb en el cual no fue posible el diseño de *primers* apropiados para la amplificación, debido a la abundancia de polimorfismos de un sólo nucleótido (~10%), presencia de secuencias palindrómicas y riqueza en A-T, por lo que esta región no está representada en el esquema de los bucles estructurales. Por otro lado, la posición del marcador **j** fue deducida en función de las posiciones de sus marcadores vecinos, la distancia entre ellos y la magnitud de las zonas topológicas.

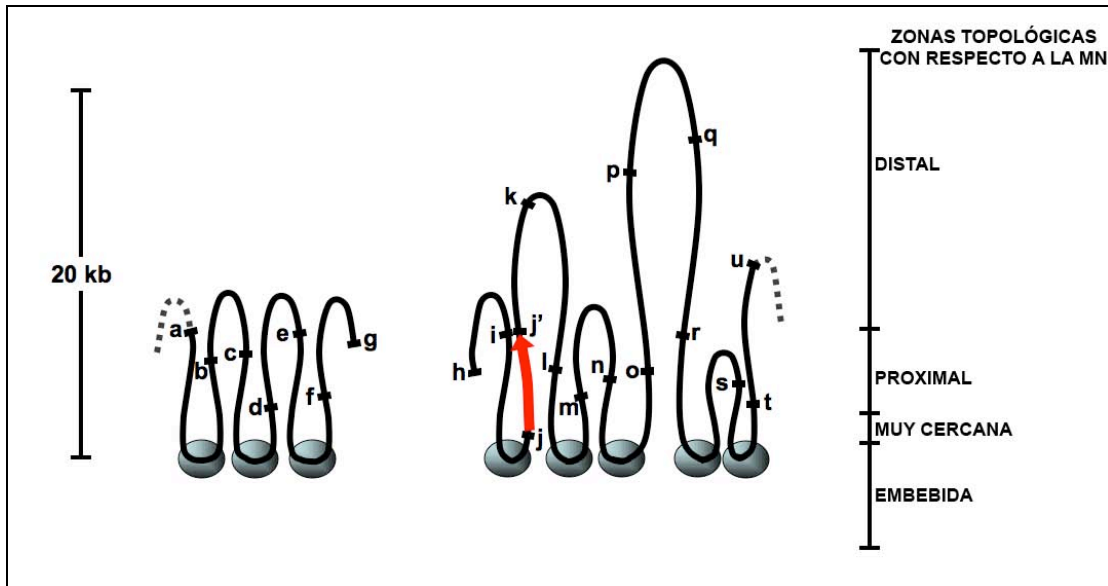


Figura 22. Organización en bucles estructurales del DNA en la región genómica de 210 kb del cromosoma 7 que contiene a *c-myc*, en hepatocitos quiescentes. Se muestran los diferentes marcadores ubicados en la zona topológica determinada experimentalmente. Las esferas representan elementos de la MN. Se muestra a *c-myc* en rojo, con la punta de la flecha indicando la dirección de la transcripción.

V. Mapeo topológico de secuencias con respecto a la MN durante la replicación y retorno a la quiescencia

Un buen modelo de proliferación sincronizada *in vivo* es la hepatectomía parcial en rata, ya que se ha determinado que aproximadamente el 95% de los hepatocitos, en ratas jóvenes, entra en uno o dos ciclos celulares, y que a las 24 horas post-hepatectomía existe el mayor pico de síntesis de DNA (Michalopoulos y DeFrances, 1997). Para establecer la posible correlación entre los bucles estructurales y las unidades de replicación, se realizó el mapeo topológico de las diferentes secuencias blanco con respecto a la MN en este modelo animal, de manera que se pueden establecer los movimientos de las secuencias durante la fase S del ciclo celular.

La digestión con DNasa I de los nucleoides obtenidos a partir de hepatocitos a las 24 horas post-hepatectomía se realizó en las mismas condiciones que la de los nucleoides de hepatocitos quiescentes, es decir, con cantidades limitadas de DNasa I y durante los mismos tiempos. En la **Figura 23** se muestra la cinética promedio de digestión del DNA de nucleoides obtenidos a partir de hepatocitos de rata a las 24 horas post-hepatectomía. Como puede observarse, la cinética es ligeramente más rápida, en contraste con la cinética control, ya que se remueve un ~60% de DNA en la primera etapa de cinco minutos; en los siguientes 55 minutos se remueve un 28% adicional de DNA y al

finalizar la digestión el porcentaje de DNA asociado a la MN es de cerca del 11%, lo que contrasta con el 21% de los nucleoides quiescentes. De acuerdo con las pendientes y las desviaciones estándar de los porcentajes de DNA asociados a la MN en los diferentes puntos de tiempo de la cinética de digestión, en el DNA de los nucleoides de ratas a las 24 horas post-hepatectomía también se pueden delimitar cuatro zonas topológicas con respecto a la MN (**Tabla 3**): distal (entre el 100 y el 41%), proximal (entre el 41 y el 23%), muy cercana (entre el 24 y el 11%) y embebida (entre el 11 y >0%).

El DNA de los nucleoides, correspondiente a los diferentes puntos de tiempo de la cinética de digestión, se utilizó para amplificar las diferentes secuencias blanco. En la **Figura 24** se muestra un gel representativo que muestra la zona topológica en la que amplifican cada una de las secuencias blanco a las 24 horas post-hepatectomía.

Ubicando a las secuencias en la zona topológica correspondiente (**Tabla 4**) se observaron acercamientos significativos, como los que experimentan las secuencias **e**, **i**, **j'** y **r**, las cuales, de amplificar alternativamente en la zona proximal y distal, pasaron a amplificar consistentemente en la zona proximal. Del mismo modo la secuencia **b** pasó de amplificar en la zona topológica proximal a amplificar alternativamente en las zonas topológicas proximal y muy cercana. Para otras secuencias el cambio fue más dramático: la secuencias **q** y **u** pasaron de la zona distal a la zona proximal y las secuencias **m** y **o** pasaron de la zona proximal a la zona muy cercana. En dos casos las secuencias se alejaron de la MN: la secuencia **a** pasó de amplificar alternativamente en la zonas distal y proximal a amplificar consistentemente en la zona distal, y la secuencia **l** pasó de amplificar consistentemente en la zona proximal a amplificar alternativamente en las zonas distal y proximal. El resto de las secuencias se ubicó en la misma zona topológica que en los nucleoides de ratas del grupo control.

Los resultados de la amplificación se correlacionaron con las cinéticas de digestión correspondientes para ubicar a los diferentes marcadores en la zona topológica correspondiente y reconstruir con estos datos la organización de los bucles estructurales de DNA en el núcleo de hepatocitos en replicación (**Figura 25**). El segmento de DNA comprendido entre las secuencias **a** y **g** conserva esencialmente la misma organización en bucles estructurales, y las secuencias se encuentran en la misma zona topológica. Sin embargo, al verse alterada la cinética de digestión y el patrón de amplificación de algunas secuencias, el resultado es el acercamiento a la MN de casi todas las secuencias blanco. El cambio más significativo se observó en el bucle formado por las secuencias **o**, **p**, **q** y **r** en nucleoides de hepatocitos quiescentes, ya que el acercamiento de las secuencias **o** y

q supuso la reducción en el tamaño de este bucle y la formación de uno más pequeño, que contiene a la secuencia **r**, en nucleoides de hepatocitos en proliferación. En el resto de las secuencias se observan cambios poco significativos, la mayoría de los cuales son acercamientos a la MN que no significan el salto de la secuencia a una zona topológica más cercana a la MN.

Cabe mencionar que aunque los datos indican que la secuencia **l** puede ubicarse en la transición entre las zonas topológicas proximal y distal, el contexto constituido por el resto de las secuencias blanco, la distancia entre ellas y la magnitud de las zonas topológicas impone que dicha secuencia se ubique en la zona topológica proximal.

De esta manera se determinó que en nucleoides de hepatocitos en proliferación, la región genómica bajo estudio está organizada en al menos siete bucles estructurales, variando en tamaño desde 10 hasta 30 kb (**Figura 25**).

Un paso importante para confirmar los movimientos durante la replicación de las secuencias que se encuentran en los bucles es la determinación de la organización estructural de los bucles de DNA a los 7 días post-hepatectomía, cuando el proceso de regeneración hepática ha concluido y los hepatocitos están nuevamente en quiescencia (Michalopoulos y DeFrances, 2005). Usando las mismas condiciones de digestión con DNasa I que con los nucleoides control y a las 24 hrs post-hepatectomía, se determinó la curva de digestión promedio para los nucleoides de hepatocitos de rata a los 7 días post-hepatectomía (**Figura 23**).

Con base en las pendientes y las desviaciones estándar de los porcentajes de DNA asociados a la MN en los diferentes puntos de tiempo de la cinética de digestión, se delimitaron las cuatro zonas topológicas con respecto a la MN en nucleoides de ratas a los 7 días post-hepatectomía (**Tabla 3**): distal (entre 100 y 56%), proximal (entre 56 y 23%), muy cercana (entre 23 y 17%) y embebida (entre 17 y >0%).

En la **Figura 24** se muestra un experimento representativo en donde puede observarse el patrón de amplificación de las diferentes secuencias. Al ubicar las secuencias blanco en las zonas topológicas correspondientes, se encontró un fuerte contraste con el patrón de amplificación de los nucleoides de hepatocitos de ratas control sin hepatectomizar, también quiescentes, ya que mientras que la mayoría de las secuencias en este último caso amplifican en las zonas topológicas distal y proximal, en los nucleoides de hepatocitos quiescentes a los 7 días post-hepatectomía las secuencias **g**, **i**, **m**, **n** y **u** amplifican alternativamente en las zonas topológicas proximal y muy

cercana; las secuencias **j**, **j'**, **k** y **p** amplifican en la zona topológica proximal y el resto de las secuencias amplifican en la zona topológica muy cercana a la MN.

Al calibrar el patrón de amplificación de las diferentes secuencias blanco con las zonas topológicas establecidas a partir de la cinética de digestión promedio se obtiene la reconstrucción de los bucles estructurales a los 7 días post-hepatectomía, como se muestra en la **Figura 25**. Como puede observarse, las diferencias en el patrón de amplificación se traducen en una mayor extensión de DNA embebido en la MN. Aunque las relaciones topológicas que tienen la mayoría de las secuencias con respecto a la MN se conservan a las 24 horas post-hepatectomía, la asociación de una sola región con la MN (situada entre las secuencias **q** y **r**), es decir, la actualización de un MAR en LAR, es suficiente para cambiar la organización en bucles estructurales: mientras en quiescencia la región está organizada en al menos seis bucles estructurales de entre 10 y 40 kb de longitud, a las 24 horas y a los 7 días post-hepatectomía la región se organiza en siete bucles estructurales, de entre 10 y 30 kb.

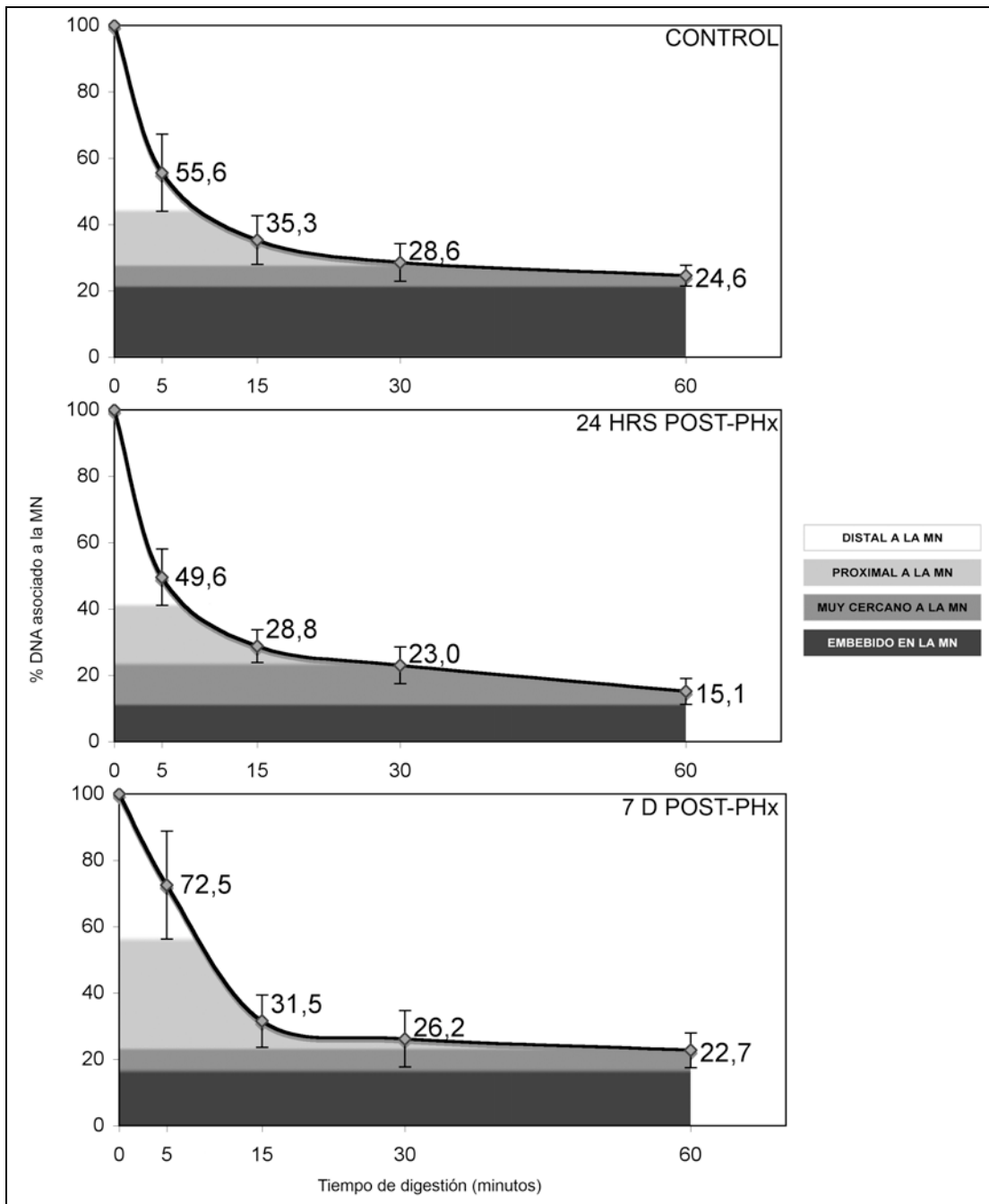


Figura 23. Cinéticas promedio de digestión con 0.46 U/ml de DNasa I (n=6) de nucleoides obtenidos a partir de hepatocitos de ratas a las 24 horas post-hepatectomía y a los 7 días post-hepatectomía. Las barras representan la desviación estándar de cada uno de los puntos de tiempo. Con fines comparativos se muestra la cinética de digestión de nucleoides obtenidos a partir de hepatocitos de ratas control no hepatectomizadas.

Tiempo de digestión (min)	CONTROL		24 HRS POST-PHx		7 D POST-PHx	
	Pendiente	Zona topológica	Pendiente	Zona topológica	Pendiente	Zona topológica
0-5	-8,88	Distal	-10,09	Distal	-5,50	Distal
5-15	-2,03	Proximal	-2,08	Proximal	-4,10	Proximal
15-30	-0,45	Muy cercana	-0,39	Muy cercana	-0,35	Muy cercana
30-60	-0,13		-0,26		-0,12	

Tabla 3. Pendientes entre los diferentes puntos de tiempo de la digestión del DNA de nucleoides obtenidos a partir de hepatocitos de ratas a las 24 horas post-hepatectomía y a los 7 días post-hepatectomía. Con fines comparativos se muestran las pendientes entre los puntos de tiempo de la digestión de nucleoides obtenidos a partir de hepatocitos de ratas control no hepatectomizadas.

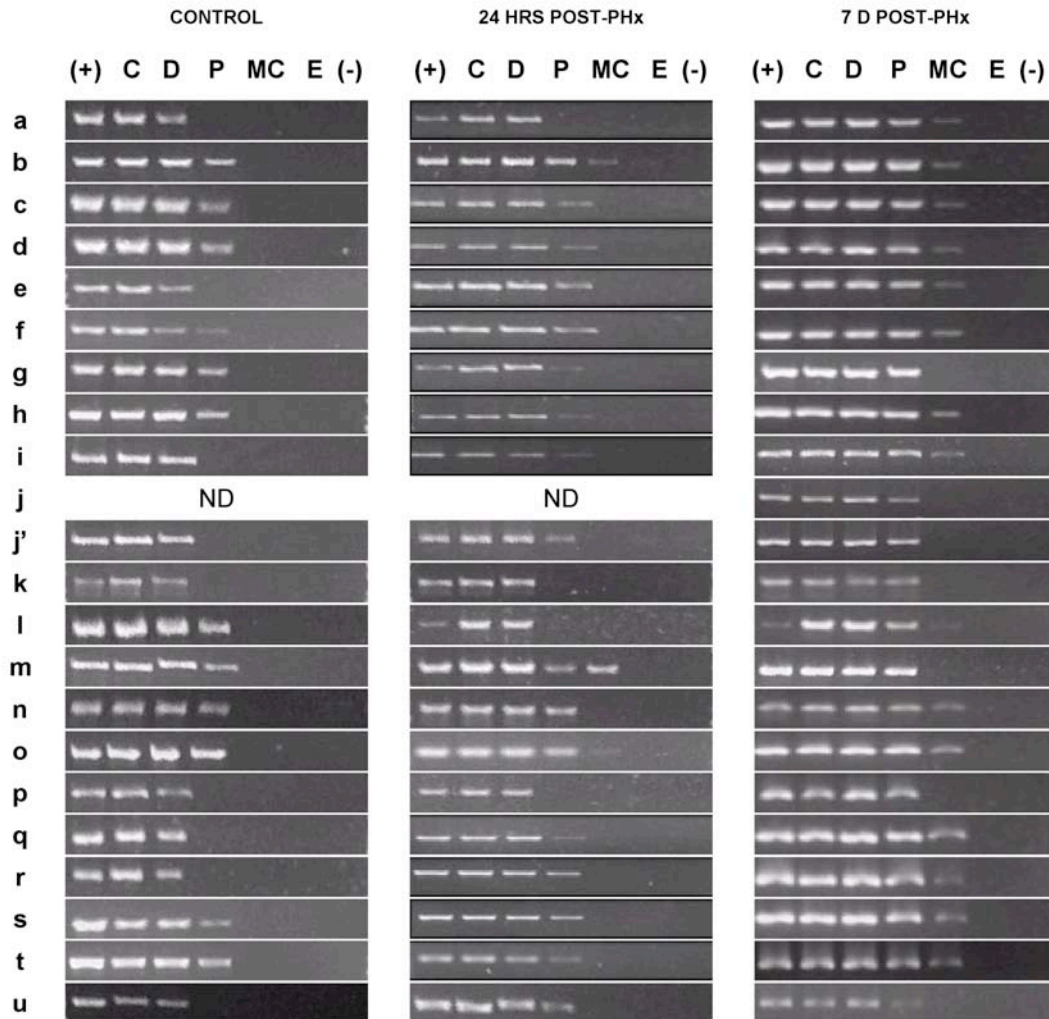


Figura 24. Patrón de amplificación de las diferentes secuencias blanco en nucleoides a las 24 hrs post-hepatectomía y a los 7 días post-hepatectomía. Con fines comparativos se muestra el patrón de amplificación de las diferentes secuencias blanco en nucleoides de ratas control no hepatectomizadas

AMPLICON	ZONAS TOPOLÓGICAS CON RESPECTO A LA MN														
	CONTROL					24 HRS POST-PHx					7 D POST-PHx				
	C	D	P	MC	E	C	D	P	MC	E	C	D	P	MC	E
a	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
b	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
c	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
d	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
e	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
f	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
g	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
h	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
i	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
j			ND					ND			+	+	+	-	-
j'	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
k	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
l	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
m	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
n	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
o	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
p	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
q	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
r	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
s	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
t	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
u	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-

Tabla 4. Ubicación de las secuencias blanco en cada una de las zonas topológicas a las 24 hrs y a los 7 d post-hepatectomía. Con fines comparativos se muestra la ubicación de las secuencias blanco en ratas control no hepatectomizadas. ND= No Determinado.

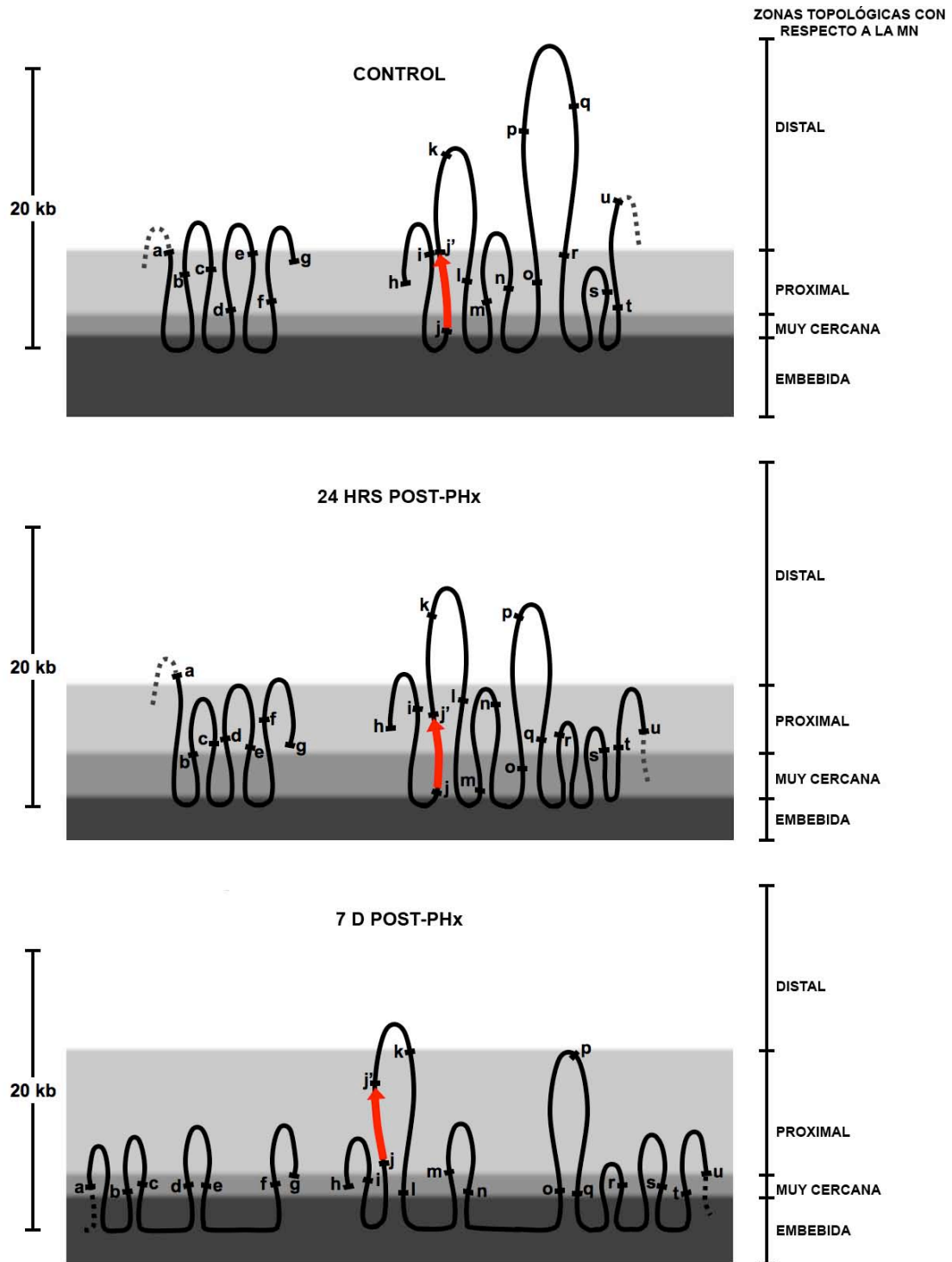


Figura 25. Organización en bucles estructurales del DNA en la región genómica de 210 kb del cromosoma 7 que contiene a *c-myc* durante la fase S del ciclo celular y los 7 d post-hepatectomía, cuando el proceso de regeneración hepática ha concluido y los hepatocitos están quiescentes. Con fines comparativos se muestra la organización en bucles estructurales en ratas control no hepatectomizadas.

