

番号: Selexis_2007_Aug_Nature Meth.

分野: MARs(新規 MAR の *in silico* 探索と wet chem 実証)

添付1

論文	Genome-wide prediction of matrix attachment regions that increase gene expression in mammalian cells
雑誌	NATURE METHODS, PUBLISHED ONLINE 5 AUGUST 2007
著者	Pierre-Alain Girod ^{1,4} , Duc-Quang Nguyen ^{1,2,4} , David Calabrese ^{1,4} , Stefania Puttini ¹ , Me'lanie Grandjean ¹ , Danielle Martinet ³ , Alexandre Regamey ^{1,4} , Damien Saugy ¹ , Jacques S Beckmann ³ , Philipp Bucher ² & Nicolas Mermod ¹
機関	<ol style="list-style-type: none">1. Institute of Biotechnology, University of Lausanne, and Center for Biotechnology of the University of Lausanne and E'cole Polytechnique Fe'de'rale de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland.2. Swiss Institute for Experimental Cancer Research, Swiss Institute of Bioinformatics, 1066 Epalinges, Switzerland.3. Service of Medical Genetics, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland.4. Present addresses: Selexis SA, 18 Ch. des Aulx, Geneva, Switzerland (P.A.G., D.C., A.R.), MRC Functional Genetics Unit, University of Oxford, Oxford OX1 3TG, UK (D.-Q.N.).
要旨	<p>➤ 培養真核細胞や生物体での導入遺伝子の発現には、<u>エピジェネティックな効果による不安定な低発現性やクローン間の高い変異率</u>など課題が多い。</p> <p>➤ このエピジェネティックな効果を軽減するため MAR などのエピジェネティックな調節系の活用が有望と考えられる。そこで、既知 MAR の徹底解析から<u>導入遺伝子発現の向上に関わる配列モチーフの同定</u>を行なった。</p> <p>➤ バイオインフォマティクスによる解析の結果、これらのモチーフは、<u>湾曲した DNA 構造とそれに伴うヌクレオソームの特定場所への配置と転写因子への結合性</u>を示した。</p> <p>➤ これらの観察を元にヒトゲノム中の MAR を割り出し、それら配列をクローニングした。その結果、<u>培養細胞での発現増強効果のみならずマウスにおいて高効率で持続可能な導入遺伝子の発現を確認</u>した。</p>

【背景・概要】

1. 技術課題

蛋白質発現の変動要因のひとつとして、DNAパッケージングによる抑制的クロマチン構造への変化というエピジェネティックな事象並びに核内の染色体の組織化に由来するトポロジカルな制限が挙げられる¹。

2. MAR概要

クロマチンは50-200kbの染色体ループに折りたたまれ、そのループの根元部分で核マトリックスに付着している。このアンカー部分のDNA領域はSAR、MARなどと命名され、DNA複製や遺伝子発現の調節に関与していることが知られている^{2,3};

- 1) 複製開始点が多く、真核生物ゲノムのMARに特定されており⁴、エピソームに目的遺伝子と一緒にMARを配置した場合、その複製が促進⁵。
- 2) MARは細胞遺伝子の差次的発現に関連する⁶。
- 3) これらのことから、MARをプロモーターおよびエンハンサー領域に隣接して配置すれば導入遺伝子の発現増強とクローン間変異の抑制を期待できる⁷。
- 4) MARは、SATB1、NMP4あるいはCTCFなどの偏在性あるいは組織特異的転写因子と結合する⁸⁻¹⁰。これらの蛋白質は、染色体のヘテロクロマチン領域を取り囲む一方真正クロマチン領域をループアウトさせるSATB1によって形成されるcage-like構造に例示されるような複雑な核蛋白質超分子の集合を促進すると思われる⁹。また、MAR結合蛋白質はヒストンアセチル基転移酵素を動員、ATP依存性クロマチン再構成複合体を形成し、それにより遺伝子発現を促進すると考えられる¹¹。
- 5) MARは染色体の調節ドメインの範囲を規定し、局所的なクロマチン構造を調節する蛋白質を動員すると考えられる。ゲノム当たり50,000以上とも推定されているMARsのうち確定されているものはわずか数個である²。MARの核マトリックスへの結合は植物から哺乳類まで保存されているが、それらの配列は高度に多型であり、その機能は単純にある配列モチーフに負うものではない。このように、MARの機能は配列というよりA-Tリッチな配列のアンワインディングやアンペアリングに対する感受性や二重らせんの高い変性傾向など構造的な特徴に関係していると言える^{12,13}。これらの特徴がMARsの転写活性にどのように貢献するかは依然不明である。

