



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Doctorado en Ciencias
Biológicas, área Biología Celular y Molecular

**Función de los Factores de Transcripción CREB y
C/EBP β en la Actividad Transcripcional del Promotor de
RIC8B humano.**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas,
área Biología Celular y Molecular.

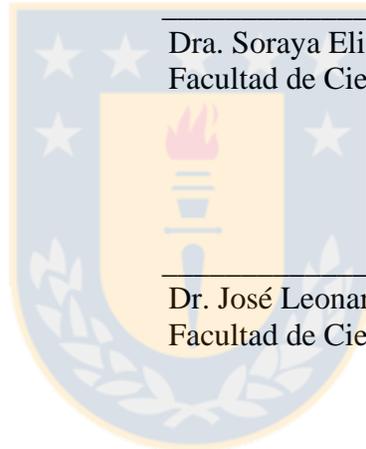
Alejandro Sebastián Maureira Moya
CONCEPCIÓN-CHILE
2016

Profesor Guía: Dr. José Leonardo Gutiérrez Contreras
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. José Leonardo Gutiérrez Contreras
Profesor Guía
Facultad de Ciencias Biológicas



Dra. Soraya Elisa Gutiérrez Gallegos
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. José Leonardo Guzmán González
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Martín Alejandro Montecino Leonard
Profesor Evaluador Externo
Universidad Andrés Bello

Dr. Juan Pablo Henríquez Hoffmann
Director
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular



A María Alejandra y a nuestro hijo Domingo,

y a la hermosa familia que hemos formado.

A mis padres, Custodia y Domingo, y a su fe incondicional en este largo camino.

A mis hermanos, Rosa y Diego, y a su infinita comprensión y cariño.

Agradecimientos

A CONICYT por financiar mi estadía en el doctorado (Beca Doctorado Nacional N°21100280) y por apoyar parte de la ejecución de mi tesis (Beca de Apoyo de Tesis Doctoral N° 24121186).

A los proyectos FONDECYT de Investigación N°1090150, N°1110803, N°1140394 por financiar gran parte de la ejecución mi tesis doctoral

A los profesores Dra. Soraya Gutiérrez, Dr. Martín Montecino y Dr. Leonardo Guzmán por su aporte en el análisis crítico durante la revisión de ésta tesis como comité evaluador.

A la Universidad de Concepción y a su departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, particularmente a las personas que ahí se desempeñan.

Agradecimientos especiales:

Al profesor Dr. José Leonardo Gutiérrez, por su amistad, guía y confianza en mí durante toda la realización de esta tesis doctoral.

A la profesora Dra. Marcela Torrejón, por su amistad y apoyo en buenos y malos momentos, en donde comprobé su sabiduría y enorme calidad humana.

A los profesores Dra. María Victoria Hinrichs y Dr. Juan Olate, que me recibieron en su laboratorio y me permitieron desarrollar mi tesis doctoral, participando de mi formación científica al compartir su vasto conocimiento, consejos, disciplina y búsqueda de la excelencia durante mi formación.

A mis compañeros de los laboratorios de Genética Molecular (hoy de Señalización en el Desarrollo) y Regulación Transcripcional, por su amistad y comprensión.

Y por último pero no menos importante, a mi familia y amigos, y a todos aquellos que de alguna manera me han acompañado en este viaje.

Tabla de Contenidos

Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice de Figuras y Tablas.....	xii
Abreviaturas.....	xiv
Resumen.....	xviii
Summary.....	xx
1 Introducción.....	1
1.1 Contexto histórico del estudio de la transducción de señales.....	1
1.2 Receptores de siete hélices transmembrana o receptores acoplados a proteínas G.....	2
1.3 Transducción de señales mediada por proteínas G heterotriméricas.....	4
1.4 Vía de señalización dependiente de AMP cíclico.....	10
1.5 Regulación temporal de la señalización mediada por proteínas G heterotriméricas.....	11
1.6 Proteínas RIC8 o Sinembrina.....	12
1.7 Patrón de expresión del gen <i>RIC8B</i>	13
1.8 Conceptos generales sobre la regulación transcripcional en eucariontes.....	14
1.9 Estructura del DNA cromosomal nuclear y transcripción.....	15
1.10 Modificaciones postraduccionales de las Histonas.....	17
1.10.1 Acetilación de Histonas.....	17
1.10.2 Metilación de Histonas.....	18
1.11 Metilación del DNA e Islotes CpG.....	18
1.12 Complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.....	19
1.13 Factores de transcripción básicos con cierre de leucina (bZIP).....	22

1.14	Regulación transcripcional del gen <i>RIC8B</i>	27
2	Hipótesis de trabajo.....	33
3	Objetivo general.....	34
4	Objetivos específicos	34
5	Materiales.....	35
5.1	Enzimas modificadoras del DNA.....	35
5.2	Reactivos y soluciones.	36
5.3	Cepas bacterianas.	40
5.4	Líneas celulares.	41
5.5	Medios de cultivo de bacterias.....	41
5.6	Medios de cultivo para líneas celulares.....	41
5.7	Oligonucleótidos y fragmentos de DNA.....	42
5.8	Vectores de expresión y construcciones.....	45
5.9	Anticuerpos.	53
6	Métodos.....	54
6.1	Cultivo celular y diferenciación de las células SH-SY5Y.....	54
6.2	Construcción de los vectores de expresión.....	55
6.3	Transformación por calcio de <i>E. coli</i> DH5 α , BL21 Rosetta (DE3) y BL-21 <i>Codon Plus</i> (DE3) RP.....	57
6.4	Transfección de cultivos celulares eucariontes.	57
6.5	Ensayos de actividad luciferasa en células HEK293T.	58
6.6	Extracción de RNA total y proteínas con el reactivo TRIzol.....	59
6.7	Extracción de RNA total mediante columna de sílice.....	60
6.8	Transcripción reversa.	62
6.9	Amplificación de DNA mediante PCR..	62

6.10	PCR en tiempo real.....	63
6.11	Electroforesis de DNA en gel y fotodocumentación.	64
6.12	Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP)	65
6.13	Expresión y purificación de proteínas recombinantes.....	66
6.14	Generación de los extractos nucleares.....	68
6.15	Cuantificación de proteínas totales en solución.....	69
6.16	SDS-PAGE e inmunodetección de proteínas mediante <i>western blot</i>	69
6.17	Marcaje radiactivo de las sondas.....	70
6.18	Ensayos de cambio de la movilidad electroforética en gel (EMSA).	70
6.19	Mapa de protección a DNasa I (<i>DNaseI-Footprinting</i>).	71
6.20	Análisis del posicionamiento nucleosomal y marcas epigenéticas en el promotor de <i>RIC8B</i> humano desde la base de datos ENCODE.....	72
7	Resultados	76
7.1	Objetivo específico 1	76
7.1.1	El factor de transcripción CREB presente en extractos nucleares se une a los elementos CRE presentes en el promotor de <i>RIC8B</i> humano.....	76
7.1.2	C/EBP β recombinante se une a los elementos C/EBP del promotor de <i>RIC8B</i> humano <i>in vitro</i>	85
7.1.3	CREB1 y C/EBP β se unen de manera preferencial a la región proximal y distal de promotor del gen <i>RIC8B</i> humano, respetivamente.....	92
7.2	Objetivo Específico 2	97
7.2.1	Los elementos CRE y C/EBP del promotor de <i>RIC8B</i> humano son necesarios para la actividad transcripcional en células proliferativas.....	97
7.2.2	La activación de la quinasa PKA reduce la actividad del promotor de <i>RIC8B</i> humano.....	100
7.3	Objetivo Específico 3	105

7.3.1	CREB1 se une a la región promotora del gen <i>RIC8B</i> en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y indiferenciadas.	105
7.3.2	La activación de PKA promueve la disociación de CREB1 y C/EBP β del promotor de <i>RIC8B</i> humano.	110
7.3.3	Estructura del promotor de <i>RIC8B</i> humano en base a la comparación de nuestros resultados y al análisis bioinformático de la base de datos ENCODE. ...	113
8	Discusión.....	116
8.1	Distribución de los elementos en <i>cis</i> de la región promotora del gen de <i>RIC8B</i> estudiada.....	116
8.2	Relación funcional de los elementos CRE y C/EBP dependiente de la arquitectura del promotor del gen <i>RIC8B</i> humano.	118
8.3	La regulación de la actividad transcripcional del promotor de <i>RIC8B</i> es definida por la unión de los factores de transcripción CREB1 y C/EBP β	121
8.4	La represión transcripcional del gen <i>RIC8B</i> se relaciona con su función en los tipos celulares analizados.....	128
9	Conclusiones	130
10	Perspectivas.....	130
11	Bibliografía	131
12	Apéndices.....	153
12.1	Apéndice 1: Tablas de preparación de geles de poliacrilamida.....	153
12.1.1	Geles nativos de poliacrilamida para DNA.....	153
12.1.2	Geles de poliacrilamida para EMSA.....	153
12.1.3	Gel de secuenciación de DNA	154
12.1.4	Gel de poliacrilamida desnaturante para proteínas al 12%	154
12.1.5	Gel de poliacrilamida desnaturante en gradiente 8-15%.....	155
12.2	Mezcla de transcripción reversa	155
12.2.1	Tabla de reacción para la enzima M-MLV RT	155

12.3	Mezcla y programa de amplificación por PCR de la enzima <i>GoTaq Flexi</i> DNA polimerasa.	156
12.3.1	Tabla de reacción para la amplificación.....	156
12.3.2	Programa de amplificación	156
12.4	Mezcla y programa de amplificación por qPCR de la enzima <i>GoTaq Hot Start Flexi</i> DNA polimerasa.	157
12.4.1	Tabla de reacción para la amplificación.....	157
12.4.2	Programa de amplificación	157
12.5	Secuenciaciones y cromatogramas	158
12.5.1	Secuenciación parcial del vector pCS2+/hCREB1A (región 5')	158
12.5.2	Secuenciación parcial del vector pCS2+/hCREB1B (región 5')	158
12.5.3	Secuenciación parcial del vector pcDNA3.1-hPRKACA1-V5His (región 5').....	159
12.5.4	Secuenciación parcial del vector pcDNA3.1His B-hPRKACB1 (región 5').....	159
12.5.5	phRIC8B/600bp(-546)mut	160
12.5.6	phRIC8B/600bp(-482)mut	160
12.5.7	phRIC8B/600bp(-468)mut	161
12.5.8	phRIC8B/600bp(-194)mut	161
12.5.9	phRIC8B/600bp(-164)mut	161
12.6	Estandarización de los ensayos de EMSA.....	162
12.6.1	Estandarización de las condiciones de unión de los ensayos de EMSA empleando sondas consenso para C/EBP β y CREB.	162
12.6.2	Expresión y purificación de CREB1 humano recombinante con epítipo de 6 histidina.....	163
12.6.3	Cálculo de la constante de disociación aparente de CREB1B por los elementos CRE.....	164

12.6.4	Ensayo de EMSA para las sondas que contienen los elementos CRE y C/EBP del promotor de <i>RIC8B</i> en presencia de los factores de transcripción recombinantes CREB1B y C/EBP β 2.	165
12.6.5	Ensayo de EMSA para la sonda distal del promotor de <i>RIC8B</i> en presencia de los factores de transcripción recombinantes C/EBP β 3 y C/EBP β 2.	166
12.7	Estandarización de los ensayos de actividad luciferasa.....	167
12.7.1	Las sobreexpresión de las subunidades catalíticas de PKA producen una fuerte activación transcripcional de un promotor con elementos CRE y caja TATA.....	167
12.8	Estandarización de los ensayos de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP).....	168
12.8.1	Análisis del tamaño de los fragmentos de DNA obtenidos desde la cromatina sonicada.....	168
12.8.2	Los fragmentos de cromatina presentan una pequeña fracción de fragmentos que abarcan ambas regiones analizadas del promotor de <i>RIC8B</i> humano.....	169
12.8.3	La disminución en la expresión del mRNA de <i>RIC8B</i> durante la diferenciación de células SH-SY5Y, se correlaciona con la disociación de CREB1 desde promotor del gen.	170
12.8.4	Análisis del enriquecimiento en la unión de CREB1 y C/EBP β al promotor del gen <i>RIC8B</i> humano mediante ChIP en células HEK293T.....	171
13	Anexo	172
13.1	Valores de unión de CREB y CREB fosforilado al promotor de <i>RIC8B</i> humano obtenidos desde el análisis de <i>ChIP-on-chip</i> en células HEK293T.....	172
13.2	Publicaciones	173
13.2.1	Publicación generada a partir de esta Tesis Doctoral.....	173
13.2.2	Otras publicaciones generadas durante la permanencia en el programa de Doctorado en Ciencias Biológicas área Biología Celular y Molecular.....	173

13.2.3 Presentaciones a Congresos Internacionales durante la permanencia en el programa de Doctorado en Ciencias Biológicas área Biología Celular y Molecular.....173

13.2.4 Presentaciones a Congresos Nacionales durante la permanencia en el programa de Doctorado en Ciencias Biológicas área Biología Celular y Molecular.....173



Índice de Figuras y Tablas

Figura 1: Mecanismo de activación y desactivación de proteínas G heterotriméricas.	8
Figura 2: Efectos de la remodelación de cromatina mediada por los complejos remodeladores de cromatina.	21
Figura 3: Dominios y sitios de interacción identificados en los factores de transcripción CREB1 y C/EBP β humanos.....	26
Figura 4: Análisis bioinformático del promotor <i>RIC8B</i> humano para factores de transcripción de interés.	29
Figura 5: Estudio del efecto de la región distal del promotor de <i>RIC8B</i> humano sobre la actividad transcripcional de un promotor mínimo con elementos CRE en respuesta a la activación de la vía dependiente de cAMP.	31
Figura 6: Inmunodetección de CREB y C/EBP β en los extractos nucleares obtenidos desde células HEK293T y SH-SY5Y.....	78
Figura 7: Representación esquemática del promotor de <i>RIC8B</i> humano en estudio y de los elementos C/EBP y CRE identificados.	80
Figura 8: CREB1 Se une a los elementos CRE del promotor de <i>RIC8B</i> humano.	81
Figura 9: Las sondas que contienen los elementos C/EBP del promotor de <i>RIC8B</i> humano son reconocidas por factores de transcripción presentes en el extracto nuclear de células SH-SY5Y.	83
Figura 10: Análisis de los factores de transcripción recombinantes purificados CREB1B, C/EBP β 2 y C/EBP β 3.	87
Figura 11: Las proteínas recombinantes C/EBP β 2 y CREB1B se unen a los elementos C/EBP y CRE presentes en el promotor de <i>RIC8B</i> humano, respectivamente.	89
Figura 12: CREB1B se une preferencialmente a los elementos proximales CRE, mientras que C/EBP β 2 reconoce específicamente a los elementos distales C/EBP.....	91
Figura 13: CREB1B se une con alta afinidad sólo a la región proximal del promotor mientras que C/EBP β 2 se une preferencialmente a la región distal del promotor del gen <i>RIC8B</i> humano.	93
Figura 14: Ensayos de protección a digestión por DNasa I (<i>DNaseI-Footprinting</i>) para los segmentos de DNA de las regiones proximal y distal del promotor de <i>RIC8B</i> humano, dada por los factores de transcripción CREB1B y C/EBP β 3.....	96