En múltiples estudios se ha reportado la dinámica de la regeneración hepática. Un pico importante de síntesis de DNA se registra a las 24 horas post-hepatectomía, y existe un pico menos importante a las 36-48 horas post-hepatectomía, y al término de 7 días el proceso ha concluido y la masa hepática ha sido restablecida. La organización en bucles estructurales del DNA determinada en este estudio muestra que a los 7 días post-hepatectomía muchas de las secuencias se sitúan en la zona topológica muy cercana, en contraste con su ubicación en los nucleoides de hepatocitos de ratas control no hepatectomizadas, en donde se sitúan en las zonas topológicas distal o proximal. Una hipótesis para explicar este fenómeno es que a los 7 días post-hepatectomía aún exista una población de hepatocitos en fase S y por lo tanto las secuencias siguen asociadas a la MN en las fábricas de replicación. Para probar o refutar esta hipótesis se realizó un estudio de expresión de un marcador de proliferación (PCNA, **P**roliferating **C**ell **N**uclear **A**ntigen), tanto por RT-PCR convencional como en tiempo real. En la **Figura 26** se muestra la expresión de *PCNA* con respecto al gen de expresión constitutiva *β-actina*. Puede notarse que, si bien existe una expresión basal de *PCNA* en hepatocitos de ratas control sin hepatectomizar (quiescentes), la cantidad de mRNA de *PCNA* con respecto a la de *β-actina* se incrementa a las 24 horas post-hepatectomía, lo que correlaciona con el pico de síntesis de DNA reportado ; a los 7 días post-hepatectomía los niveles de mRNA de *PCNA* en los hepatocitos han regresado a sus valores basales, por lo que es razonable concluir que ya no existen cantidades significativas de hepatocitos en fase S y, por lo tanto, la razón por la que las secuencias blanco en la región estudiada se encuentran cercanas a la MN no es que estén acercándose a ésta para ser replicadas.

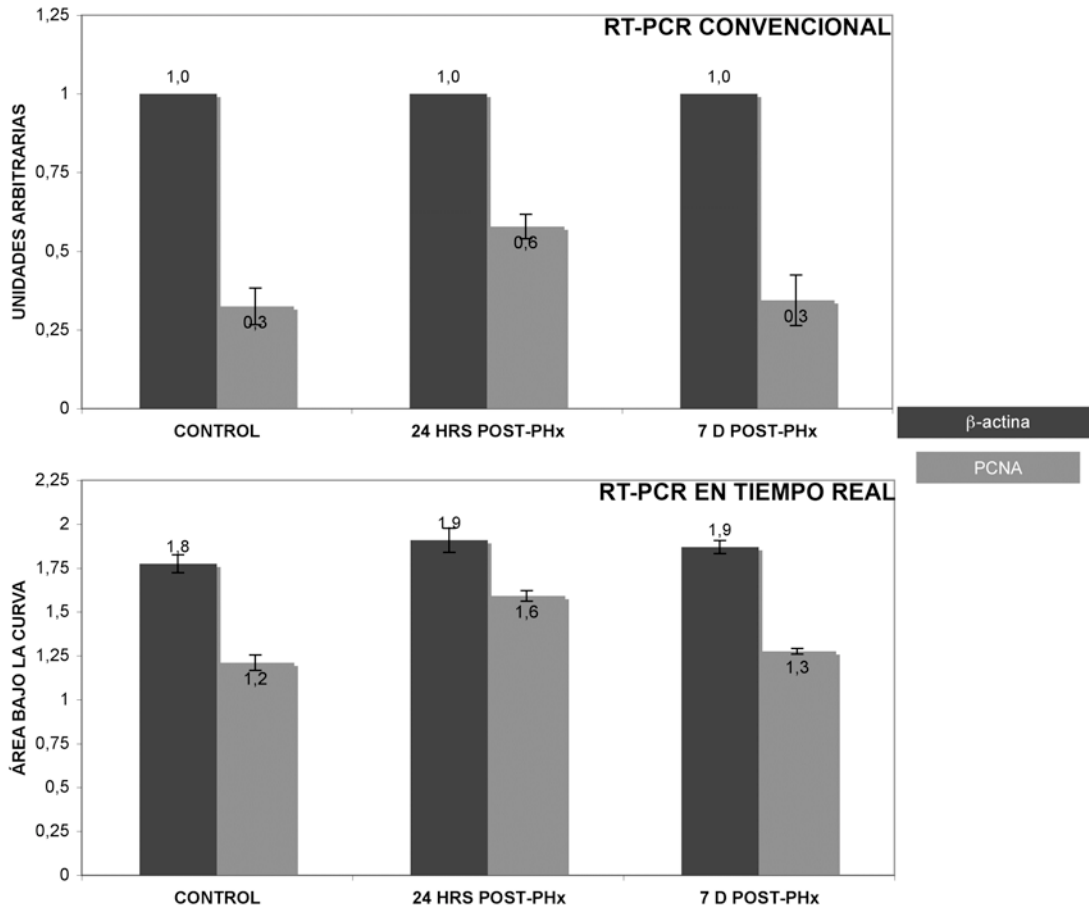


Figura 26. Expresión de *PCNA* por RT-PCR convencional en hepatocitos (control, n=6; 24 hrs post-PHx, n=3; 7 d post-PHx, n=5), en donde la intensidad de la banda correspondiente a *PCNA* se calibra con la de *b-actina*, un gen de expresión constitutiva, para establecer las unidades relativas de expresión; y por RT-PCR en tiempo real (*b-actina*, para todos los casos, n=3; *PCNA* para todos los casos, n=2), en donde se muestra el área bajo la curva obtenida de la amplificación de ambos marcadores.

VI. Mapeo topológico de secuencias con respecto a la MN posterior a la finalización del proceso de regeneración hepática post-hepatectomía

Una segunda hipótesis para explicar la cercanía de las secuencias, que no están siendo replicadas, a la MN, es que el proceso de restablecimiento de los bucles estructurales se encuentra temporalmente desfasado del de replicación; por lo tanto, se estudió la organización en bucles estructurales del DNA en nucleoides de ratas a los 21 días post-hepatectomía y a los 3 meses post-hepatectomía. Se planteó que estos tiempos eran suficientes para permitir el restablecimiento de los bucles estructurales originales, en caso de que éste se llevara a cabo.

La cinética de digestión promedio de los nucleoides de hepatocitos a los 21 días post-hepatectomía es similar a la de los nucleoides de hepatocitos de ratas control sin hepatectomizar. Por otro lado la cinética de digestión de los nucleoides de hepatocitos a los 3 meses post-hepatectomía es inicialmente tan rápida como las cinéticas de los nucleoides control y a los 21 días post-hepatectomía, pero el porcentaje de DNA asociado con la MN después de 60 minutos de digestión con DNasa I es del 30.6%, un 5% más que en las cinéticas mencionadas. Ambas cinéticas se muestran en la **Figura 27**.

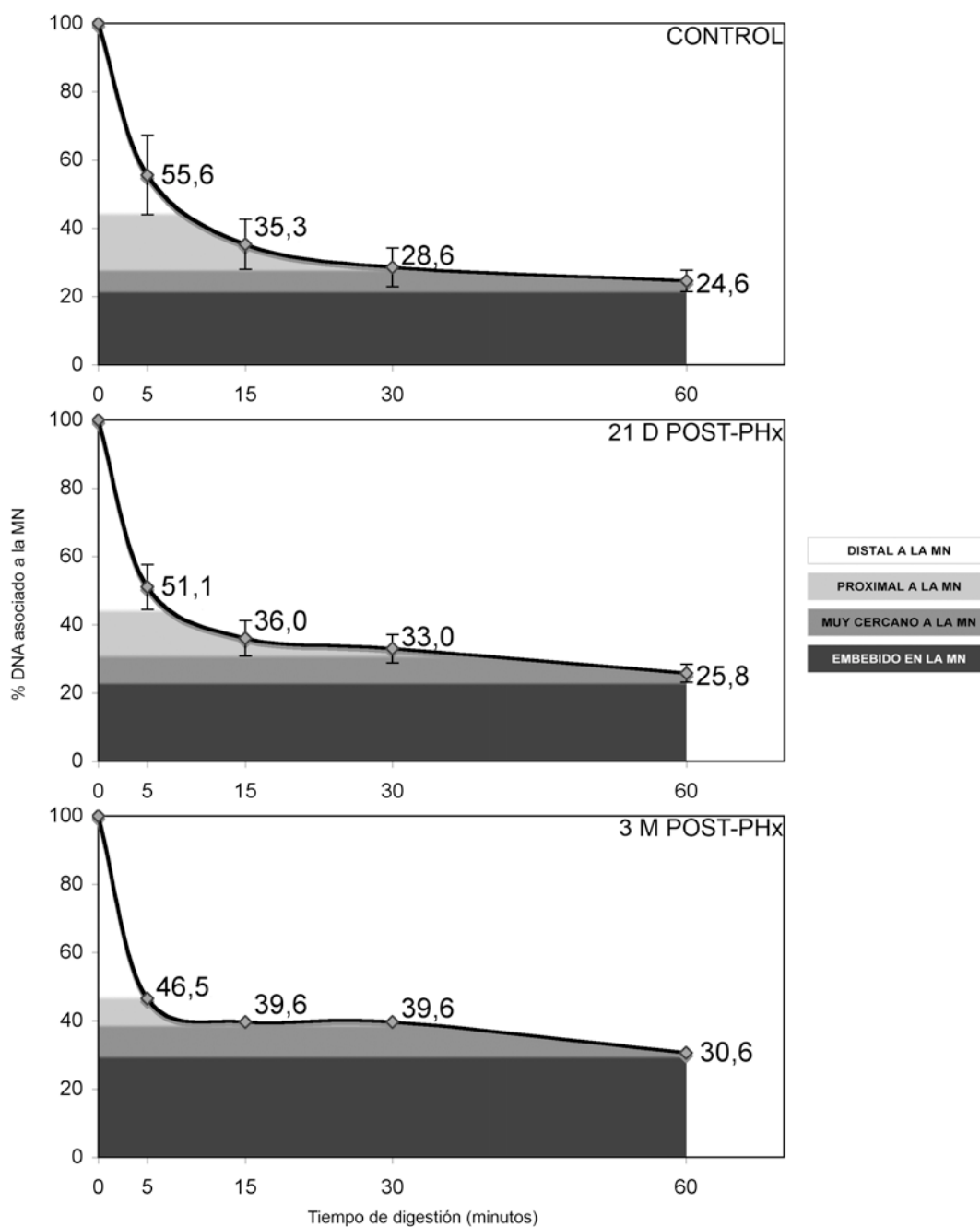


Figura 27. Cinéticas promedio de digestión con 0.46 U/ml de DNasa I de nucleoides obtenidos a partir de hepatocitos de ratas a los 21 días post-hepatectomía (n=5) y a los 3 meses post-hepatectomía (n=1). Las barras representan la desviación estándar de cada uno de los puntos de tiempo. Con fines comparativos se muestra la cinética de digestión de nucleoides obtenidos a partir de hepatocitos de ratas control no hepatectomizadas.

Con la ayuda de las pendientes y las desviaciones estándar se establecieron las cuatro zonas topológicas con respecto a la MN en nucleoides a los 21 días post-hepatectomía: distal (entre 100 y 44%), proximal (entre 44 y 30%), muy cercana (entre 30 y 23%) y embebida (entre 23 y >0%). Sólo se realizó un experimento con nucleoides de ratas a los 3 meses post-hepatectomía y por lo tanto se establecieron las zonas topológicas entre los puntos de tiempo cuyas pendientes son significativas, ya que al tratarse solamente de una réplica biológica no fue posible obtener las desviaciones estándar. Las zonas topológicas determinadas para este caso son distal (entre 100 y 46%), proximal (entre 46 y 39%), muy cercana (entre 39 y 30%) y embebida (entre 30 y >0%). Las pendientes y las zonas topológicas de ambas cinéticas de digestión se muestran en la **Tabla 5**.

Tiempo de digestión (min)	CONTROL		21 D POST-PHx		3 M POST-PHx	
	Pendiente	Zona topológica	Pendiente	Zona topológica	Pendiente	Zona topológica
0-5	-8,88	Distal	-9,79	Distal	-10,70	Distal
5-15	-2,03	Proximal	-1,51	Proximal	-0,69	Proximal
15-30	-0,45	Muy cercana	-0,20	Muy cercana	0,00	Muy cercana
30-60	-0,13		-0,24		-0,30	

Tabla 5. Pendientes entre los diferentes puntos de tiempo de la digestión del DNA de nucleoides obtenidos a partir de hepatocitos de ratas a los 21 días post-hepatectomía y a los 3 meses post-hepatectomía. Con fines comparativos se muestran las pendientes entre los puntos de tiempo de la digestión de nucleoides obtenidos a partir de hepatocitos de ratas control no hepatectomizadas

Los nucleoides parcialmente digeridos se usaron como templado para la amplificación por PCR. En la **Figura 28** se muestra un experimento representativo de la amplificación de cada uno de los marcadores en nucleoides de hepatocitos de ratas a los 21 días y a los 3 meses post-hepatectomía.

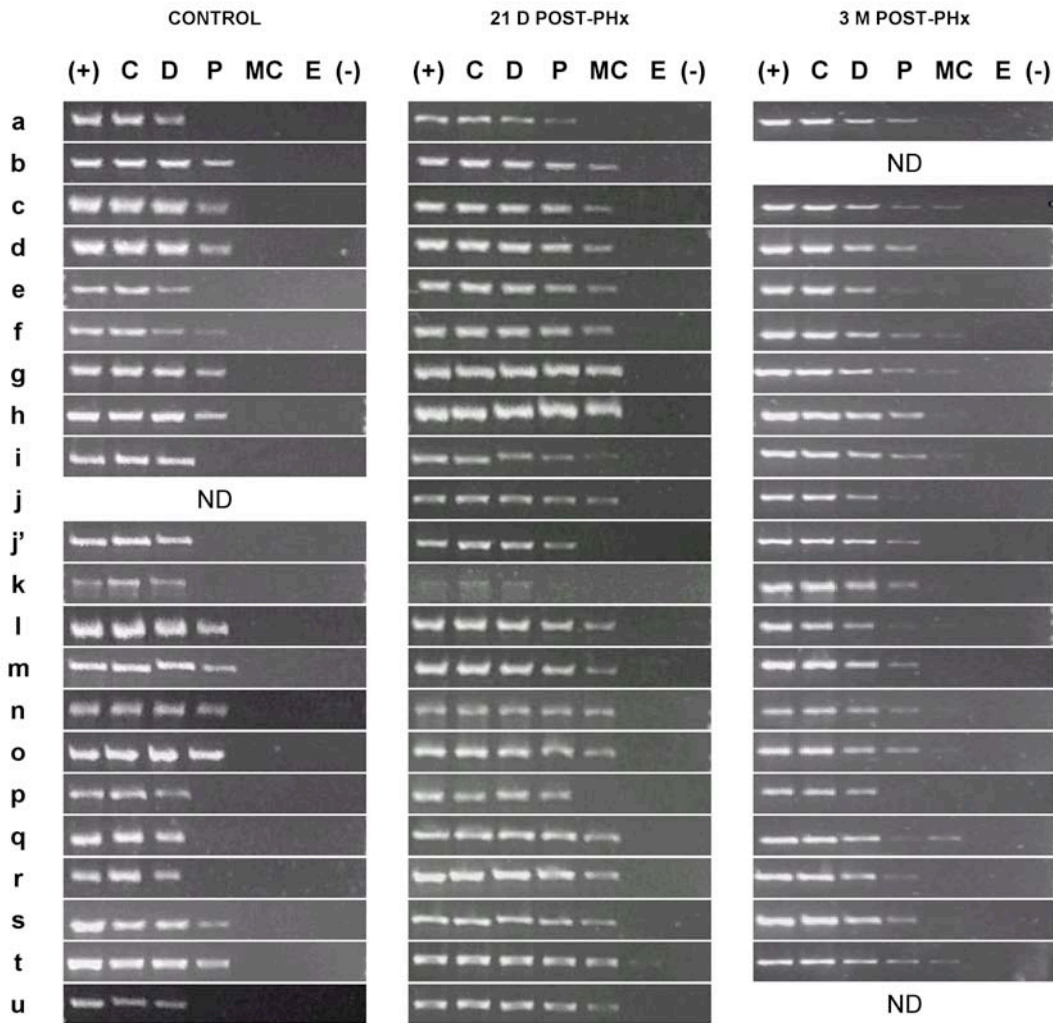


Figura 28. Patrón de amplificación de las diferentes secuencias blanco de nucleoides a los 21 días post-hepatectomía y a los 3 meses post-hepatectomía. Con fines comparativos se muestra el patrón de amplificación de las diferentes secuencias blanco en nucleoides de ratas control no hepatectomizadas.

Ubicando a las secuencias blanco en su zona topológica correspondiente se obtuvo la **Tabla 6**, en donde se observa en nucleoides a los 21 días post-hepatectomía que la mayoría de las secuencias amplifican en la zona topológica muy cercana, con las siguientes excepciones: las secuencias **a**, **j'** y **u** amplifican alternativamente en las zonas proximal y muy cercana; la secuencia **t** amplifica alternativamente en las zonas topológicas muy cercana y embebida; y la secuencia **k** amplifica alternativamente en las zonas distal y proximal. En los nucleoides de hepatocitos a los 3 meses post-hepatectomía se observa una distribución más homogénea de las secuencias blanco en las diferentes zonas topológicas, ya que nueve de las secuencias (**c**, **f**, **g**, **h**, **i**, **n**, **o**, **q** y **t**) se encuentran amplificando en la zona topológica muy cercana; otras nueve (**a**, **d**, **e**, **j**, **j'**,

k, l, m y **r**) amplifican en la zona topológica proximal; y dos secuencias (**p** y **s**) amplifican en la zona topológica distal.

AMPLICON	ZONAS TOPOLÓGICAS CON RESPECTO A LA MN														
	CONTROL					21 D POST-PHx					3 M POST-PHx				
	C	D	P	MC	E	C	D	P	MC	E	C	D	P	MC	E
a	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
b	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
c	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
d	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
e	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
f	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
g	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
h	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
i	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
j	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
j'	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
k	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
l	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
m	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
n	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
o	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
p	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
q	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
r	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
s	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
t	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
u	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

Tabla 6. Ubicación de las secuencias blanco en cada una de las zonas topológicas en ratas a los 21 días y a los 3 meses post-hepatectomía. Con fines comparativos se muestra la ubicación de las secuencias blanco en ratas control no hepatectomizadas.

Estos patrones de amplificación se traducen en la organización en bucles estructurales que se muestra en la **Figura 29**. A los 21 días post-hepatectomía la región bajo estudio está organizada en al menos siete bucles estructurales (al igual que en los nucleoides a las 24 horas post-hepatectomía y a los 7 días post-hepatectomía), la mayoría de ellos con un tamaño homogéneo de ~15 kb, exceptuando al que contiene al gen *c-myc*, cuyo tamaño es de ~30 kb.

A los 3 meses post-hepatectomía se observa que la región está organizada en al menos ocho bucles estructurales, todos ellos con un tamaño de ~15 kb, lo que contrasta con la organización de los bucles estructurales en tiempos más cercanos al procedimiento de la hepatectomía (24 horas, 7 días y 21 días).

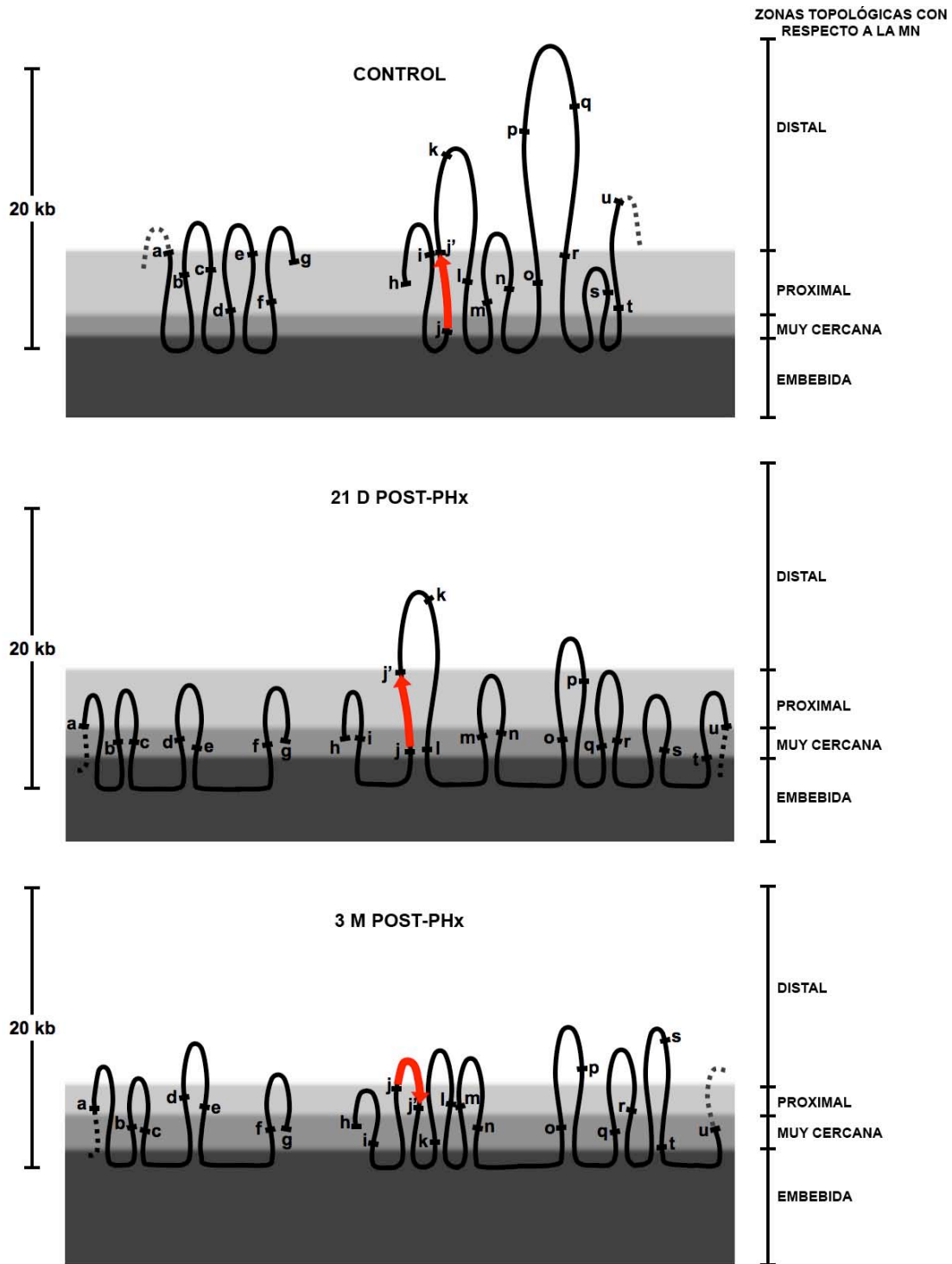


Figura 29. Organización en bucles estructurales del DNA en la región genómica de 210 kb del cromosoma 7 que contiene a *c-myc* a los 21 días y 3 meses post-hepatectomía. Con fines comparativos se muestra la organización en bucles estructurales en ratas control no hepatectomizadas.