3. 研究概要;目的・成果

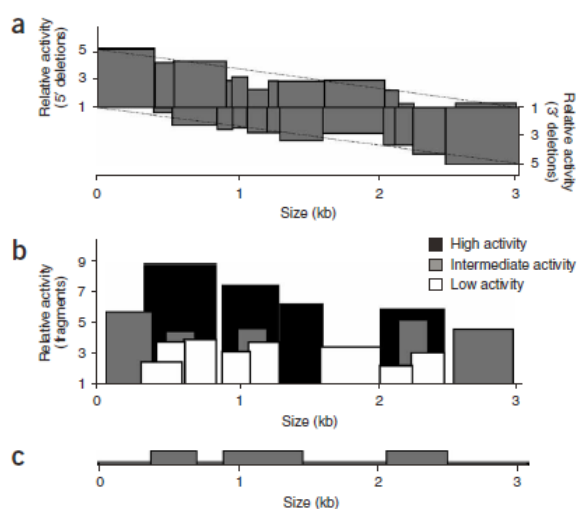
個々のMARsは実験的に同定されているが、ゲノムスケールの計算化学的方法論による哺乳動物の配列同定はなされていない。本研究では、導入遺伝子の高い発現性を支持するDNAモチーフ群を特定し、このモチーフを豊富に含む配列をヒトゲノム全体わたり探索した。これらの配列の多くは、既知のMARとして知られる**cLysMAR**に比べ培養細胞およびマウス体内において持続性のある高遺伝子発現を示した。このように、高度なエピジェネティックな調節を行う配列組成が大規模な*in silico*ゲノム探索で同定できた。

【結果】

1. ニワトリリゾチーム遺伝子5' MARの詳細分析(3,000-base-pair MAR)

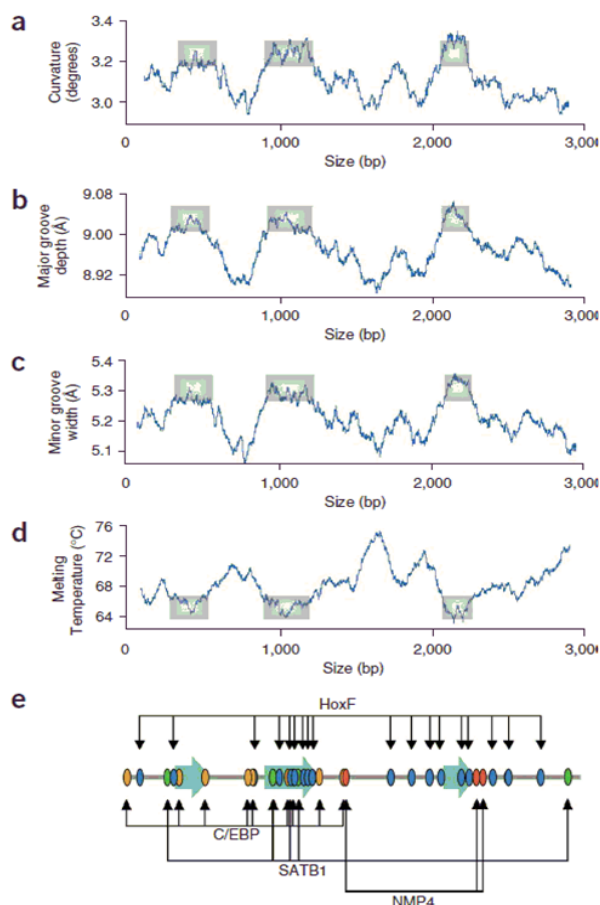
ニワトリリゾチーム遺伝子の5'端に存在するMAR(cLysMAR)を、導入遺伝子のプロモータとエンハンサーの上流に挿入した場合、その発現量および発現安定性が増加することを報告している^{14,15}。

- ✓ 本研究においては、リポータ遺伝子としてEGFPを用い、cLysMARの機能発現に重要な配列領域を特定するため5'あるいは3'から配列欠失を起こした多くのcLysMARの機能レベルの評価をEGFPの発光量測定により行った(図1a)。その結果、5'端から0.6、1.2そして2.2 kb近傍の3つの領域の欠失が機能低下に関与することが明らかとなった。
- ✓ 一方、cLysMARを断片化し、元の長さの約半分程度につなぎ合わせその機能を評価した実験においても欠失実験で重要性が示唆された配列部位が機能発現に重要であることが示された(図1b)。