Figura 15: La mutación tanto de los sitios C/EBP (-546, -482, 468) como de los elementos CRE (-194 y -164) reducen significativamente la actividad del promotor de <i>RIC8B</i> de -600 pb en células HEK293T y SH-SY5Y.....	99
Figura 16: La activación de PKA reduce la expresión del mRNA de <i>RIC8B</i> humano en células HEK293T.....	102
Figura 17: La activación de PKA inhibe la actividad del promotor de -600 pb del gen <i>RIC8B</i> en células HEK293T.....	104
Figura 18: CREB1 se une a la región promotora del gen <i>RIC8B</i> en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y indiferenciadas.....	107
Figura 19: El mRNA de <i>RIC8B</i> disminuye durante la diferenciación de células SH-SY5Y.....	108
Figura 20: La activación de PKA disminuye la unión de C/EBP β a la región distal del promotor de <i>RIC8B</i> en células HEK293T.....	111
Figura 21: La activación de PKA disminuye la unión de CREB1 al promotor de <i>RIC8B</i> en células HEK293T.....	112
Figura 22: Análisis bioinformático de la información estructural obtenida para el promotor de <i>RIC8B</i> humano desde la base de datos ENCODE.....	115
Figura 23: Modelo para la arquitectura de la región promotora de -600 pb del gen <i>RIC8B</i> humano.....	120
Figura 24: Modelo de regulación de la actividad del promotor de -600 pb del gen <i>RIC8B</i> durante la diferenciación de células SH-SY5Y en respuesta a ácido retinoico.	126
Tabla 1: Vectores de clonación y expresión usados en ésta tesis.....	46

Abreviaturas

AA:	Acrilamida.
AC:	Adenililciclasa.
ADP:	Difosfato de adenosina.
APS:	Persulfato de amonio.
ATRA:	todo- <i>trans</i> -ácido retinoico; todo-(E)-ácido retinoico.
ATP:	Trifosfato de adenosina.
A_{230nm}:	Absorbancia a 230 nm.
A_{260nm}:	Absorbancia a 260 nm.
A_{280nm}:	Absorbancia a 280 nm.
BDNF:	Factor neurotrófico derivado de cerebro.
BisAA:	Bisacrilamida.
cAMP:	Monofosfato de adenosina-3',5'-cíclico.
cDNA:	DNA copia.
C/EBP:	Proteína de unión al elemento CCAAT/enhancer.
ChIP:	Inmunoprecipitación de cromatina.
CMV:	Citomegalovirus.
CRE:	Elemento de respuesta a cAMP.
CREB:	Proteína de unión a CRE.
DMSO:	Dimetilsulfóxido.
DNA:	Ácido desoxirribonucleico.
DNasa I:	Desoxirribonucleasa I.
dNTP:	Desoxirribonucleótidos trifosfatos (dATP, dGTP, dTTP y dCTP).
DTT:	Ditiotreitol.
EDTA:	Ácido etilendiaminotetracético.
EMSA:	Ensayo de movilidad electroforética en gel.
EtBr:	Bromuro de Etidio.
fmol:	FemtomoL.
g:	Gramo.

GAP:	Proteína activadora de GTPasas.
GDI:	Proteína inhibidora de la disociación de nucleótidos de guanina.
GDP:	Difosfato de guanosina.
GEF:	Proteína factor intercambiador de nucleótidos de guanina.
G_iα:	Proteína G tipo i, inhibidora de la adenililciclase.
G_oα:	Proteína G tipo o.
G_{olf}α:	Proteína G tipo olfatoria. Pertenece a la familia de proteínas Gαs.
G_sα:	Proteína G tipo s, estimulante de la adenililciclase.
G₁₂α:	Proteína G tipo 12.
GPCR:	Receptor Acoplado a Proteína G.
GTP:	Trifosfato de guanosina.
GuHCl:	Cloruro de guanidinio
HEPES:	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazina-etanosulfónico.
hr(s):	Hora(s).
IgG:	Inmunoglobulina G.
IMAC:	Cromatografía de afinidad a un ion metálico inmovilizado en una resina.
IPTG:	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido.
l:	Litro.
LB:	Medio Luria-Bertani (Caldo de Lisogenia).
M:	Molar.
MCS:	Sitio de múltiple clonación en un plásmido.
mer:	Nucleótidos o bases presentes en un polímero (18-mer = 18 bases).
mg:	Miligramos.
min:	Minuto(s).
ml:	Mililitros.
MNasa:	Nucleasa microcócica (<i>Micrococcal nuclease</i>).
mM:	Milimolar.
mRNA:	Ácido ribonucleico mensajero.
ms:	Milisegundos.
ng:	Nanogramos.
mmol:	Nanomol.

nM:	Nanomolar.
°C:	Grados Celcius.
% (p/v):	Porcentaje peso en volumen.
% (v/v):	Porcentaje volumen en volumen.
OD:	Densidad óptica.
PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
pb:	Pares de bases.
PBS:	Tampón fosfato salino.
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
PEG:	Polietilenglicol.
PIC:	Complejo de preiniciación.
pmol:	Picomol.
RGS:	Proteína reguladora de la señalización de proteínas G.
RIC:	Resistentes a inhibidores de la colinesterasa (ej.: RIC8).
RNA:	Ácido ribonucleico.
RNasa:	Ribonucleasa.
RT:	Transcriptasa reversa.
RPM:	Revoluciones por minuto.
s:	Segundo(s).
SAP:	Fosfatasa alcalina de camarón.
SDS:	Dodecilsulfato de sodio.
SEM:	Error estándar (<i>Standard Error of the Mean</i>).
SV40:	Virus vacuolizante del simio número 40.
TBS:	Tampón Tris Salino.
TE:	Tampón Tris-HCl-EDTA.
TF:	Factor de transcripción.
TEMED:	N, N, N', N'-tetrametiletildiamina.
Tris:	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol; Tris-(hidroximetil)-aminometano.
TSS:	Sitio de inicio de la transcripción.
U:	Unidad.
ufc:	Unidad formadora de colonia.

μg : Microgramo.
 μl : Microlitros.
 μM : Micromolar.
 $\times\text{g}$: Veces de fuerza centrífuga.



Resumen

RIC8B es una proteína con actividad GEF y chaperona para las subunidades estimulantes ($G_{s\alpha}/G_{o1f\alpha}$) de las proteínas G heterotriméricas, modulando temporalmente la vía de señalización dependiente de cAMP. La expresión de *RIC8B* tejido específico así como dependiente del estadio del desarrollo podría explicar en parte los efectos pleiotrópicos de esta vía de señalización presente de manera ubicua en el organismo. Esta expresión restringida del gen *RIC8B* puede estar definida por la presencia de elementos de respuesta específicos en su región promotora. Análisis bioinformáticos de esta región permitieron la identificación de elementos de respuesta putativos para los factores de transcripción con dominio básico y cierre de leucina, CREB y C/EBP β , altamente conservados en mamíferos. Estudios posteriores demostraron que la unión de C/EBP β al promotor de *RIC8B* de ratón conduce a una disminución en la expresión de este gen durante la diferenciación de una línea osteoblástica, debido al reclutamiento de complejos remodeladores de cromatina de la familia SWI/SNF. Además, estudios previos de nuestro laboratorio han determinado que la actividad del promotor de *RIC8B* humano responde de manera negativa a aumentos en los niveles de cAMP. Sin embargo, la participación de CREB y de los elementos CRE en la actividad transcripcional del promotor de *RIC8B* aún no ha sido dilucidada.

Con estos antecedentes decidimos determinar si la actividad del promotor del gen *RIC8B* humano es regulada por la acción de los factores de transcripción CREB y C/EBP β . Nuestros resultados mostraron que tanto CREB1 como C/EBP β se unen a secuencias del promotor del gen *RIC8B* humano en ensayos de unión *in vitro* y en ensayos en un contexto celular, debido a la presencia de elementos de unión específicos para cada factor de transcripción, distribuidos en dos regiones: una región proximal que contiene dos elementos CRE y una región distal que contiene 3 sitios C/EBP. Observamos además que la sobreexpresión de la subunidad catalítica de la quinasa PKA, en células HEK293T, genera una disminución de la actividad del promotor de *RIC8B* reflejado en una disminución en los niveles del RNA mensajero. Esta reducción en la actividad transcripcional del gen se asocia a una baja ocupancia de C/EBP β y CREB1 en el promotor. Por otra parte, en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y indiferenciadas

sólo detectamos la unión de CREB1 al promotor. En esta condición el promotor se encontraría transcripcionalmente activo, ya que la inducción de la diferenciación al fenotipo neuronal produce una disminución en los niveles del mensajero.

En su conjunto nuestros resultados muestran que los elementos CRE y C/EBP presentes en las regiones proximal y distal controlan la actividad del promotor y sugieren roles comunes y diferenciales para CREB1 y C/EBP β en la regulación transcripcional del gen *RIC8B* humano.



Summary

RIC8B is a chaperone protein with GEF activity over $G_{s\alpha}/G_{olf\alpha}$ heterotrimeric G protein subunits and hence modulates the cAMP signaling duration. RIC8B shows a tissue specific and developmental dependent expression profile and this could explain in part the pleiotropic effects of $G_{s\alpha}$ signaling pathway. After a bioinformatic inspection of *RIC8B* promoter, we identified several binding sites for basic domain/leucine zipper transcription factors CREB and C/EBP β and conserved among mammals. It has been reported that C/EBP β binds to *RIC8B* promoter after osteoblastic differentiation in a mouse model producing a decrease in promoter activity and mRNA expression, and the mechanism involves SWI/SNF remodeling complex recruiting by this transcription factor. Furthermore, we have observed previously that an increased intracellular cAMP level leads to a *RIC8B* promoter activity reduction. However, it remains to elucidate the importance of CRE elements and participation of CREB on *RIC8B* transcriptional regulation.

We decided to test if CREB and C/EBP β control *RIC8B* gene promoter activity. Our results show that both transcription factors bind to -600 bp promoter, by *in vitro* binding assays and ChIP in two cell lines, due to existence of two specific binding sites clusters: a proximal region containing two CRE elements and a distal region having three C/EBP sites. In HEK293T cells overexpressing the catalytic subunit of PKA we observed a diminished levels on *RIC8B* mRNA, associated with lower promoter occupancy levels of C/EBP β and CREB1. Meanwhile, in undifferentiated neuroblastoma cells SH-SY5Y only CREB1 was associated to the promoter. In this proliferative cellular state, the *RIC8B* promoter seems to be transcriptionally active based on the reduction of gene expression seen after differentiation induction by retinoic acid incubation.

Together, these results demonstrate that C/EBP and CRE binding sites located in the proximal and distal regions control the promoter activity and suggest both common and differential roles for CREB1 and C/EBP β in transcriptional regulation of *RIC8B* human gene.

1 Introducción

1.1 Contexto histórico del estudio de la transducción de señales.

La membrana plasmática delimita a la célula, controlando el intercambio de materia entre este sistema y el entorno; su existencia fue propuesta inicialmente por W. Pfeffer en 1887 (Heimburg, 2007). De carácter semipermeable, esta barrera es capaz de permitir el paso de agua y pequeños iones (Reuss, 2008). Sin embargo, y producto de su tamaño y carácter fisicoquímico, la velocidad de difusión a través de la bicapa lipídica de gran parte de las moléculas de importancia metabólica es muy lenta respecto de los procesos bioquímicos (Gomperts, et al., 2009). Para compatibilizar estos requerimientos, existen proteínas de transmembrana que permiten el paso de moléculas, conocidas como proteínas transportadoras (Reuss, 2011). De igual forma, existen en la membrana proteínas capaces de reconocer y/o captar estímulos extracelulares y, a través de mecanismos muy sofisticados, llevar a la generación de una respuesta a nivel celular y, últimamente, del organismo completo. El estudio de los mecanismos involucrados en la captación de tales estímulos fue relativamente tardío dentro de la historia de la fisiología, comenzando a finales del 1800 con los primeros estudios acerca de la acción hormonal en humanos por Charles E. Brown-Sequard (Gomperts, et al., 2009), aunque las bases del entendimiento de estos fenómenos tienen su origen en las evidencias que demostraron la transmisión química nerviosa.

En 1948, R. Ahlquist demostró la existencia de dos tipos de receptores para adrenalina denominados α y β en base a la respuesta farmacológica de diversos tejidos a análogos de adrenalina (Ahlquist, 1948). Si bien durante la década de 1960 se había logrado definir, según su afinidad a diversas aminas, la existencia de 3 tipos de receptores adrenérgicos tipo β y de al menos 2 del tipo α (Lands, et al., 1967), el entendimiento de los mecanismos moleculares de la transmisión de la señal hormonal debió esperar más de una década.