Hasta ahora se han presentado las tablas de ubicación de las secuencias blanco en las diferentes zonas topológicas con respecto a la MN calibradas con la cinética de digestión de los nucleoides obtenidos a partir de hepatocitos en diferentes etapas del ciclo celular: G0, antes (control sin hepatectomizar) y después (7 y 21 días y 3 meses) de la hepatectomía parcial; y S (24 horas post-hepatectomía). Dado que las cinéticas de digestión muestran diferencias entre sí, es lógico esperar que las secuencias presenten cambios en su posición con respecto a la MN, por lo que, para establecer la magnitud de los cambios en las posiciones de las diferentes secuencias blanco con respecto a la MN se calibró la señal de amplificación de las diferentes secuencias blanco con la cinética de digestión de los nucleoides de ratas control sin hepatectomizar. Estos datos se presentan en la **Tabla 7**, en donde puede observarse que a las 24 horas post-hepatectomía las secuencias **a, f, g, h, i, j', k, l, n y p** no experimentan cambios en su posición con respecto a la MN; el resto de las secuencias se han acercado una (**b, c, d, e, g, r, s, t y u**) o dos (**m, o y q**) zonas topológicas. Por otro lado, a los 7 días post hepatectomía existe una gran cantidad de secuencias situadas en la zona embebida (**b, l, n, o, q y t**) y en la transición entre las zonas topológicas muy cercana y embebida (**a, c, d, e, f, h, i, r y s**) y pocas secuencias en la zona muy cercana (**g, m y u**), en la transición entre muy cercana y proximal (**j**) y en la distal (**j', k y p**), de las cuales **k y p** están en la zona distal tanto en nucleoides de hepatocitos quiescentes como en los de hepatocitos a las 24 horas post-hepatectomía. También puede observarse que en etapas posteriores a la regeneración hepática las secuencias se van alejando progresivamente de la MN (a los 21 días post-hepatectomía una gran cantidad de secuencias se encuentran en la zona topológica muy cercana, en la transición entre las zonas proximal y muy cercana y en la zona proximal, y sólo una secuencia (**k**) en la zona distal; a los 3 meses post-hepatectomía la secuencia **d** se ubica en la transición entre las zonas muy cercana y proximal, las secuencias **k, q y u** en la zona proximal, y las secuencias **j y s** en la zona distal. Estos cambios son suficientes para la una modificación significativa en la organización de los bucles estructurales, como se puede observar en la **Figura 29**.

AMPLICON	ZONAS TOPOLOGICAS CON RESPECTO A LA MN DE ACUERDO A LA CINÉTICA DE DIGESTIÓN DE NUCLEOIDES EN G0																									
	CONTROL					24 HRS POST-PHx					7 D POST-PHx					21 D POST-PHx					3 M POST-PHx					
	C	D	P	MC	E	C	D	P	MC	E	C	D	P	MC	E	C	D	P	MC	E	C	D	P	MC	E	
a	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	
b	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
c	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
d	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
e	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
f	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
g	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
h	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
i	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
j																										
j'	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
k	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
l	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
m	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
n	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
o	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
p	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
q	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
r	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
s	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
t	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
u	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-

Tabla 7. Ubicación de las secuencias blanco en cada una de las zonas topológicas en ratas control, 24 horas post-hepatectomía, 7 y 21 días post-hepatectomía y 3 meses post-hepatectomía, calibrada con la cinética de digestión de nucleoides obtenidos a partir de hepatocitos de ratas control sin hepatectomizar.

Para descartar nuevamente que existan poblaciones proliferantes de hepatocitos que introduzcan sesgos en los resultados se realizó el estudio de expresión del mRNA de *PCNA* en hepatocitos de las ratas a los 21 días y a los 3 meses post-hepatectomía. Puede observarse en la **Figura 30** que a los 21 días post-hepatectomía el nivel de mRNA de *PCNA* es similar al encontrado en los hepatocitos de las ratas control no hepatectomizadas, por lo que es muy probable que no haya hepatocitos en proliferación a los 21 días post-hepatectomía; en la RT-PCR convencional se observa el mismo fenómeno hasta los 21 días post-hepatectomía, e incluso puede notarse que el nivel de mRNA de *PCNA* en hepatocitos de ratas a los 3 meses post-hepatectomía es menor al de las ratas control, lo que nos habla de un potencial de proliferación disminuido en estos hepatocitos.

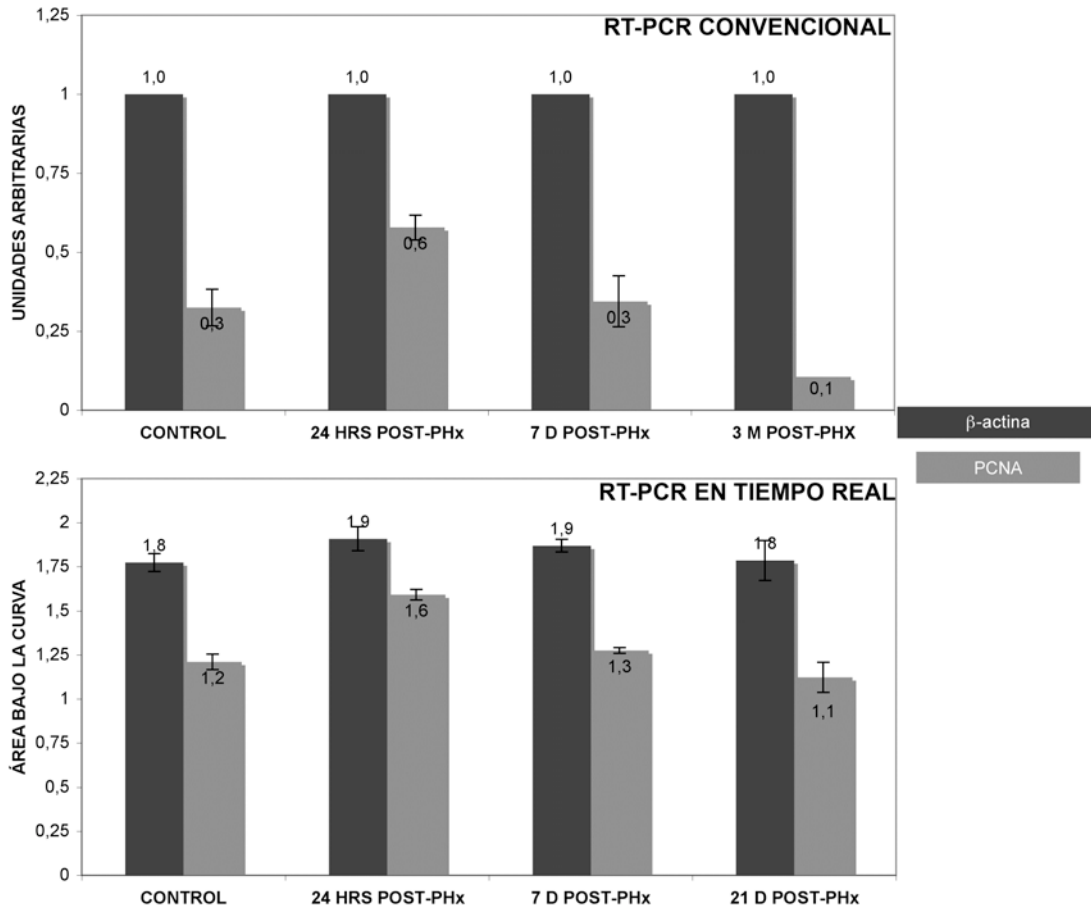


Figura 30. Expresión de *PCNA* por RT-PCR convencional en hepatocitos (control, n=6; 24 hrs post-PHx, n=3; 7 d post-PHx, n=5; 3 m post-PHx, n=1), en donde la intensidad de la banda correspondiente a *PCNA* se calibra con la de β -actina, un gen de expresión constitutiva, para establecer las unidades relativas de expresión; y por RT-PCR en tiempo real (β -actina, para todos los casos, n=3; *PCNA* para todos los casos, n=2), en donde se muestra el área bajo la curva obtenida de la amplificación de ambos marcadores.

Debido a los múltiples reportes que correlacionan a los bucles con las unidades de transcripción este enfoque ha persistido a pesar de que existen también varios reportes en los que se ha determinado que una unidad de transcripción está organizada en varios bucles estructurales (Iarovaia, *et al.*, 2004; Trevilla-García y Aranda-Anzaldo, 2012), y de que la cercanía o lejanía de los genes a la MN no implica un cambio significativo en los niveles de transcripción. En este trabajo se realizó el estudio de expresión de *c-myc* en los hepatocitos de los diferentes tratamientos (control, 24 horas post-hepatectomía, 7 días post-hepatectomía, 21 días post-hepatectomía y 3 meses post-hepatectomía) por RT-PCR convencional y en tiempo real. En la **Figura 31** se muestran los niveles relativos de mRNA de *c-myc* con respecto a β -actina. Por ambos protocolos se observa que los niveles de mRNA de *c-myc* aumentan a las 24 horas post-hepatectomía y vuelven a sus

niveles basales a los 7 días post-hepatectomía; a los 21 días post-hepatectomía los niveles de mRNA de *c-myc* son imperceptibles por RT-PCR en tiempo real, mientras que a los 3 meses post-hepatectomía el nivel de mRNA de *c-myc* es menor al encontrado en los hepatocitos de ratas del grupo control.

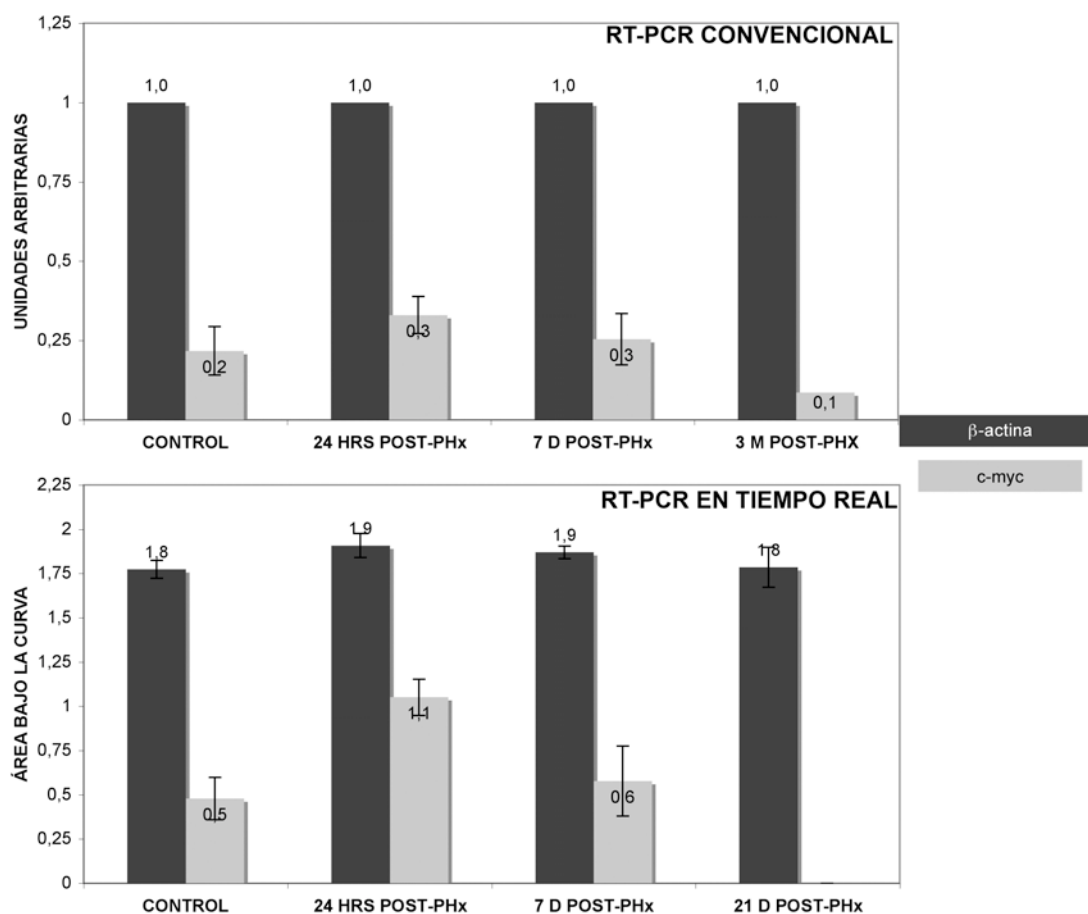


Figura 31. Expresión de *c-myc* por RT-PCR convencional en hepatocitos (n= >3, excepto para 3 m post-PHx, n=1), en donde la intensidad de la banda correspondiente a *c-myc* se calibra con la de β -actina, un gen de expresión constitutiva, para establecer las unidades relativas de expresión; y por RT-PCR en tiempo real (n=3), en donde se muestra el área bajo la curva obtenida de la amplificación de ambos marcadores.

DISCUSIÓN

I. Los algoritmos de predicción de secuencias MAR

El primer paso a realizar en el presente trabajo era el establecimiento de los límites de los bucles estructurales en quiescencia en la región centrada en *c-myc*, por lo que inicialmente se planteó el objetivo de determinar experimentalmente las regiones que están formando los anclajes a la MN. Sin embargo, la mayoría de los trabajos experimentales publicados estaban basados en la determinación de MARs *in vitro*, y la única estrategia confiable para determinar MARs *in situ* era la de escisión de bucles por topoisomerasa II endógena (Iarovaia, *et al.*, 2004), misma que requería recursos no disponibles en nuestro laboratorio. Por lo tanto, antes de definir una nueva estrategia experimental y como una guía para la búsqueda de los anclajes de la zona de estudio, se hizo uso de herramientas bioinformáticas que declaraban cierta confiabilidad en la predicción de secuencias MAR. Como se puede observar en la **Figura 14**, existen diferencias en cuanto al número de MARs y en localización de las mismas en la región de estudio con los tres algoritmos usados, MAR-Finder (Singh, *et al.*, 1997), SMARTest (Frisch, *et al.*, 2002) y MARSCAN (van Drunen, *et al.*, 1999). Sin embargo, también existen MARs que fueron predichas por las tres herramientas. Este criterio aunado a evidencia experimental de la posición del gen *c-myc* con respecto a la MN (Maya-Mendoza, *et al.*, 2003), fueron considerados para escoger tres regiones con MARs potenciales para la corroboración experimental de LARs.

Una de las características de las secuencias cercanas a la MN, o asociadas con la MN, es su resistencia a la digestión con nucleasas. Bajo esta premisa se diseñó una estrategia experimental para determinar si las MARs potenciales predichas por los programas constituyen LARs, con base en la noción de que las secuencias que se encontraran formando anclajes se pondrían en evidencia en nucleoides digeridos exhaustivamente con DNasa I, si el DNA asociado con la MN se amplificara por PCR. Sin embargo, ninguna de las tres secuencias con mayor potencial de constituir LARs predichas por los tres algoritmos, se hizo evidente al amplificar el DNA residual asociado a la MN después de la digestión exhaustiva con DNasa I. Esto corrobora el bajo poder predictivo de los algoritmos, lo que ya fue puesto en evidencia en un trabajo publicado en forma contemporánea con nuestros experimentos (Evans, *et al.*, 2007). Más aún, al ubicar sobre los bucles estructurales determinados por el método de mapeo topológico desarrollado en nuestro laboratorio (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010) los sitios en donde los algoritmos predijeron MARs se estimó que el 56% de los sitios predichos por

MAR-Finder, el 57% de los sitios predichos por SMARTest y el 66% de los sitios predichos por MARSCAN, se concentran en regiones proximales o distales con respecto a la MN en la región genómica de *c-myc*, y ninguno de los sitios predichos se encuentra suficientemente cerca o dentro de los LARs inferidos por el método de mapeo topológico. Por lo tanto, se confirma que los resultados producidos por estos algoritmos son muy poco confiables y sin valor intrínseco, a menos que se corroboren con métodos experimentales.

II. El ensayo *pellet*-sobrenadante

En el presente trabajo se utilizó el ensayo *pellet*-sobrenadante para tratar de determinar la configuración en bucles estructurales de la región genómica de 210 kb centrada en el gen *c-myc*. Este ensayo se usa ampliamente en el campo, con ligeras variantes en cuanto al método de detección de las secuencias en la fracción cortada por enzimas de restricción (sobrenadantes = DNA del bucle) o en la fracción asociada con la MN (*pellet* = MARs). Sin embargo, este método tiene limitantes importantes que deben mencionarse:

1. El uso de enzimas de restricción, en lugar de nucleasas inespecíficas, introduce un sesgo en el corte, dictado por la secuencia consenso de la o las enzimas usadas, por lo que se debe poner especial cuidado en el diseño del cóctel de enzimas de restricción que se usará para digerir los bucles de DNA, ya que un cóctel de diseño deficiente podría producir bucles completamente digeridos y bucles que tienen cortes escasos o nulos, en la población total de bucles, lo que podría producir falsos negativos o falsos positivos, respectivamente.

2. Derivado del punto anterior se desprende que la digestión del DNA del bucle debería llevarse a cabo con enzimas inespecíficas. Sin embargo esto no es técnicamente posible, ya que una nucleasa inespecífica como la DNasa I continúa la actividad de digestión en los fragmentos que ya han sido cortados de los bucles y que se mantienen en la fracción del sobrenadante, produciendo fragmentos de DNA cada vez más pequeños que no son apropiados para la amplificación por PCR ni para ningún otro método de detección específica.

3. En los trabajos citados se da por sentado que la fracción asociada con la MN después de la digestión con enzimas de restricción es la que está constituyendo los LARs. Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se llevó a cabo una estimación del porcentaje de DNA asociado con la MN posterior a la digestión con enzimas de restricción. En la

mayoría de los experimentos de este tipo realizados en nuestro laboratorio el porcentaje de DNA asociado con la MN después de la digestión con enzimas de restricción es de entre el 20 y el 30% (datos no mostrados), el cual es muy superior al $\leq 2\%$ del DNA que está constituyendo los LARs; por lo tanto, los supuestos “anclajes” determinados en los trabajos citados pueden corresponder a regiones cercanas a la MN, pero no se puede afirmar que representen verdaderos anclajes.

4. En los trabajos citados se utiliza un sólo paso de sedimentación por centrifugación como medio para separar los fragmentos de DNA cortados después de la digestión de las preparaciones de nucleoides con enzimas de restricción; se asumió que este paso era suficiente para separar de la MN cualquier fragmento de DNA cortado por la nucleasa. Sin embargo, el DNA es una molécula “pegajosa” y los fragmentos de DNA cortados por la enzima de restricción pueden re-asociarse con la MN o enredarse con el DNA asociado con la MN, por lo que es importante introducir en el protocolo una serie de lavados específicos que eliminen cualquier fragmento de DNA cortado que pudiera estar asociado con la MN de manera inespecífica (Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo, 2003). En experimentos de nuestro laboratorio se ha observado que existe una señal de los diferentes marcadores en los sobrenadantes posteriores a los lavados, señal que va decreciendo a medida que avanzan los lavados (datos no mostrados), lo que nos habla de que efectivamente existen fragmentos cortados que se re-asocian inespecíficamente con la MN y de que estos fragmentos pueden eliminarse siguiendo un protocolo sencillo pero sistemático de lavados.

5. Independientemente del método de detección de las secuencias en las diferentes fracciones de los bucles de DNA digeridos con enzimas de restricción, siempre se hace una estimación del enriquecimiento relativo de las señales respectivas en el *pellet* o en el sobrenadante. Al tratarse de una técnica semi-cuantitativa debería hacerse también una estimación del material que se pierde por el manejo experimental de los nucleoides, estimación que se omite en los trabajos citados. En experimentos realizados en nuestro laboratorio se detectó una fuerte señal de todos los marcadores examinados en el sobrenadante, aún cuando los nucleoides no se habían digerido con enzimas de restricción o nucleasas inespecíficas (datos no mostrados), lo que nos indica que hay fragmentos de DNA que se están desprendiendo de los bucles debido a fuerzas mecánicas ejercidas sobre el DNA en solución y no al corte específico de las enzimas, y por lo tanto con este método siempre habrá señal de los marcadores en el sobrenadante. Por otro lado, como se mencionó con anterioridad, existen fragmentos cortados que se re-

asocian con la MN; para obtener una estimación precisa del enriquecimiento de las señales en el *pellet* y en el sobrenadante, también debe hacerse una evaluación cuantitativa o semi-cuantitativa de estos fragmentos, de lo cual se prescinde por lo general en los trabajos mencionados.

6. El uso de controles positivos, LARs determinados *in vivo* o *in situ* por una serie de métodos, está ausente en los reportes citados. Los controles positivos usados en algunos de estos trabajos consisten en MARs determinados *in vitro*, fragmentos muy cortos del DNA que tienen cierta afinidad por la MN, pero cuyo contexto estructural se pierde al quebrantarse la continuidad de la molécula de DNA. Se sabe que hay un subconjunto de MARs que están formando los verdaderos anclajes *in situ* (Boulikas, 1995; Razin, 2001; Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010); lo que se desconoce hasta la fecha es si la continuidad estructural del DNA es necesaria para la actualización de MARs en LARs o para la preferencia de una MAR sobre otra para formar los anclajes *in situ*, y por lo tanto, el uso como control positivo en el ensayo de *pellet*-sobrenadante de MARs determinados *in vitro* debe tomarse con precaución.

III. Organización en bucles estructurales en quiescencia

La digestión por la DNasa I en los bucles estructurales de DNA, desprovistos de proteínas de la cromatina, producen cinéticas de digestión características, con tres fases diferenciables que pueden correlacionarse en sus primeras etapas con el grado de superenrollamiento de los bucles estructurales y en etapas posteriores, con el impedimento estérico que ejerce la MN en la acción de la DNasa I. De este modo, las cinéticas de digestión son un promedio de la acción de la DNasa I en la población total de bucles estructurales presentes en el núcleo de los hepatocitos. Estas cinéticas pueden verse aceleradas, como se observa en la **Figura 23**, si la integridad del DNA se ve comprometida por procesos naturales, como la replicación, en la cual tenemos un desenrollamiento del DNA causado por helicasas, y desnaturalización de la molécula y muescas (regiones de cadena sencilla) entre los fragmentos de Okazaki de la cadena rezagada (a las 24 horas post-hepatectomía), como por causas artificiales, como la introducción de muescas por la misma DNasa I utilizada en este sistema o la pérdida de superenrollamiento por daño al DNA (rupturas) durante la preparación de los nucleoides. Es por esta razón que la concentración de DNasa I debe ser muy baja para poder observar cinéticas de digestión estables y reproducibles.

La caracterización de las cinéticas de digestión es muy importante para el establecimiento de las zonas topológicas relativas a la MN de los bucles estructurales y poder reconstruir la organización de los bucles estructurales por el método de mapeo topológico (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010). Este mapeo se basa en el principio topológico elemental que permite establecer la configuración espacial de cualquier fibra flexible en función de la posición de distintos puntos de esta fibra relativa a un invariante de referencia posicional (Flegg, 2001). La magnitud de las zonas topológicas permite, dada la distancia entre dos o más secuencias blanco, y en función de la ubicación de los demás puntos vecinos, establecer cuántas secuencias blanco (puntos) puede contener una zona topológica. Esto es importante porque un mapeo en el que varias secuencias blanco estén en la misma zona topológica y no existan otros puntos de referencia, producirá varias alternativas de reconstrucción de los bucles estructurales. Por lo tanto, para establecer la organización de los bucles estructurales en el genoma de la rata en la región de 210 kb centrada en *c-myc* se diseñaron 22 pares de *primers* para amplificar el mismo número de secuencias blanco ubicadas regularmente a lo largo de la región. Tres factores se tomaron en cuenta para establecer la organización en bucles estructurales: la ubicación de las secuencias en las zonas topológicas con respecto a la MN, la distancia entre las secuencias en pb y la magnitud de las zonas topológicas. De este modo, observamos que en nucleoides de hepatocitos quiescentes, la región se organiza en al menos seis bucles estructurales, con tamaños de entre ~10 y ~40 kb, y que el gen *c-myc* está ubicado en el bucle estructural de mayor tamaño, con su 5' orientado hacia la MN y en una posición que es consistente con otros trabajos experimentales realizados en nuestro laboratorio (Maya-Mendoza, *et al.*, 2003). La organización de los bucles estructurales es una evidencia indirecta de que deben existir anclajes a la MN entre las secuencias **a-b**, **c-d**, **e-f**, **i-j**, **l-m**, **n-o**, **r-s** y **s-t** (**Figura 25**).

Un punto importante que debe recalarse es que las cinéticas de digestión son un promedio dentro de una población de núcleos de hepatocitos. Si bien nos hablan de la organización global de los bucles estructurales, la extrapolación directa de estas cinéticas de digestión a regiones particulares del genoma no es válida, como se puede observar en las **Figuras 23** y **25**: en nucleoides control, el DNA asociado a la MN después de 60 minutos de digestión es del 24.6%, mientras que en el esquema de los bucles estructurales la región embebida dentro de la MN es de ~10% de DNA. Dado que la curva de digestión es un promedio, el porcentaje de DNA embebido en la MN en otras regiones

del genoma será mayor (cerca del 40%) de modo que en el global se observa el porcentaje mencionado.