2. Computer-recognizable structural features of MARs

次に導入遺伝子の発現増強に関与が電算的に推定される配列モチーフの同定を試みた。MARの通常みられる特徴は高AT含有量であることCytosineがBase-unpairing (BUR) 領域を形成する一方の鎖に偏在することが挙げられる¹⁶。幾つかの単純なAT-richな配列モチーフがMAR配列内に見出されるが、これらの機能的な重要性は殆ど明らかにされていない²。MAR配列がDNA巻き戻し配列のような特徴のあるモチーフの様々な組み合わせから構成されることが提示されており、これらのモチーフを同定するソフト創出されている^{12,13}。しかしながら、これらのモチーフの分布の解析結果はcLysMARの全領域にわたって存在し、EGFPの発現亢進を介在する配列との明確な相関は認められなかった(オンライン補遺の図1)。この知見は、これらソフトウェアのアルゴリズムはnuclear matrix attachment DNA領域の同定仕様に設計されており、matrix-binding activityは必ずしも遺伝子発現増強活性とは相関しないという事実から説明できる¹⁷。我々は、Nucleosome positioningモチーフの分布がEGFP発現亢進とよく相関



番号: Selexis_2007_Aug_Nature Meth.

分野: MARs(新規 MAR の *in silico* 探索と wet chem 実証)

するが、Nucleosome-disfavoring モチーフが亢進活性の低い配列にまで及んでいることを見出した(オンライン補遺の図1)。これらのnucleosome positioningモチーフは ヒストンコアを包み込む時、ある曲面構造(planar curve structure)を取り易いヌクレオチドストレッチに相当しMAR活性には関係してないと考えられてきた¹⁸。

ヌクレオソームアレイの予測に用いた38のアルゴリズム¹⁹のうち、三つはEGFPの発現亢進に関与するMARの領域特定に威力を発揮した(図2a-c)。これらのアルゴリズムを基に、活性MAR配列が、湾曲性、深い主溝そして広い副溝等の性質を備えていることを予測した。また、前者より弱いDNAのTmの極小値と相関することを見出している(図2d)。これらのアルゴリズムは相関予測を与えるが、無視できない相違点もあり、相互に代替できるものではない。例えば、(A+T)-rich 配列は低いTm領域を予測できるが、必ずしもDNAの折れ曲がり(bending)領域を言い当てるものではない。さらに、ここで規定される曲り易い構造が他のアルゴリズムで特定されるDNA巻き戻し(unwinding)あるいは折れ曲がり(bending)モチーフと良く重ならない²⁰。活性MAR領域が幾つかの転写因子結合部位と相互に関連する可能性がある²¹。NMP4, SATB1 およびホメオボックスタンパク質(HoxF)などの推定結合部位が活性MAR領域近傍に存在し、cLysMARの活性ドメインの最小単位の枠組みを形成している(図2e)。NMP4と SATB1についてはゲルシフトアッセイで実際のこれら領域への結合性を確認している。

DNAの4つの構造的特徴と転写因子結合領域候補を計算した上記アルゴリズム群をひっくるめてSMARScanと命名した。これらのアルゴリズム用のパラメータを”knownMARs”のデータベースを用いて微調整した(オンライン補遺の方法および図1)。これにより、全ヒトゲノムに50,400のMARの存在が推定でき、他の方法で推定された30,000~100,000という数値の範囲内にあった¹²。活性の高いMARを探し出すため、さらに厳しい条件での探索を行ったところ1,566 の配列を同定した(オンライン補遺の図2)。

新たに特定されたMARはヒトゲノム全体にわたって分布しているが、特にX染色体やY染色体の偽常染色体領域など遺伝子リッチな領域に高頻度で見出される(図3a)。逆に、コードする遺伝子が少なくヘテロクロマチン領域として知られる末端動原体型染色体の短腕には存在しない。ヒトの遺伝子間の配列100種類とそれに相当するマウスのオルソログ²²の配列比較を行った。5つの異なるオルソログ配列上に見つかった12のヒトMARのうち構造高い特徴的構造を持つ3つの配列に対してマウスの相応するオルソログ配列が存在し、MARが種間で保存される可能性を示唆した。しかしながら、1,566の予測されたヒトMARのどれもマウスゲノム上に並列配置できなかったことから、これらのMARが種を超えて保存されたとしても進化の過程で異なる配列を獲得し、それによって種の特異性に寄与したのかもしれない。