Trabajando en el laboratorio de Carl y Gerty Cori, Earl Sutherland identificó que el nucleótido monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) aumentaba en muestras de hígado de conejo en respuesta a la estimulación con adrenalina. Con esto, se dio inicio al concepto de segundo mensajero; al igual que lo ocurrido para la transmisión química sináptica,

presentó dificultades en ser aceptado hasta mediados del siglo XX (Beavo & Brunton, 2002). Parte de este escepticismo estaba ligado a la dificultad en la detección de esta molécula. Es por ello que varios grupos de investigación desarrollaron metodologías que permitieron detectar las bajas cantidades basales de cAMP que se generan en las células (del orden de 5 pmoles por mg de proteína total). Hacia 1970, Alfred Gilman desarrolló un ensayo de competencia de sensibilidad cercana a los 0,1 pmoles y que requería de la quinasa dependiente de cAMP (PKA) y [³H]-cAMP (Gilman, 1970), masificando de esta forma los estudios metabólicos. Así, ya a finales de 1970 se conocía el metabolismo general de este nucleótido que es sintetizado por una adenililciclase desde ATP y degradado por las fosfodiesterasas a AMP. Se determinó que el cAMP es capaz de activar a la proteína quinasa A al unirse a la subunidad reguladora de la holoenzima, lo que induce la liberación de la subunidad catalítica activa (Beavo & Brunton, 2002). Todavía quedaba la pregunta ¿cómo se asocia la estimulación por adrenalina con la síntesis de cAMP?. Uno de los modelos propuestos hacía referencia al receptor nicotínico de acetilcolina y postulaba que la adenililciclase era en sí el receptor para el ligando adrenalina, existiendo entonces un número de distintas adenililciclasas proporcional a la gran cantidad de ligandos capaces de activar la enzima.

1.2 Receptores de siete hélices transmembrana o receptores acoplados a proteínas G.

A pesar de la evidencia proporcionada por los ensayos de unión a ligandos marcados radioactivamente, la purificación de la molécula receptora era un requerimiento esencial para comprobar la existencia de los receptores adrenérgicos. Con este propósito, Robert Lefkowitz y su grupo de investigación comenzaron la estandarización de una cromatografía de afinidad, utilizando ligandos específicos, para los diversos receptores adrenérgicos y que finalizó primero en la purificación del receptor β y luego α_2 y α_1 (Caron, et al., 1979; Regan, et al., 1982; Lomasney, et al., 1986). Esta tarea no fue fácil, pues estos receptores se encuentran en cantidades extremadamente bajas en la membrana, en el orden de 500 a 1000 receptores β -adrenérgicos por membrana de eritrocito de pavo (Levitzki, et al., 1974). El uso de detergentes fue crucial para solubilizar estas moléculas desde preparaciones de membranas. El análisis electroforético mostró que las fracciones

obtenidas desde las cromatografías correspondían a glicoproteínas de membrana con un peso molecular cercano a 65 kDa (Lefkowitz, 2012). Sin embargo, esto no demostraba que la proteína en cuestión correspondía al receptor, pudiendo incluso ser proteínas asociadas al receptor real, todo esto en base a la suposición de que la propia adenililciclase podía ser el receptor. No obstante, mediante éstas técnicas cromatográficas se pudo separar la fracción de membrana de eritrocitos de rana que presentaba la unión al ligando adrenalina de otra fracción con actividad ciclase, echando así por tierra la teoría receptor-enzima (Limbird & Lefkowitz, 1977). Basado en estos antecedentes, Rick Cerioni desarrolló un ensayo de reconstitución para el receptor β -adrenérgico, donde el receptor purificado fue insertado en vesículas de fosfolípidos y luego fusionados a membranas de eritrocitos de *Xenopus laevis* carentes del receptor. En éstos ensayos observó la activación del receptor β -adrenérgico por el agonista (-)-isoproterenol, demostrando así de manera definitiva la existencia del receptor (Cerione, et al., 1983). Rápidamente se generó la necesidad de obtener la secuencia del receptor. Para ello, Brian Kobilka purificó y secuenció cinco péptidos obtenidos mediante tratamiento con CNBr del receptor β -adrenérgico purificado en el laboratorio de Lefkowitz. Con esta información se generó un anticuerpo contra la proteína y además se logró clonar el cDNA completo para el receptor. El análisis de la secuencia demostró la existencia de sitios de glicosilación hacia el extremo amino y sitios de fosforilación para PKA hacia el carboxilo. Aún más importante resultó el análisis del perfil de hidrofobicidad de la proteína el que mostró gran similitud con el patrón previamente observado para los 2 fotoreceptores de la familia rodopsina, donde se sabía ya que la bacteriorodopsina poseía 7 hélices de transmembrana (Dixon, et al., 1986).

Los resultados antes expuestos permitieron concluir que el mecanismo molecular por el cual el receptor transmembrana era capaz de activar o inhibir la adenililciclase requeriría de un tercer componente. Esta hipótesis fue apoyada por experimentos farmacológicos de competencia contra el antagonista β -adrenérgico [3 H]-dihidroalprenolol ejecutados por el mismo grupo de Lefkowitz. En estos estudios se observó que las curvas de desplazamiento generadas por la incubación con el agonista (-)-isoproterenol indicaban la existencia de una población heterogénea del receptor, compuesta por al menos 2 conformaciones con afinidades diferentes por el ligando (32 nM y 2,5 μ M). Más aún, determinaron que la

adición de GTP a la reacción homogeneizaba la población del receptor β -adrenérgico, llevándolo a su conformación de menor afinidad (Kent, et al., 1979). Con estos antecedentes, Lefkowitz propuso su teoría del complejo ternario para el receptor β -adrenérgico, la que considera el ligando (H), el receptor (R) y un componente de membrana desconocido (X) cuya activación lleva a la activación de la enzima adenililciclase (E) (De Lean, et al., 1980).

1.3 Transducción de señales mediada por proteínas G heterotriméricas.

En paralelo al estudio de los receptores adrenérgicos, Martin Rodbell y Lutz Birnbaumer estudiaron la unión de varias hormonas (como adrenalina y glucagón) a preparaciones de membranas de adipocitos y lograron asociarlas a cambios en la producción de cAMP, demostrando la existencia de una unidad de respuesta en estas membranas que permitía comunicar al receptor con la activación de la adenililciclase. Esta unidad de respuesta es constituida por un discriminador que corresponde al receptor de la hormona, un amplificador correspondiente a la adenililciclase y un componente transductor desconocido que conecta al discriminador y al amplificador. Con la finalidad de identificarlo, el grupo de Rodbell realizó ensayos farmacológicos de unión del ligando glucagón a su receptor. Estos ensayos mostraron que en presencia de bajas concentraciones de GTP y del ion Magnesio el ligando glucagón se unía rápidamente al receptor y esto estimulaba la síntesis de cAMP. Estos resultados junto a la detección de una actividad hidrolasa de GTP en las preparaciones de membranas estimuladas permitieron concluir que Mg^{+2} y el nucleótido de guanina se unían al transductor (Rodbell, 1997). Para la identificación de la enzima capaz de hidrolizar este nucleótido fue necesario el uso de la toxina del cólera (CTX). Gill y Meren demostraron que la toxina del cólera era capaz de ADP-ribosilar una proteína de 42 kDa desde preparaciones de fantasmas de eritrocitos de paloma (Gill & Meren, 1978), y postularon que probablemente debería ser la proteína que unió GTP, identificada por Pfeuffer y que hasta ese momento se pensaba que era una subunidad de la adenililciclase (Pfeuffer, 1977). Por otro lado, en la identificación de esta GTPasa fue de gran utilidad la selección de una sublínea celular de linfoma de ratón S49 insensibles a los aumentos intracelulares en los niveles de cAMP tras la estimulación con adrenalina y designada *cyc-*, debido a la idea de que debían ser

mutantes para la adenililciclase. (Milligan & Kostenis, 2006). Esta teoría fue refutada en 1970 tras la detección en estas células de la adenililciclase. En realidad, estas células carecían de un factor proteico soluble que era capaz de acoplar la activación del receptor β_2 -adrenérgico con la activación del efector enzimático (Beavo & Brunton, 2002). Es así como el grupo de Gilman se propuso identificar este factor soluble desde hígado de conejo, al que denominó proteína G (GTP). Tras múltiples etapas de purificación obtuvieron dos péptidos susceptibles de ser ribosilados por CTX, de 52 y 45 kDa, además de un péptido de 35 kDa (Northup, et al., 1980). Observaciones posteriores indicaron la existencia de otro péptido, cercano a 10 kDa, el cual era excluido del análisis electroforéticos debido a su alta movilidad. Se determinó que las proteínas de 35 y 10 kDa formaban complejos triméricos con cada una de las proteínas susceptibles de ADP-ribosilación. El complejo identificado estaba constituido de tres subunidades de tamaño molecular decreciente a las que se les denominó $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$, respectivamente. Estudios posteriores de filtración en gel y centrifugación en gradiente de sacarosa sugirieron que en respuesta a la unión del ligando al receptor el complejo se disocia en un monómero $G\alpha$ y un dímero $G\beta\gamma$, sufriendo previo a la disociación un cambio conformacional, atribuible a la unión de GTP por la subunidad $G\alpha$ (Northup, et al., 1983; Codina, et al., 1984). La proteína G recientemente identificada como subunidad $G\alpha$ y que estimulaba la actividad de la adenililciclase fue denominada subunidad $G\alpha$ estimulante ($G_s\alpha$). Posteriormente, diversas subunidades $G\alpha$ nuevas fueron identificadas. Hasta este momento se contaba con la identidad de cada uno de los elementos del sistema de transducción, no obstante faltaba por demostrar que en conjunto todos ellos formaban una sola unidad funcional. Con este objetivo, se reconstituyó ésta unidad funcional en un sistema artificial de vesículas lipídicas, que contenían las proteínas purificadas de forma independiente, correspondiente al receptor β -adrenérgico, el complejo heterotrimérico de proteínas G ($G_s\alpha\beta\gamma$) y la adenililciclase. Sólo cuando los tres componentes se encontraban juntos en la misma vesícula lipídica se observó síntesis de cAMP en respuesta a la incubación con agonistas adrenérgicos (Cerione, et al., 1984). En la actualidad se han identificado en humano más de 800 genes para receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), 16 genes para subunidades $G\alpha$ (23 proteínas), 5 genes para subunidades β (6 proteínas) y 12 genes para subunidades γ (13 proteínas). Con éste amplio espectro de componentes, el estudio de la señalización celular

ha permitido su participación en casi todos los procesos fisiológicos, por lo que no es de extrañar que cerca de un 40% de los fármacos de venta regular sean ligandos para GPCRs (McCudden, et al., 2005; Kobilka, 2007; Salon, et al., 2011; Khan, et al., 2013). El estudio de los eventos moleculares a través de los cuales los receptores con estructura de siete hélices de transmembrana acoplados a proteínas G (GPCR) activan a las proteínas G heterotriméricas ha sido constante desde 1980 hasta el día de hoy. En la actualidad los GPCRs se agrupan en 5 familias: rodopsina, secretina, glutamato, adhesión y frizzled–receptor gustativo tipo 2, siendo los receptores tipo rodopsina (adrenérgicos incluidos) los más estudiados (Oldham & Hamm, 2008). A la fecha, existen 26 GPCRs cuyas estructuras cristalinas han sido depositadas en la base de datos de proteínas (PDB) siendo la gran mayoría de ellos del tipo rodopsina. En base a esta información estructural y a la obtenida desde ensayos de resonancia paramagnética de electrones se ha podido establecer de manera general el mecanismo molecular de la activación del receptor por el ligando y el efecto sobre la proteína G acoplada. Ha sido posible identificar múltiples conformaciones entre la conformación inactiva (como rodopsina unida a retinal en oscuridad, que se comporta como un agonista inverso) y la conformación activa (como el receptor β_2 -adrenérgico unido a un agonista de afinidad extremadamente alta). De esta forma, el modelo actual incorpora el carácter flexible de la región intracelular de las hélices (particularmente la VI) que es regulada por los cambios conformacionales de las cadenas laterales de algunos residuos (o microinterruptores) en respuesta a la unión del ligando a residuos en el bolsillo de unión (gatillos moleculares) (Katritch, et al., 2013). Estos mismos estudios muestran que la conformación activa es estabilizada por la interacción con la proteína $G\alpha$. Por otro lado, el estudio de la estructura de las proteínas G, iniciando con transducina (subunidad α sola o como heterotrímero) y después para otras clases de proteína G, mostraron dos dominios estructurales conservados en las subunidades $G\alpha$; un dominio carboxilo tipo Ras que contiene gran parte de los residuos de unión al nucleótido y de actividad GTPasa (Figura 1, $G\alpha$ -DR), y un dominio helicoidal (Figura 1, $G\alpha$ -DH) en la región amino que se pliega sobre el bolsillo de unión del nucleótido. Ambos dominios se encuentran conectados entre sí por dos *loops*. Además, existen dos hélices de gran importancia funcional, una hélice amino terminal que interacciona con la subunidad β para formar el heterotrímero y la hélice 5 del dominio Ras

que se une fuertemente al receptor en conformación activa. Por su parte, la subunidad β presenta una estructura de hélice de 7 aspas de hojas β que contienen el motivo WD40 y un dominio de hélice α hacia el extremo amino. La subunidad γ presenta una estructura helicoidal extendida que le permite interactuar fuertemente con el extremo amino de la subunidad β (interacción *coiled-coil*) y también con las aspas 5 y 6 (Oldham & Hamm, 2008). Tanto el GPCR (extremo carboxilo), como la subunidad α (extremo amino) y la subunidad γ (extremo carboxilo) presentan modificaciones lipídicas y que han demostrado ser esenciales para su función (Wedegaertner, et al., 1995; Chen & Manning, 2001; Goddard & Watts, 2012). El análisis comparativo de las estructuras cristalinas de algunas subunidades $G\alpha$ unidas a GDP con las unidas a un análogo no hidrolizable de GTP mostró de manera similar a lo observado para las proteínas G pequeñas tres regiones que presentaban los mayores cambios y fueron denominadas regiones interruptoras I, II y III (Lambright, et al., 1994; Sprang, 1997). Los cambios en estas regiones dan cuenta de la actividad hidrolasa sobre el nucleótido GTP y de la disminución de la afinidad entre las subunidades α y β , aunque no explican cómo se produce el intercambio del nucleótido de guanina. Hubo que esperar hasta la publicación de la estructura cristalina del complejo receptor β_2 -adrenérgico activo con el heterotrímero para observar por primera vez la forma abierta de la subunidad $G\alpha$, donde sus dos dominios se encuentran separados y la hélice 5 del dominio Ras se encuentra inserta dentro del bolsillo citoplasmático en el receptor generado por el desplazamiento de la hélice transmembrana 6. De esta forma, el receptor estimula el intercambio del nucleótido de guanina al favorecer el estado abierto y libre de nucleótido de la proteína $G\alpha$ y que posee mayor afinidad por el nucleótido GTP (Rasmussen, et al., 2011). Ésta actividad intercambiadora del nucleótido GDP por GTP sobre la proteína $G\alpha$ se denomina actividad GEF (*Guanine Nucleotide Exchange Factor*) y es característica del receptor en su estado activo. En la figura 1 se muestra el mecanismo clásico de activación y desactivación de la proteína G en base a estos hallazgos y otros obtenidos recientemente mediante espectroscopia paramagnética de electrones (Dror, et al., 2015; Manglik, et al., 2015). La señalización finaliza cuando la propia subunidad $G\alpha$ hidroliza el nucleótido GTP (actividad GTPasa intrínseca) quedando nuevamente en su conformación basal $G\alpha$ -GDP.