IV. Organización en bucles estructurales durante la replicación y retorno a la quiescencia

Recientemente se estableció, para una región rica en genes (el locus de la familia albúmina), que las secuencias se acercan secuencialmente a la MN durante la fase S, lo que es consistente con un modelo de replicación de carrete, en donde la maquinaria de replicación permanece fija y el DNA se acerca a ella para ser replicado. Para establecer si este mecanismo es aplicable en las regiones pobres en genes, como la estudiada en este trabajo, así como establecer la correlación entre los bucles estructurales y las unidades de replicación, se realizó el mapeo topológico para las 22 secuencias blanco cuya organización fue determinada en quiescencia, usando el modelo animal de hepatectomía parcial en el cual el estímulo de proliferación está determinado puntualmente. Es importante mencionar que los hepatocitos adultos raramente se dividen en el hígado saludable, por lo que los hepatocitos están en G0 en ratas control sin hepatectomizar. Posterior a la hepatectomía parcial (a las 24 horas) aproximadamente el 95% de los hepatocitos están en fase S; y a los 7 días post-hepatectomía parcial la masa hepática ha sido restablecida, los hepatocitos están nuevamente quiescentes y el proceso de regeneración ha concluido, como lo muestran indicadores bioquímicos y de expresión de genes. Por lo tanto, las poblaciones de hepatocitos para cada una de las muestras son homogéneas.

Se realizó el mapeo topológico de las secuencia blanco en nucleoides extraídos a las 24 horas post-hepatectomía, con resultados importantes. El primero, referente a la configuración global del DNA en los nucleoides: la cinética de digestión de los nucleoides a las 24 horas post-hepatectomía es más rápida desde sus primeras etapas, lo que nos habla de que el superenrollamiento no es igual que el observado en las ratas control. Como se mencionó con anterioridad, esto es debido al desenrollamiento del DNA, desnaturalización de la molécula y muescas entre los fragmentos de Okazaki de la cadena rezagada, todos estos fenómenos presentes durante la replicación del DNA.

El DNA de los nucleoides parcialmente digeridos se usó como templado para la amplificación de las diferentes secuencias blanco, y de acuerdo al patrón de amplificación las secuencias se ubicaron en las zonas topológicas correspondientes. Como en el caso los nucleoides de hepatocitos quiescentes, se utilizaron los criterios de distancia entre las secuencias blanco, posiciones de secuencias vecinas y amplitud de las zonas topológicas

según la cinética promedio para hacer la reconstrucción de los bucles estructurales. Como se puede observar en la **Tabla 4**, muchas de las secuencias experimentaron acercamientos a la MN durante la fase S, lo que es consistente con el mecanismo de replicación en carrete y el acercamiento del DNA a maquinarias de replicación fijas sobre la MN. La secuencia **q** experimenta el cambio de posición más notable, que de estar en una zona distal pasa a la zona proximal, cercana a la transición con muy cercana. Este acercamiento, aunado al hecho de que la secuencia **s** está en la zona proximal, produce la formación de un nuevo bucle, de ~10 kb, y la reducción de tamaño del bucle que contiene a las secuencias **o-r** de ~40 kb a ~30 kb, de modo que durante la fase S se observan al menos siete bucles estructurales, de entre 10 y 30 kb en tamaño.

La ultraestructura de una fábrica de replicación, que incluye varias maquinarias de replicación activas, así como un buen número de replicones y por consiguiente una extensión considerable de DNA, se antoja bastante compleja. Una pregunta obvia es cuál es el patrón de replicación de los LARs: al ser los más cercanos a la MN y a las fábricas de replicación no es ilógico pensar que son los primeros en ser replicados; pero los LARs son secuencias no codificantes y aunque ésta no es una regla absoluta (Weidtkamp-Peters, *et al.*, 2006), las regiones no codificantes son las últimas en replicarse. En el primer caso, si las LARs son de replicación temprana, un potencial problema de desconfiguración de los bucles estructurales surgiría cuando las LARs son expulsados de la fábrica de replicación. Éste se resolvería si LAR replicado se asociara inmediatamente con la MN. Por otro lado, si los LARs fueran de replicación tardía, el problema potencial de desconfiguración de los bucles estructurales estaría resuelto de antemano, ya que los anclajes no se perderían, mientras los LARs no se repliquen y salgan expulsados de la fábrica de replicación. Es decir, la organización en bucles estructurales podría mantenerse en dos casos:

1. Si los LARs se replican de manera temprana y se asocian inmediatamente con la MN.
2. Si los LARs se replican tardíamente y durante todo el proceso de replicación se mantienen asociados con la MN.

Cualquiera de estos dos casos puede estar ocurriendo en la región de *c-myc* durante la replicación, dado que la organización en bucles estructurales tiene cierto grado de conservación durante la fase S. Es notable, por ejemplo, la conservación del bucle que contiene a las secuencias **j-l** y a *c-myc* durante la fase S, aunque varias de sus secuencias hayan experimentado acercamientos a la MN.

Una característica importante de los modelos de replicación de carrete, en fábricas de replicación fijas, es que los bucles de DNA regresarán a su configuración original una vez terminado el proceso de replicación. Para ver si esto se cumplía para la región de *c-myc*, se realizó el mapeo topológico de las secuencias blanco con respecto a la MN en nucleoides obtenidos a partir de hepatocitos de rata a los 7 días post-hepatectomía, cuando la regeneración ha terminado y los hepatocitos vuelven a estar en G0. La curva de digestión de dichos nucleoides muestra las tres fases características ya descritas, y el porcentaje de DNA asociado a la MN después de 60 minutos de digestión es similar al de las ratas control. Sin embargo, la organización en bucles estructurales no es la misma que en las ratas control, sino que es similar a la encontrada en los nucleoides a las 24 horas post-hepatectomía parcial: al menos siete bucles estructurales, con tamaños de entre 10 y 30 kb. Sin embargo, resulta paradójico que los cambios en cuanto a posición relativa con respecto a la MN son aún más evidentes a los 7 días post-hepatectomía. Una hipótesis para explicar este fenómeno es que en regiones pobres en genes, o incluso en bucles estructurales que no contienen genes, en contraste con regiones ricas en genes como el locus de la familia albúmina, el restablecimiento de la organización de bucles estructurales está temporalmente desfasado del proceso de replicación. Consistente con esta hipótesis, el bucle que contiene a las secuencias *j-l* y a *c-myc*, se conserva durante la fase S y también cuando las células han regresado a quiescencia, aunque no idéntico al original, guardando la polaridad del gen con respecto a la MN y los sitios de anclaje (**Figura 25**).

El experimento obvio para comprobar esta hipótesis es la determinación de los bucles estructurales en etapas posteriores a la regeneración hepática. Se planteó que 21 días era una ventana de tiempo lo suficientemente amplia para observar el restablecimiento de los bucles estructurales, si éste se lleva a cabo.

La curva de digestión de los nucleoides a los 21 días post-hepatectomía es muy semejante a la observada en nucleoides de ratas control: tres fases diferenciables por las pendientes entre sus puntos, y un porcentaje de DNA asociado a la MN de 25.8%, indicios de que la organización global en bucles estructurales es similar en ambos tipos de nucleoides. Sin embargo, a los 21 días post-hepatectomía, las diferencias en la organización de los bucles estructurales es aún más obvia, ya que la secuencia *q* se recorre hacia otro bucle, reduciendo el tamaño del bucle en donde se situaba a los 7 días post-hepatectomía, y aumentando el tamaño del bucle que la contiene a los 21 días post-hepatectomía. También es notable la conservación en estos nucleoides del bucle estructural que contiene a las secuencias *j-l* y a *c-myc* (**Figura 29**).

Es importante mencionar que, si bien hay regiones no codificantes en el área de estudio que no sufrieron cambios dramáticos en la configuración en bucles estructurales, como la delimitada por las secuencias correspondientes a los amplicones **a-g**, la región comprendida entre las secuencias **o-r**, que tampoco contiene secuencias codificantes, sufrió el cambio más dramático observado en toda la región. Por otro lado, en el bucle estructural que incluye al gen *c-myc*, delimitado por las secuencias correspondientes a los amplicones **j** y **l**, los cambios registrados son mínimos y resultan del acercamiento de las secuencias a la MN durante el pico de síntesis de DNA, a las 24 hrs post-hepatectomía, y en ningún modo a la reducción permanente del tamaño del bucle ni a la actualización de MARs en LARs. Este bucle que contiene a *c-myc* se conserva de manera sorprendente en los tiempos post-hepatectomía examinados en el presente trabajo. El significado biológico de este fenómeno podría estar relacionado con un mecanismo que mantiene la configuración de los bucles estructurales que contienen a los genes, aún después de transiciones nucleares importantes como la replicación del DNA, como se ha observado en el locus de la familia albúmina (Rivera-Mulia, *et al.*, 2011), así como en el caso de otros genes en hepatocitos (*β-actina*, *colágena tipo I* e *IP3-R3*) cuyo acercamiento a la MN durante el pico de síntesis de DNA, y posterior retorno a su posición original cuando las células vuelven al estado de quiescencia, se documentaron por trabajos experimentales de nuestro laboratorio (Maya-Mendoza, *et al.*, 2003). Este mecanismo podría estar dictado por la configuración local de la cromatina: mientras que regiones no codificantes del DNA constituyen la heterocromatina, las regiones codificantes están formadas por eucromatina, si se están expresando de forma activa, o heterocromatina facultativa, si tienen potencial de expresión aunque no se estén transcribiendo activamente.

In vivo las proteínas de la cromatina podrían impedir interacciones DNA-MN potenciales, compitiendo con la MN por cualquier secuencia o configuración del DNA. Por consiguiente la configuración de la cromatina cerca de genes potencialmente activos puede contribuir a la selección del subconjunto de LARs a partir del conjunto de MARs potenciales en una región rica en genes, conduciendo a un OSON que permanece similar a través de varios ciclos celulares. Por otro lado, en una región pobre en genes la conformación de la cromatina promedio asociada con DNA no codificante parece competir poco con la MN por secuencias o configuraciones del DNA, de modo que después de la replicación del DNA o la mitosis el restablecimiento de las interacciones DNA-MN en una región genómica no codificante puede estar guiada de forma primaria por restricciones estructurales resultantes de la tensión torsional y de doblez a lo largo del DNA, tensión

que necesita disiparse para preservar la integridad estructural del DNA, y esto conduciría a una re-organización mayor de las interacciones DNA-MN locales (Castillo-Mora y Aranda-Anzaldo, 2012).

V. Mecanismo general de replicación: variantes del modelo de carrete

En un estudio previo (Rivera-Mulia, 2010) se propusieron dos modelos alternativos del mecanismo general de duplicación de los bucles estructurales del DNA; en uno de ellos, llamado de encarrilamiento, la maquinaria de replicación se desplaza a lo largo del templado de DNA, duplicándolo a medida que lo recorre. En una primera variante de este modelo se propone que la configuración de los bucles estructurales del DNA se conserva durante el proceso de replicación; sin embargo, mediante el empleo de diversas estrategias experimentales, se ha demostrado que las polimerasas activas y el DNA recién sintetizado se asocian a la MN y resisten a la elución y corte por nucleasas (McCready, *et al.*, 1980; Jackson y Cook, 1986b; Jackson y Cook, 1986a; Nakayasu y Berezney, 1989; Hassan y Cook, 1993; Hozak, *et al.*, 1993). Asimismo, el DNA recién sintetizado está concentrado en sitios granulares discretos, implicando que las polimerasas no se encuentran libres en toda la hebra de DNA (Ma, *et al.*, 1998). Si la maquinaria de replicación se encontrara encarrilada sobre el templado de DNA en el momento de la extracción, la actividad de polimerasa no se hubiera detectado en la fracción de la MN, y los movimientos de las secuencias blanco mapeadas tanto en zonas ricas en genes (Rivera-Mulia, *et al.*, 2011) como en zonas pobres en genes, como la de *c-myc* descrita en este trabajo (Castillo-Mora y Aranda-Anzaldo, 2012), distribuidas a lo largo de los diferentes bucles estructurales, serían indetectables durante el proceso de replicación.

En una segunda variante del modelo de encarrilamiento, la estructura de los bucles estructurales se ve perturbada al colapsarse éstos sobre las fábricas de replicación, donde se concentran las proteínas de la maquinaria de replicación, ensambladas sobre la MN; la maquinaria experimenta un movimiento acotado dentro de la fábrica de replicación, mientras duplica el DNA. Los trabajos experimentales de nuestro laboratorio, así como ciertos argumentos teóricos, contradicen este modelo: si bien se observan cambios en las posiciones de las secuencias ubicadas a lo largo de los bucles estructurales durante el proceso de duplicación, existe cierta coherencia en la estructura de los bucles, ya que hay secuencias que siguen estando más distales que otras con respecto a la MN, y en ningún caso se observa que todas las secuencias sean resistentes

a la digestión con DNasa I, que sería el caso de un bucle completamente colapsado sobre la MN. Por otro lado el colapso de varios bucles (de 5 a 50 replicones adyacentes; Blow y Ge, 2008) de DNA de 80 kb en promedio, sobre una fábrica de replicación de aproximadamente 70 nm de diámetro, potencialmente podría causar daño estructural en la molécula de DNA, lo que sería costoso para la célula.

El modelo de carrete propone que la maquinaria de duplicación permanece fija sobre la MN y las diferentes regiones del bucle estructural se mueven hacia ésta, no todas en forma simultánea, sino manteniendo orden y coherencia en las relaciones de posición: las secuencias más cercanas a la MN en quiescencia serán las primeras en acercarse a la MN durante la replicación, mientras que las secuencias posicionadas en regiones topológicas más distales se acercarán posteriormente. A medida que el DNA está siendo duplicado, el DNA recién sintetizado sale expulsado de la fábrica de replicación (Cook, 1999). Estos modelos son energéticamente más favorables para el proceso de replicación y resuelven ciertos problemas topológicos generados en el mismo proceso.

Los resultados de este trabajo y otros previos indican que este mecanismo en carrete puede ser el que se está llevando a cabo en hepatocitos *in vivo* durante la regeneración hepática. Particularmente en la zona de *c-myc* se observa que si bien la región comprendida entre los amplicones **a-g** no experimenta cambios significativos en cuanto al número de bucles, sí existe un acercamiento de todas las secuencias (**a**, **b**, **c**, **d**, **e** y **f**) a la MN durante el pico de replicación, a las 24 horas post-hepatectomía (**Figura 25**). Los cambios en la configuración en bucles estructurales en región comprendida entre los amplicones **h-u** son más evidentes: aunque la mayoría de las secuencias se acercan a la MN aún es posible distinguir la organización en bucles estructurales, lo que nos habla de que estos se conservan aún durante el proceso de replicación, como se plantea en el modelo de carrete.

El replicón se define como el tracto de DNA replicado a partir de un sólo origen de replicación (Blow y Ge, 2008). Existen evidencias de que la replicación en metazoarios inicia en sitios aleatorios dentro de una región probabilística de inicio de replicación, y que existen muchos más sitios potenciales de inicio que los que actualmente se usan en la célula y que pueden dispararse en circunstancias determinadas, por ejemplo, cuando una horquilla se detiene por daño en el DNA (Blow, *et al.*, 2011). Se ha observado en sistemas poco complejos e *in vitro* que las horquillas de replicación pueden viajar de forma unidireccional o bi-direccional (Santamaria, *et al.*, 2000; Marheineke, *et al.*, 2005) y aunque las tasas de replicación son similares en horquillas que parten de un sólo origen,

a nivel de genoma exhiben una variabilidad importante (de 0.14 a 11.8 kb/min; Conti, *et al.*, 2007).

Todos estos resultados sugieren que el replicón es una entidad dinámica y que los replicones pueden estar delimitados en forma diferencial durante cada una de las fases S de una misma célula.

Podríamos predecir que la dinámica de la replicación será diferente para cada ciclo celular en los bucles estructurales del DNA que no contienen genes. Por ejemplo, en este trabajo, la región comprendida entre los amplicones **o** y **s** experimenta cambios dramáticos, reduciéndose el tamaño de uno de los bucles de ~40 a ~30 kb, y generándose uno nuevo de ~10 kb. Ambos bucles se conservan aún cuando el proceso de regeneración ha concluido. Estos cambios podrían implicar el uso de nuevos orígenes de replicación para un siguiente ciclo celular, origen que no se utilizó en el ciclo celular previo porque la organización de los bucles estructurales no era permisiva para el uso de ese origen.

En un intento por reconciliar todos estos datos y establecer una correlación entre los replicones y los bucles estructurales de DNA, se plantean algunas variantes del modelo de carrete que toman en cuenta la direccionalidad de las horquillas de replicación y la activación diferencial de los orígenes de replicación potenciales asociados con la MN. En el primer modelo se plantea que existe un sólo origen de replicación activo en un bucle estructural, ubicado dentro o en cercana vecindad con un LAR, y que la progresión de la replicación es unidireccional (**Figura 32**, A). En este bucle tentativo existen secuencias muy cercanas, proximales y distales con respecto a la MN. De acuerdo a este modelo, las secuencias más cercanas al origen de replicación (secuencia **d**) es la primera en acercarse a la MN a medida que progresa la replicación, mientras que la secuencia **a**, siendo la más lejana al origen de replicación, aunque no la más distal con respecto a la MN, sería la última en acercarse a esta estructura. En etapas intermedias de la replicación existirían tres bucles potenciales (dos correspondientes a la fracción que ya ha sido replicada y uno correspondiente a la fracción del bucle que aún no lo es) de aproximadamente la mitad del tamaño del bucle estructural original. Eventualmente el DNA del bucle estructural es completamente replicado. La estructura del bucle estructural original, así como la estructura de los bucles recién sintetizados, se conservarían tanto si el LAR es duplicado tempranamente y se vuelve a asociar con la MN inmediatamente después de ser duplicado como si el LAR es de replicación tardía y no se separa de la MN mientras el proceso de replicación tiene lugar en el resto del bucle.

En una segunda variante del modelo de replicación por el mecanismo de carrete se tienen dos orígenes de replicación, uno dentro o en cercana vecindad con cada uno de los LARs que delimitan el bucle estructural del DNA, así como secuencias muy cercanas (secuencia *d*), proximales (secuencias *a* y *c*) y distales (secuencia *b*) con respecto a la MN (**Figura 32**, B). En este caso, las secuencias más cercanas a los orígenes de replicación, que también son las más cercanas a la MN, son las primeras en acercarse, con la formación transitoria de cinco bucles estructurales (cuatro correspondientes a la fracción del DNA que ya ha sido replicada y uno correspondiente a la que aún no lo es) y un estado intermedio de dos bucles cuyo anclaje intermedio corresponde a la región originalmente más distal con respecto a la MN. Para restablecer la organización original en bucles estructurales sería necesario que este anclaje transitorio se libere de la MN. De nuevo, el hecho de que los LARs sean de replicación temprana o tardía, no implicaría ninguna diferencia mientras permanezcan anclados a la MN. Sin embargo existe la posibilidad de que los anclajes transitorios no se despeguen de la MN, y tomando en cuenta que las horquillas de replicación pueden progresar a diferentes velocidades, un mecanismo de este tipo puede rendir una organización en bucles estructurales fundamentalmente diferente después de la replicación del DNA.

De forma similar, la tercera variante del modelo propone la existencia de un sólo origen de replicación bidireccional, lo que sería suficiente para duplicar el DNA de dos bucles estructurales adyacentes (**Figura 32**, C). En este caso, el origen de replicación se encontraría dentro, o en cercana vecindad, con el LAR, y al ser replicado tempranamente sería expulsado de la fábrica de replicación y despegado de la MN; en los estados intermedios de este modelo, se formarían cuatro bucles, dos correspondientes a la fracción de los bucles estructurales que ya ha sido replicada y otros dos, decrecientes en tamaño, correspondientes a la fracción que aún no ha sido replicada. Los bucles resultantes son del doble del tamaño del bucle original, ya que comprenden los dos bucles estructurales originales. Para restablacer el tamaño original de los bucles se requiere que alguna región dentro de los bucles replicados se re-asocie con la MN; la probabilidad de que sea el mismo LAR que originalmente se encontraba asociado con la MN depende de la presencia de otros MARs en la región y de la afinidad que éstas MARs tengan por la MN. Bajo este esquema, los bucles resultantes después de la replicación pueden ser diferentes a aquellos encontrados en quiescencia, como en el caso de la variante anterior.

De acuerdo con los datos de los movimientos de las diferentes secuencias blanco situadas a lo largo de la región de estudio, estos tres mecanismos podrían estar teniendo

lugar en diferentes regiones, dado que no son mutuamente excluyentes. Por ejemplo, en la región delimitada por las secuencias correspondientes a los amplicones **a-g**, al no experimentar cambios sustanciales en la configuración de los bucles estructurales durante ni después del proceso de replicación, podría estar operando un mecanismo de carrete similar al primero propuesto en este trabajo. Para el caso de la región comprendida entre los amplicones **o-r** el mecanismo operante podría ser cualquiera de los dos en los que se pierde la interacción DNA-MN, dada la formación no transitoria de un nuevo bucle de ~10 kb. Este nuevo bucle podría estar constituyendo un nuevo replicón en ciclos celulares posteriores. Sin embargo, el método usado en este trabajo no permite discernir los detalles finos del mecanismo de replicación, por lo que sólo pueden plantearse hipótesis a este respecto.

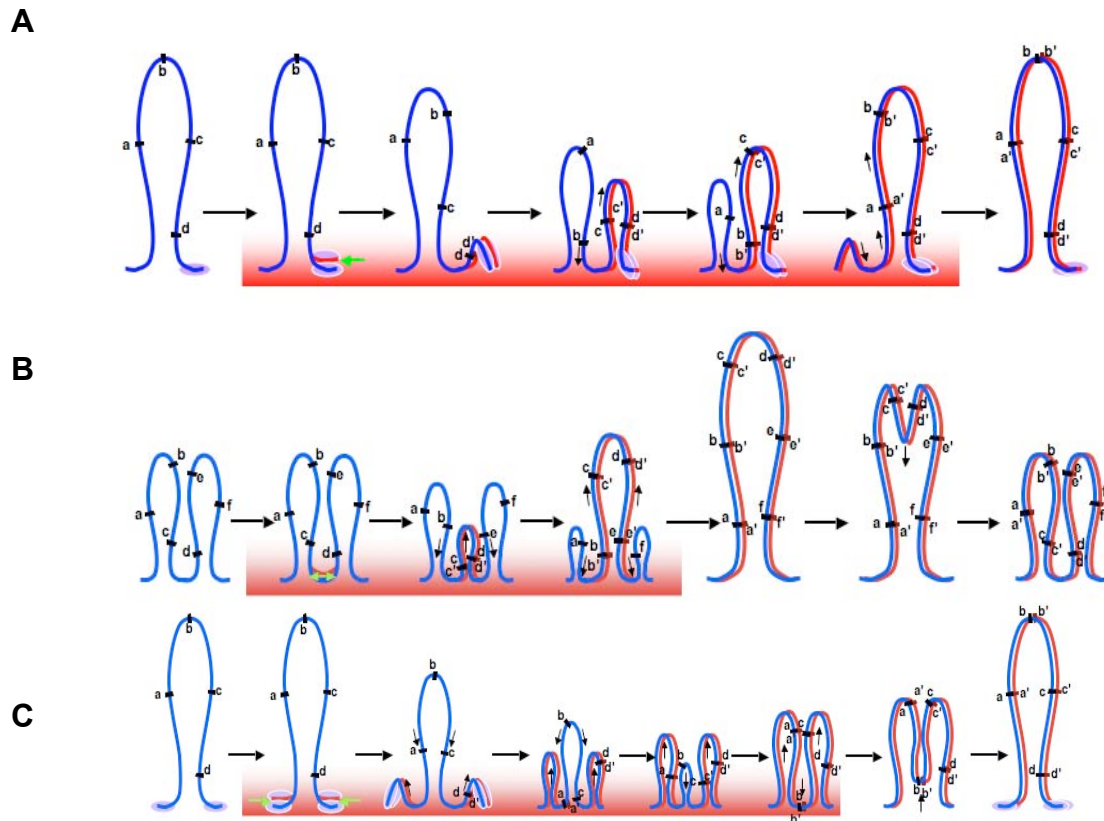


Figura 32. Variantes del mecanismo de replicación por carrete. **A**, se muestra el acercamiento de las secuencias a la MN cuando un bucle se replica a partir de un sólo origen de replicación, situado muy cerca del anclaje estructural. En esta variante se generan dos bucles durante la replicación, pero dado que no se pierden los anclajes estructurales, los bucles resultantes son iguales al que existía antes de la replicación. **B**, se muestra la replicación de dos bucles a partir de un sólo origen de replicación, bidireccional. Esta variante plantea el problema de que el restablecimiento de los bucles estructurales originales sólo puede llevarse a cabo si el LAR que se actualiza es el mismo en ambos bucles, pero esto puede depender de la existencia de otras zonas que tengan afinidad por la MN en la región. **C**, se muestra la replicación de un sólo bucle a partir de un sólo origen de replicación. Una vez más, el restablecimiento de los bucles estructurales depende de la afinidad de ciertas secuencias a la MN. Las letras representan secuencias blanco sobre los bucles hipotéticos; las letras con apóstrofe representan secuencias que ya fueron replicadas; las flechas representan orígenes de replicación, y las puntas indican la dirección de las horquillas de replicación; los óvalos representan orígenes de replicación; los rectángulos sombreados en la base de los bucles representan las fábricas de replicación y la fase S del ciclo celular.

