

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

Juan Carlos Rivera Mulia* y Armando Aranda Anzaldo*

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

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

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

Correo electrónico:

riveramjc@gmail.com y aarandaa@uaemex.mx
Este trabajo ha sido patrocinado por la UAEMéx, proyecto 2212/2006, y el

CONACYT, proyecto 48447-Q (Responsable Armando Aranda Anzaldo). Juan Carlos Rivera Mulia es becario CONACYT y candidato a Doctor en Ciencias registrado en el programa en Ciencias Biomédicas con sede en el Instituto de Fisiología Celular (IFC), UNAM, programa del Padrón Nacional de Posgrado Competente a Nivel Internacional.

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

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

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

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

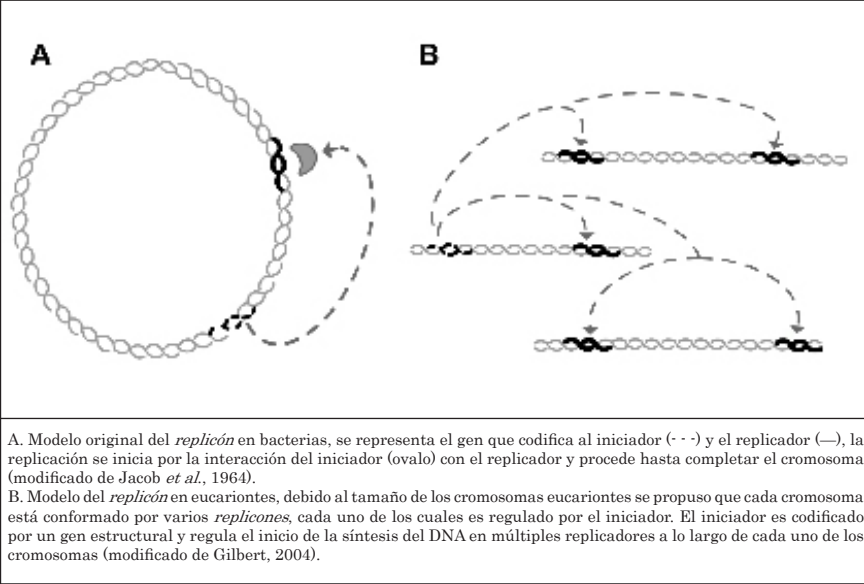
Key words: chromatin, DNA loops, nuclear matrix, MARS, DNA ORC.

Introducción

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

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

Figura 1. El modelo del replicón.



A. Modelo original del replicón en bacterias, se representa el gen que codifica al iniciador (---) y el replicador (—), la replicación se inicia por la interacción del iniciador (oval) con el replicador y procede hasta completar el cromosoma (modificado de Jacob *et al.*, 1964).
 B. Modelo del replicón en eucariotes, debido al tamaño de los cromosomas eucariotes se propuso que cada cromosoma está conformado por varios replicones, cada uno de los cuales es regulado por el iniciador. El iniciador es codificado por un gen estructural y regula el inicio de la síntesis del DNA en múltiples replicadores a lo largo de cada uno de los cromosomas (modificado de Gilbert, 2004).

1. El modelo del replicón

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

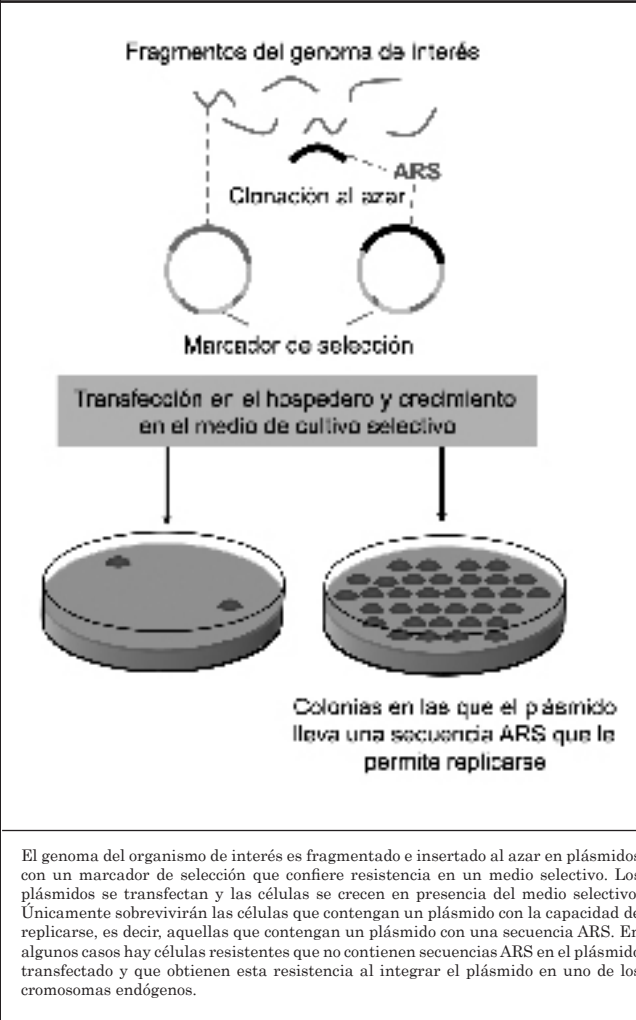
componente que difunde y regula el inicio de la polimerización: el *iniciador*, el cual interactúa con el segundo elemento, que es una secuencia específica de nucleótidos en el DNA que determina el sitio en el que comienza la síntesis: el *replicador* (figura 1A).