3. Characterization of computationally identified MARs

組織特異的活性の問題を避けるため、計算上高得点かつ遍在的発現で知られた遺伝子の近傍にあることを条件に幾つかの推定MAR配列を選んだ。また、様々な長さのコアエレメントを持つ配列と多様な組み合わせの転写因子結合部位を含む配列の片方あるいは双方を含む配列を選んだ。染色体1 (MAR 1-6 to 1-68)から5つ並びに染色体3とX染色体から各1つ (MAR 3-5、X-29) 選んだ (Table 1)。これら配列をヒトゲノムDNAからクローン化し、EGFPの発現を促進するSV40プロモータの上流に挿入したプラスミッドを作成した。CHO細胞にトランスフェクトし、ポクローナルな安定発現細胞を選別した。図3bに幾つかの推定配列のマトリックス結合能の実験結果を示した。真正なMAR配列が特定されていることが分かる。本研究において高得点を挙げた推定MARの多くがSMARTest や MARFinderで認識されている (オンライン補遺の表1)。

ポクローナル細胞集団におけるGFPの発現はFACSで調べた。6つの新たに同定したMARは実質的に導入遺伝子の発現亢進活性を示し、特にX-29は活性が高かった (図4a)。MAR無しでトランスフェクトした場合に比べ平均の増加率は6.6倍であり高発現細胞では50倍に及んだ。陰性対照として、あるMAR近傍のゲノム断片を用いた。この断片は SMARScan 予測で陰性で、導入遺伝子発現亢進能は認められなかった。

MARによる導入遺伝子発現亢進能とマトリックス結合能が高い相関性を持たないことはMAR X-29の結果から明らかである (図3bと4a)。この結果は、マトリックス結合能は導入遺伝子発現亢進活性の指標にならないとする以前の報告と一致している¹⁷。導入遺伝子発現の亢進とともにMARはEGFP蛍光の変動係数の減少に寄与している。これは発現の変動は近傍クロマチン介在の遺伝子抑制効果によるからである。一方、MARは一過性トランスフェクション発現ではEGFP発現に影響を与えないため、MARの効果はエンハンサーエレメントによるものではないと考えられる。

ゲノム断片の1-15は実質的には導入遺伝子発現亢進活性は示さなかった。Nucleosome-favoring DNAに相当するMARのコア配列の長さあるいは発現ベクターに挿入したゲノムDNAの長さの比較では活性配列と非活性配列の間で際立った差異はなかった (表1)。コア配列は、ATを

Table 1 | Property of *in silico*-predicted human MAR elements selected for further analysis

MAR identifier ^a	Total length	Core length	Putative binding sites					Transcriptional activity
			SatB1	HoxF	CEBP	NMP4	FAST1	
1-6	4,618	349	51	39	8	6	8	+
1-9	2,279	771	3	9	1	0	6	-
1-15	2,331	356	18	2	1	1	0	-
1-42	4,660	1,523	10	13	2	0	3	+
1-68	3,630	663	6	22	4	2	3	+
3-5	2,675	527	3	10	2	5	10	+
X-29	3,492	132	3	32	10	2	7	+
NC	1,012	None	6	5	1	0	2	-