VI. Organización en bucles estructurales posterior a la finalización del proceso de regeneración hepática post-hepatectomía

La organización en bucles estructurales del DNA en locus de la familia albúmina, rica en genes, regresó a su configuración original después del proceso de replicación, cuando la regeneración hepática había concluido a los 7 días post-hepatectomía (Rivera-Mulia, *et al.*, 2011), mientras que en la región estudiada en este trabajo, con excepción del bucle que contiene a *c-myc*, no se restableció la configuración original en la misma ventana de tiempo. Este hecho condujo al planteamiento de la hipótesis de que el restablecimiento de los bucles estructurales podría estar temporalmente desfasado del proceso de replicación. Para probar esta hipótesis se realizó el mapeo topológico de las secuencias en nucleoides de ratas a los 21 días post-hepatectomía y a los 3 meses post-hepatectomía. La curva de digestión de los nucleoides a los 21 días post-hepatectomía es un primer indicio de que la organización global de los bucles estructurales es muy semejante a la descrita en nucleoides control, ya que los porcentajes y las pendientes son similares en ambas curvas. Por lo tanto, el superenrollamiento y el DNA protegido de la digestión con DNasa I por su proximidad con la MN, es decir, los LARs, deben ser semejantes en ambos casos. En contraste, en la curva de digestión de nucleoides a los 3 meses post-hepatectomía se observa que después de 30 minutos de digestión el porcentaje de DNA asociado con la MN no disminuye significativamente, de modo que a los 60 minutos de digestión el porcentaje de DNA asociado con la MN es de 30.6%. En nucleoides de ratas envejecidas (540 días, 1.4 años), se observa un porcentaje de DNA asociado a la MN de 40.1% (Maya-Mendoza, *et al.*, 2005). Este porcentaje de DNA correlaciona con una estabilización de las interacciones MN-DNA que progresa a medida que el animal envejece, aunque las células no hayan sufrido rondas consecutivas de proliferación, y que se correlaciona con una pérdida del potencial de proliferación (Aranda-Anzaldo, 2009). El fenómeno observado en este trabajo podría estar mimetizando los efectos del envejecimiento: si bien a los 21 días post-hepatectomía no es tiempo suficiente para observar los efectos del envejecimiento en la re-organización global de los bucles estructurales, a los 3 meses post-hepatectomía el animal ya ha vivido 180 días, por lo que se considera como “envejecido” y por lo tanto era lógico esperar que hubiera más DNA asociado con la MN, es decir, menos sensible a la digestión con DNasa I. Otro fenómeno que nos podría estar hablando del envejecimiento de estas células es la expresión basal de *PCNA* y *c-myc*, cuyos niveles son inferiores a los encontrados en hepatocitos de ratas control.

CONCLUSIONES

- Las herramientas bioinformáticas usadas para la predicción de secuencias MAR producen resultados que carecen de valor intrínseco a menos que se corroboren con métodos experimentales.
- El ensayo *pellet-sobrenadante*, usado ampliamente para determinar las zonas de anclaje a la MN y la configuración en bucles estructurales del DNA, tiene limitantes notables que introducen sesgos en los resultados que produce.
- En quiescencia, la región genómica de 210 kb centrada en *c-myc* se organiza en al menos seis bucles estructurales, con tamaños de entre ~10 y ~40 kb. El gen *c-myc* se ubica en el mayor bucle estructural, de ~40 kb, con su 5' orientado hacia la MN. Esta organización en bucles estructurales es una evidencia indirecta de la existencia de al menos ocho anclajes a la MN en esta región genómica.
- Durante la fase S del ciclo celular, se observa un acercamiento a la MN de las secuencias de DNA presentes en los bucles estructurales. Este acercamiento ocurre de forma secuencial, lo que es consistente con un modelo de replicación en carrete para el DNA *in vivo*
- Durante la fase S del ciclo celular, el acercamiento de las secuencias de DNA a la MN y la actualización de un anclaje producen el re-ordenamiento de la región genómica de 210 kb centrada en *c-myc* en al menos siete bucles estructurales, de entre 10 y 30 kb, y al menos nueve anclajes a la MN.
- La organización en bucles estructurales del DNA en la región genómica de 210 kb centrada en *c-myc* no se restablece al término de los procesos de replicación del DNA y regeneración hepática, ya que se observan siete bucles estructurales, con tamaños de entre 10 y 30 kb.
- Los cambios más dramáticos en la organización en bucles estructurales se observan en las zonas no codificantes de la región genómica estudiada. En contraste, la ubicación de los anclajes del bucle estructural que contiene a *c-myc*, así como la polaridad del gen con respecto a la MN, se conservan tanto en la fase S del ciclo celular como en quiescencia, una vez terminado el proceso de regeneración hepática. La configuración local de la cromatina que contiene genes activos o potencialmente activos podría estar determinando la conservación de la organización en bucles estructurales de las regiones codificantes.

- Tres meses después de la hepatectomía parcial se observa una homogeneización del tamaño de los bucles, así como un incremento en el porcentaje de DNA asociado con la MN que resulta en la formación de un nuevo bucle. Ambos fenómenos se asocian con una pérdida del potencial de proliferación de los hepatocitos relacionada con el envejecimiento.

REFERENCIAS

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. 1994. *Molecular biology of the cell*, USA, Garland Publishing.
- Albrethsen J, Knol JC, Jimenez CR. 2009. Unravelling the nuclear matrix proteome. *J Proteomics*. 72, 71-81.
- Alva-Medina J, Dent MA, Aranda-Anzaldo A. 2010. Aged and post-mitotic cells share a very stable higher-order structure in the cell nucleus in vivo. *Biogerontology*. 11, 703-16.
- Anachkova B, Djeliova V, Russev G. 2005. Nuclear matrix support of DNA replication. *J Cell Biochem*. 96, 951-61.
- Aranda-Anzaldo A. 1989. On the role of chromatin higher-order structure and mechanical interactions in the regulation of gene expression. *Speculat Sci Technol*. 12, 163-176.
- Aranda-Anzaldo A. 2009. A structural basis for cellular senescence. *Aging (Albany NY)*. 1, 598-607.
- Aranda-Anzaldo A, Dent MA. 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, Maya-Mendoza A, E. G-V, Gariglio P 1998. Organización estructural y funcional del DNA en el núcleo celular. *Genética y Biomedicina Molecular*. México: LIMUSA.
- Aranda-Anzaldo A, Orozco-Velasco F, Garcia-Villa E, Gariglio P. 1999. p53 is a rate-limiting factor in the repair of higher-order DNA structure. *Biochim Biophys Acta*. 1446, 181-92.
- Arents G, Moudrianakis EN. 1993. Topography of the histone octamer surface: repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90, 10489-93.
- Becker F. 1974. *The liver*, USA, Marcel Dekker Inc.
- Benham C, Kohwi-Shigematsu T, Bode J. 1997. Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *J Mol Biol*. 274, 181-96.
- Berezney R, Buchholtz LA. 1981. Dynamic association of replicating DNA fragments with the nuclear matrix of regenerating liver. *Exp Cell Res*. 132, 1-13.
- Berezney R, Coffey DS. 1974. Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Commun*. 60, 1410-7.
- Berezney R, Coffey DS. 1975. Nuclear protein matrix: association with newly synthesized DNA. *Science*. 189, 291-3.

Berezney R, Coffey DS. 1977. Nuclear matrix. Isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei. *J Cell Biol.* 73, 616-37.

Berezney R, Wei X. 1998. The new paradigm: integrating genomic function and nuclear architecture. *J Cell Biochem Suppl.* 30-31, 238-42.

Berrios M, Osheroff N, Fisher PA. 1985. In situ localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of the Drosophila nuclear matrix fraction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82, 4142-6.

Bickmore WA, Oghene K. 1996. Visualizing the spatial relationships between defined DNA sequences and the axial region of extracted metaphase chromosomes. *Cell.* 84, 95-104.

Blow JJ, Ge XQ. 2008. Replication forks, chromatin loops and dormant replication origins. *Genome Biol.* 9, 244.

Blow JJ, Ge XQ, Jackson DA. 2011. How dormant origins promote complete genome replication. *Trends Biochem Sci.* 36, 405-14.

Bode J, Kohwi Y, Dickinson L, Joh T, Klehr D, Mielke C, Kohwi-Shigematsu T. 1992. Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. *Science.* 255, 195-7.

Bode J, Winkelmann S, Gotze S, Spiker S, Tsutsui K, Bi C, A KP, Benham C. 2006. Correlations between scaffold/matrix attachment region (S/MAR) binding activity and DNA duplex destabilization energy. *J Mol Biol.* 358, 597-613.

Boulikas T. 1995. Chromatin domains and prediction of MAR sequences. *Int Rev Cytol.* 162A, 279-388.

Buongiorno-Nardelli M, Micheli G, Carri MT, Marilley M. 1982. A relationship between replicon size and supercoiled loop domains in the eukaryotic genome. *Nature.* 298, 100-2.

Byrd K, Corces VG. 2003. Visualization of chromatin domains created by the gypsy insulator of Drosophila. *J Cell Biol.* 162, 565-74.

Cai S, Lee CC, Kohwi-Shigematsu T. 2006. SATB1 packages densely looped, transcriptionally active chromatin for coordinated expression of cytokine genes. *Nat Genet.* 38, 1278-88.

Castillo-Mora R. 2005. Mapeo posicional de secuencias génicas con respecto a la matriz nuclear en hepatocitos de rata de edad avanzada sometidos a proliferación. *Tesis de Licenciatura.* Universidad Autónoma del Estado de México.

Castillo-Mora RC, Aranda-Anzaldo A. 2012. Reorganization of the DNA-Nuclear matrix interactions in a 210 kb genomic region centered on c-myc after DNA replication in vivo. *J Cell Biochem.*

Cavalli G. 2007. Chromosome kissing. *Curr Opin Genet Dev.* 17, 443-50.

Ciejek EM, Tsai MJ, O'malley BW. 1983. Actively transcribed genes are associated with the nuclear matrix. *Nature*. 306, 607-9.

Cockerill PN. 2011. Structure and function of active chromatin and DNase I hypersensitive sites. *FEBS J*. 278, 2182-210.

Cockerill PN, Garrard WT. 1986a. Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell*. 44, 273-82.

Cockerill PN, Garrard WT. 1986b. Chromosomal loop anchorage sites appear to be evolutionarily conserved. *FEBS Lett*. 204, 5-7.

Cockerill PN, Yuen MH, Garrard WT. 1987. The enhancer of the immunoglobulin heavy chain locus is flanked by presumptive chromosomal loop anchorage elements. *J Biol Chem*. 262, 5394-7.

Conti C, Sacca B, Herrick J, Lalou C, Pommier Y, Bensimon A. 2007. Replication fork velocities at adjacent replication origins are coordinately modified during DNA replication in human cells. *Mol Biol Cell*. 18, 3059-67.

Cook PR. 1995. A chromomeric model for nuclear and chromosome structure. *J Cell Sci*. 108 (Pt 9), 2927-35.

Cook PR. 1999. The organization of replication and transcription. *Science*. 284, 1790-5.

Cook PR. 2010. A model for all genomes: the role of transcription factories. *J Mol Biol*. 395, 1-10.

Cook PR, Brazell IA. 1975. Supercoils in human DNA. *J Cell Sci*. 19, 261-79.

Cook PR, Brazell IA. 1978. Spectrofluorometric measurement of the binding of ethidium to superhelical DNA from cell nuclei. *Eur J Biochem*. 84, 465-77.

Cook PR, Brazell IA, Jost E. 1976. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J Cell Sci*. 22, 303-24.

Cook PR, Lang J, Hayday A, Lania L, Fried M, Chiswell DJ, Wyke JA. 1982. Active viral genes in transformed cells lie close to the nuclear cage. *EMBO J*. 1, 447-52.

Corbin IR, Buist R, Volotovskyy V, Peeling J, Zhang M, Minuk GY. 2002. Regenerative activity and liver function following partial hepatectomy in the rat using (31)P-MR spectroscopy. *Hepatology*. 36, 345-53.

Cremer T, Kupper K, Dietzel S, Fakan S. 2004. Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function. *Biol Cell*. 96, 555-67.

Depamphilis ML 1996. Replication origins in metazoan chromosomes. *In: Blow JJ (ed.) Eukaryotic DNA Replication*. Oxford: IRL Press.

Dimitrova DS, 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.

Djeliova V, Russev G, Anachkova B. 2001. Dynamics of association of origins of DNA replication with the nuclear matrix during the cell cycle. *Nucleic Acids Res.* 29, 3181-7.

Earnshaw WC, Halligan B, Cooke CA, Heck MM, Liu LF. 1985. Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds. *J Cell Biol.* 100, 1706-15.

Eivazova ER, Gavrilov A, Pirozhkova I, Petrov A, Iarovaia OV, Razin SV, Lipinski M, Vassetzky YS. 2009. Interaction in vivo between the two matrix attachment regions flanking a single chromatin loop. *J Mol Biol.* 386, 929-37.

Evans K, Ott S, Hansen A, Koentges G, Wernisch L. 2007. A comparative study of S/MAR prediction tools. *BMC Bioinformatics.* 8, 71.

Fabrikant JI. 1968. The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. *J Cell Biol.* 36, 551-65.

Farache G, Razin SV, Targa FR, Scherrer K. 1990. Organization of the 3'-boundary of the chicken alpha globin gene domain and characterization of a CR 1-specific protein binding site. *Nucleic Acids Res.* 18, 401-9.

Flegg HG. 2001. *From geometry to topology*, USA, Dover Publications.

Freshney I. 1994. *Culture of animal cells*, USA, Wiley-Liss.

Frisch M, Frech K, Klingenhoff A, Cartharius K, Liebich I, Werner T. 2002. In silico prediction of scaffold/matrix attachment regions in large genomic sequences. *Genome Res.* 12, 349-54.

Gavrilov AA, Razin SV. 2008a. Spatial configuration of the chicken alpha-globin gene domain: immature and active chromatin hubs. *Nucleic Acids Res.* 36, 4629-40.

Gavrilov AA, Razin SV. 2008b. Study of spatial organization of chicken alpha-globin gene domain by 3C technique. *Biochemistry (Mosc).* 73, 1192-9.

Gerdes MG, Carter KC, Moen PT, Jr., Lawrence JB. 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.

Gilbert DM. 2001. Making sense of eukaryotic DNA replication origins. *Science.* 294, 96-100.

Gombert WM, Farris SD, Rubio ED, Morey-Rosler KM, Schubach WH, Krumm A. 2003. The c-myc insulator element and matrix attachment regions define the c-myc chromosomal domain. *Mol Cell Biol.* 23, 9338-48.

Greenbaum LE, Li W, Cressman DE, Peng Y, Ciliberto G, Poli V, Taub R. 1998. CCAAT enhancer-binding protein beta is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *J Clin Invest.* 102, 996-1007.

Gromova, Ii, Nielsen OF, Razin SV. 1995a. 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.

Gromova, Ii, Thomsen B, Razin SV. 1995b. 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, 102-6.

Hamlin JL. 1992. Initiation of replication in mammalian chromosomes. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2, 359-81.

Hassan AB, Cook PR. 1993. Visualization of replication sites in unfixed human cells. *J Cell Sci.* 105 (Pt 2), 541-50.

He DC, Nickerson JA, Penman S. 1990. Core filaments of the nuclear matrix. *J Cell Biol.* 110, 569-80.

Hendzel MJ, Boisvert F, Bazett-Jones DP. 1999. Direct visualization of a protein nuclear architecture. *Mol Biol Cell.* 10, 2051-62.

Heng HH, Goetze S, Ye CJ, Liu G, Stevens JB, Bremer SW, Wykes SM, Bode J, Krawetz SA. 2004. Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. *J Cell Sci.* 117, 999-1008.

Higgins G, Anderson R. 1931. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol.* 12.

Hozak P, Hassan AB, Jackson DA, Cook PR. 1993. Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton. *Cell.* 73, 361-73.

Hozak P, Jackson DA, Cook PR. 1994. Replication factories and nuclear bodies: the ultrastructural characterization of replication sites during the cell cycle. *J Cell Sci.* 107 (Pt 8), 2191-202.

Iarovaia O, Hancock R, Lagarkova M, Miassod R, Razin SV. 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, 302-8.

Iarovaia OV, Akopov SB, Nikolaev LG, Sverdlov ED, Razin SV. 2005. Induction of transcription within chromosomal DNA loops flanked by MAR elements causes an association of loop DNA with the nuclear matrix. *Nucleic Acids Res.* 33, 4157-63.

Iarovaia OV, Borounova V, Vassetzky YS, Razin SV. 2006. An unusual extended DNA loop attachment region is located in the human dystrophin gene. *J Cell Physiol.* 209, 515-21.

Iarovaia OV, Bystritskiy A, Ravcheev D, Hancock R, Razin SV. 2004. Visualization of individual DNA loops and a map of loop domains in the human dystrophin gene. *Nucleic Acids Res.* 32, 2079-86.

Iarovaia OV, Lagarkova MA, Razin SV. 1995. The specificity of human lymphocyte nucleolar DNA long-range fragmentation by endogenous topoisomerase II and exogenous Bal 31 nuclease depends on cell proliferation status. *Biochemistry.* 34, 4133-8.

Jackson DA. 1991. Structure-function relationships in eukaryotic nuclei. *Bioessays.* 13, 1-10.

Jackson DA. 2003. The principles of nuclear structure. *Chromosome Res.* 11, 387-401.

Jackson DA, Cook PR. 1985a. A general method for preparing chromatin containing intact DNA. *EMBO J.* 4, 913-8.

Jackson DA, Cook PR. 1985b. Transcription occurs at a nucleoskeleton. *EMBO J.* 4, 919-25.

Jackson DA, Cook PR. 1986a. A cell-cycle-dependent DNA polymerase activity that replicates intact DNA in chromatin. *J Mol Biol.* 192, 65-76.

Jackson DA, Cook PR. 1986b. Different populations of DNA polymerase alpha in HeLa cells. *J Mol Biol.* 192, 77-86.

Jackson DA, Cook PR, Patel SB. 1984. Attachment of repeated sequences to the nuclear cage. *Nucleic Acids Res.* 12, 6709-26.

Jackson DA, Dickinson P, Cook PR. 1990. The size of chromatin loops in HeLa cells. *EMBO J.* 9, 567-71.

Jackson DA, Hassan AB, Errington RJ, Cook PR. 1993. Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *EMBO J.* 12, 1059-65.

Jackson DA, Iborra FJ, Manders EM, Cook PR. 1998. Numbers and organization of RNA polymerases, nascent transcripts, and transcription units in HeLa nuclei. *Mol Biol Cell.* 9, 1523-36.

Jackson DA, 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.

Jost JP, Seldran M. 1984. Association of transcriptionally active vitellogenin II gene with the nuclear matrix of chicken liver. *EMBO J.* 3, 2005-8.

Kalandadze AG, Bushara SA, Vassetzky YS, Jr., Razin SV. 1990. Characterization of DNA pattern in the site of permanent attachment to the nuclear matrix located in the vicinity of replication origin. *Biochem Biophys Res Commun.* 168, 9-15.

Kallappagoudar S, Varma P, Pathak RU, Senthilkumar R, Mishra RK. 2010. Nuclear matrix proteome analysis of *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Proteomics.* 9, 2005-18.

Kaneoka H, Miyake K, Iijima S. 2009. Interactions between the nuclear matrix and an enhancer of the tryptophan oxygenase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 387, 717-22.

Klaus AV, Mccarrey JR, Farkas A, Ward WS. 2001. Changes in DNA loop domain structure during spermatogenesis and embryogenesis in the Syrian golden hamster. *Biol Reprod.* 64, 1297-306.

Kornberg RD. 1974. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science.* 184, 868-71.

Krajewski WA, Razin SV. 1992. Organization of specific DNA sequence elements in the region of the replication origin and matrix attachment site in the chicken alpha-globin gene domain. *Mol Gen Genet.* 235, 381-8.

Kumar PP, Bischof O, Purbey PK, Notani D, Urlaub H, Dejean A, 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.

Lagarkova MA, Svetlova E, Giacca M, Falaschi A, Razin SV. 1998. DNA loop anchorage region colocalizes with the replication origin located downstream to the human gene encoding lamin B2. *J Cell Biochem.* 69, 13-8.

Lanctot C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T. 2007. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet.* 8, 104-15.

Laperche Y. 2003. [Oval cells and liver regeneration]. *Med Sci (Paris).* 19, 697-8.

Ma H, Samarabandu J, Devdhar RS, Acharya R, Cheng PC, Meng C, Berezney R. 1998. Spatial and temporal dynamics of DNA replication sites in mammalian cells. *J Cell Biol.* 143, 1415-25.

Ma H, Siegel AJ, 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, 531-42.

Marheineke K, Hyrien O, Krude T. 2005. Visualization of bidirectional initiation of chromosomal DNA replication in a human cell free system. *Nucleic Acids Res.* 33, 6931-41.

Mattern MR. 1984. The relation of three-dimensional DNA structure to DNA repair as studied by nucleoid sedimentation. *Nucleic Acids Symp Ser.* 35-50.

Maya-Mendoza A, 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.

Maya-Mendoza A, Hernandez-Munoz R, Gariglio P, 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.

Maya-Mendoza A, Hernandez-Munoz R, Gariglio P, 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.

Maya-Mendoza A, Hernandez-Munoz R, Gariglio P, 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.

Mccready SJ, Godwin J, Mason DW, Brazell IA, Cook PR. 1980. DNA is replicated at the nuclear cage. *J Cell Sci.* 46, 365-86.

Meaburn KJ, Misteli T. 2007. Cell biology: chromosome territories. *Nature.* 445, 379-781.

Mendez J, Stillman B. 2003. Perpetuating the double helix: molecular machines at eukaryotic DNA replication origins. *Bioessays.* 25, 1158-67.

Michalopoulos GK, Defrances M. 2005. Liver regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 93, 101-34.

Michalopoulos GK, Defrances MC. 1997. Liver regeneration. *Science.* 276, 60-6.

Michalowski SM, Allen GC, Hall GE, Jr., Thompson WF, Spiker S. 1999. Characterization of randomly-obtained matrix attachment regions (MARs) from higher plants. *Biochemistry.* 38, 12795-804.

Mika S, Rost B. 2005. NMPdb: Database of Nuclear Matrix Proteins. *Nucleic Acids Res.* 33, D160-3.

Mitchell JA, Fraser P. 2008. Transcription factories are nuclear subcompartments that remain in the absence of transcription. *Genes Dev.* 22, 20-5.

Montazer-Torbati MB, Hue-Beauvais C, Droineau S, Ballester M, Coant N, Aujean E, Petitbarat M, Rijnkels M, Devinoy E. 2008. Epigenetic modifications and chromatin loop organization explain the different expression profiles of the Tbrg4, WAP and Ramp3 genes. *Exp Cell Res.* 314, 975-87.

Nakayasu H, Berezney R. 1989. Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus. *J Cell Biol.* 108, 1-11.

Nakayasu H, Berezney R. 1991. Nuclear matrices: identification of the major nuclear matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 10312-6.

Nalepa G, Harper JW. 2004. Visualization of a highly organized intranuclear network of filaments in living mammalian cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 59, 94-108.

Nelson WG, Pienta KJ, Barrack ER, Coffey DS. 1986. The role of the nuclear matrix in the organization and function of DNA. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 15, 457-75.

Neusser M, Schubel V, Koch A, Cremer T, Muller S. 2007. Evolutionarily conserved, cell type and species-specific higher order chromatin arrangements in interphase nuclei of primates. *Chromosoma.* 116, 307-20.

Nickerson J. 2001. Experimental observations of a nuclear matrix. *J Cell Sci.* 114, 463-74.

Olins AL, Olins DE. 1974. Spheroid chromatin units (v bodies). *Science.* 183, 330-2.