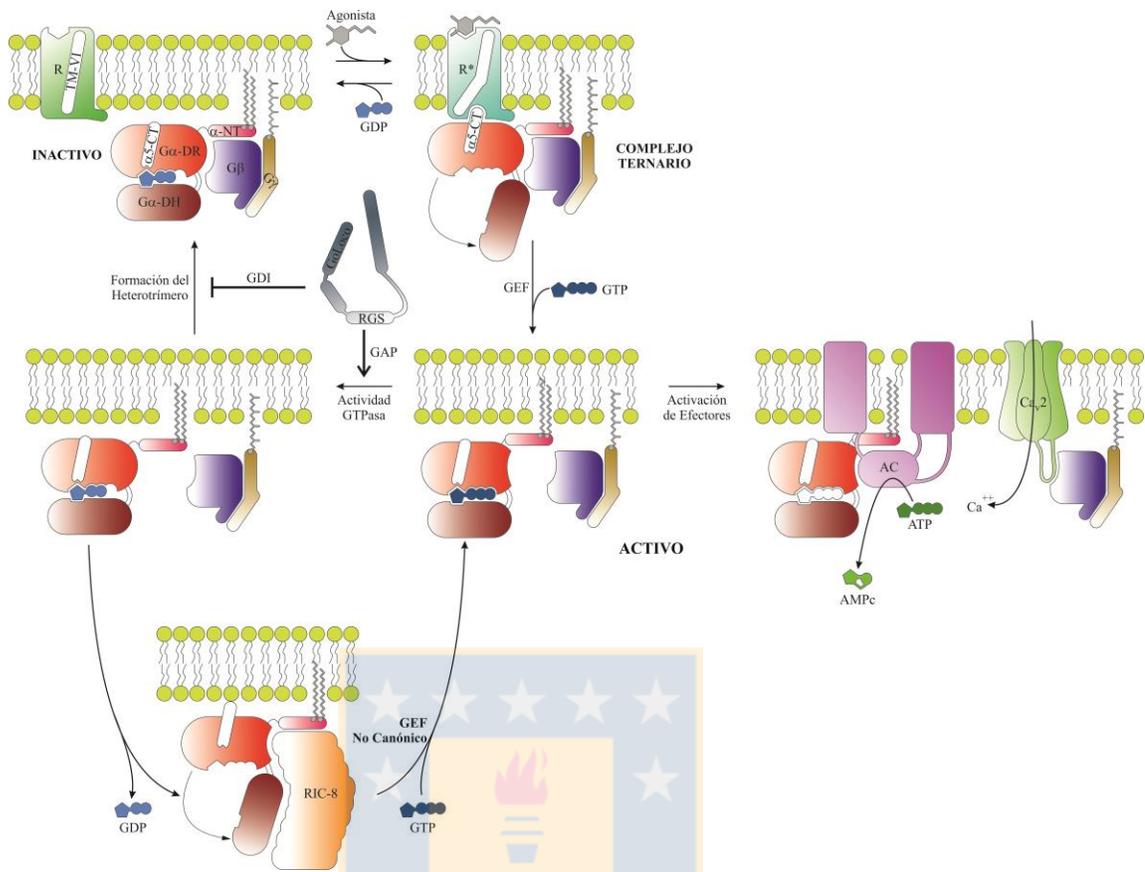


Figura 1: Mecanismo de activación y desactivación de proteínas G heterotriméricas.

Se muestra la vía clásica o canónica de activación de las proteínas G heterotriméricas ($G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$) por parte de los receptores acoplados a proteína G (R), con actividad GEF (intercambiadora de nucleótido de guanina sobre la subunidad $G\alpha$) en su estado activo unido al ligando (R^*). Además, se muestran tanto la regulación de sus sistemas efectores como su desactivación por la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad $G\alpha$. Finalmente, se indican los componentes no canónicos como las proteínas citosólicas con actividad GEF (RIC8) y las proteínas RGS (reguladoras de la señalización mediada por proteínas G). Las proteínas RGS pueden poseer actividad GAP (proteína activadora de la GTPasa) o GDI (inhibidora de la disociación de GDP desde la subunidad $G\alpha$). AC: adenililciclase. Ca_v2 : canal de calcio dependiente de voltaje. DR: dominio Ras. DH: dominio helicoidal. TM: hélice transmembrana. α : hélice α ($\alpha 5$: hélice α número 5). NT y CT: dominios amino y carboxilo terminales, respectivamente. ATP: trifosfato de adenosina. cAMP: monofosfato de adenosina cíclico. GDP y GTP: difosfato y trifosfato de guanosina,

respectivamente. Fuente: Adaptado desde (Oldham & Hamm, 2008; Rasmussen, et al., 2011) y actualizado desde (Dror, et al., 2015; Manglik, et al., 2015).



1.4 Vía de señalización dependiente de AMP cíclico.

Una de las vías de señalización canónicas estudiadas en detalle fue la iniciada por la activación de los receptores acoplados a proteínas $G_s\alpha$. Esta subunidad puede activar a diferentes tipos de adenililciclasas y con ello generar un aumento en los niveles del nucleótido de AMP cíclico (cAMP). Éste segundo mensajero a su vez es el responsable de la activación, entre otros blancos, de la proteína quinasa A (PKA) (Gilman, 1997). Ésta vía de señalización se encuentra presente prácticamente en todos los tipos celulares animales estudiados, pero sorprendentemente ejerce efectos pleiotrópicos en los distintos tipos de células. Esta paradoja comenzó a ser descifrada en los años 80, mediante elegantes ensayos bioquímicos que indicaban la existencia de una compartimentación de las vías de señalización dependiente de cAMP. Uno de éstos estudios, realizado sobre lisados totales de cardiomiocitos aislados desde conejo, demostró el cambio de la localización de la actividad de la quinasa PKA desde la fracción granulosa a la fracción soluble sólo en presencia de un análogo de adrenalina y no en presencia de prostaglandina E1 (PGE1). Esto es particularmente peculiar, ya que ambos ligandos activan a receptores acoplados a proteínas $G_s\alpha$, con la consecuente activación de la adenililciclasa y un aumento en los niveles de cAMP (Buxton & Brunton, 1983). Así, el efecto final de activación del blanco, por ejemplo la glicógeno fosforilasa, se observa sólo con el ligando adrenalina en el cardiomiocito. Trabajos posteriores en el mismo modelo de cardiomiocito han demostrado que existe una segregación de los diferentes receptores β -adrenérgicos a nivel de microdominios en la membrana plasmática (Buxton & Brunton, 1983) (Steinberg & Brunton, 2001). Algunas adenililciclasas se encuentran oligomerizando en complejos de tipo homoméricos o heteroméricos (Gu, et al., 2002) (Tang, et al., 1995). Estos complejos se relacionan a su vez con GPCRs específicos a nivel de las caveolas, microdominios de membrana generados por la presencia de la proteína de andamiaje caveolina en regiones de la membrana ricas en lípidos de esfingosina llamadas balsas lipídicas (Levitt, et al., 2009) (Pontier, et al., 2008; Rybin, et al., 2000). Formando parte de este sistema encontramos a las fosfodiesterasas, enzimas responsables de la hidrólisis de cAMP y que han sido clásicamente descritas como las responsables de la finalización de la acción del segundo mensajero (Francis, et al., 2011). Más aún, se ha observado que las fosfodiesterasas contribuyen más bien a la delimitación del microdominio. Esto es posible

por su interacción con diversas proteínas adaptadoras que permiten la generación de un complejo denominado signalosoma (Kapiloff & Chandrasekhar, 2011). La proteína adaptadora más importante corresponde a las proteínas de anclaje de PKA (AKAP), responsables de la localización en la fracción granulosa de la actividad quinasa dependiente de cAMP (McCartney, et al., 1995; Michel & Scott, 2002). A continuación se describe otro componente importante en la regulación de la señalización, que es la duración temporal de la señalización.

1.5 Regulación temporal de la señalización mediada por proteínas G heterotriméricas.

La duración de la señalización en el tiempo es regulado por proteínas que controlan finamente el ciclo de activación-desactivación de las proteínas G heterotriméricas. En las últimas décadas han sido descritas muchas de estas proteínas a través de numerosas revisiones bibliográfica (McCudden, et al., 2005; Siderovski & Willard, 2005; Willard, et al., 2004; Zhong & Neubig, 2001). Algunas regulan la vía de manera negativa, como las proteínas RGS (*Regulator of G-protein Signaling*), que potencian la actividad GTPasa (GAP, *GTPase Activating Protein*) o que impiden la disociación de nucleótido GDP de la subunidad $G\alpha$ (GDI, *Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor*) a través del motivo estructural GoLoco que les permite la interacción con las proteínas G y que impiden a su vez la reasociación del heterotrímero, potenciando la acción de $G\beta\gamma$. Estas proteínas llevan a una disminución en el tiempo de activación o de respuesta a la activación de las proteínas G. Otras proteínas, denominadas GEF (*Guanine-nucleotide Exchange Factor*), potencian en el tiempo la activación de las proteínas G al inducir el intercambio de GDP por GTP de la subunidad $G\alpha$ libre. Algunos de sus miembros más destacados son las proteínas RIC8 y la proteína GIV/Girdina. Éstas, a diferencia de las proteínas RGS, no presentan un motivo estructural común, sino más bien una gran heterogeneidad estructural (Sprang, 2001; Sato, et al., 2006; Hinrichs, et al., 2012; García-Marcos, et al., 2015).

1.6 Proteínas RIC8 o Sinembrina.

En 1996 se reportó la existencia de un gen en el nematodo *Caenorhabditis elegans* cuya mutación, identificada como la mutante número 8 del estudio, le confería resistencia a la neurotoxicidad inducida por aldicarb, un inhibidor de las colinesterasas usado como insecticida y nematocida. Este gen fue denominado entonces *RIC8* (*Resistant to Inhibitors of Cholinesterase mutant 8*) y codifica una proteína citoplasmática de 566 aminoácidos, con una masa de 63 kDa y carente de señales de localización subcelular. Además, el fenotipo observado en ausencia de aldicarb para el mutante fue de baja movilidad, el cual era revertido al tratar a los nemátodos mutantes con un agonista de los receptores nicotínicos de acetilcolina. Estos resultados sugerían la participación del gen *RIC8* en la liberación del neurotransmisor acetilcolina y no en su recepción, síntesis ni reciclaje. Estudios similares ampliaron la función sináptica de este gen a la liberación del neurotransmisor GABA (Miller, et al., 1996). El mismo grupo determinó, mediante estudios genéticos de *epistasis*, la relación funcional entre el gen que codifica para *RIC8* (*ric-8*) y los genes que codifican para $G_{q\alpha}$ (*egl-30*), fosfolipasa C β (*egl-8*) y una proteínas RGS para $G_{o\alpha}$ (*egl-10*) (Miller, et al., 2000). Éstas evidencias, junto con la alta expresión de la proteína *RIC8* en tejido nervioso y a la alta letalidad observada en las mutantes asociadas a defectos de posicionamiento del huso mitótico en las primeras etapas del desarrollo embrionario del nematodo, generó otro nuevo nombre para la proteína, el de sinembrina (*Synaptic Transmission and Early Embryogenesis*). Sin embargo, estos estudios no pudieron definir si el efecto de *RIC8* era directo sobre las proteínas G, especulando incluso un rol sobre la subunidad G_{β} (Miller & Rand, 2000). Mediante ensayos de doble híbrido en levadura y en búsqueda de proteínas interactoras de las subunidades G_{α} de las proteínas G heterotriméricas, dos grupos de investigación identificaron de manera independiente a la proteína *RIC8* en mamíferos. El grupo de Alfred Gilman determinó dos genes parálogos en ratón, con una identidad cercana al 40% en su secuencia de aminoácidos, a las que denominaron *RIC8A* y *RIC8B*. A través de ensayos de doble híbrido y *GST-pull down* demostraron que *RIC8A* interacciona con $G_{q\alpha}$, $G_{i-1\alpha}$, $G_{o\alpha}$ y $G_{13\alpha}$, pero no con $G_{s\alpha}$. En cambio *RIC8B* interacciona sólo con $G_{s\alpha}$ y $G_{q\alpha}$. Mediante ensayos bioquímicos detectaron una actividad GEF de *RIC8A* sobre las subunidades $G_{q\alpha}$ y $G_{i1\alpha}$, actividad no observable para $G_{s\alpha}$. El mecanismo involucra la estabilización de la forma

libre de nucleótido de la subunidad $G_{i1}\alpha$ en complejo con RIC8A, similar a lo descrito para la actividad GEF de los GPCRs. Sin embargo, a diferencia de un GPCR, RIC8A no posee actividad GEF sobre el heterotrímero, tal como lo indican los ensayos de análisis del estado estacionario de la actividad GTPasa en presencia del dímero $G_{1\beta}$ - $G_{2\gamma}$ (Tall, et al., 2003). En paralelo, el grupo de Juan Olate desarrollo ensayos de doble híbrido empleando como carnada $G_{s\alpha}$ para analizar una librería de expresión de cerebro humano fetal logrando identificar un gen ortólogo similar al gen *RIC8* de *C. elegans*, al que denominaron sinembrina humana (*hSyn*). Las interacciones entre *hSyn*/ $G_{s\alpha}$ y *hSyn*/ $G_{q\alpha}$ también fueron corroboradas por ensayos de *pull down*. Al comparar las secuencias de aminoácidos obtenidas por ambos grupos se observa claramente que *hSyn* corresponde a una isoforma del RIC8B, producto de un evento de *splicing* alternativo del exón 10 con retención de parte del intrón 9-10. Más importante aún fue la observación de una lenta translocación desde el citosol a la membrana de RIC8B en respuesta a la estimulación de los receptores acoplados a $G_{s\alpha}$ y $G_{q\alpha}$ (Klattenhoff, et al., 2003). Posteriormente se demostró *in vitro* la actividad GEF para la proteína RIC8B sobre las subunidades $G_{s\alpha}$ y $G_{q\alpha}$ y además de estableció que la abundancia de las subunidades $G\alpha$ depende de la función de las proteínas RIC8 (Chan, et al., 2011). Evidencia experimental del grupo de Gregory Tall demostró posteriormente la actividad de chaperona de RIC8 para las subunidades $G\alpha$ (Papasergi, et al., 2015). Éste nuevo hallazgo de función de las proteínas RIC8 permite integrar de mejor manera la enorme variedad de fenotipos observados en estudios de función de RIC8 para distintos organismos. Por ejemplo, la letalidad del *knock-out* de ambos genes parálogos de RIC8 en ratón (Gabay, et al., 2011; Tõnissoo, et al., 2010) indican claramente que la expresión de las proteínas RIC8 en diferentes tipos celulares o en ciertas etapas del ciclo celular es indispensable para regular el tipo y la duración de la señalización a través de las proteínas G heterotriméricas (Hinrichs, et al., 2012).