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

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

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

Figura 2. Ensayo de replicación autónoma.



El genoma del organismo de interés es fragmentado e insertado al azar en plásmidos con un marcador de selección que confiere resistencia en un medio selectivo. Los plásmidos se transfectan y las células se crecen en presencia del medio selectivo. Únicamente sobrevivirán las células que contengan un plásmido con la capacidad de replicarse, es decir, aquellas que contengan un plásmido con una secuencia ARS. En algunos casos hay células resistentes que no contienen secuencias ARS en el plásmido transfectado y que obtienen esta resistencia al integrar el plásmido en uno de los cromosomas endógenos.

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

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

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

2. El replicón de la levadura

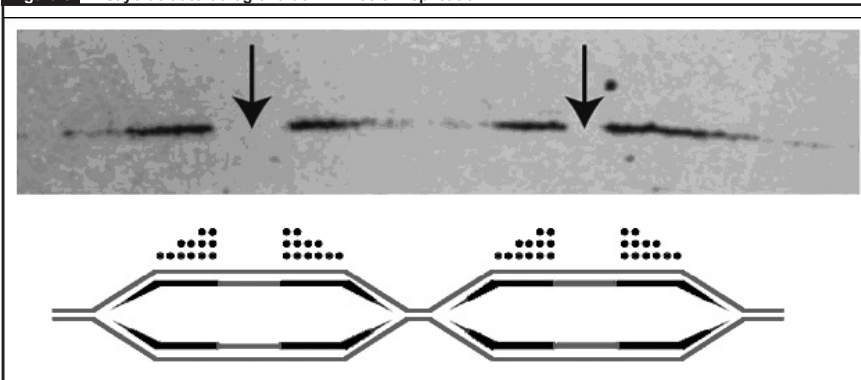
Poco después de la identificación de los elementos del replicón en bacterias se realizó el ensayo de replicación autónoma en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, uno de los organismos más

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

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

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

Figura 3. Ensayo de autoradiografía de DNA recién replicado.



En la parte superior se muestra el resultado típico de un experimento de autoradiografía sobre DNA recién replicado y extendido en una laminilla. La intensidad del marcaje se extingue conforme va agotándose la cantidad del nucleótido radioactivo, lo que indica la dirección de la replicación. Las flechas indican la posición de dos sitios de inicio de la replicación a lo largo de un segmento de DNA.

En la parte inferior se esquematizan las horquillas de replicación del experimento de la parte superior, se muestra que el número de marcas (●) es mayor al inicio del pulso.

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

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

3. El replicón de los metazoarios

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

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

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

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

3.1 El iniciador

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

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

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

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

3.2 La búsqueda del replicador metazoario

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

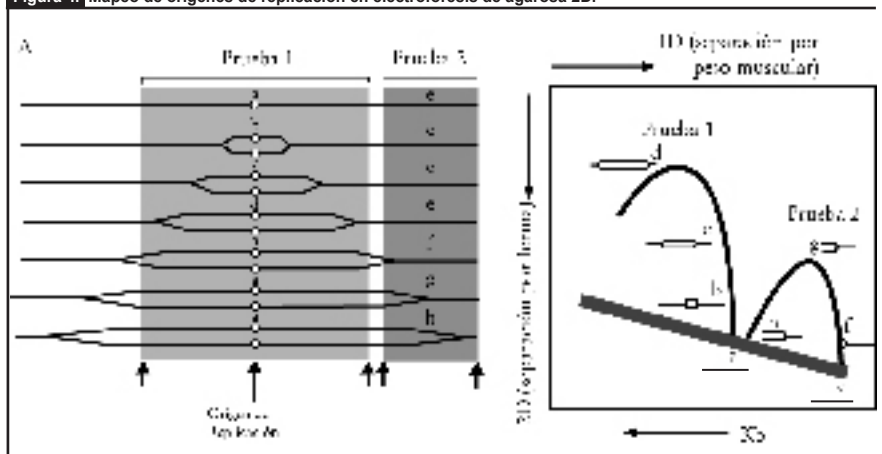
Una de las primeras técnicas utilizadas para detectar los sitios de arranque de la replicación fue la identificación del DNA recién sintetizado en un locus de interés (de secuencia conocida), asumiendo que el replicador debe estar cerca de estas regiones. Para ello, las células se cultivan en presencia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

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

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

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

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



En A se representa una región de DNA en diferentes tiempos durante la replicación. La región de interés se digiere con enzimas de restricción (flechas) y los fragmentos son analizados por electroforesis de dos dimensiones y transferencia de Southern utilizando sondas complementarias a la región de interés.