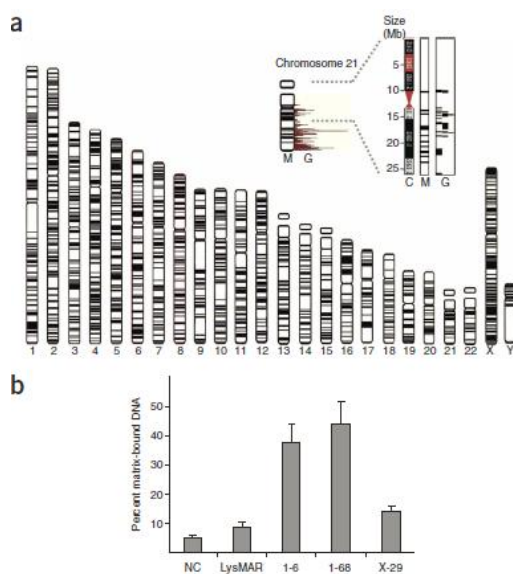


図3

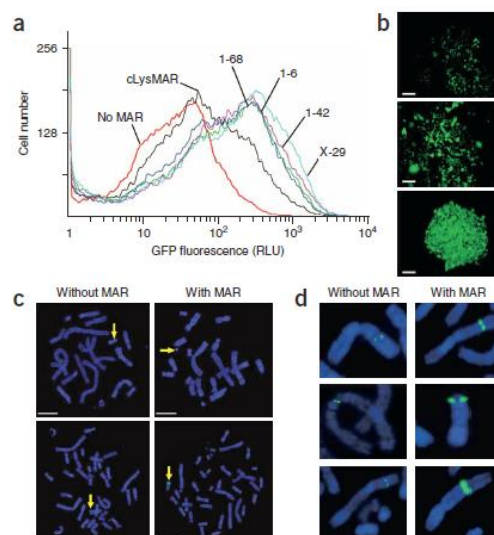


図4 導入遺伝子の発現量と挿入部位の解析

長さの比較では活性配列と非活性配列の間で際立った差異はなかった (表1)。コア配列は、ATを

交互に含む様々な型の反復配列からなり, AT および TA のジヌクレオチドを平均して 70% 程度含んでいる。一方 G および C を含むジヌクレオチドは希少である(0.8% 以下)。機能的 MAR と不活性 MAR のコア配列で定量的あるいは定性的な差異は認められなかった。このように単なる (A+T)-rich なコア配列の存在だけでは遺伝子発現の亢進には不十分であり、活性の欠如は CHO における組織特異的活性の欠如に由来するかあるいは何か付加的な DNA の性状が必要なのかもしれない。これに関連して、最も活性の高い MAR 配列は HoxF, CEBP そして NMP4 の結合モチーフと同様 FAST1 に対する結合モチーフを含んでいた(例として, 1-6, 1-42, 1-68, 3-5 and X-29), 一方中等度の活性を示す 1-9 や活性を示さない 1-15 や NC はこのような配列を欠いていた(表 1)。これらの転写因子が MAR による活性化に寄与していることを示唆している。

単クローン集団の個々の細胞を比較すると導入遺伝子の発現は度々変動を示し、クロマチン構造に関連したエピジェネティック効果や細胞周期に起因するといわれている²³。他の MAR に比べ、とりわけ MAR 1-68 はクローン間の変動が少ない(図 4b)。この結果が染色体構造に起因するか否かを決定するため導入遺伝子の染色体上の挿入部位を FISH 法で評価した。当該 MAR でトランスフェクトした 80 以上の細胞を解析した結果、複数の挿入事象や異常な染色体構造は認められず、また特異的染色体部位を標的としていないことが示された(図 4c, d とオンライン補遺の表 3)しかし、蛍光強度は概して当該 MAR の場合高く、導入遺伝子数の多さが示唆された。定量的 PCR アッセイでは 3-4 倍のコピー数が確認できた^{14,24}。

4. MAR-mediated expression of therapeutic proteins

MAR1-68の性能を評価するためCHO細胞における抗体タンパク質の発現を試みた。H鎖とL鎖を挿入するための別々のプラスミッドにSV40のエンハンサーとプロモータとその上流に被験MAR (1-68あるいはcLysMAR)を挿入した。二つのプラスミッドとそれぞれ選別のためのピューロマイシン耐性遺伝子を含むプラスミッドを共トランスフェクトした。300以上の抗生物質耐性のクローンを限界希釈法で単離した。高産生株はI-68MARを用いたもので、70 pg/c/d を示した。これは cLysMARで達成しうる最高値30 pg/c/d やMAR(-)の1-4 p/c/d を凌駕した¹⁴(図. 5a,b)。1-68MARでは約30クローンあたり1クローンが30 p/c/d もしくはそれ以上の産生性を示したが、cLysMARの場合300以上のクローン数が必要であった。