Ottaviani D, Lever E, Takousis P, Sheer D. 2008. Anchoring the genome. *Genome Biol.* 9, 201.

Parada L, Misteli T. 2002. Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol.* 12, 425-32.

Paulson JR, Laemmli UK. 1977. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell.* 12, 817-28.

Petrova NV, Iarovaia OV, Verbovov VA, Razin SV. 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, 850-7.

Petrova NV, Yakutenko I, Alexeevski AV, Verbovov VA, Razin SV, Iarovaia OV. 2007. Changes in chromosome positioning may contribute to the development of diseases related to X-chromosome aneuploidy. *J Cell Physiol.* 213, 278-83.

Radulescu AE, Cleveland DW. 2010. NuMA after 30 years: the matrix revisited. *Trends Cell Biol.* 20, 214-22.

Razin SV. 1997. *Nuclear matrix and the spatial organization of chromosomal domains*, USA, Landes Bioscience.

Razin SV. 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.

Razin SV, Gavrilov AA, Pichugin A, Lipinski M, Iarovaia OV, Vassetzky YS. 2011. Transcription factories in the context of the nuclear and genome organization. *Nucleic Acids Res.* 39, 9085-92.

Razin SV, Gromova I, Iarovaia OV. 1995. Specificity and functional significance of DNA interaction with the nuclear matrix: new approaches to clarify the old questions. *Int Rev Cytol.* 162B, 405-48.

Razin SV, Hancock R, Iarovaia O, Westergaard O, Gromova I, Georgiev GP. 1993. Structural-functional organization of chromosomal DNA domains. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 58, 25-35.

Razin SV, Kekelidze MG, Lukanidin EM, Scherrer K, Georgiev GP. 1986. Replication origins are attached to the nuclear skeleton. *Nucleic Acids Res.* 14, 8189-207.

Razin SV, Petrov P, Hancock R. 1991a. Precise localization of the alpha-globin gene cluster within one of the 20- to 300-kilobase DNA fragments released by cleavage of chicken chromosomal DNA at topoisomerase II sites in vivo: evidence that the fragments are DNA loops or domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 8515-9.

Razin SV, Vassetzky YS, Hancock R. 1991b. Nuclear matrix attachment regions and topoisomerase II binding and reaction sites in the vicinity of a chicken DNA replication origin. *Biochem Biophys Res Commun.* 177, 265-70.

Razin SV, Yarovaya OV, Georgiev GP. 1985. Low ionic strength extraction of nuclease-treated nuclei destroys the attachment of transcriptionally active DNA to the nuclear skeleton. *Nucleic Acids Res.* 13, 7427-44.

Rivera-Mulia JC. 2010. *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.* Ph. D., Universidad Nacional Autónoma de México.

Rivera-Mulia JC, Aranda-Anzaldo A. 2008. Estructura y función de la unidad fundamental de replicación del DNA (el replicón) en eucariontes. *Ciencia Ergo Sum.* 15, 269-286.

Rivera-Mulia JC, 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. *DNA Res.* 17, 23-35.

Rivera-Mulia JC, Hernandez-Munoz R, Martinez F, Aranda-Anzaldo A. 2011. DNA moves sequentially towards the nuclear matrix during DNA replication in vivo. *BMC Cell Biol.* 12, 3.

Robinson SI, Nelkin BD, Vogelstein B. 1982. The ovalbumin gene is associated with the nuclear matrix of chicken oviduct cells. *Cell.* 28, 99-106.

Robinson SI, Small D, Idzerda R, Mcknight GS, Vogelstein B. 1983. The association of transcriptionally active genes with the nuclear matrix of the chicken oviduct. *Nucleic Acids Res.* 11, 5113-30.

- Rozga J. 2002. Hepatocyte proliferation in health and in liver failure. *Med Sci Monit.* 8, RA32-8.
- Santamaria D, Viguera E, Martinez-Robles ML, Hyrien O, Hernandez P, Krimer DB, Schwartzman JB. 2000. Bi-directional replication and random termination. *Nucleic Acids Res.* 28, 2099-107.
- Shaman JA, Yamauchi Y, Ward WS. 2007. Function of the sperm nuclear matrix. *Arch Androl.* 53, 135-40.
- Simon DN, Wilson KL. 2011. The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic 'network of networks'. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12, 695-708.
- Singh GB, Kramer JA, Krawetz SA. 1997. Mathematical model to predict regions of chromatin attachment to the nuclear matrix. *Nucleic Acids Res.* 25, 1419-25.
- Small D, Nelkin B, Vogelstein B. 1985. The association of transcribed genes with the nuclear matrix of Drosophila cells during heat shock. *Nucleic Acids Res.* 13, 2413-31.
- Small D, Vogelstein B. 1985. The anatomy of supercoiled loops in the Drosophila 7F locus. *Nucleic Acids Res.* 13, 7703-13.
- Smith C, Wood E. 1992. *Cell Biology*, London, Chapman & Hall.
- Smith HC, Berezney R. 1983. Dynamic domains of DNA polymerase alpha in regenerating rat liver. *Biochemistry.* 22, 3042-6.
- Smith HC, Puvion E, Buchholtz LA, Berezney R. 1984. Spatial distribution of DNA loop attachment and replicational sites in the nuclear matrix. *J Cell Biol.* 99, 1794-802.
- Tachiki K, Kodama Y, Nakayama H, 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, 11-9.
- Trevilla-Garcia C, Aranda-Anzaldo A. 2012. The organization of a large transcriptional unit (Fyn) into structural DNA loops is cell-type specific and independent of transcription. *Gene.* 493, 1-8.
- Tsutsui KM, Sano K, Tsutsui K. 2005. Dynamic view of the nuclear matrix. *Acta Med Okayama.* 59, 113-20.
- Tubo RA, Berezney R. 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, 5857-65.
- Tubo RA, Berezney R. 1987b. Nuclear matrix-bound DNA primase. Elucidation of an RNA priming system in nuclear matrix isolated from regenerating rat liver. *J Biol Chem.* 262, 6637-42.

Van Drunen CM, Sewalt RG, Oosterling RW, Weisbeek PJ, Smeekens SC, Van Driel R. 1999. A bipartite sequence element associated with matrix/scaffold attachment regions. *Nucleic Acids Res.* 27, 2924-30.

Varma P, Mishra RK. 2011. Dynamics of nuclear matrix proteome during embryonic development in *Drosophila melanogaster*. *J Biosci.* 36, 439-59.

Vassetzky YS, Jr., Razin SV, Georgiev GP. 1989. DNA fragments which specifically bind to isolated nuclear matrix in vitro interact with matrix-associated DNA topoisomerase II. *Biochem Biophys Res Commun.* 159, 1263-8.

Verheijen R, Van Venrooij W, Ramaekers F. 1988. The nuclear matrix: structure and composition. *J Cell Sci.* 90 (Pt 1), 11-36.

Vogelstein B, Pardoll DM, Coffey DS. 1980. Supercoiled loops and eucaryotic DNA replicaton. *Cell.* 22, 79-85.

Wang X, Quail E, Hung NJ, Tan Y, Ye H, Costa RH. 2001. Increased levels of forkhead box M1B transcription factor in transgenic mouse hepatocytes prevent age-related proliferation defects in regenerating liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 11468-73.

Ward WS, Partin AW, Coffey DS. 1989. DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma.* 98, 153-9.

Wei X, Samarabandu J, Devdhar RS, Siegel AJ, Acharya R, Berezney R. 1998. Segregation of transcription and replication sites into higher order domains. *Science.* 281, 1502-6.

Wei X, Somanathan S, Samarabandu J, Berezney R. 1999. Three-dimensional visualization of transcription sites and their association with splicing factor-rich nuclear speckles. *J Cell Biol.* 146, 543-58.

Weidtkamp-Peters S, Rahn HP, Cardoso MC, Hemmerich P. 2006. Replication of centromeric heterochromatin in mouse fibroblasts takes place in early, middle, and late S phase. *Histochem Cell Biol.* 125, 91-102.

Zbarskii IB, Debov SS. 1948. On the proteins of the cell nucleus. *Dokl Akad Nauk.* 63, 795-798.

ANEXO

Castillo-Mora RC, Aranda-Anzaldo A. 2012. Reorganization of the DNA-nuclear matrix interactions in a 210 kb genomic region centered on c-myc after DNA replication in vivo. *J Cell Biochem.* 113, 2451-63.

Reorganization of the DNA–Nuclear Matrix Interactions in a 210 kb Genomic Region Centered on *c-myc* After DNA Replication In Vivo

Rebeca C. Castillo-Mora^{1,2} and Armando Aranda-Anzaldo^{1,2*}

¹Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Tollocan y Jesús Carranza s/n, Toluca, 50180 Edo. Méx., Mexico

²Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias UNAM, Universidad 3000 Circuito Exterior S/N, 04510 Ciudad Universitaria, México, D.F., Mexico

ABSTRACT

In the interphase nucleus of metazoan cells DNA is organized in supercoiled loops anchored to a nuclear matrix (NM). DNA loops are operationally classified in structural and facultative. Varied evidence indicates that DNA replication occurs in replication foci organized upon the NM and that structural DNA loops may correspond to the replicons in vivo. In normal rat liver the hepatocytes are arrested in G₀ but synchronously re-enter the cell cycle after partial-hepatectomy leading to liver regeneration. Using this model we have previously determined that the DNA loops corresponding to a gene-rich genomic region move in a sequential fashion towards the NM during replication and then return to their original configuration in newly quiescent cells, once liver regeneration has been achieved. In the present work we determined the organization into structural DNA loops of a gene-poor region centered on *c-myc* and tracked-down its movement at the peak of S phase and after the return to cellular quiescence during and after liver regeneration. The results confirmed that looped DNA moves towards the NM during replication but in this case the configuration of the gene-poor region into DNA loops becomes reorganized and after replication only the loop containing *c-myc* resembles the original in the control G₀ hepatocytes. Our results suggest that the local chromatin configuration around potentially active genes constraints the formation of specific structural DNA loops after DNA replication, while in non-coding regions the structural DNA loops are only loosely determined after DNA replication by structural constraints that modulate the DNA–NM interactions. *J. Cell. Biochem.* 113: 2451–2463, 2012. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: CHROMATIN; DNA LOOP; HEPATOCYTE; LOOP ATTACHMENT REGION; MATRIX ATTACHMENT REGION; NUCLEAR HIGHER-ORDER STRUCTURE; PARTIAL HEPATECTOMY

In the interphase nucleus of metazoan cells DNA is organized in supercoiled loops anchored to a high-salt insoluble nuclear compartment constituted by a sort of fibrogranular ribonucleoprotein network which retains the shape and some morphological features of the nucleus, known as the nuclear matrix [Razin, 1997; Nickerson, 2001]. The exact composition of the nuclear matrix (NM) is a matter of debate as some 400 proteins have been associated with such a compartment [Mika and Rost, 2005]. Nevertheless there is compelling evidence for the existence of a true nucleoskeleton that involves networks of nuclear filaments and that provides mechanical connectivity and continuity between cytoskeleton and chromatin [Simon and Wilson, 2011]. Moreover, proteins historically regarded as components of the NM participate in the linkage

between nucleoskeletal structures and chromatin [Radulescu and Cleveland, 2010]. Currently the NM is understood as a dynamic structural entity [Tsutsui et al., 2005] as exemplified by the fact that important functional nuclear proteins such as topoisomerase II or NeuN/Fox-3 may be shuttling between the NM and the nucleoplasm [Christensen et al., 2002; Dent et al., 2010]. Usually DNA is attached to the NM by non-coding sequences known as matrix associated or matrix attachment regions (MARs). So far in mammals there are no specific consensus sequences for a priori defining an MAR although most well characterized MARs are rich in A-T and repetitive sequences [Ottaviani et al., 2008]. In situ MARs have been operationally classified into constitutive-structural, resistant to high-salt extraction, and facultative, perhaps functional,

Grant sponsor: CONACYT, México; Grant number: 48447-Q-25506.

*Correspondence to: Dr. Armando Aranda-Anzaldo, MD, PhD, Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina, UAEMéx, Paseo Tollocan y Jesús Carranza s/n, Toluca, 50180 Edo. Méx., Mexico. E-mail: aaa@uaemex.mx

Manuscript Received: 16 December 2011; Manuscript Accepted: 27 February 2012

Accepted manuscript online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 6 March 2012

DOI 10.1002/jcb.24123 • © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

non-resistant to high-salt extraction [Razin, 2001; Maya-Mendoza et al., 2003]. Therefore the resulting DNA loops can be also classified into structural and facultative [Elcock and Bridger, 2008; Ottaviani et al., 2008; Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010]. The high-salt resistant MARs attaching the structural DNA loops to the NM are also known as loop anchorage regions or LARs [Razin, 2001]. The structural DNA–NM interactions occur on a grand scale and so define a nuclear higher-order structure (NHOS). There is evidence that such an NHOS slowly but spontaneously changes in vivo as a function of age [Maya-Mendoza et al., 2005; Alva-Medina et al., 2010, 2011].

For some time it has been speculated that DNA loops correspond to independent functional domains of chromatin. However, it has been shown that a single transcriptional unit may be organized into several structural DNA loops [Iarovaia et al., 2004]. Moreover, the gene *Fyn*, that constitutes a single large transcriptional unit, has been shown to be differentially organized into structural DNA loops according to cell type in vivo without precluding *Fyn* expression [Trevilla-García and Aranda-Anzaldo, 2012]. This evidence rules out a direct correlation between structural DNA loops and transcriptional units. On the other hand, there is varied evidence suggesting that the structural DNA loops may correspond to the actual replicons [Tomilin et al., 1995; Razin, 2001]. Indeed, DNA replication occurs in mammalian cells at so-called replication foci or factories occupying defined nuclear sites at specific times during S phase [Sadoni et al., 2004] and there is important evidence that such replication factories are organized upon the NM [Nakamura et al., 1986; Hozak et al., 1993; Wei et al., 1998]. Theoretical implications resulting from considering the topology of DNA and the actual size of the replication complexes that include enormous polymerizing machines that dwarf the DNA template, suggest that replication of mammalian DNA in vivo involves fixed polymerases in replication foci that reel in their templates as they extrude newly made DNA [Cook, 1999]. This coupled to varied experimental evidence suggests that the NM is the structural support of DNA replication [Anachkova et al., 2005].

Using the model of liver regeneration after partial hepatectomy (PHx) in the rat, we have shown that looped DNA, corresponding to the five structural loops present in 162 kb of the gene-rich region corresponding to the albumin-gene family, moves in a sequential fashion, as if reeled in, towards the NM during DNA replication in vivo. Yet, by day 7 post-partial hepatectomy (7 d post-PHx), once the liver regeneration has been achieved, the DNA returns to its original configuration in the newly quiescent hepatocytes [Rivera-Mulia et al., 2011]. Using the same animal model, in the present work we first determined the organization into structural DNA loops of a 210 kb gene-poor region centered on the *c-myc* gene, region that happened to be organized into at least six well-defined DNA loops in quiescent primary hepatocytes. Then we characterized the dynamics of such structural DNA loops at the peak of DNA replication after PHx. Our experiments confirmed that DNA moves in a sequential fashion towards the nuclear matrix during DNA replication in vivo. However in this case, the movement of DNA to the NM during replication resulted in a permanent reorganization of the structural DNA loops in the *c-myc* genomic region after mitosis and only the loop containing the solitary *c-myc* gene remained closely similar to

the original in quiescent, unperturbed, control hepatocytes. Our results suggest that in vivo the local chromatin configuration around active or potentially active genes (such as *c-myc*) tightly constraints the formation of specific structural DNA loops after DNA replication and mitosis, while in non-coding regions the structural DNA loops are only loosely determined after DNA replication by structural constraints that modulate the DNA–NM interactions, thus leading to major reorganization of the local NHOS after mitosis.

MATERIALS AND METHODS

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) and with the approval of the UAEMéx School of Medicine Committee on Bioethics.

PARTIAL HEPATECTOMY

Surgical removal of two-thirds of the liver (partial mechanical hepatectomy) was performed between 9 and 11 am, under ether anesthesia following the classical protocol of Higgins and Anderson [1931]. Briefly, through an abdominal incision the median and left lateral lobes of the rat liver were exposed and a surgical ligature was performed around their base, such lobes were removed ($\approx 70\%$ liver mass) leaving the rest of the liver (right and caudate lobes) intact. Rats were sacrificed using ether anesthesia at 24 h, 7 and 21 days after partial mechanical hepatectomy (PHx). For each experimental series paired rats were subjected to the surgical procedure and one member of the pair was randomly chosen as donor for the liver material post-PHx while the other remained as living proof of the successful regeneration of the liver.

HEPATOCTYTES

Primary rat hepatocytes were obtained from rat livers (normal or hepatectomized), as previously described [Maya-Mendoza et al., 2003]. Briefly, the livers were washed in situ by perfusion with PBS without Ca^{2+} and Mg^{2+} (PBS-A) at 37°C for 5 min at 15 ml/min for non-hepatectomized rats and for 2 min for hepatectomized rats. The tissue was further perfused with a solution of collagenase IV, Sigma (0.025% collagenase with 0.075% of CaCl_2 in HEPES buffer, pH 7.6) for 8 min for non-hepatectomized rats and for 3 min for hepatectomized rats. Hepatocytes were isolated following the protocol of Freshney [1994]. Viable hepatocytes were counted in a haemocytometer and used immediately for preparing the nucleoids (see below).

PARAMETERS OF LIVER REGENERATION

Liver regeneration progression, including main peak of DNA synthesis and return of hepatocytes to G0 after completion of liver regeneration, was estimated by determination of thymidine kinase activity in the cytosolic liver fraction using a radiometric method as previously described [Morales-González et al., 1999].

PREPARATION OF NUCLEOIDS

The naked 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 [Maya-Mendoza and Aranda-Anzaldo, 2003]. Briefly, freshly isolated and washed hepatocytes were suspended in ice-cold PBS-A, aliquots of 50 μ l containing 3×10^5 cells were gently mixed with 150 μ 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 at 4°C, the mixture was washed in 14 ml of PBS-A at 4°C for 4 min at 3,000 rpm (1,500 *g*). The pellet was recovered in a volume ranging from 200 to 300 μ l.

DNase I DIGESTION OF NUCLEOID SAMPLES

The washed nucleoids were pooled for setting up the DNase I digestion curves (1.8×10^6 nucleoids in 1.2 ml of PBS-A) and mixed with 5 ml of DNase I digestion buffer (10 mM MgCl₂, 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 contained 3×10^5 nucleoids. Digestion reactions were stopped by adding 200 μ 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 nucleoids' aliquots were pelleted at 9,000 *g* 10 min at 4°C then washed by centrifugation at 9,000 *g* 10 min at 4°C once in PBS-A and twice in double distilled-H₂O water. The NM-bound DNA was determined by spectrometry on aliquots of partially digested nucleoid samples. The final nucleoid pellet was re-suspended in 200 μ l double distilled-H₂O to be used directly as template for PCR.

GENOMIC DNA PRIMERS

Distinct pairs of primers were designed for establishing the topological positions relative to the NM of 22 small amplicons located along 210 kb of the genomic region in the rat chromosome 7 centered on the *c-myc* gene (Fig. 1). Briefly, primer pairs were designed approximately each 10 kb in order to establish rather regular intervals along the region studied. All primers sets were designed with a length of 20–25 bp, G–C content between 50% and 55%, T_m of 55–60°C, and PCR products of 275–394 bp (Table I). Secondary structures and dimers/duplexes were avoided.

PCR AMPLIFICATION

Ten nanograms of nuclear matrix-bound DNA were used as template for PCR. PCR was carried out using 0.625 U GoTaq DNA Polymerase (Promega), 1.0 mM MgCl₂, 0.1 mM of each dNTP and 10 pmol of

each primer in a final volume of 50 μ l. Amplification was performed in an Applied Biosystems 2720 thermocycler and the same amplification program was used for all pairs of primers: initial denaturizing step at 94°C for 5 min, denaturizing 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 μ g/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.

REAL-TIME PCR ANALYSIS OF mRNA

The expression of *PCNA*, *c-myc* and *beta-actin* mRNA was assessed by Real-Time PCR analysis of mRNA using the LightCycler FastStart DNA Master-PLUS SYBR Green 1 kit (Roche) according to the manufacturers instructions in a LightCycler 3.5 thermocycler (Roche). Each reaction used 2 μ l of a 1:10 dilution of cDNA. The amplification program was: initial pre-incubation step 95°C 10 min, followed by 45 cycles of touch-down amplification (denaturizing step at 95°C for 10 s; annealing for 10 s and extension at 72°C for 25 s). In the first two cycles annealing was at 65°C and then descending 1°C every two cycles until reaching 60°C. A melting curve was applied at the end of the program for confirming the identity of the amplified product and determining the relative concentration of the template. Primers: *c-myc* forward: TCTGCTCTCCGTCCTATGTTGC; *c-myc* reverse: TTCTTCAGAGTCGCTGCTGGTG, amplicon size 557 bp. *PCNA* forward: GTGAACCTACAGAGCATGGATTCCG; *PCNA* reverse CCACAGCATCTCCAATATGGCT, amplicon size 373 bp. *Beta-actin* forward: AACACCCAGCCATGTACG; *Beta-actin* reverse: ATGTCACGCACGATTCCC, amplicon size 254 bp.

RESULTS

CORRELATION OF THE KINETICS OF NUCLEOID–DNA DIGESTION WITH THE DNA–REPLICATING STATUS OF HEPATOCYTES

The naked DNA loops plus the NM constitute a nucleoid. Under the conditions of lysis employed to generate nucleoids the DNA remains intact but it lacks the nucleosome structure because of the

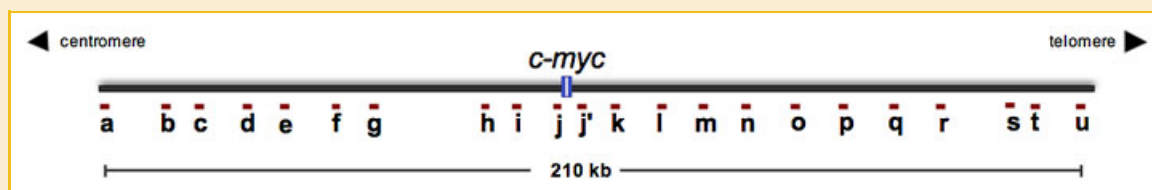


Fig. 1. Target sequences in the 210 kb genomic region centered on *c-myc*. The 210 kb genomic region is located in rat chromosome 7q33. The letters indicate the location of the 22 target DNA sequences (amplicons) to be positionally mapped relative to the NM. The presence of inverted repeats, palindromic and variable sequences, precluded the design of a reliable target amplicon between g and h. The primer pairs defining the corresponding amplicons are given in Table I. [Color figure can be seen in the online version of this article, available at <http://wileyonlinelibrary.com/journal/jcb>]

TABLE I. Pairs of Primers Used for Amplification of 22 Small Target Sequences (Amplicons) Located Along the 210 kb Genomic Region Centered on *c-myc* (Fig. 1)

Amplicon	Forward primer	Reverse primer	Amplicon length
a	TCACCAGGCTCTAACACTTTGC	CCTTGATGTCAGGTGCATAAGGC	394
b	GGAATAACAGGGGAGAGAGAAATGG	GCTGGTTGATTGACAGGACTCTGA	393
c	TTCTCACATTACAGGCAACGGTG	CTGCGTGTACCTTTCTTCTCAAG	342
d	CCACTTCCCATATCTTCCCTCC	GCAAGTCTGTGATGCTCTGCAA	338
e	CTACCTCGTAGCCACATCTTTC	GCTGTAAATGTGAGCCAACGA	312
f	CTGGCTGCACACATTTGGTCTA	AACCAGTAAGGCTCACAGAGCAAG	290
g	CCTTTACACTGTCTTTACGCTGCC	GTGAAGCCACTGAGACCTCTGTCTA	334
h	GAATGGACAACAGAAACCGAGG	GGACTGAAGGCTCGTGAGATAAAC	291
i	TCCTTGTCTATGGGGAAGCCTGA	CCACCCTACCCTGAGCTAACCTT	341
j	ACTATCACTCCACTGAGCAAGGG	CCCGACATTTTCTCTGGT	282
j'	GGTGCCTCAAGACCTTAAGTTC	CTCACTACAACCTCCGAACCTTT	388
k	ATGCCTTTAATCCAGAGGTGGAG	GGGTGGAACAGGGTGAAGATGACT	338
l	ATCTTGTGTTCCGCTGGTACTTG	GAGTCTCAAATAACAGCCAAGCC	361
m	ACCAAACAAGATCCCACACTG	GCTCAACTCATGTTCTCCCTCC	367
n	TAGGCTGTCCCAGGTTTGAAGC	CCAGGATGTTGGTGACACTCAATG	284
o	GCCTCCATAGTACCATGAATGAAAA	GCTCTAATCCCACTCTTTGCTA	296
p	GATGCTGAAGATGCTCTCCATCAC	TGAAGATGCTACCTGCCCTTG	393
q	TCAAGCCCCAGTAAATTCTACCCC	GCAGCAACAAGCAAGAAGTCAGC	304
r	CTAAGTTGAAAGGGACTTCTGGC	GCACCTCAGGAAGTCAAGGACAGA	324
s	TGCTGGCAAACACTGTACTGA	AGGAATGGGCTAAGAGAGAGGGCTA	330
t	CATTGTAGTCTGTCCCTGTGAGC	TGCCTGCCTATGACTTCAGAGTCC	275
u	TCACCTCTGTGGGCTAGTGGTAGT	GTTCCAGCTCACTCATCACCTTC	305

The corresponding amplicon length in bp is indicated.

dissociation of histones and other chromatin proteins. The DNA loops are topologically constrained by being anchored to the NM thus being equivalent to closed DNA circles [Cook et al., 1976; Roti-Roti et al., 1993]. The naked DNA loops display a gradient of supercoiling that goes from lower to higher from tip to base of the loop [Bloomfield et al., 2000], save for the fact that the structural properties of MARs/LARs are such that they also function as buffers or sinks of negative supercoiling [Benham et al., 1997] thus avoiding maximal supercoiling at the base of the loops.