1.7 Patrón de expresión del gen *RIC8B*.

El análisis de los perfiles de expresión de las proteínas RIC8 mostró que RIC8A presenta una localización ubicua en ratón y en diversas líneas celulares humanas (Fenech, et al., 2009; Nishimura, et al., 2006). A diferencia de esto, el mensajero de RIC8B mostró

una expresión más localizada, por ejemplo en el cuerpo estriado, núcleo *accumbens* y bulbo olfatorio de cerebro adulto del ratón (Von Dannecker, et al., 2005). Debido a su expresión restringida, *RIC8B* ha sido utilizado como un marcador de núcleo *accumbens* (Ernst, et al., 2007). También se observó una marcada expresión de *RIC8B* en testículo. Éste perfil de expresión diferencial para *RIC8B*, indicaría que existe un importante control de la actividad de $G_{s\alpha}$ y $G_{olfr\alpha}$ en éstos tejidos y por ende de la vía dependiente de cAMP. Estos antecedentes apuntan además a que la regulación de la expresión del gen *RIC8B* está dada a nivel transcripcional. Para entender mejor ésta posible regulación del gen *RIC8B* tejido-específica es necesario describir los elementos fundamentales que regulan el proceso de la transcripción génica.

1.8 Conceptos generales sobre la regulación transcripcional en eucariontes.

Los estudios pioneros sobre la regulación de la transcripción génica son más bien recientes, a comienzos de la década del 60. El descubrimiento de la enzima RNA polimerasa presente tanto en eucariontes como en bacterias junto con la caracterización del control de la expresión de las proteínas involucradas en el metabolismo de la lactosa y de las encargadas del control del ciclo de infección del bacteriófago lambda en la bacteria *E. coli*, permitieron desarrollar un modelo transcripcional que con algunas modificaciones perdura hasta hoy (Hurwitz, 2005; Yaniv, 2011). El estudio en eucariontes mostró que existe una conservación del mecanismo general observado en procariontes, aunque de mayor complejidad. Se demostró la existencia de regiones promotoras de la transcripción que poseen secuencias específicas, llamadas elementos *in cis*, de gran representación en el genoma de los organismos superiores y que dirigen la expresión génica. Éstas secuencias en el DNA son reconocidas por proteínas de unión al DNA llamadas factores de transcripción (reguladores *in trans*) que regulan el reclutamiento de la maquinaria transcripcional y el asentamiento de la enzima RNA polimerasa (Mattick, 2004). En el promotor de un gen se pueden distinguir regiones con diferente función dependiendo de su composición de elementos *in cis* y de su ubicación. Existe un promotor mínimo (*core promoter*) que corresponde a la secuencia mínima dentro del promotor necesaria para permitir la transcripción por parte de la RNA polimerasa (Kadonaga, 2012). En humanos se describen 3 tipos RNA polimerasas (RNAP) conservadas en eucariontes

y que presentan diferentes sensibilidades a la acción de la toxina α -amanitina: RNAP1 se encarga de la síntesis de los RNA ribosomales 28S, 18S y 5.8S. RNAP3 sintetiza los tRNAs y del RNA ribosomal 5S. RNAP2, la más sensible a α -amanitina, se encarga de la transcripción de los genes que codifican proteínas (Montoya, 2005). La enzima RNAP2 corresponde a un complejo de 12 subunidades que requiere de un conjunto de reguladores en *trans* denominados factores generales de la transcripción (GTFs) y que permiten el reconocimiento del promotor, el reclutamiento de la RNA polimerasa, la interacción con factores reguladores, la apertura de la doble hélice y el reconocimiento del sitio de inicio de la transcripción. El llamado complejo de preiniciación de la transcripción (PIC) corresponde al complejo proteico formado por la RNAP2 y los siguientes GTFs: TFIID, TFIIA, TFIIB, TFIIF, TFIIE y TFIIH. TFIID es un complejo multiproteico constituido por la proteína de unión a la caja TATA (TBP) y sus 12 proteínas asociadas (TAFs) (Nikolov & Burley, 1997; Grünberg & Hahn, 2013). Sin embargo, en un contexto celular se requieren de factores en *trans* que permiten la transcripción en un contexto nuclear y que permiten integrar las señales extracelulares que regulan la transcripción génica. Estos factores pueden corresponder a factores de transcripción específicos de un tipo celular y que regulan la expresión de un set de genes o a complejos proteicos como el complejo mediador. Este complejo mediador es conservado en eucariontes y permite integrar la acción de factores de transcripción que se unen a elementos en *cis* distantes al promotor mínimo, como los potenciadores (*enhancer*), y el complejo de preiniciación (Malik & Roeder, 2010).

1.9 Estructura del DNA cromosomal nuclear y transcripción.

En eucariontes, el DNA nuclear se encuentra compactado entre 10^5 - 10^6 veces su largo (Trifonov, 2011). Esto se debe a que el DNA se encuentra en el núcleo celular formando parte de un complejo nucleoproteico denominado cromatina. En ésta el DNA se encuentra empaquetado alrededor de proteínas básicas de bajo peso molecular, denominadas histonas, y que están casi totalmente conservadas en todos los organismos eucariontes. Estas se organizan en un núcleo globular formado por un tetrámero de histonas H3 y H4 al que se adhieren dos dímeros de las histonas H₂A/H₂B, flanqueando cada lado (Kelley, 1973; Kornberg & Thomas, 1974). Envolviendo esta estructura

globular compacta, la doble hebra de DNA da 1,65 vueltas con sentido antihorario equivalentes a 147 pares de bases (pb). Una extensión variable de DNA sirve de conector (*linker*) entre una de estas estructuras y la siguiente. Estos distintos elementos conforman lo que se denomina nucleosoma; en ausencia de DNA *linker* se define a esta estructura como el *core* nucleosomal. La interacción del DNA con las histonas está dada principalmente por puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas entre el núcleo de histonas y el surco menor de la doble hebra de DNA (Luger, et al., 1997). Por su disposición periódica a lo largo de una hebra de DNA, que genera una estructura que asemeja un collar de perlas, el nucleosoma es la unidad estructural básica de la cromatina. Tras la digestión parcial con nucleasa microcócica (MNasa) genera un patrón de corte cada aproximadamente 200 pb, reflejo de esta disposición periódica (Kornberg, 1974; Kornberg & Lorch, 1999). La presencia de otra histona, denominada H1, cierra la entrada y salida del DNA y conforma el cromatosoma, que posee un contenido de DNA de aproximadamente 160 pb (Simpson, 1978). Se conocen órdenes superiores de organización de la cromatina, observándose el mayor nivel de compactación durante la mitosis con la formación de los cromosomas metafásicos. Esta compactación del DNA genómico se presenta como la primera barrera para la transcripción. Evidencia para apoyar esta premisa se obtuvo cuando la pérdida inducida de los nucleosomas *in vivo* en levaduras condujo a la activación transcripcional de todos los genes estudiados en condiciones basales (Han & Grunstein, 1988). Durante la evolución se generaron y perfeccionaron mecanismos para permitir la descompactación de la cromatina y de esa manera pasar la barrera estructural y permitir la transcripción. Uno de los mecanismos es la regulación del posicionamiento nucleosomal en las regiones promotoras del gen, generando una región libre de nucleosomas, y así permitir el libre reconocimiento por parte de los factores de transcripción de las secuencias de unión presentes en el promotor (Jiang & Pugh, 2009). Las histonas presentan una región flexible cargada positivamente hacia su extremo amino (cola N-terminal) que sobresale desde el *core* del nucleosoma pasando a través de los espacios entre las hélices de DNA que lo envuelve (Luger, et al., 1997).

1.10 Modificaciones postraduccionales de las Histonas.

Las colas de las histonas presentan un gran número de aminoácidos básicos y sitios de fosforilación que pueden ser modificados covalentemente, generando un código que es “leído” por la maquinaria reguladora y que controla la localización del nucleosoma en la hebra de DNA. Este mecanismo ha sido denominado como el “código de histonas” (Strahl & Allis, 2000; Jenuwein & Allis, 2001). Se ha obtenido mucha información acerca de las modificaciones en las histonas y su relación con la actividad transcripcional (Iizuka & Smith, 2003; Li, et al., 2007).

1.10.1 Acetilación de Histonas.

La acetilación de histonas fue asociada desde su descubrimiento a la regulación transcripcional (Allfrey, et al., 1964). Es un proceso controlado por la actividad opuesta de dos familias de enzimas: los complejos histonas acetiltransferasas (HATs), que catalizan la transferencia de un grupo acetilo desde la acetil coenzima A al grupo ϵ -amino de una lisina en la cola de las histonas, y los complejos de histonas desacetilasas (HDACs), que escinden esta modificación (Khan & Khan, 2010). Esta marca es reconocida por proteínas que contienen el dominio tipo bromo, el cual se encuentra presente en numerosas proteínas asociadas a la cromatina y en las propias HATs (Sanchez & Zhou, 2009). La acetilación de histonas está relacionada con la descompactación de la cromatina desde heterocromatina a eucromatina (Dillon, 2004) y favorece la accesibilidad de la RNA polimerasa. Se ha observado que la acetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27ac) está asociada a regiones del genoma que potencian la actividad transcripcional de la región promotora, denominadas potenciadores o *enhancer*, y también con promotores activos con alto contenido de dinucleótidos CpG (Creyghton, et al., 2010; Karlić, et al., 2010). Se ha observado que las enzimas HATs pueden acetilar proteínas no histónicas (Das & Kundu, 2005). En mamíferos, la familia de acetiltransferasas CBP/p300 actúa sobre el factor de transcripción p53 y los factores generales de transcripción TFIIE (subunidad β) y TFIIF (Sternier & Berger, 2000).

1.10.2 Metilación de Histonas.

La metilación de las colas de las histonas ocurre sobre residuos de lisinas y arginina. Esta modificación fue clasificada por décadas como irreversible, hasta el descubrimiento de enzimas con actividad desmetilasa de histonas (Bannister & Kouzarides, 2005). El grupo metilo es pequeño y no neutraliza la carga positiva de los residuos básicos de las histonas. No obstante, la metilación es reconocida por proteínas con dominios tipo cromosoma, el cual está evolutivamente conservado y presente en proteínas reguladoras de la transcripción (Jones, et al., 2000). Las enzimas responsables de la metilación de histonas son las metiltransferasas de histonas (HMTs) (Greer & Shi, 2012). Al igual que las HATs, las metiltransferasas también poseen sustratos no histónicos, como algunos factores de transcripción (Biggar & Li, 2015). Recientemente, se han descrito enzimas capaces de revertir la metilación de algunas histonas en residuos de lisina y arginina (Greer & Shi, 2012). La trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) está asociada a activación transcripcional mientras que la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) se relaciona con la represión transcripcional. Finalmente, la cromatina altamente compactada y transcripcionalmente silente, conocida como heterocromatina, ha mostrado estar asociada a la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3) (Martin & Zhang, 2005).

1.11 **Metilación del DNA e Islotes CpG.**

La metilación del DNA fue la primera marca epigenética descrita y desde esa época se demostró su fuerte asociación con la represión de la expresión de un mismo gen o de un grupo de genes durante la diferenciación celular (McGhee & Ginder, 1979; McDonald, 2005). La metilación en mamíferos ocurre sobre el carbono 5 de la citosina (5meC), y es catalizada por las citosina metiltransferasas (DNMTs) en función a una secuencia correspondiente al dinucleótido de citosina-guanina (CpG) (Goll & Bestor, 2005). Existen regiones del genoma con un alto contenido de C+G denominados islotes CpG y que, a pesar de contener la secuencia consenso de metilación, se caracterizan por mantener muy bajos o nulos niveles de 5meC. Muchos estudios han mostrado que en torno a estos islotes se ubican las regiones reguladoras del 60-70% de los genes (Illingworth & Bird, 2009).

La metilación del DNA está asociada a represión transcripcional tejido específica, a la diferenciación de un linaje celular y a procesos neoplásicos (Ndlovu, et al., 2011; Tost, 2010). La represión mediada por esta modificación puede deberse al impedimento directo a la unión de un factor de transcripción o por el reclutamiento de complejos que tengan asociado actividad HDAC o actividad remodeladora de cromatina. Estos complejos son reclutados a estas regiones debido a que presentan dominios de unión a 5meC (MBD) o porque son reclutados por las propias DNMTs (Klose & Bird, 2006).