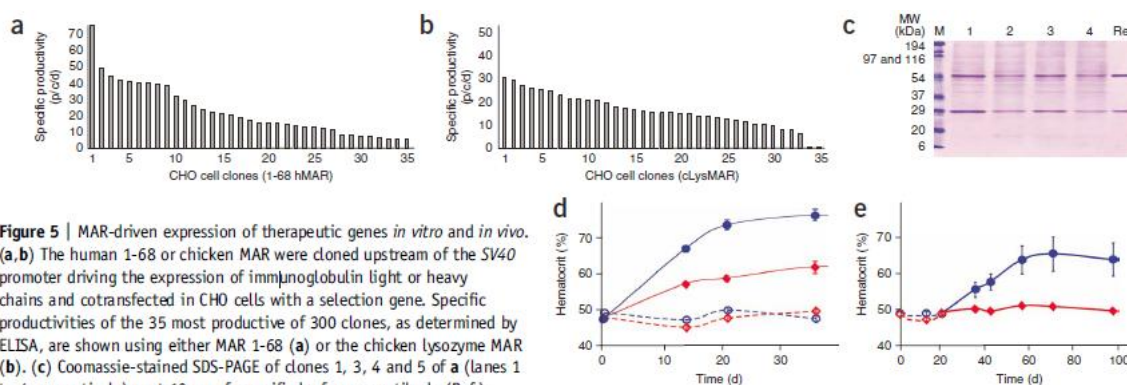


Figure 5 | MAR-driven expression of therapeutic genes *in vitro* and *in vivo*. (a,b) The human 1-68 or chicken MAR were cloned upstream of the SV40 promoter driving the expression of immunoglobulin light or heavy chains and cotransfected in CHO cells with a selection gene. Specific productivities of the 35 most productive of 300 clones, as determined by ELISA, are shown using either MAR 1-68 (a) or the chicken lysozyme MAR (b). (c) Coomassie-stained SDS-PAGE of clones 1, 3, 4 and 5 (lanes 1 to 4, respectively) next 10 μ g of a purified reference antibody (Ref.). (d,e) The tibialis anterior muscles of mice were electroporated *in vivo* with plasmids mediating doxycycline-regulated expression of erythropoietin, without (red diamond signs) or with one copy of MAR 1-68 (blue circles). Mice were provided (continuous lines, closed symbols) or not (dashed lines, open symbols) with doxycycline in their drinking water, and average hematocrit levels is presented with s.d. ($n = 8$).

大量分泌するクローンは、無血清培地での浮遊系培養に適応が出来、選択圧力を必要とせず高く安定した産生能を示した。ポリクローナル細胞の培養上清から分離精製した免疫グロブリンの質量分析は、正しいプロセッシングと翻訳後修飾が示された。培養上清の電気泳動的解析から主産物は免疫グロブリンであり、個々のクローンの産物は同一品質の抗体が産生されていることが示された(図5c)。

MAR1-68 の有効性を、エリスロポエチン導入遺伝子の *in vivo* 発現を動かすための遺伝子スイッチ系の観点から試験した。この系は、doxycycline で制御される転写レプレッサーおよびある条件下で発現するアクティベータータンパク質からなる。アクティベータータンパク質は、導入遺伝子の正確な制御を行うため遺伝子ネットワーク上で機能する²⁵。Doxycycline なしではレプレッサーはアクティベーターとEPO双方の発現を阻害する。Doxycycline存在下では転写レプレッサーは不活性になりアクティベーターはEPOと正のフィードバックループにより自身の発現を亢進する。その結果赤血球数とヘマトクリット値の上昇を引き起こす。 *in vivo* でマウス筋細胞にこれらのMAR有り、無しのプロモーターをトランスフェクトしEPOの発現をヘマトクリット値から評価した。MAR1-68を当該プロモーターの上流に挿入した場合、doxycyclineに応答しEPO発現の亢進が認められたが、誘導無しでは影響を受けなかった (図5d)。当該抗生剤非存在下ではMARを用いなかった系では21日後には不可逆的な導入遺伝子の抑制起こる(図5e)。本効果は、以前に報告したクロマチン介在のエピソームベクターの遺伝子抑制およびトランスジェニックマウスにおけるレプレッサー制御ベクターの不可逆的遺伝子抑制効果と一致する^{26,27}。MARの存在はそのような遺伝子抑制効果を阻止し、本研究期間中130日間にわたり当該抗生剤の誘導能が維持され、ヘマトクリット値の上昇が認められた。このように、MARは導入遺伝子の調節を改善すること、そして *in vivo* におけるエピジェネティックな遺伝子抑制効果に対抗して高く安定した発現を介在することを示した。

【考察】

MARは、どの特異的DNAモチーフにもその原因を帰することが出来ない実に様々な活性を示す。本研究では、導入遺伝子の発現を亢進するリゾチームMARの幾つかの部位が電算的に予測されるDNA湾曲性とヌクレオソーム位置決定部位と一致することを見出した。湾曲DNAモチーフの存在は活性MAR領域の良い指標ではあるが、転写能を説明するには不十分であることを示した。追加条件として、SatB1、NMP4 そして Hox様ファミリータンパクなどの転写因子結合部位の存在の必要性が示唆された。MARによる遺伝子発現の活性化にはDNA構造の特徴を決めるものと転写因子の結合部位を形成する2種類のモチーフ群が必要と推定された。ここでは、そのような条件を満たす領域をゲノム全体にわたって計算・特定できるアルゴリズムが有用であることを示した。