In nucleoid preparations the relative resistance of a given loop-DNA sequence to a limited concentration of DNase I, a non-specific nuclease that is sensitive to the local DNA topology [Lewin, 1980], is directly proportional to its proximity to the NM anchoring point [Maya-Mendoza and Aranda-Anzaldo, 2003; Maya-Mendoza et al., 2004; Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010]. Two main factors determine such property: (1) steric hindrance resulting from the proteinaceous NM that acts as a physical barrier that relatively protects the naked loop DNA that is closer to the NM from endonuclease action. (2) The local DNA topology, corresponding to the degree of loop DNA supercoiling that is lower in the distal portions of the loop and higher in the regions proximal to the NM. Thus in a large sample of nucleoids exposed to a limited concentration of DNase I there is a consistent trend in which distal regions of the loop are digested first while the regions closer to the NM are digested later.

In the corresponding nucleoid-DNA digestion curves it is possible to calculate the slopes between pairs of digestion-time points (Table II) that together with the standard deviations of the time-point values are used for determining four topological zones relative to the NM (Fig. 2) as previously defined [Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García and Aranda-Anzaldo, 2012]. A topological zone is a relational concept for establishing a range of closeness (in this case for DNA sequences relative to the NM), without considering the actual distance (either in microns or bp),

since in topological spaces the notions of distance and length are non-relevant [Flegg, 2001]. There is a fraction of loop DNA that is resistant to DNase I even after long incubation times (the local slope of the digestion curve becomes very close to zero after 60 min and remains unchanged in time), corresponding to the DNA that is actually embedded within the NM and so it is rather inaccessible to the limited concentration of enzyme used (Fig. 2).

In rats the surgical ablation of approximately 70% of the liver mass leads to massive, synchronized re-entry into the cell cycle of some 95% of the residual hepatocytes, this is followed by a well-characterized and highly reproducible large peak of DNA synthesis at 24 h [Michalopoulos and DeFrances, 1997]. The whole regeneration process usually lasts 5–7 days after which there is full recovery of the liver function [Fausto, 2001]. Nucleoids from primary rat hepatocytes isolated at 24 h post-PHx and treated with DNase I show a relatively faster kinetics of loop DNA digestion than the control (compare the corresponding graphs in Fig. 2) indicating greater overall sensitivity of DNA to the endonuclease. This phenomenon has been previously described in nucleoids from cells undergoing

TABLE II. Slopes Between Pairs of Digestion-Time Points in the Corresponding Kinetics of Digestion With DNase I of Nucleoids From Hepatocytes (Fig. 2)

Digestion time (min)	Slopes			21 d post-PHx
	Control	24 h post-PHx	7 d post-PHx	
0–5	–8.9	–10.1	–5.5	–9.8
5–15	–2.0	–2.1	–4.1	–1.5
15–30	–0.4	–0.4	–0.4	–0.2
30–60	–0.1	–0.3	–0.1	–0.2

Control G0 hepatocytes; 24 h post-PHx hepatocytes; 7 d post-PHx hepatocyte; 21 d post-PHx hepatocytes. In all cases the slope after 60 min becomes close to zero and remains unchanged in time.

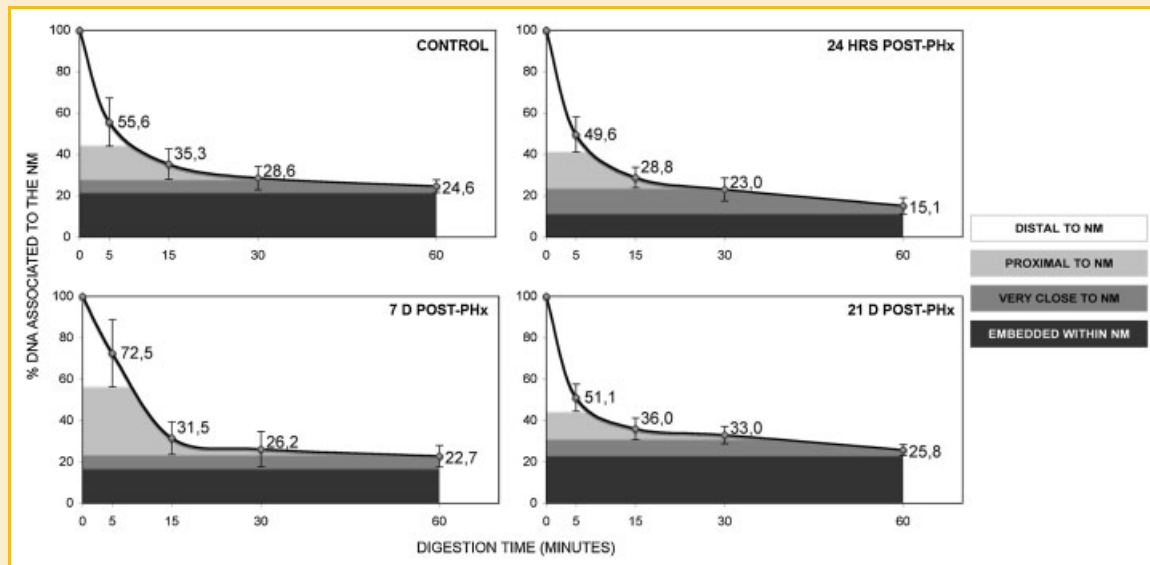


Fig. 2. Kinetics of nucleoid-DNA digestion. Nucleoids from freshly isolated primary rat hepatocytes were digested with a limited concentration of DNase I (0.5 U/ml) for different times. Each time-point value is the average of separate experiments with samples obtained from separate animals ($n \geq 4$): control G0 hepatocytes. Proliferating hepatocytes 24 h after partial hepatectomy (24 h post-PHx). Restored G0 hepatocytes 7 days after partial hepatectomy (7 d post-PHx). Hepatocytes from fully recovered rats 21 days after partial hepatectomy (21 d post-PHx). Bars indicate the corresponding SD. The topological zones relative to the NM (distal, proximal, very close, and embedded within the NM) correspond to decreasing percentages of total DNA bound to the NM and were defined according to the decreasing slopes between pairs of digestion-time points in each curve (Table II) and the corresponding SD as previously described [Trevilla-García and Aranda-Anzaldo, 2012]. In all cases the slope after 60 min becomes close to zero and remains unchanged in time indicating that the DNA embedded in the NM is rather inaccessible to the limited concentration of the enzyme used.

DNA synthesis [Aranda-Anzaldo, 1992, 1998]. Yet, nucleoids from rat hepatocytes isolated at 7 d and 21 d post-PHx display a kinetics of DNA digestion that is similar to the original in undisturbed G0 hepatocytes and so, the amount of endonuclease-resistant DNA embedded within the NM is basically the same (Fig. 2), indicating that the original degree of supercoiling has been restored in the corresponding structural DNA loops of the newly quiescent hepatocytes in the regenerated liver.

DETERMINATION OF THE ORGANIZATION INTO STRUCTURAL DNA LOOPS OF A GENOMIC REGION CENTERED ON THE *c-myc* LOCUS

We determined, in primary rat hepatocytes, the organization into structural DNA loops of a 210 kb genomic region centered on the *c-myc* gene. For this purpose we used a general method that exploits the topological properties of loop DNA attached to the NM. With this method it is possible to determine the specific DNA loop configuration of a given genomic region of known sequence without previous characterization of the LARs involved [Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010]. The method is based on the elementary topological principle that points in a deformable string (DNA) can be positionally mapped in space relative to a position-reference invariant (NM), and that from such mapping it can be deduced the configuration of the string in third dimension [Flegg, 2001]. Thus we first designed a set of 21 small amplicons (target sequences) located on average some 10 kb from each other along a gene-poor 210 kb region of rat chromosome 7 centered on the *c-myc* gene (Fig. 1). Within the region studied there is a sub-domain of 23 kb (between the g and h target sequences) in which the DNA sequence is plenty with AT, inverted repeats, palindromic and

variable sequences, all these factors precluded the design of a reliable amplicon. Thus it was not possible to have a target sequence within such a sub-domain. Nevertheless, by coupling the specific kinetics of nucleoid-digestion with DNase I (control in Fig. 2) with data from direct PCR amplification of the target sequences in NM-bound templates from partially digested nucleoid samples (control in Fig. 3), corresponding to the time-points of the DNase I digestion curve, it is possible to map the position of each of the target sequences relative to the NM and so to determine its location within a given topological zone (Table III). In the mapping protocol the specific templates are scored either as present (amplifiable) or absent (non-amplifiable) as a function of endonuclease-digestion time, without considering the intensity of the amplicon signals but just whether such signals are detected or not by an image-analysis program since the property of locality in space is factual but not statistical [Maya-Mendoza and Aranda-Anzaldo, 2003; Maya-Mendoza et al., 2004; Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García and Aranda-Anzaldo, 2012]. For most target sequences the consistent amplification pattern among experiments allocated the corresponding sequence to a specific topological zone. However, in about 30–50% of the experiments some target sequences (marked as +* in Table III) mapped in either of two contiguous topological zones suggesting that the corresponding target sequence is somehow located at the border region or fluctuating between two contiguous topological zones.

The data for the control in Table III were used to draw the most likely DNA loop organization relative to the NM of the region under study in the undisturbed, primary hepatocytes, by considering the distance in kb between the separate target sequences mapped and

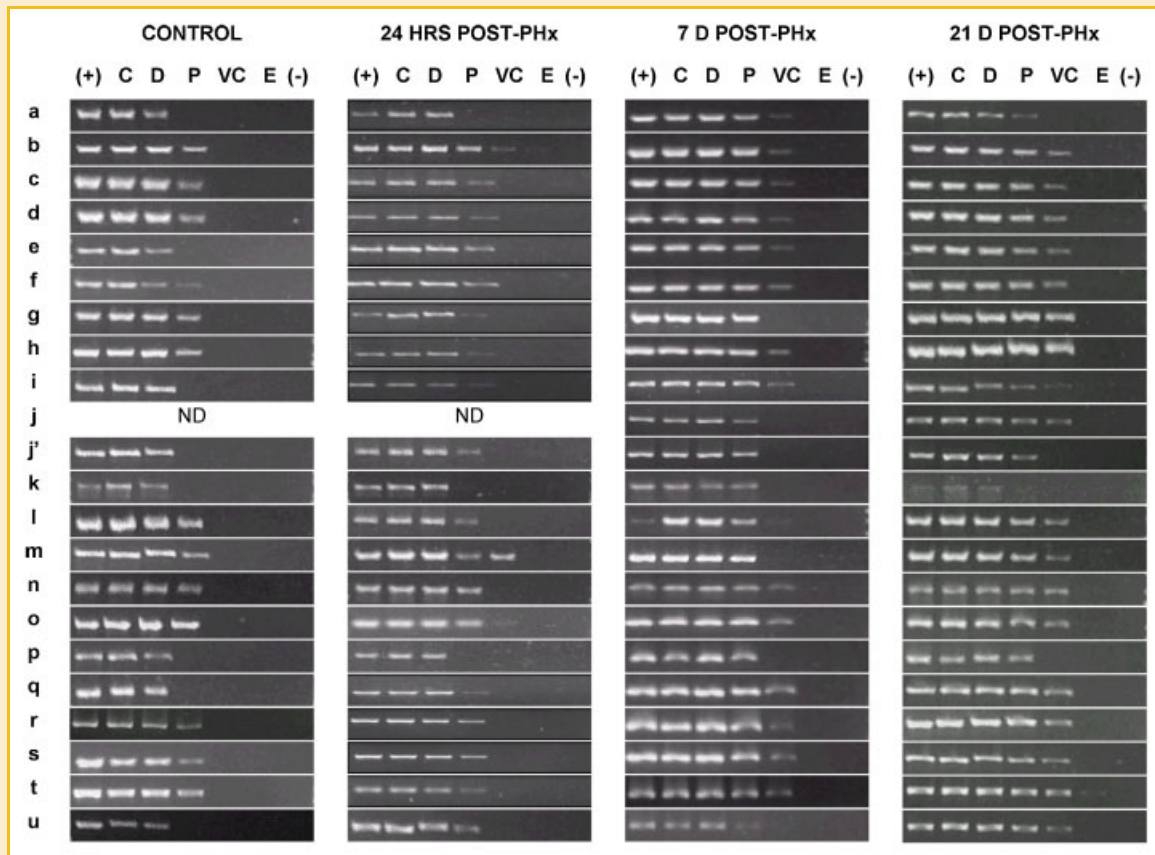


Fig. 3. Positional mapping relative to the NM of specific target sequences. The image shows the results from a typical mapping experiment. The position relative to the NM of specific target sequences along the 210 kb genomic region was determined by PCR. Nucleoids from rat hepatocytes were treated with DNase I (0.5 U/ml) for different times (Fig. 2). The residual NM-bound DNA in the partially digested samples was directly used as template for PCR amplification of the chosen target sequences (a–u). The specific amplicons were resolved in 2% agarose gels and stained with ethidium bromide (0.5 μ g/ml). The amplicons were scored either as positive or negative as a function of endonuclease 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 III). Topological zones relative to the NM: D, distal; P, proximal; VC, very close; E, embedded within the NM. C, 0' digestion-time control. (+) positive control (pure genomic DNA as template); (–) negative control (no template). Control G0 hepatocytes; 24 h post-PHx, hepatocytes 24 h after partial hepatectomy; 7 d post-PHx, hepatocytes 7 days after partial hepatectomy; 21 d post-PHx, hepatocytes 21 days after partial hepatectomy. The amplification patterns were consistently reproduced in separate experiments with samples from independent animals ($n \geq 4$). The j amplicon is located near the 5' of *c-myc* and so it complements amplicon j' located near the 3' end of *c-myc*, both amplicons define the location of whole length *c-myc* gene.

the topological positions of such sequences relative to the NM (control in Fig. 4). Thus in primary quiescent hepatocytes the region under study is organized at least in six well-defined structural DNA loops and the *c-myc* gene is contained in a single loop of some 40 kb in whole length (Fig. 4). Given the lack of a reliable target sequence for the region between targets g and h we could not determine whether there are well-defined loops within that 23 kb region or if that region is mostly embedded within the NM. It must be stressed that whichever DNA sequences are actually involved in attaching the DNA to the NM they must lay in the DNA fraction embedded within the NM. However, in our experimental approach there is no need for characterizing the actual LARs involved since the DNA loop organization can be directly inferred from the topological distribution of the target sequences (amplicons) in third-dimensional space. On the other hand, the fact that MARs lack any consensus sequence yet they are usually rich in AT and repetitive sequences precludes, in principle, the design of reliable amplicons that may correspond to or include an actual MAR attached to the

NM. Nevertheless when we previously determined the DNA loop organization in the multi-genic locus of the albumin family and the *Fyn* locus in B lymphocytes we found some of the corresponding target amplicons clearly embedded within the NM [Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García and Aranda-Anzaldo, 2012], yet in the present case of the *c-myc* region none of the target amplicons fell within the embedded region in the control hepatocytes.

SEQUENTIAL MOVEMENT OF LOOP DNA RELATIVE TO THE NM CORRELATES WITH DNA REPLICATION

Using nucleoid samples from primary hepatocytes obtained from: control (G0); 24 h post-PHx and 7 d post-PHx livers, we mapped the position relative to the NM of at least 21 target sequences in a comparative fashion. The specific topological zones for each kind of partially digested nucleoid hepatocyte sample were defined according to the specific kinetics of nucleoid DNA digestion shown in Figure 2 (Table III). Figure 3 shows typical amplification patterns

TABLE III. Location of the Target Sequences From the 210 kb Genomic Region Studied Within the Specific Topological Zones Relative to the NM

Amplicon	Topological zones relative to NM																			
	Control					24 h post-PHx					7 d post-PHx					21 d post-PHx				
	C	D	P	VC	E	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			+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
j'	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
k	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
l	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
m	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
n	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
o	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
p	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
q	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
r	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
s	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
t	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
u	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

Such topological zones were defined according to the specific kinetics of nucleoid-DNA digestion for each kind of nucleoid sample (Fig. 2). The amplicons were scored either as positive or negative as a function of endonuclease 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. 3). Control G0, samples from normal rat liver hepatocytes. Twenty-four hours post-PHx, samples obtained from hepatocytes 24 h after partial hepatectomy. Seven days post-PHx, samples obtained from hepatocytes 7 days after partial hepatectomy. Twenty-one days post-PHx, samples obtained from hepatocytes 21 days after partial hepatectomy. C, 0' digestion-time control. D, distal to the NM. P, proximal to the NM. VC, very close to the NM. E, embedded within the NM. All target sequences were mapped in repeated experiments with samples from separate animals (n ≥ 4). +* Indicates that in about 30–50% of the experiments the corresponding target sequence mapped to the previous topological zone farther from the NM.

of the corresponding target sequences in DNase I-treated nucleoid samples containing residual loop DNA bound to the NM. With that information we drew the most likely configuration for the corresponding structural DNA loops at 24 h post-PHx and 7 d post-PHx (Fig. 4).

Considering the topological zones defined by the kinetics of nucleoid DNA digestion in samples from undisturbed G0 hepatocytes as the original reference zones and using these zones for calibrating the actual positions relative to the NM of the target sequences in the 24 h post-PHx samples it is possible to confirm a trend for most target sequences to become significantly closer to the NM at 24 h post-PHx (Table IV) when there is a well-known peak of DNA synthesis [Michalopoulos and DeFrances, 1997; Fausto, 2001]. This trend supports our previous observation that DNA moves towards the NM during DNA replication in vivo [Maya-Mendoza et al., 2003; Rivera-Mulia et al., 2011]. However, in the 7 d post-PHx samples, when the liver regeneration is already complete according to classical experimental parameters of liver regeneration (see Materials and Methods Section), most target sequences remain closer to the NM than in the control, indicating that the original configuration of the structural DNA loops has not been restored (Table III). This was in contrast to our published results showing that in the case of the multi-gene locus of the albumin family the original configuration of the structural DNA loops is fully reestablished by 7 d post-PHx [Rivera-Mulia et al., 2011]. Moreover, using the specific kinetics of nucleoid DNA digestion corresponding to G0 (control in

Fig. 2) for locating each target sequence within a topological zone relative to the NM in the 7 d post-PHx samples, it was confirmed that most target sequences remained closer to the NM at 7 d post-PHx, without having returned to their original position observed in the unperturbed G0 controls (Table IV).

ORGANIZATION IN STRUCTURAL DNA LOOPS OF THE *c-myc* REGION AFTER FULL RECOVERY FROM PARTIAL HEPATECTOMY

We determined the organization in structural DNA loops of the *c-myc* region in primary hepatocytes obtained at 21 d post-PHx. That means from rats that were fully recovered from the surgical procedure showing normal feeding and overall behavior as well as normal gain of weight. For these experiments we included a further amplicon (j) that is located near the 5' end of the *c-myc* gene and so it complements the amplicon j' located near the 3' end of the *c-myc* gene. This was done in order to assess the location of the whole *c-myc* gene within the topological zones relative to the NM.

Using the corresponding data from: the kinetics of loop DNA digestion with DNase I (Fig. 2), PCR amplification of target sequences in partially digested nucleoid samples corresponding to the time-points of the DNase I digestion curve (Fig. 3), and the location of each mapped sequence within a given topological zone relative to the NM (Table III), we drew the most likely configuration of the DNA loops at 21 d post-PHx (Fig. 4), that together with data in Tables III and IV, confirmed that in the newly quiescent hepatocytes of the regenerated liver most target sequences corresponding to the

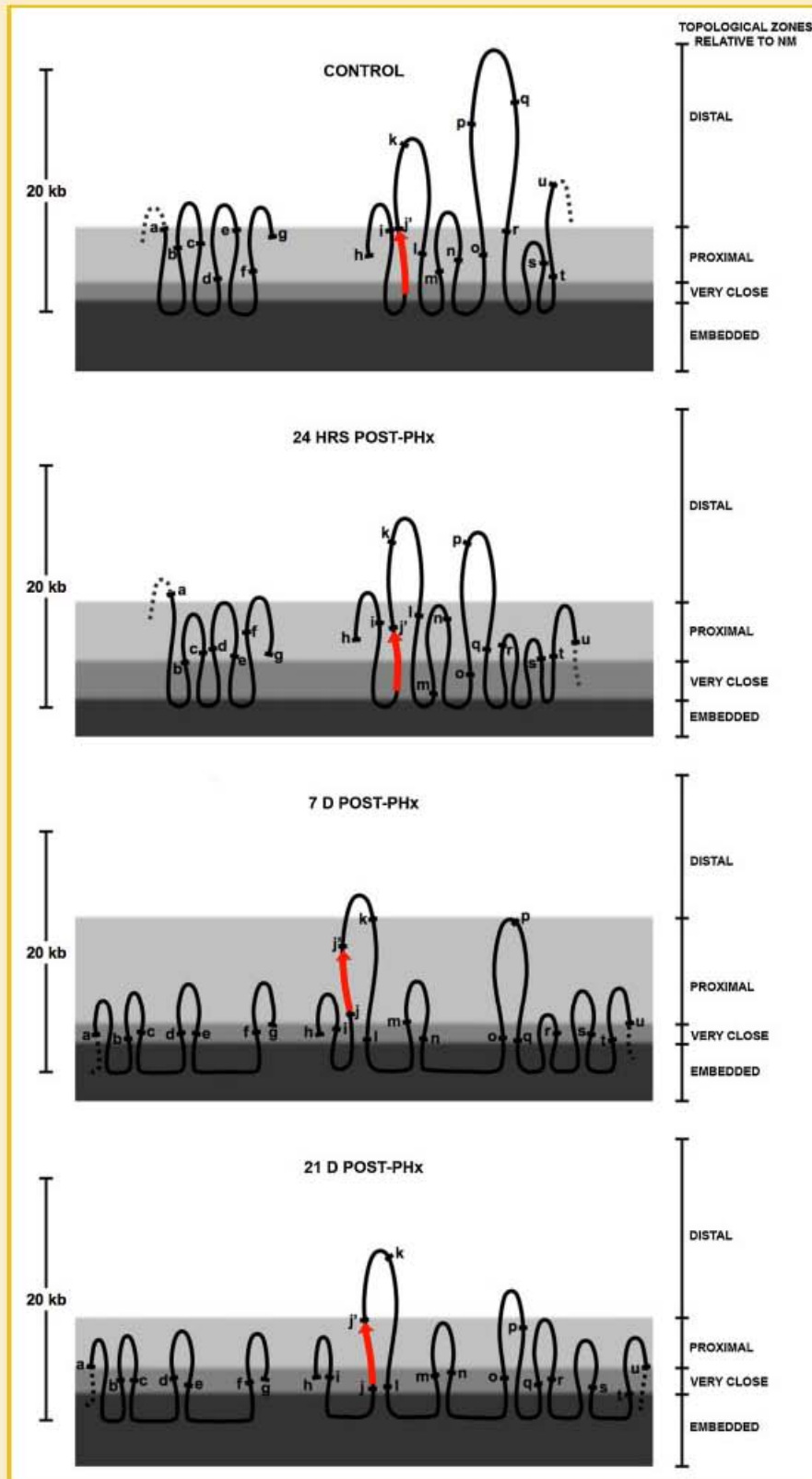


Fig. 4. Experimentally determined structural DNA loop organization of the 210 kb region centered on *c-myc*. The drawings are based on data from Table III. The letters indicate the position of the target sequences within the DNA loops. The arrow corresponds to *c-myc* and the tip indicates direction of transcription. The dashed lines indicate 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 specific kinetics of nucleoid DNA digestion (Fig. 2). The illustration is according to scale in kb along the x and y axis. [Color figure can be seen in the online version of this article, available at <http://wileyonlinelibrary.com/journal/jcb>]

TABLE IV. Location of the Target Sequences From the 210 kb Genomic Region Studied Within the Specific Topological Zones Relative to the NM Defined According to the Kinetics of Nucleoid-DNA Digestion in Samples From Control G0 Hepatocytes Obtained From Normal Rat Liver (Fig. 2)

Amplicon	Topological zones relative to NM according to kinetics of DNA digestion of nucleoids from G0 hepatocytes																			
	Control					24 h post-PHx					7 d post-PHx					21 d post-PHx				
	C	D	P	VC	E	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	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
j'	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
k	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
l	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
n	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
o	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
q	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
r	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
s	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
t	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
u	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

The amplicons were scored either as positive or negative as a function of endonuclease 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. 3). Control G0, samples from normal rat liver hepatocytes. Twenty-four hours post-PHx, samples obtained from hepatocytes 24 h after partial hepatectomy. Seven days post-PHx, samples obtained from hepatocytes 7 days after partial hepatectomy. Twenty-one days post-PHx, samples obtained from hepatocytes 21 days after partial hepatectomy. C, 0' digestion-time control. D, distal to the NM. P, proximal to the NM. VC, very close to the NM. E, embedded within the NM. All target sequences were mapped in repeated experiments with samples from separate animals (n ≥ 4). +* Indicates that in about 30–50% of the experiments the corresponding target sequence mapped to the previous topological zone farther from the NM.

region under study do not return to their original positions observed in the original, unperturbed G0 hepatocytes. Thus in the case of this 210 kb, gene-poor, genomic region DNA replication resulted in the formation of an extra loop (see 24 h post-PHx in Fig. 4) that was still present in the newly quiescent hepatocytes of the regenerated liver at 7 d post-PHx. Moreover, at 21 d post-PHx the *c-myc* region remains organized into at least seven well-defined DNA loops in the hepatocytes from the regenerated liver and only the loop containing the *c-myc* gene is somehow preserved in a configuration similar to that in the original G0 control hepatocytes (Fig. 4). Indeed, the data suggest that at 7 d post-PHx the whole *c-myc* gene is located in the P region relative to the NM while at 21 d post-PHx the *c-myc* gene is again split between two contiguous topological zones (P and VC) as in the control hepatocytes (Fig. 4).