1.12 Complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.

Estudios realizados en *Saccharomyces* mostraron la existencia de proteínas implicadas en el cambio fenotípico que sufren algunas levaduras durante la reproducción sexual (*switching defective*). Estas proteínas además están implicadas en la inducción del fenotipo fermentador en presencia de sacarosa como fuente de carbono (*sucrose non-fermentor*), por lo que fueron denominadas SWI/SNF (Hargreaves & Crabtree, 2011). Posteriormente se demostró además que estas proteínas poseen un dominio con actividad ATPasa dependiente de DNA (Cairns, et al., 1994; Kornberg & Lorch, 1999). Los complejos remodeladores se caracterizan por poseer una subunidad catalítica, subunidades reguladoras y dominios de reconocimiento de modificaciones covalentes de histonas y para factores de transcripción (Clapier & Cairns, 2009). El mecanismo por el que ocurre el movimiento del nucleosoma es tema de intenso estudio, y actualmente se sabe que los complejos son capaces de unir la hebra de DNA que envuelve un nucleosoma en un punto dado y fijarse al mismo nucleosoma en un punto distante. Finalmente, a través de un cambio conformacional en la proteína mediado por la hidrólisis del ATP, se acercan ambos puntos en contacto rompiendo mecánicamente las interacciones entre el DNA y el *core* de histonas (Cairns, 2007). En la actualidad se conocen 4 subfamilias de complejos remodeladores de cromatina agrupadas según sus subunidades catalíticas: SWI/SNF, ISWI, CHD e INO80. En todas ellas, el sitio catalítico se encuentra formado por los dominios funcionales DExx y HELICc. Estos complejos remodeladores pueden ejercer efectos coordinados sobre la transcripción a través de múltiples interacciones con las proteínas del complejo mediador (Yin & Wang, 2014). Se ha observado que cerca del inicio de la transcripción de un gran número de genes la existencia de una región libre de

nucleosomas (NFR). Estas regiones están flanqueadas por nucleosomas que presentan las variantes de histonas H3.3 y H2A.Z (Jiang & Pugh, 2009). Los diferentes efectos de la remodelación de cromatina por los complejos remodeladores aparecen ilustrados en la figura 2, dentro de los cuales está el recambio de variantes de histonas y la eyección de nucleosomas que en conjunto cooperan para la generación de la región NFR.



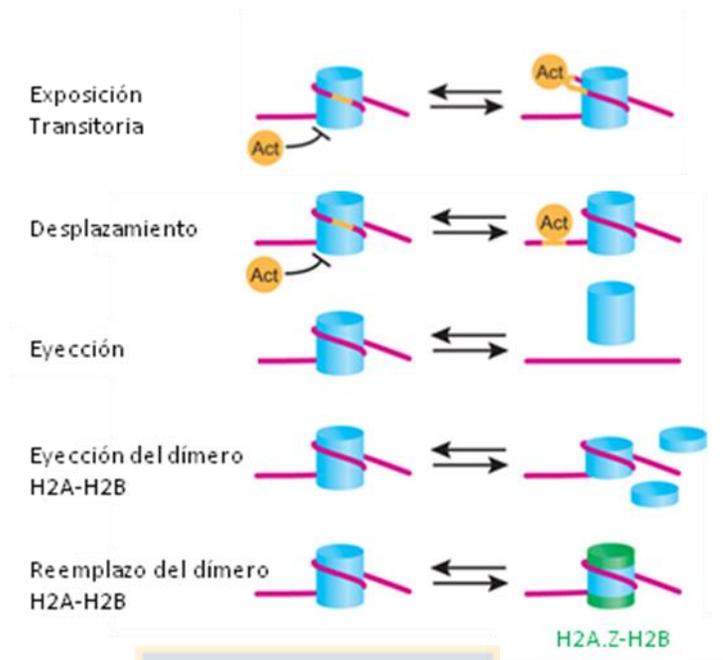


Figura 2: Efectos de la remodelación de cromatina mediada por los complejos remodeladores de cromatina.

El cilindro azul representa el *core* de histonas en torno al cual se encuentra la doble hebra de DNA, indicada en rojo. Act: activador transcripcional con su elemento de unión ubicado en el DNA nucleosomal, indicado en amarillo. Fuente: Modificado desde (Cairns, 2007).

1.13 Factores de transcripción básicos con cierre de leucina (bZIP).

La regulación específica de la expresión de un gen o un grupo de genes depende de la unión de activadores transcripcionales a los promotores de estos genes, cuya función es complementaria a la de los GTFs. Estos activadores son factores de transcripción reclutados a regiones cercanas al promotor mínimo (elementos reguladores proximales) o distantes (elementos reguladores distales). Dentro de los elementos distales tenemos a las secuencias potenciadoras (*enhancers*), silenciadoras y aislantes (*insulators*) de la transcripción. Los factores de transcripción se caracterizan por la secuencia y estructura de su dominio de unión al DNA, que reconoce un sitio específico de entre 6 a 12 pb. Durante la evolución, la duplicación de estos genes generó familias de factores de transcripción con dominios de unión similares, pero con funciones en algunos casos redundantes y en otras opuestas. La diferencia está dada en el dominio de transactivación de cada factor de transcripción, que permite el reclutamiento de coactivadores específicos, como lo son el complejo mediador y los complejos modificadores de cromatina (complejos remodeladores de cromatina y complejos modificadores covalentes de histonas) (Maston, et al., 2006; Yin & Wang, 2014). Los factores de transcripción se pueden agrupar en 5 superclases de acuerdo a sus dominios de unión al DNA, numeradas del 0 al 4. Dentro de éstas, la superclase 1 comprende a los factores de transcripción con dominio de unión al DNA del tipo básico, cuya estructura se caracteriza por una hélice rica en residuos de arginina y lisina (Wingender, et al., 2015). Dentro de esta superclase 1 se encuentran la clase de factores con dominio de cierre de leucina, el cual es un dominio de dimerización entre monómeros a través de interacciones del tipo *coiled-coil*. Este dominio también es necesaria para el reconocimiento y unión al DNA (Patikoglou & Burley, 1997).

La familia de factores de transcripción ATF/CREB (*Activating Transcription Factor/cAMP Response Element Binding protein*) presentan el dominio bZIP altamente conservado, pero ellos se diferencian en su dominio de transactivación. Basado en esto son agrupados en 3 subfamilias: ATF, CREB y CREM (*cAMP-Responsive Element Modulator*). Estos factores de transcripción controlan la expresión de genes por su unión a elementos de respuesta a cAMP denominados CRE, que poseen la secuencia palindrómica TGACGTCA, o a los medios sitios TGACG o CGTCA (De Cesare &

Sassone-Corsi, 2000). CREB fue el primer factor de transcripción descrito como sustrato de la proteína quinasa A (PKA), siendo fosforilado en la serina 133. Pronto se demostró que la actividad transactivacional de esta proteína es regulada por esta fosforilación y que el dominio KID fosforilado de CREB (donde se encuentra la serina 133) es reconocido por la histona acetiltransferasa CBP/p300. En la figura 3A se muestran los dominios estructurales y funcionales identificados en las isoformas A y B de la proteína CREB1 humana. Actualmente, se ha demostrado que CREB también puede ser fosforilado por otras proteínas quinasas en el mismo residuo de serina 133 en respuesta a diversos estímulos (Johannessen, et al., 2004), lo que refuerza la importancia de ésta modificación en el proceso transcripcional. Flanqueando este dominio KID, existen dos dominios ricos en glutamina, denominados Q1 y Q2. El dominio Q2 de CREB1, y particularmente su secuencia LQTL, es necesario para su interacción con la proteína TAF4 (TFII130/TFII135), que forman parte del factor general de la transcripción TFIID (Mayr & Montminy, 2001). En un contexto cromatínico, se ha observado una cooperatividad entre los dominios KID fosforilado y Q2 para inducir la transcripción en respuesta a la activación de la vía dependiente de cAMP de genes cuyos promotores poseen elementos CRE. Para esto, se ha propuesto un mecanismo en el que el reclutamiento de CBP/p300 facilita la interacción entre CREB1 y TFIID (Asahara, et al., 2001). La unión de CREB a su secuencia consenso es fuertemente impedida por la metilación de la citosina del dinucleótido central CpG del elemento CRE, a diferencia de lo observado para otro factor de transcripción insensible a metilación de su sitio de unión, como es Sp1 (Iguchi-Arigo & Schaffner, 1989). En parte, esta metilación es responsable de la baja unión de CREB a los cerca de 750.000 elementos CRE presentes en el genoma, a pesar que la constante de disociación de unión de CREB, estimada entre 1-100 nM, que es mucho menor a la concentración estimada de CREB intranuclear (~400 nM) (Hagiwara, et al., 1993; Mayr & Montminy, 2001; Zhang, et al., 2005). Mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de genoma completo en mamíferos se determinó que CREB se une a cerca de 5.000 regiones promotoras, a elementos CRE conservados cercanos al inicio de la transcripción y con bajo porcentaje de metilación (Impey, et al., 2004; Zhang, et al., 2005). Se determinó además que en el caso de promotores sin cajas TATA (*TATA-less*) y con elementos CRE, CREB no es capaz de reclutar eficientemente a su coactivador

CBP/p300 ni producir la inducción de la expresión en respuesta a cAMP (Zhang, et al., 2005). Más aún, la simple incorporación de una caja TATA en el promotor TATA-*less* del gen CDC37 lo convierte en un promotor que responde a cAMP (Conkright, et al., 2003). A pesar de esto, la unión de CREB a algunos promotores es necesaria para su actividad basal. Por ejemplo, en el promotor TATA-*less* del gen de expresión testicular Oxct2b, el elemento CRE es necesario para su actividad basal *in vivo* (Somboonthum, et al., 2005).

Por su parte, la familia de factores de transcripción C/EBP (*CCAAT/viral Enhancer Binding Proteins*) posee el dominio bZIP, de la cual se han descrito seis parálogos en mamíferos (α , β , δ , γ , ϵ , ζ). Estas proteínas fueron descubiertas por propiedad de unirse a la secuencia CCAAT (McKnight, 2001), que está presente en un 25-30% de los promotores eucariontes y a la que también se unen también otros factores de transcripción específicos como NF-Y (Matuoka & Chen, 2002). C/EBP β presenta tres isoformas, a pesar de no poseer regiones intrónicas en su gen. Estas isoformas se generan por traducción de un mismo RNA mensajero a partir de tres codones de inicio (AUG) en marco de lectura, fenómeno denominado uORF (*upstream Open Reading Frame*) (Calkhoven, et al., 2000). Las tres isoformas fueron caracterizadas inicialmente en murino por su alta expresión en hígado y denominadas LAP* (*Liver-enriched transcriptional Activator Protein**, 38 kDa), LAP (34 kDa) y LIP (*Liver-enriched transcriptional Inhibitory Protein*, 20 kDa). En humano estas isoformas son denominadas C/EBP β 1 (44 kDa), C/EBP β 2 (42 kDa) y C/EBP β 3 (20 kDa) (Zahnow, 2009). En la figura 3B se muestran las tres isoformas humanas de C/EBP β , indicando sus dominios funcionales. La isoforma C/EBP β 3 sólo posee el dominio de unión al DNA (DBD) y parte de los dominios reguladores (RD), y actúa como una dominante negativa para las otras dos isoformas (Ramji & Foka, 2002). La secuencia de DNA consenso óptima de unión a C/EBP β es (^{A/G})TTGCG(^{C/T})AA(^{C/T}). Aunque C/EBP β participa comúnmente en la activación transcripcional de los genes a cuyos promotores se une, se ha descrito que C/EBP β puede atenuar la inducción de la actividad de un promotor. Un ejemplo de ello es el promotor del gen de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2), debido a que C/EBP β recluta a la enzima HDAC4 en respuesta a EGF. Cabe destacar de manera particular que LAP* requiere ser sumoilado en la lisina 174 para mediar la represión transcripcional (Wang, et al., 2008).

También se ha observado que C/EBP β interacciona con p300 (EP300) a través de su dominio de activación (Mink, et al., 1997). EP300 es capaz de acetilar al factor de transcripción C/EBP β en su lisina 39, modificando su actividad transactivacional, y que es revertida por la acción de la enzima HDAC1 (Ceseña, et al., 2007; Ceseña, et al., 2008). Finalmente, la isoforma LAP* de ratón es capaz de reclutar al complejo SWI/SNF (Kowenz-Leutz & Leutz, 1999). Esta interacción se ve impedida por la dimetilación en la arginina 3 de LAP*, catalizada por la enzima histona metil transferasa PRMT4. La fosforilación de C/EBP β 1 en su residuo treonina 235 por MAPK impide ésta metilación, permitiendo así el reclutamiento de SWI/SNF (Kowenz-Leutz, et al., 2010).

Existe evidencia experimental de una relación funcional entre los factores de transcripción CREB y C/EBP β . El promotor del gen C/EBP β posee dos sitios CRE y responde positivamente a los aumentos intracelulares de cAMP (Niehof, et al., 1997). En esta misma línea, PKA fosforila a C/EBP β -LAP en varios residuos de serina *in vitro*, modificaciones que en conjunto modulan su afinidad de unión al DNA (Trautwein, et al., 1994). Debido a la presencia del dominio bZIP, los factores de transcripción CREB y C/EBP β deberían generar heterodímeros, aunque no existe aún una demostración directa. Inicialmente se concluyó que CREB y C/EBP β pueden heterodimerizar y unirse a elementos de unión quiméricos (Tsukada, et al., 1994), aunque hallazgos más recientes indican que en realidad existe una competencia entre los homodímeros de cada factor de transcripción por estos elementos quiméricos, cuya secuencia correspondiente a medios sitios de unión para cada factor de transcripción (Flammer, et al., 2006).