En B se muestra el patrón de hibridaciones que se obtiene en la transferencia de Southern. Los fragmentos lineales de diferentes tamaños (a y e en A) hibridan a lo largo de la línea diagonal, mientras que los fragmentos que derivan de distintas posiciones de una horquilla de replicación migran de manera aberrante e hibridan en diferentes posiciones a lo largo de las líneas curvas (b, c, d, f, g, h) (tomado de Cook, 2001).

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

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

3.3 Replicadores en mamíferos

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

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

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

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

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

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

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

4. El contexto de la replicación

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

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

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

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

4.1. La replicación en los eucariontes

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5. Hacia un modelo del replicón metazoario

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

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

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

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

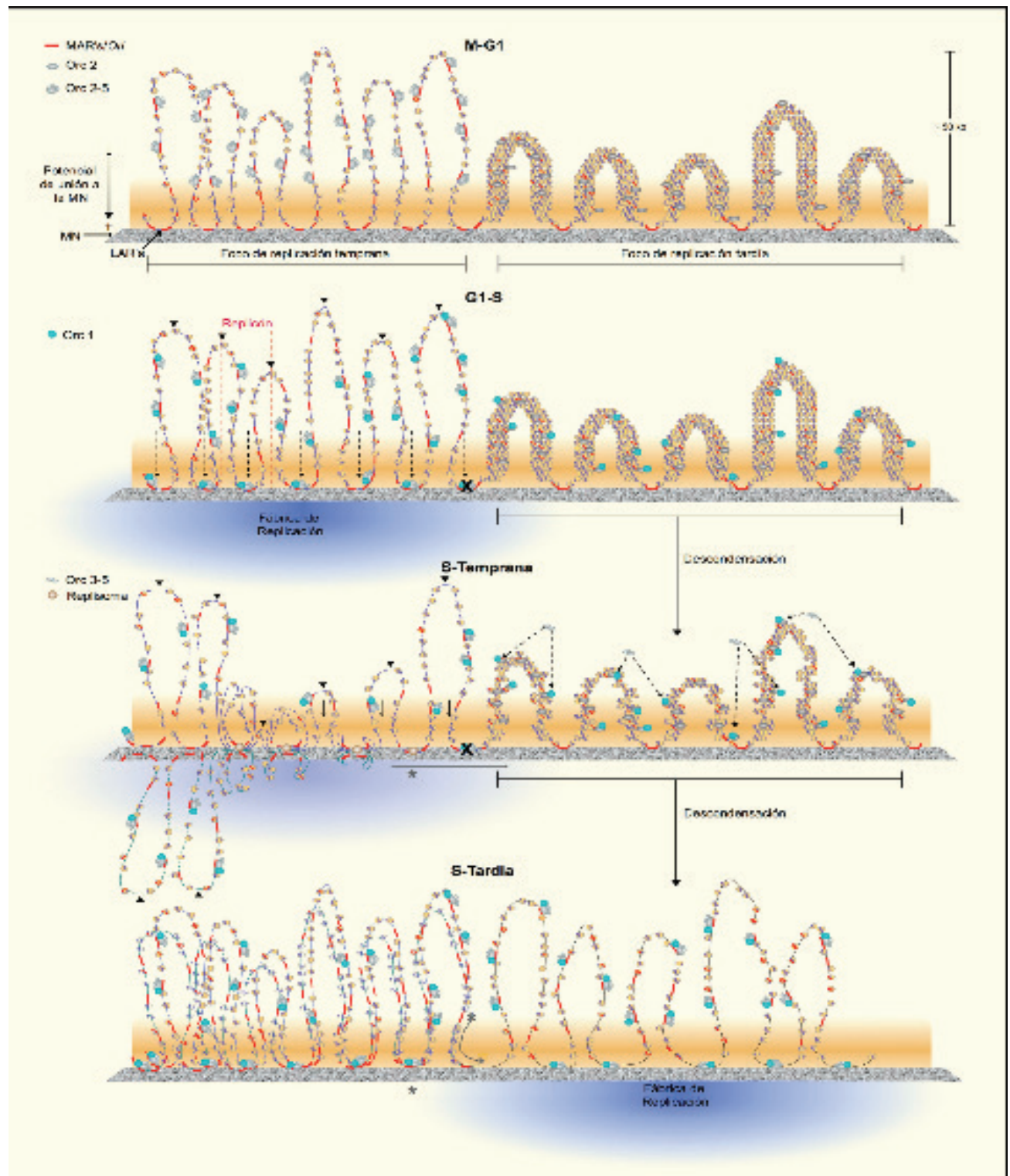
el establecimiento y mantenimiento de la heterocromatina (Pak *et al.*, 1997; Shareef *et al.*, 2001; Prasanth *et al.*, 2004) ya que existe una interacción del Orc2 con la proteína de heterocromatina Hp1 (figura 5 M-G1).