EXPRESSION OF PCNA AND *c-myc* IN HEPATOCYTES BEFORE AND AFTER PARTIAL HEPATECTOMY

PCNA codes for a processivity factor for DNA polymerase delta essential for replication and the abundance of its mRNA increases in cells stimulated to proliferate [Maga and Hubscher, 2003]. On the other hand, *c-myc* is a typical immediate early gene whose expression is augmented by proliferating stimuli [Taub, 1996]. We performed real-time PCR analysis of mRNA experiments for assessing the relative expression of such genes in control (quiescent), 24 h, 7 d and 21 d post-PHx hepatocytes. *PCNA* and

c-myc are early-response genes necessary for cell proliferation after PHx and so their peak of expression occurs before the entry into S phase which is basically completed by 24 post-PHx [Taub, 1996; Michalopoulos and DeFrances, 1997]. Thus at 24 post-PHx the expression of both genes is already declining. Nevertheless the results show an increase in the corresponding mRNAs at 24 h post-PHx when compared with the control. Such mRNAs have returned to control values by 7 d post-PHx, when liver regeneration is complete (Fig. 5). However, the expression of *c-myc* becomes undetectable at 21 d post-PHx suggesting that the significant reorganization of the loops in the region under study somehow precludes the basal expression of the gene.

DISCUSSION

Metazoan chromosomes correspond to single and very long DNA molecules. The intrinsic structural properties of DNA pose a structural stress problem when the molecule is longer than its currently estimated persistence length of ≈240 pb or 800 Å. The persistence length corresponds to that in which the molecule behaves as a rigid rod but at longer lengths the molecule becomes flexible and shows a trend for cyclization [Calladine et al., 2004]. DNA loops are topological equivalents of covalently closed DNA circles. Indeed, by looping and supercoiling around its axis DNA

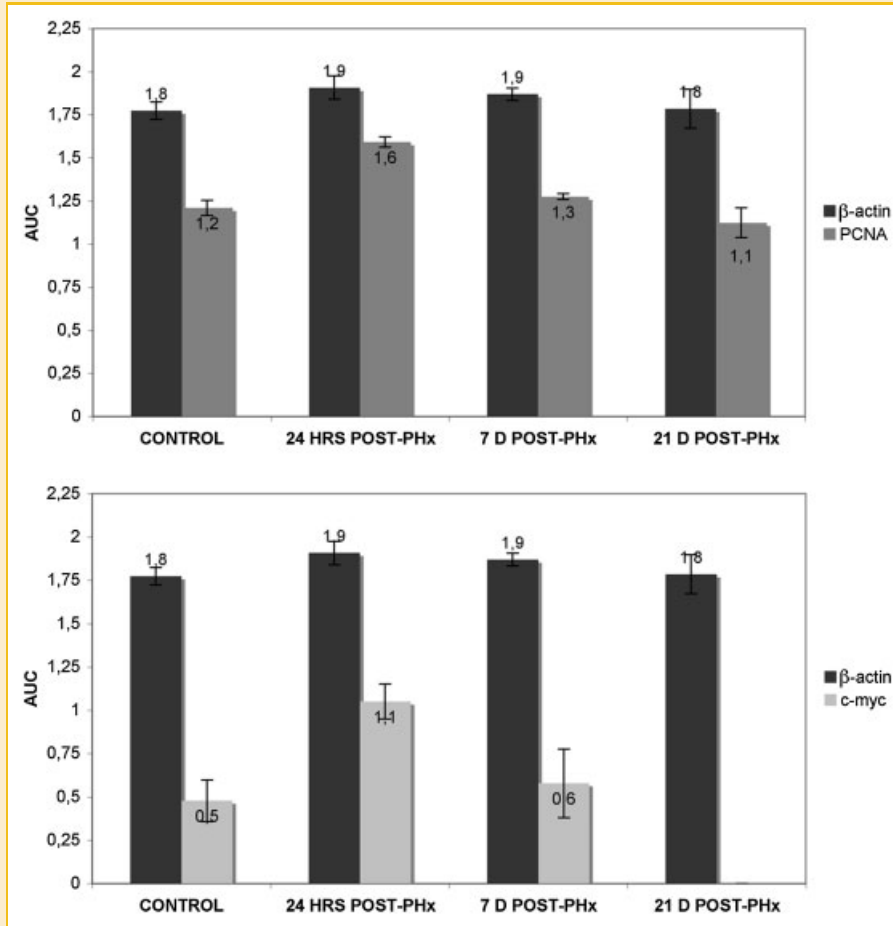


Fig. 5. Real-time PCR analysis of mRNA. Expression of *PCNA* and *c-myc* was analyzed by real-time PCR. Control G0 hepatocytes; proliferating hepatocytes 24 h post-partial hepatectomy (24 h post-PHx); restored G0 hepatocytes 7 days after partial hepatectomy (7 d post-PHx); hepatocytes from fully recovered animals 21 days after partial hepatectomy (21 d post-PHx). The expression of *beta-actin*, a constitutive gene, was included for comparison; *c-myc* expression was not detectable at 21 d post-PHx. AUC: area under the curve. Bars indicate SD ($n = 3$).

dissipates structural-stress energy and avoids the otherwise unavoidable disruption of the weak hydrogen bonds between both strands, thus preserving molecular integrity [Bloomfield et al., 2000; Calladine et al., 2004]. Apparently, the spontaneous formation of loops attached to the NM is a natural answer to a structural stress problem that may put at risk the integrity of DNA. Yet as it has been pointed out elsewhere [Woodcock and Ghosh, 2010] there is common misunderstanding on the phenomenon of DNA looping as some loops are just the result of transient protein-DNA interactions in particular associated with transcription (e.g., enhancer-promoter loops) that involve chromatin proteins and transcription factors while other loops are long-term structures formed independently of chromatin proteins. The present work has been done using nucleoids that consist of the NM plus the naked DNA loops attached to it, such preparations are completely devoid of histones and all other chromatin proteins. Thus here we describe a phenomenology related to naked supercoiled DNA loops attached to a non-soluble proteinaceous structure (NM).

The kinetics of nucleoid DNA digestion with DNase I indicate that similar amounts of total loop DNA are highly resistant to the enzyme

and thus embedded within the NM in control, 7 d and 21 d post-PHx samples (Fig. 2). However, at 24 h post-PHx the percentage of loop DNA highly resistant to the enzyme is less than that in the control but in this case there are two factors linked to DNA replication that transiently increase the overall sensitivity of loop DNA to DNase I, an enzyme that hydrolyzes the DNA backbone by a single-strand cleavage (nicking) mechanism [Lewin, 1980]: helicase-mediated reduction of DNA supercoiling and the presence of single-stranded DNA in the replication forks. Nevertheless, at 24 h post-PHx the location of the specific target sequences to a given topological zone was determined using both the zonification according to the specific digestion kinetics (Table III) and the zonification according to the digestion kinetics of the control (Table IV). In both cases the results are consistent with a movement of the target sequences towards the NM in a sequential fashion during DNA replication in vivo (Fig. 4). These results confirm our previous observations concerning the structural DNA loops corresponding to the genomic region of the albumin family [Rivera-Mulia et al., 2011].

It is important to note that we are actually monitoring the average DNA loop configuration in a large number of nucleoids from

hepatocytes. Thus the data for the 24 h post-PHx samples correspond to an average snapshot at the end of the S phase (when most proliferating hepatocytes have incorporated the largest possible amount of $[H]^3$ -thymidine), and so to the average configuration at the peak of DNA synthesis [Fabrikant, 1968] of the structural loops in the region studied. Such an average snapshot of the late S phase is possible because of the well-known high synchronicity of reentry into the cell cycle of the remaining hepatocytes after PHx [Fabrikant, 1968; Fausto, 2001]. Under our standard experimental conditions the positional mappings of the target sequences relative to the NM at 24 h post-PHx are quite reproducible among experiments (Fig. 3). However, in experiments carried out at earlier and latter hours around the main peak of DNA synthesis (24 h post-PHx) the location of most target sequences relative to the NM becomes truly erratic (data not shown), yet this indirectly confirms the movement of DNA towards the NM during S phase.

The loop organizations depicted in Figure 4 were inferred from the distribution in topological space of a relatively large set of points (amplicons) rather evenly spaced along the genomic region studied. So far there is non-reliable method for actually seeing the specific loops corresponding to a natural genomic region. Currently 3C chromosome conformation capture (3C) is widely used for determining whether any two DNA sequences are located in spatial proximity to each other in the eukaryotic nucleus [Woodcock and Ghosh, 2010]. This method is based in the artificial crosslinking between DNA and proteins within the nucleus followed by digestion of chromatin with restriction enzymes and partial solubilization of chromatin fragments and dispersion by dilution. Then enzymatic ligation of DNA fragments held in proximity is carried out followed by identification of such fragments by different means. So far only a single study of 3C applied to preparations extracted for NM, hence devoid of chromatin proteins (M3C), has been published and the results showed that important DNA sequences labeled as proximal to each other in the standard 3C protocol were not so in the M3C assay [Gavrilov et al., 2010]. Yet despite its uncertainties many a scientist infer that a DNA loop exists between two DNA sequences positive in the artificial proximity ligation procedure of 3C. Hence the whole trajectory of a several-kb long segment of DNA in space is inferred from just the proximity of two points (short DNA sequences). In contrast, our topological approach for determining the organization into structural DNA loops of any genomic region with known sequence [Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo, 2010] is based in a sound, fundamental topological principle [Flegg, 2001]: points in a deformable string (DNA) can be positionally mapped in topological space relative to a position-reference invariant (NM), from such mapping it can be deduced the trajectory of the string in third dimension. Corollary: the larger the number of points mapped (short DNA sequences) the better the resolution of the strings' trajectory. Hence we do not depend on pairs of apparently proximal points (two short DNA sequences) for assuming that there is a loop between each pair but we map in topological space a set of points (short DNA sequences) whose distribution depicts the whole trajectory of the string (genomic region) in space.

In the case of the *c-myc* region the original position of most target sequences relative to the NM (control in Fig. 4) was not recovered in

the newly quiescent hepatocytes at 7 d nor at 21 d post-PHx despite the successful regeneration of the liver (Tables III and IV). Indeed, the resulting configuration for most of the structural DNA loops was remarkably different to that in the control (Fig. 4). Interestingly, at 21 d post-PHx only the loop containing the *c-myc* gene is rather similar to the original in the control hepatocytes. In the rat *c-myc* is a solitary gene located in chromosome 7q33, the nearest bona fide genes are *A1bg* located some 1.15 Mb from the 5' end of *c-myc* and *Gsdmc 1* located some 2.15 Mb from the 3' end of *c-myc* (RGSC Genome Assembly v3.4). Hence, the fact that a gene-rich genomic region recovers its original configuration of structural DNA loops after liver regeneration [Rivera-Mulia et al., 2011] while this is not the case for a gene-poor region as the one centered on *c-myc*, suggests that the chromatin conformation around potentially active genes somehow determines or guides the reestablishment of the DNA–NM interactions after DNA replication and mitosis. This suggestion is further supported by the fact that the original loop containing *c-myc* is the only one that is relatively preserved in the newly formed hepatocytes after liver regeneration and so it remains rather heterogeneous in size relative to its neighbors (Fig. 4). Nevertheless, the apparent permanent reorganization of the *c-myc* genomic region following DNA synthesis and mitosis during liver regeneration correlates with the eventual extinction of *c-myc* basal expression in the regenerated liver (Fig. 5). As *c-myc* is an early response gene necessary for cellular progression to mitosis, the absence of basal *c-myc* expression in hepatocytes from regenerated liver may be also correlated with the known fact that rats that have previously undergo a full cycle of liver regeneration may undergo further rounds of liver regeneration but each further round is more protracted and less efficient [Michalopoulos and DeFrances, 1997] as if *c-myc* upregulation after PHx starts from zero in the regenerated liver.

DNA–NM interactions of the structural kind occur on a grand scale as there are some 66,000 DNA loops in a typical diploid hepatocyte of a young rat. Yet that number tends to increase in the long term as a function of age, with the corresponding reduction in the loop average size [Maya-Mendoza et al., 2005]. This phenomenon, apparently driven by thermodynamic and structural constraints, has been linked to the loss of proliferating potential and terminal differentiation of mammalian cells after which the loops become quite short and homogeneous in size [Aranda-Anzaldo, 2009; Alva-Medina et al., 2010, 2011]. However, from our previous work we know that a time window of not more than 21 d post-PHx, used in the present experiments, is not long enough for producing spontaneous but observable changes in the overall NHOS of hepatocytes [Maya-Mendoza et al., 2005]. Therefore, the observed reorganization of the structural DNA loops in the *c-myc* region is a consequence of DNA replication and mitosis after PHx. For obvious ethical reasons we cannot perform repeated PHx in the same animal yet it is known, from old reports in the literature, that young adult rats may undergo repeated PHx followed by the corresponding successful liver regeneration [Michalopoulos and DeFrances, 1997] and so this implies that whichever the resulting NHOS after liver regeneration in young rats such an NHOS is compatible with further DNA replication *in vivo*.

It is known that a single, large transcriptional unit can be differentially arranged into several DNA loops according to cell type without precluding the expression of the corresponding gene, indicating that transcription is not a major factor for determining the structural DNA loops [Trevilla-García and Aranda-Anzaldo, 2012]. Indeed, chromatin proteins do not participate in the DNA–NM interactions as such proteins are completely eliminated by the high salt used for obtaining nucleoids [Verheijen et al., 1986]. Thus, the structural DNA–NM interactions have a higher affinity than those between chromatin proteins and DNA. Nevertheless, in vivo chromatin proteins may hinder potential DNA–NM interactions by competing with the NM for a given DNA sequence or configuration. Hence the chromatin conformation around potentially active genes may contribute to the selection of the actual set of LARs from the potential set of MARs in a gene-rich region, thus leading to a local NHOS that remains rather similar through several cell cycles. On the other hand, in a gene-poor region the average chromatin conformation associated with non-coding DNA seems unable to compete with the NM for DNA sequences or configurations and so after DNA replication or mitosis the reestablishment of DNA–NM interactions in a non-coding genomic region may be primarily guided by structural constraints resulting from torsional and bending stress along the DNA, stress that needs to be dissipated in order to preserve the structural integrity of DNA and this would lead to major reorganization of the local DNA–NM interactions.

ACKNOWLEDGMENTS

While doing this work Rebeca C. Castillo-Mora was a CONACYT Research Scholar within the Graduate Program in Biological Sciences at the Faculty of Sciences-UNAM, México. We thank Dr. Rolando Hernández-Muñoz from IFC-UNAM and Dr. Federico Martínez from the Faculty of Medicine-UNAM for their valuable comments and suggestions on this work.

REFERENCES

- Alva-Medina J, Dent MAR, Aranda-Anzaldo A. 2010. Aged and post-mitotic cells share a very stable higher-order structure in the cell nucleus in vivo. *Biogerontology* 11:703–716.
- Alva-Medina J, Maya-Mendoza A, Dent MAR, Aranda-Anzaldo A. 2011. Continued stabilization of the nuclear higher-order structure of post-mitotic neurons in vivo. *PLoS ONE* 6(6):e21360.
- Anachkova B, Djeliova V, Russev G. 2005. Nuclear matrix support of DNA replication *J Cell Biochem* 96:951–961.
- 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.
- 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.
- Aranda-Anzaldo A. 2009. A structural basis for cellular senescence. *Aging* 1:598–607.
- Benham C, Kohwi-Shigematsu T, Bode J. 1997. Stress-induced duplex destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *J Mol Biol* 277:181–196.
- Bloomfield VA, Crothers DM, Tinoco I, Jr. 2000. *Nucleic Acids; structure, properties and functions*. Sausalito, CA: University Science Books. pp. 443–473.
- Calladine CR, Drew HR, Luisi BF, Travers AA. 2004. *Understanding DNA*. London: Elsevier-Academic Press. pp. 94–138.
- Christensen MO, Larsen MK, Barthelmes HU, Hock R, Andersen CL, Kjeldsen E, Knudsen BR, Westergaard O, Boege F, Mielke C. 2002. Dynamics of human topoisomerase II alpha and II beta in living cells. *J Cell Biol* 157:31–44.
- Cook PR. 1999. The organization of replication and transcription. *Science* 282:1790–1795.
- Cook PR, Brazell I, Jost E. 1976. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J Cell Sci* 22:303–324.
- Dent MAR, Segura-Anaya E, Alva-Medina J, Aranda-Anzaldo A. 2010. NeuN/Fox3 is an intrinsic component of the neuronal nuclear matrix. *FEBS Lett* 584:2767–2771.
- Elcock LS, Bridger JM. 2008. Exploring the effects of a dysfunctional nuclear matrix. *Biochem Soc Trans* 36:1378–1383.
- Fabrikant J. 1968. The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. *J Cell Biol* 36:551–565.
- Fausto N. 2001. Liver regeneration: From laboratory to clinic. *Liver Transplant* 7:835–844.
- Flegg HG. 2001. *From geometry to topology*. Mineola, NY: Dover Publications. 208 pp.
- Freshney I. 1994. *Culture of animal cells*, 3rd edition. New York: Wiley-Liss. pp. 320–322.
- Gavrilov AA, Zukher IS, Philonenko ES, Razin SV, Iarovaia OV. 2010. Mapping of the nuclear matrix-bound chromatin hubs by a new M3C experimental procedure. *Nucleic Acids Res* 38:8051–8060.
- Higgins GM, Anderson RM. 1931. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 12:186–202.
- Hozak P, Hassan AB, Jackson DA, Cook PR. 1993. Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton. *Cell* 73:361–373.
- Iarovaia OV, Bystritsky A, Ravcheev D, Hancock R, Razin SV. 2004. Visualization of individual DNA loops and a map of loop domains in the human dystrophin gene. *Nucleic Acids Res* 32:2079–2086.
- Lewin B. 1980. *Gene expression*. New York: John Wiley and Sons. pp. 360–362.
- Maga G, Hubscher U. 2003. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): A dancer with many partners. *J Cell Sci* 116:3051–3060.
- Maya-Mendoza A, 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.
- Maya-Mendoza A, Hernández-Muñoz R, Gariglio P, 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.
- Maya-Mendoza A, Hernández-Muñoz R, Gariglio P, 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.
- Maya-Mendoza A, Hernández-Muñoz R, Gariglio P, 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.
- Michalopoulos GK, DeFrances MC. 1997. Liver regeneration. *Science* 276:60–66.
- Mika S, Rost B. 2005. NMPdb: Database of nuclear matrix proteins. *Nucleic Acids Res* 33:D160–D163.
- Morales-González JA, Gutiérrez-Salinas J, Yáñez L, Villagómez-Rico C, Badillo-Romero J, Hernández-Muñoz R. 1999. Morphological and biochemical effects of a low ethanol dose on rat liver regeneration. *Dig Dis Sci* 44:1963–1974.

- Nakamura H, Morita T, Sato C. 1986. Structural organizations of replicon domains during DNA synthetic phase in the mammalian nucleus. *Exp Cell Res* 165:291–297.
- Nickerson JA. 2001. Experimental observations of a nuclear matrix. *J Cell Sci* 114:463–474.
- Ottaviani D, Lever E, Takousis P, Sheer D. 2008. Anchoring the genome. *Genome Biol* 9(1):201.
- Radulescu AE, Cleveland DW. 2010. NuMA after 30 years: The matrix revisited. *Trends Cell Biol* 20:214–222.
- Razin SV. 1997. Nuclear matrix and the spatial organization of chromosomal DNA domains. Austin: RG Landes Co. Inc. p. 13.
- Razin SV. 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.
- Rivera-Mulia JC, 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. *DNA Res* 17: 23–35.
- Rivera-Mulia JC, Hernández-Muñoz R, Martínez F, Aranda-Anzaldo A. 2011. DNA moves sequentially towards the nuclear matrix during DNA replication *in vivo*. *BMC Cell Biol* 12:3.
- Roti-Roti JL, Wright WD, Taylor YC. 1993. DNA loop structure and radiation response. *Adv Radiat Biol* 17:227–259.
- Sadoni N, Cardoso MC, Stelzer EH, Leonhardt H, Zink D. 2004. Stable chromosomal units determine the spatial and temporal organization of DNA replication, *J Cell Sci* 117:5353–5365.
- Simon DN, Wilson KL. 2011. The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic network of networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:695–708.
- Taub R. 1996. Transcriptional control of liver regeneration. *FASEB J* 10:413–427.
- Tomilin N, Solovjeva L, Krutilina R, Chamberland C, Hancock R, Vig B. 1995. Visualization of elementary DNA replication units in human nuclei corresponding in size to DNA loop domains. *Chromosome Res* 3:32–40.
- Trevilla-García C, Aranda-Anzaldo A. 2012. The organization of a large transcriptional unit (*Fyn*) into structural DNA loops is cell-type specific and independent of transcription. *Gene* 493:1–8.
- Tsutsui KM, Sano K, Tsutsui K. 2005. Dynamic view of the nuclear matrix. *Acta Med Okayama* 59:113–120.
- Verheijen R, Kuijpers H, Vooijs P, van Venrooij W, Ramaekers F. 1986. Protein composition of nuclear matrix preparations from HeLa cells: An immunochemical approach. *J Cell Sci* 80:103–122.
- Wei X, Samarabandu J, Devdhar RS, Siegel AJ, Acharya R, Berezney R. 1998. Segregation of transcription and replication sites into higher order domains. *Science* 281:1502–1506.
- Woodcock CL, Ghosh RP. 2010. Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 2:a000596.