我々の研究結果は、MARの活性化能には転写因子結合部位の近傍にヌクレオソームが形成されることが重要であることが示唆している。転写アクティベーターの作用機作のひとつには”許容クロマチン構造”を調節するヒストンアセチル転移酵素を動員することが挙げられる。このようにDNA配列の組み合わせは、以前観察したMARと他のインシュレーターエレメントが段階的な過アセチル化ヌクレオソーム構造に対応しているという説明を提供すると考えられる²⁸。一貫して特異的ヒストンの修飾とヌクレオソームの位置決めはサイレントクロマチン構造の伝搬に対する歯止めになっており、染色体挿入部位におけるエピジェネティック効果の一部緩和に役立っている。最終的に、MARの”許容性クロマチン構造”は相同性組換えの亢進²⁹に関わっており、培養細胞のゲノムに挿入された遺伝子のコピー数の増加の理論的根拠をなしている。

遺伝子発現のエピジェネティック要因による変動は、真核細胞・動物の遺伝子導入のあらゆる局面で元来影響を与える⁷。エピジェネティックな調節エレメントの利用は、現状においてはその有効性、可用性および/または、その活性が特殊な遺伝子系あるいは細胞型にのみ有効であるため限定的である。さらに、これら因子・配列が十分に解明されていないため操作・細工が困難である。本研究での解析の結果、多くのエピジェネティックな調節エレメントが定義された DNA モチーフの出現性からゲノム規模で特定出来ることを示唆し、実際新たに同定された調節エレメントが高く、安定な組換えタンパク質(免疫グロブリン)の発現に介在することを示した。これらの効果は特殊な細胞、遺伝子そしてプロモーターに限定されておらず、MAR 含有エピソーム性ベクターを用い、マウス生体内におけるエリスロポエチンの高効率安定発現を可能とした。このように電算的に特定したMARは好ましからざるエピジェネティックな効果への対抗策として有用であった。

番号: Selexis_2007_Aug_Nature Meth.

分野: MARs(新規 MAR の *in silico* 探索と wet chem 実証)

【方法】

Identification of MARs. We performed the initial analysis of active MAR portions using the algorithms from the GeneExpress package originally designed to predict nucleosome positioning on the DNA¹⁹, using default parameters (<http://srs6.bionet.nsc.ru/srs6>). The SMARScan I program was assembled to automatically compute structural features of DNA using the GeneExpress algorithms designed to predict the melting temperature, curvature, major groove depth and minor groove width of the DNA. Its default parameters were optimized using the August 2003 release of the S/MARt DB database of MAR elements³⁰. As non-MAR sequences, we used all human chromosome 22 contigs, considering that they should contain only a negligible proportion of MARs. We set the default parameter values to a bending angle above 3.202 angular degrees, a major groove depth above 9.0025, a minor groove width above 5.2695 and a lowest melting temperature lower than 73.8 1C, over a sliding window of 300 nt. To identify high-scoring MARs from the human genome, we scanned the RefSeq contig as available from the US National Center for Biotechnology Information (NCBI build 36) using the more stringent DNA bending parameters set as detailed in the Supplementary Methods (bending angle of 4.4 angular degrees, major groove depth above 9.0025, minor groove width above 5.2695, melting temperature lower than 73.8 1C). SMARScan I was coupled to the prediction of potential transcription factor binding sites, resulting in SMARScan II. Transcription factor binding sites were predicted using the Transfac weight matrices as found in the MatInspector software package²¹ (<http://www.genomatix.de/products/MatInspector/>).

Additional methods. Information on vectors, plasmid construction, gene transfer by lipid-mediated transfection, analysis of transfected CHO cells and *in vivo* electroporation of the tibialis anterior muscle of mice, is available in Supplementary Methods. Experiments involving animals followed Swiss regulations, and they were authorized by the Veterinary service of Canton de Vaud.