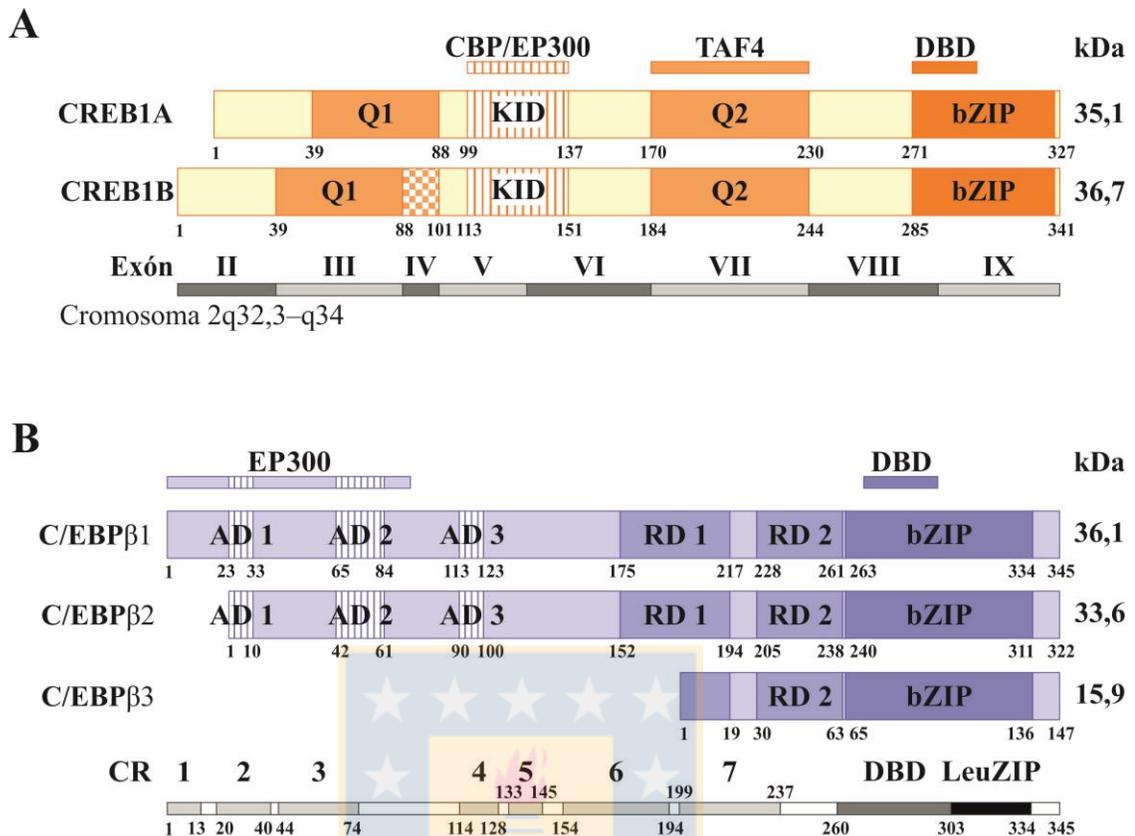


Figura 3: Dominios y sitios de interacción identificados en los factores de transcripción CREB1 y C/EBP β humanos.

Representación esquemática mostrando la ubicación de los distintos dominios funcionales (rectángulos) e indicando su identidad en la parte superior. Se muestra la posición en la secuencia de aminoácidos debajo de cada proteína. A la derecha se encuentra el peso molecular teórico de las distintas isoformas sin modificaciones postraduccionales. Los sitios de interacción relevantes para esta tesis se muestran sobre cada figura como barras en la parte superior. A) Isoformas de CREB1, en donde se muestra la composición exónica en la parte inferior como barras grises y la localización cromosomal del gen. Modificado desde (Mayr & Montminy, 2001). B) Isoformas de C/EBP β . Se muestra la localización de los dominios de activación (AD) y de regulación (RD) identificados por (Williams, et al., 1995). En tanto, en la parte inferior se indican las regiones conservadas (CR) identificadas por (Kowenz-Leutz, et al., 1994). Fuente: Elaboración propia.

1.14 Regulación transcripcional del gen *RIC8B*.

El gen *RIC8B* humano se encuentra en el cromosoma 12 (12q23.2) y está compuesto por 10 exones, que junto a sus intrones comprende una región genómica extensa de 114,72 kb, mucho mayor a la que posee su parálogo *RIC8A* (cromosoma 11, 11p15.5) que posee 10 exones y una extensión de 6,58 kb (Ensembl Project, *RIC8A*, 2015; Ensembl Project, *RIC8B*, 2015; Ensembl Project, 2016). Hacia la región 5' del gen *RIC8B* se encuentra el gen *RFX4*, con el que muestra una alta colocación subcromosomal en mamíferos (sintenia). Ambos genes se encuentran codificados en la hebra directa del cromosoma y están distanciados por 11,8 kb. El análisis bioinformático del promotor del gen *RIC8B* humano, definido como la región de 5,0 kb río arriba del inicio de la traducción, mostró una alta densidad de sitios de unión a factores de transcripción (TFBS) en la región proximal del promotor (-600 pb), como se presentan en la figura 4. Entre ellos, se identificaron tres elementos de unión para la familia de factores de transcripción C/EBP β : uno con una identidad del 50% (en la posición -546) y 2 con identidad del 60% (en las posiciones -482 y -468) respecto de la secuencia consenso $^A/GTTGCG^C/_{TAA}^T/C$ (Osada, et al., 1996). También se identificaron 2 elementos CRE (en las posiciones -194 y -164) con una identidad cercana al 90% respecto de la secuencia consenso TGACGTCA (Conkright, et al., 2003). En este mismo estudio no se identificó la caja TATA, un elemento promotor clásico (Maureira Moya, 2010). De igual forma, el grupo de Marc Montminy definió al promotor del gen *RIC8B* humano (*hSyn*) como TATA-less. También identificaron sitios CRE y determinaron la unión de CREB1 a éste promotor, mediante ensayos de *ChIP-on-chip* en células HEK293T. Sin embargo, la unión observada resultó ser muy débil, por lo sugieren corroborarla individualmente mediante inmunoprecipitación de cromatina (Zhang, et al., 2005; anexo 13.1).

Por otro lado, también se estudió la regulación transcripcional del gen *RIC8B* de rata, cuyo promotor comparte una identidad del 79% respecto al humano (en su región proximal de -600 pb). Se determinó que C/EBP β se une al sitio C/EBP designado como sitio III, el que corresponde al sitio -482 del promotor humano. Además, se observó una disminución de la expresión del mensajero de *RIC8B* en un modelo de diferenciación de líneas celulares osteoblásticas. Esta disminución depende de la unión de la isoforma de C/EBP β LAP* al promotor durante el curso de la diferenciación. A su vez, LAP* recluta

al complejo remodelador de cromatina SWI/SNF (Grandy, et al., 2011). El mecanismo propuesto para la represión transcripcional observada sugiere un desplazamiento de los nucleosomas hacia la región más proximal del promotor de *RIC8B*, donde se encuentran los sitios CRE, y sobre la que se ha mapeado la existencia de múltiples inicios de la transcripción (TSSs) tanto en ratón como en humano (Wakaguri, et al., 2008).



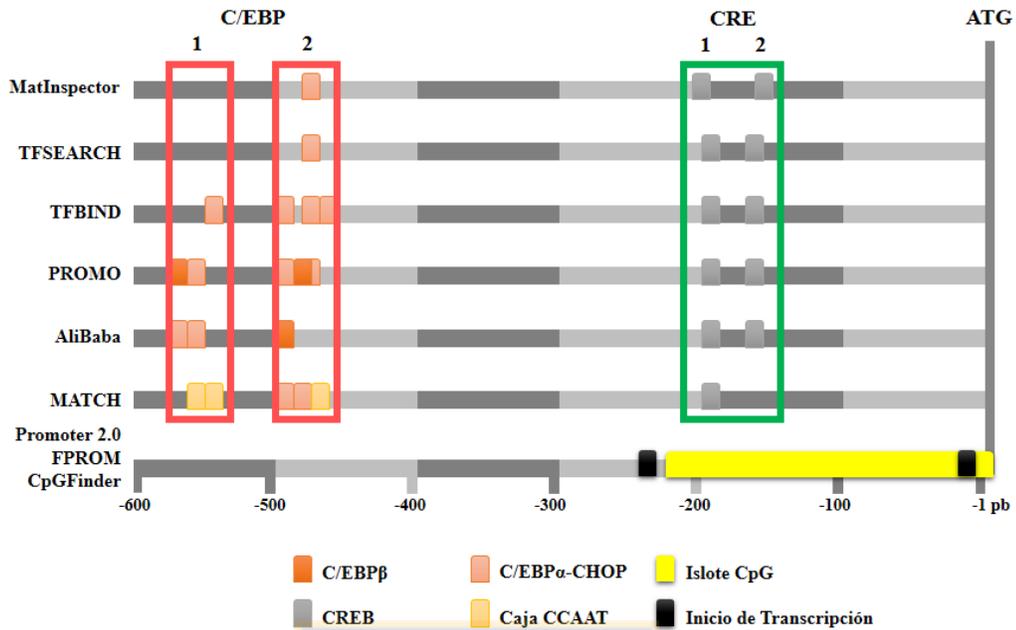


Figura 4: Análisis bioinformático del promotor *RIC8B* humano para factores de transcripción de interés.

Resultado para el estudio de la región proximal del promotor de *RIC8B* humano (-600 pb). Los números indican los resultados de los programas empleados. 1: MatInspector, 2: TFSEARCH, 3: TFBIND, 4: PROMO, 5: AliBaba, 6: MATCH y 7: Resultados en conjunto para los programas CpGFinder, Promoter 2.0 y FPROM. ATG: Codón de inicio de la traducción para la proteína *RIC8B*. En el panel inferior se muestran las claves de los elementos reguladores identificados. El tamaño del promotor analizado y la posición relativa de los elementos identificados son indicados en la figura como bloques de 100 pb río arriba del codón de inicio de la traducción (-100 pb). Fuente: Tomado desde (Maureira Moya, 2010).

De ésta forma, la región promotora proximal de -600 pb del gen *RIC8B* en mamíferos parece estar formada por dos subregiones. La primera subregión contiene los elementos de unión a C/EBP β y será designada de aquí en adelante como región distal (desde -600 a -267 en el promotor humano). La otra subregión contiene los elementos CRE y será llamada región proximal (desde -265 a -1 en humano).

Desde el estudio de la actividad transcripcional del promotor de -600 pb del gen *RIC8B* humano en células HEK293T, se observó una disminución significativa respecto de la actividad basal del promotor en respuesta a la activación de la vía dependiente de cAMP (Maureira Moya, 2010). Aunque no se esperaba un aumento en respuesta a cAMP debido a la ausencia de caja TATA en éste promotor, tampoco se esperaba un efecto represor. Posteriormente, se realizaron ensayos de eliminación seriada desde el extremo 5' de distintas regiones del promotor de -600 pb. Estos estudios indicaron que la región distal del promotor de *RIC8B* humano es responsable de dirigir la represión del promotor en respuesta a cAMP. Finalmente, y para corroborar la existencia del elemento en *cis* del promotor que inhibe la activación transcripcional en respuesta a cAMP, se insertó la región distal del promotor de *RIC8B* humano río arriba de los elementos CRE presentes en el vector pCRE-Luc, el cual contiene un promotor artificial que posee caja TATA y que responde positivamente a aumentos intracelulares de cAMP. De manera similar al resultado anterior, la inserción de la región distal del promotor de *RIC8B* reduce significativamente la activación transcripcional del promotor artificial del vector pCRE-Luc en respuesta a la activación de la vía dependiente de cAMP, resultado que se muestran en la figura 5.

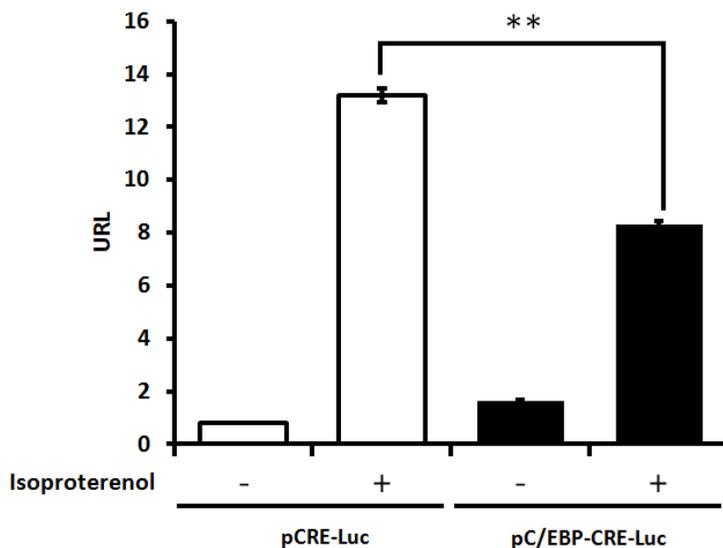


Figura 5: Estudio del efecto de la región distal del promotor de *RIC8B* humano sobre la actividad transcripcional de un promotor mínimo con elementos CRE en respuesta a la activación de la vía dependiente de cAMP.

Ensayo de actividad promotora empleando el vector pCRE-Luc, que permite la expresión del gen reportero luciferasa en función de la activación de la vía dependiente de cAMP. Este vector contiene un promotor artificial que posee elementos CRE y caja TATA. Se insertó la región distal del promotor de *RIC8B* humano río arriba de los elementos CRE, generando el nuevo vector pC/EBP-CRE-Luc. Ambos vectores fueron transfectados independientemente en células HEK293T junto a un vector control (pRL-SV40). Se evaluó el efecto de la estimulación con isoproterenol 10 μ M por 6 horas, un agonista del receptor β -adrenérgico acoplado a proteína $G_{s\alpha}$, y se midió la actividad del gen reportero (kit *Dual Luciferase Assay*, Promega). Los datos de luminiscencia fueron normalizados respecto al control interno Renilla. En el gráfico se muestra el promedio obtenido desde un ensayo representativo realizado en sextuplicado \pm SEM. Los valores normalizados fueron analizados empleando el programa InStat (Prisma); **: $P < 0,01$. Fuente: Modificado desde (Maureira Moya, 2010).

Con los antecedentes recién mencionados se demuestra la participación de C/EBP β en el control de la expresión del gen *RIC8B* durante la diferenciación osteoblástica, dejando abiertas las siguientes dos preguntas: ¿Es éste mecanismo de regulación común para otros tejidos? y ¿Es el reclutamiento de complejos remodeladores de cromatina lo que media la disminución de la actividad transcripcional del promotor de *RIC8B* en respuesta a la activación de la vía dependiente de cAMP?

El rol del factor de transcripción CREB en la regulación transcripcional del gen *RIC8B* humano no ha sido caracterizado en absoluto, y menos su participación en la respuesta a cAMP. Nuestros antecedentes preliminares sobre el estudio del promotor de *RIC8B in vitro* sugieren que la región proximal, que contiene los elementos CRE, es capaz de inducir la expresión del gen reportero aunque de manera mucho menor a la observada para la construcción que presenta además la región distal.

Es por esto que proponemos que la acción combinada de la actividad de los elementos en *cis* C/EBP junto con los elementos CRE juegan un papel en la regulación de la actividad del promotor de *RIC8B* humano.



2 Hipótesis de trabajo

La actividad del promotor del gen *RIC8B* humano es controlada por la acción de los factores de transcripción CREB y C/EBP β en células HEK293T y SH-SY5Y.



3 Objetivo general

Determinar la participación de CREB y C/EBP β en la regulación de la actividad transcripcional del gen *RIC8B* humano y determinar la participación de la vía dependiente de cAMP en esta regulación en células HEK293T y SH-SY5Y.