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

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

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

Figura 5. Modelo de la replicación de los metazoarios.



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

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

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

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

Conclusiones

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

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

oña

Bibliografía

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

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

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

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

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

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

dependent DNA Binding and Replication Initiation by the Human Origin Recognition Complex”, *Genes Dev.* 17: 1894–1908.

Vaughn, J. P.; P. A. Dijkwel; J. L. Hamlin (1990). “Replication Initiates in a Broad Zone in the Amplified CHO Dihydrofolate Reductase Domain”, *Cell.* 61: 1075–1087.

Vogelstein, B.; D. Pardoll; D. Coffey (1980). “Supercoiled Loops and Eukaryotic DNA

Replication”. *Cell.* 22: 79-85. 157.

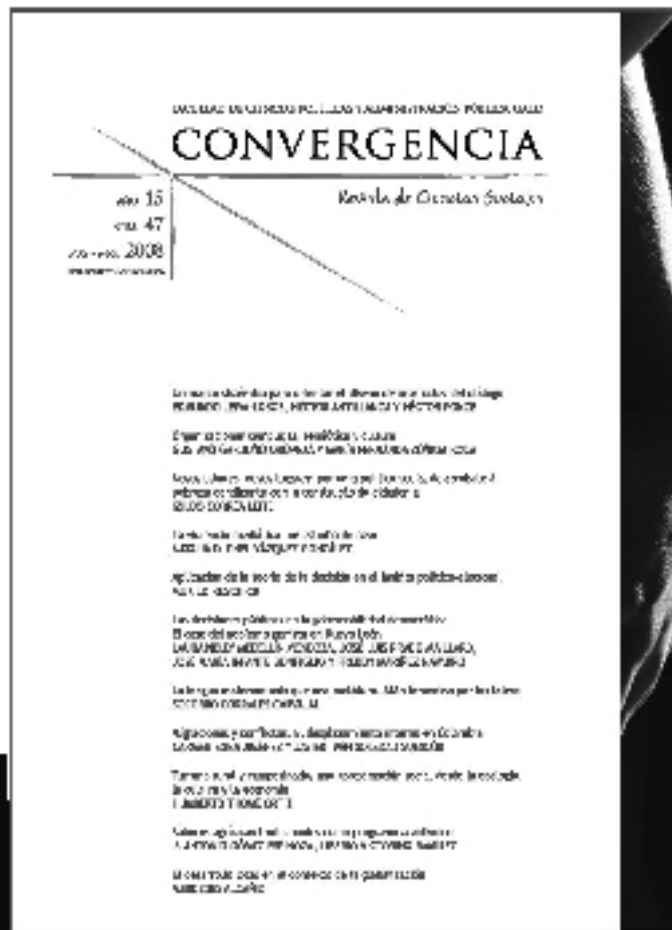
Woodfine, K.; H. Fiegler; D. M. Beare; J. E. Collins; O. T. McCann; B. D. Young; S. Debernardi; R. Mott; I. Dunham; N. P. Carter (2004). “Replication Timing of the Human Genome”, *Hum Mol Genet.* 13: 191-202.

Yamashita, M.; Y. Hori; T. Shinomiya; C. Obuse; T. Tsurimoto; H. Yoshi Kawa; K. Shirahige (1997). “The Efficiency and Timing of Ini-

tiation of Replication of Multiple Replicons of *Saccharomyces cerevisiae* Chromosome VI”, *Genes Cells* 2:655-665.

Yasuda, S.; Y. Hirota (1977). “Cloning and Mapping of the Replication Origin of *Escherichia coli*”, *Proc. Natl Acad Sci USA.* 74: 5458–5462.

Zbarskii, I. B. (1998). “On the History of Nuclear Matrix Manifestation”, *Cell Res.* 8 (2): 99-103.



CONVERGENCIA Revista de Ciencias Sociales.
 Año 15 Número 47 julio-agosto de 2008.
 Publicación del Centro de Investigación y Desarrollo Avanzado en Ciencias Políticas y
 Administración Pública, de la Universidad Autónoma del Estado de México.
 Telfax: (722) 215-9299

<http://normanpearlbrown.com.mx> • www.redalyc.org • <http://www.convergenciasocial.com.mx>