【引用文献】

1. Barrera, L.O. & Ren, B. The transcriptional regulatory code of eukaryotic cells—insights from genome-wide analysis of chromatin organization and transcription factor binding. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 291–298 (2006).
2. Bode, J., Benham, C., Knopp, A. & Mielke, C. Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements). *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 10, 73–90 (2000).
3. Heng, H.H. et al. Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix attachment regions. *J. Cell Sci.* 117, 999–1008 (2004).
4. Amati, B. & Gasser, S.M. Drosophila scaffold-attached regions bind nuclear scaffolds and can function as ARS elements in both budding and fission yeasts. *Mol. Cell. Biol.* 10, 5442–5454 (1990).
5. Jenke, A.C. et al. Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 11322–11327 (2004).
6. Tetko, I.V. et al. Spatiotemporal expression control correlates with intragenic scaffold matrix attachment regions (S/MARs) in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Comput. Biol.* 2, e21 (2006).
7. Kwaks, T.H. & Otte, A.P. Employing epigenetics to augment the expression of therapeutic proteins in mammalian cells. *Trends. Biotechnol.* 24, 137–142 (2006).
8. Bidwell, J.P. et al. Involvement of the nuclear matrix in the control of skeletal genes: the NMP1 (YY1), NMP2 (Cbfa1), and NMP4 (Nmp4/Clz) transcription factors. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 11, 279–297 (2001).
9. Cai, S., Han, H.J. & Kohwi-Shigematsu, T. Tissue-specific nuclear architecture and gene expression regulated by SATB1. *Nat. Genet.* 34, 42–51 (2003).
10. Yusufzai, T.M. & Felsenfeld, G. The 5' ζ -HS4 chicken beta-globin insulator is a CTCF-dependent nuclear matrix-associated element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8620–8624 (2004).
11. Yasui, D., Miyano, M., Cai, S., Varga-Weisz, P. & Kohwi-Shigematsu, T. SATB1 targets chromatin remodelling to regulate genes over long distances. *Nature* 419, 641–645 (2002).
12. Platts, A.E., Quayle, A.K. & Krawetz, S.A. In-silico prediction and observations of nuclear matrix attachment. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 11, 191–213 (2006).
13. Evans, K., Ott, S., Hansen, A., Koentges, G. & Wernisch, L. A comparative study of S/MAR prediction tools. *BMC Bioinformatics* 8, 71 (2007).
14. Girod, P.A., Zahn-Zabal, M. & Mermod, N. Use of the chicken lysozyme 5' ζ matrix attachment region to generate high producer CHO cell lines. *Biotechnol. Bioeng* 91, 1–11 (2005).
15. Zahn-Zabal, M. et al. Development of stable cell lines for production or regulated expression using matrix attachment regions. *J. Biotechnol.* 87, 29–42 (2001).
16. Benham, C., Kohwi-Shigematsu, T. & Bode, J. Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *J. Mol. Biol.* 274, 181–196 (1997).
17. Phi-Van, L. & Stratling, W.H. Dissection of the ability of the chicken lysozyme gene 5' ζ matrix attachment region to stimulate transgene expression and to dampen position effects. *Biochemistry* 35, 10735–10742 (1996).
18. Thastrom, A. et al. Sequence motifs and free energies of selected natural and non-natural nucleosome positioning DNA sequences. *J. Mol. Biol.* 288, 213–229 (1999).
19. Levitsky, V.G., Ponomarenko, M.P., Ponomarenko, J.V., Frolov, A.S. & Kolchanov, N.A. Nucleosomal DNA property database. *Bioinformatics* 15, 582–592 (1999).
20. Singh, G.B., Kramer, J.A. & Krawetz, S.A. Mathematical model to predict regions of chromatin attachment to the nuclear matrix. *Nucleic Acids Res.* 25, 1419–1425 (1997).
21. Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. & Werner, T. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* 23, 4878–4884 (1995).
22. Shabalina, S.A., Ogurtsov, A.Y., Kondrashov, V.A. & Kondrashov, A.S. Selective constraint in intergenic regions of human and mouse genomes. *Trends Genet.* 17, 373–376 (2001).
23. Zhang, J., Xu, F., Hashimshony, T., Keshet, I. & Cedar, H. Establishment of transcriptional competence in early and late S phase. *Nature* 420, 198–202 (2002).
24. Kim, J.M. et al. Improved recombinant gene expression in CHO cells using matrix attachment regions. *J. Biotechnol.* 107, 95–105 (2004).
25. Imhof, M.O., Chatellard, P. & Mermod, N. A regulatory network for the efficient control of transgene expression. *J. Gene Med.* 2, 107–116 (2000).
26. Suzuki, M., Kasai, K. & Saeki, Y. Plasmid DNA sequences present in conventional herpes simplex virus amplicon vectors cause rapid transgene silencing by forming inactive chromatin. *J. Virol.* 80, 3293–3300 (2006).
27. Szulc, J., Wiznerowicz, M., Sauvain, M.O., Trono, D. & Aebischer, P. A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nat. Methods* 3, 109–116 (2006).
28. Bode, J. et al. Scaffold/matrix-attached regions: structural properties creating transcriptionally active loci. *Int. Rev. Cytol.* 162A, 389–454 (1995).
29. Raynard, S.J. & Baker, M.D. Cis-acting regulatory sequences promote high-frequency gene conversion between repeated sequences in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 32, 5916–5927 (2004).
30. Liebich, I., Bode, J., Frisch, M. & Wingender, E. S/MAR DB: a database on scaffold/matrix attached regions. *Nucleic Acids Res.* 30, 372–374 (2002).