4 Objetivos específicos

4.1 Corroborar la identidad de los elementos de unión identificados *in silico* para los factores de transcripción CREB y C/EBP β mediante aproximaciones experimentales *in vitro*.

4.2 Evaluar el rol de los elementos CRE y C/EBP y de sus respectivos factores de transcripción en la actividad del promotor de *RIC8B* humano.

4.3 Estudiar el reclutamiento de CREB, de su forma fosforilada pSer133CREB, del coactivador clásico CBP/p300 y de C/EBP β al promotor de *RIC8B* humano en un contexto celular.

5 Materiales

5.1 Enzimas modificadoras del DNA.

Enzimas de Restricción: Las enzimas de restricción HindIII, KpnI, NheI, SalI, XbaI y XhoI, y sus respectivos *buffers* de reacción, fueron obtenidas desde New England BioLabs. Cada enzima presenta una concentración stock de 20 U/ μ l.

Fosfatasa Antártica: Se empleó la enzima *Antartic phosphatase* (M0289, New England BioLabs) para la desfosforilación de vectores digeridos con enzimas de restricción y destinados a reacciones de ligación. La enzima presenta una concentración de 5 U/ μ l.

DNA ligasa: Se empleó la enzima T4 DNA ligasa (EL0011, Thermo Scientific). Esta enzima presenta una concentración de 5 unidades Weiss/ μ l.

T4 polinucleótido quinasa: Esta enzima fue utilizada para el marcaje de las sondas de DNA empleadas en los ensayos de EMSA y *DNaseI-Footprinting*. La enzima fue obtenida desde New England BioLabs (M0201) y presenta una concentración de 10 U Richardson/ μ l.

Desoxirribonucleasa I: Ésta enzima se usó en los ensayos de *DNaseI-Footprinting*. La enzima recombinante DNasa I pancreática libre de RNasas (M0303) fue obtenida desde New England BioLabs y presenta una concentración de 2 U/ μ l.

Transcriptasa reversa (RT): Esta enzima se empleó en la síntesis de cDNA desde ARN total. Durante esta tesis se empleó dos variantes de la enzima del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV RT) y que presenta naturalmente una baja actividad RNasa H. Tanto la enzima M-MLV RT (M1701, Promega) como la enzima *SuperScript II* (18064-014, Invitrogen) poseen concentración de 200 U/ μ l. La enzima *SuperScript II* corresponde a una mutante de la enzima original que presenta menor actividad RNasa H y mayor estabilidad térmica.

DNA polimerasas: Necesaria para la amplificación por PCR de fragmentos de DNA. Se emplearon dos tipos de polimerasas en esta tesis. La enzima *GoTaq Flexi DNA polimerase* (M8291, Promega) con una concentración de 5 U/ μ l. La enzima presenta una tasa de incorporación de error de aproximadamente 1 en 500.000. La enzima *Herculase II Fusion*

(600675, Agilent), presenta actividad correctora y menor tasa de incorporación errores, por lo que es usada para la clonación de genes.

Nota: En el caso de las reacciones de PCR en tiempo real, se empleó la versión *GoTaq Host Start Flexi* (M5001, Promega), la que utiliza un anticuerpo que inactiva a la *Taq* polimerasa y que permite trabajar a temperatura ambiente. La enzima se activa durante la etapa de desnaturación inicial.

5.2 Reactivos y soluciones.

Acetato de Sodio (3 M, pH 5.2) (Merck. Solución autoclavada)

Agarosa (SeaKem LE, Lonza)

Agua DEPC (0,001 % v/v DEPC (Winkler). Solución incubada toda la noche y luego autoclavada)

Agua libre de nucleasas, grado biología molecular (HyClone)

APS 12,5% (p/v)

ATP (γ - ^{32}P) 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml (NEG502A, PerkinElmer)

ATRA (4,43 mM en DMSO, empleando un valor $\epsilon_{350\text{nm}}^{\text{M}}$: 44.300 en solución etanólica, Sigma)

BDNF 50 ng/ μl (en PBS 1 \times , humano recombinante, GF029, Merck-Millipore)

Bromuro de Etidio (10 mg/ml, en solución etanólica, Merck)

BSA 10 mg/ml (20 mM *buffer* fosfato de potasio, pH 7,0; 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 5% Glicerol. BSA fracción V, Rockland Inc.)

Buffer Cytomix (120 mM KCl; 0,15 mM CaCl₂; 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄; 25 mM HEPES; 2 mM EGTA; pH 7,6; 5mM MgCl₂; pH 7,6 ajustado con KOH). En el momento de usar se agregó ATP y glutatión a una concentración final de 2 y 5 mM, respectivamente. Esterilizado por filtración (0,22 μm).

Buffer A (10 mM HEPES pH 7,8, 10 mM KCl, 0,2 mM EDTA más inhibidores de proteasas)

Buffer C (20 mM HEPES pH 7,8, 420 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 25% Glicerol más inhibidores de proteasas)

Buffer de carga ácidos nucleicos A (6 \times : 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilencianol, 30% glicerol)

Buffer de carga ácidos nucleicos B (Corresponde al *buffer* 5 \times *Green GoTaq Flexi*, Promega)

Buffer de carga proteínas 6 \times (7 volúmenes *buffer* Tris-HCl/SDS pH 6,8 4 \times ; 30% glicerol; 10% SDS; 0,6 M DTT; 0,012% azul de bromofenol; completar a 10 volúmenes finales con agua destilada)

Buffer de carga de secuenciación (1× TBE, 80% (v/v) formamida, 0,05% (p/v) azul de bromofenol-xilencianol)

Buffer de electroforesis SDS-PAGE (25 mM Tris-base, 192 mM Glicina, 0.1%(p/v) SDS)

Buffer de detención para DNaseI-Footprinting (0,715 M Acetato de amonio; 7,15 µg/ml tRNA; Etanol 92%)

Buffer de diálisis (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 8,0)

Buffer de dilución de la DNasa I (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 4 mM MgCl₂; 21 mM CaCl₂; 2 mM DTT; 90 mM NaCl)

Buffer de elución (50 mM NaHCO₃, 10% SDS)

Buffer de lavado de inmunoprecipitación (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 500 mM LiCl; 0.1% IGEPAL CA-630; and 0.1% desoxicolato de sodio, 1× inhibidores de proteasa Complete (Roche); 5 mM NaF; 1 mM Na₃VO₄; 1 mM Na₄P₂O₇; 1 mM β-glicerolfosfato)

Buffer de lavado desnaturante (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 4M GuHCl, pH 7,0)

Buffer de lisis A (50 mM Na₂HPO₄; 300 mM NaCl; 50 mM imidazol, pH 8,0; 1× inhibidores de proteasas Complete, Roche)

Buffer de lisis B (50 mM HEPES, pH 7,9; 20 mM KCl; 3 mM MgCl₂; 0,1% IGEPAL CA-630; 1× inhibidores de proteasa Complete (Roche); 5 mM NaF; 1 mM Na₃VO₄; 1 mM Na₄P₂O₇; 1 mM β-glicerolfosfato)

Buffer de Remodelación I (20 mM HEPES pH 7,8; 70 mM KCl; 0,5 mM PMSF; 2 mM DTT; 0,05% NP-40; 10% Glicerol; 100 ng/µL BSA; 10 mM MgCl₂. Este *buffer* es empleado en ensayos de Remodelación de Cromatina)

Buffer de Remodelación II (20 mM HEPES pH 7,8; 100 mM KCl; 0,5 mM PMSF; 2 mM DTT; 0,05% NP-40; 10% Glicerol; 100 ng/µL BSA; 10 mM MgCl₂).

Buffer de sonicación (50 mM HEPES; pH 7,9; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% Triton X-100; 0.1% desoxicolato de sodio; 0.1% SDS; 1× inhibidores de proteasa Complete (Roche); 5 mM NaF; 1 mM Na₃VO₄; 1 mM Na₄P₂O₇; 1 mM β-glicerolfosfato)

Buffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol)

Buffer FT-0 (12,65% Glicerol)

Buffer FT-50 (12,65% Glicerol, 115 mM KCl)

Buffer FT-100 (12,65% Glicerol 230 mM KCl)

Buffer de Unión (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 8 mM KCl; 1 mM EDTA; 0,1 mM PMSF; 1 mM DTT; 0,05% NP-40; 4% Glicerol; 50 ng/μL BSA)

Buffer separador 2× (750 mM Tris-base, 0.2% (p/v) SDS pH 8.8)

Buffer concentrador 2× (250 mM Tris-base, 0.2% (p/v) SDS, pH 6.8)

Buffer Tris-HCl/SDS pH 6,8 4× (0,5M Tris-HCl; 0,4% SDS)

CaCl₂ 2M (Merck. Estéril por filtración con filtro de acetato de celulosa 0,2 μm)

Cloroformo (Merck)

Cloruro de Guanidina 6M (Sigma. Solución filtrada, 0,2 μm)

Cloruro de Guanidina 0,3M en 95% Etanol

DMSO puro (Calbiochem)

dNTP 10 mM (en agua libre de nucleasas, desde soluciones stock individuales 100 mM de cada desoxirribonucleótido, Promega)

DTT 1M (Winkler)

Estándar de RNA (*RNA ladder High Range*, Fermentas). Bandas (pb): 200, 500, 1.000, 1.500, 2.000, 3.000, 4.000, 6.000.

Estándar de DNA de rango amplio (*λ DNA/HindIII*, Fermentas). Bandas (pb): 125, 564, 2.027, 2.322, 4.361, 6.557, 9.416, 23.130.

Estándar de DNA de rango amplio (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, Fermentas)

Bandas (pb): 250, 500, 750, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 5.000, 6.000, 8.000, 10.000

Estándar de DNA de rango pequeño (*O'RangeRuler 100 bp DNA Ladder*, Fermentas)

Bandas (pb): 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500

Estándar de DNA de rango pequeño (*100 pb DNA ladder*, New England Biolabs)

Bandas (pb): 100, 200, 300, 400, 500, 517, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.200, 1.517

Estándar de Proteínas preteñido (*PageRule Prestained Protein Ladder*, Fermentas)

Bandas (kDa): 10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100, 130, 170 (aproximadamente)

Estándar de Proteínas no teñido (*PageRule Unstained Protein Ladder*, Fermentas)

Bandas (kDa): 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 85, 100, 120, 150, 200

(aproximadamente)

Etanol absoluto (Merck)

Etanol 70% (v/v) (Dilución del etanol absoluto, Merck)

Fenol/cloroformo (Fenol, cloroformo y alcohol isoamílico, en proporción 25:24:1, Merck)

Isoproterenol 10 mM (Sigma. Solución etanólica)

Forskolina 5 mg/ml (Biomol. Solución en DMSO)

Glicerol 86% (v/v) (Merck)

HBS 1× (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,75 mM Na₂HPO₄, 6 mM D-glucosa, 25 mM HEPES, 0,0015% (p/v) rojo de fenol, pH 7,04, esterilizado por filtración, 0,2 μm)

IPTG 1M (Estéril por filtración, 0,2 μm)

Isopropanol (Merck)

LiCl 5 M (Merck)

L-Glutamina 200 mM (Hyclone)

NaCl 5M (Solución filtrada, 0,2 μm)

NaCl/Polietilenglicol (1.6 M NaCl, 13% p/v PEG 8000)

Penicilina 10.000 U/ml más Estreptomicina 10.000 μg/ml (Hyclone)

PBS 1× (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,47 mM KH₂PO₄; pH 7.4). Esterilizado por filtración, 0,22 μm.

Proteinasas K 20 mg/ml (libre de DNasa, Fermentas)

Resina proteína A/G-agarosa bloqueada (*A/G-agarose Ultralink*, Pierce. Bloqueada con 200 μg de DNA de esperma de salmón y 460 mg de BSA por ml de resina suspendida en *buffer* TE al 50%)

RNasa A 10 mg/ml (libre de DNasa, Fermentas)

RNasin Plus 40 U/μl (Inhibidor de RNasas, Promega)

Rojo Ponceau (0.1% (p/v) Rojo Ponceau S (Sigma), 5% (v/v) ácido acético)

SDS 20% (p/v) (US Biological. En agua *nano pure*, pH 7.0)

Solución de Acrilamida 30% (29% (p/v) acrilamida, 1% (p/v) bisacrilamida). Previo uso, fue filtrado (filtro 0,45 μm, acetato de celulosa, estéril).

Solución de Acrilamida 41% (40% (p/v) acrilamida, 1% (p/v) bisacrilamida). Previo uso, fue filtrado (filtro 0,45 μm, acetato de celulosa, estéril).

Solución I (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM pH 8.0)

Solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%)

Solución III (CH₃COONa 3M, CH₃COOH 0,2M)

Solución ácida de Stripping (25 mM glicina-HCl (pH 2,0), 0, 1 % (p/v) SDS)

Solución TENS (10 mM Tris-HCL, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0, 0.1 N NaOH, 0.5% SDS)

Solución de disolución de proteínas (1% (p/v) SDS, 100 mM DTT)

TAE 50× (2,5 M Tris-acetato, 0,05 M EDTA, pH 8.5, Merck)

TBE 5× (0,5 M Tris-borato, 0,01 M EDTA, pH 8,3)

TBS-Tween 20 (150 mM NaCl, 10mM Tris base, 0.05% Tween 20)

TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)

Tripsina 0,5% (p/v) (sin rojo de fenol con EDTA, Gibco)

TRIzol (Invitrogen)

Nota 1: Para la preparación de todas las soluciones acuosas se empleó agua *nanopure*.

Nota 2: A menos que se indique, los reactivos fueron obtenidos desde Merck, de calidad proanálisis y libres de actividad nucleasa.

Nota 3: Cuando se trabajó con RNA, se prepararon las soluciones con agua DEPC.

5.3 Cepas bacterianas.

E. coli DH5 α : Cepa utilizada para la preparación de plásmidos en pequeña y gran escala. Estas bacterias son competentes para transformación química por el método de Inoue modificado.

Genotipo: F⁻, ϕ 80*dlacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk⁻, mk⁺), *phoA*, *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*.

E. coli BL21-Rosetta (DE3): Propiedad de Novagen. Ésta cepa se utilizada para la expresión recombinante de proteínas. Esta cepa expresa de manera estable la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV5* que responde a un análogo de lactosa (IPTG). Además, esta cepa presenta el plásmido pRARE que contiene varias copias de la secuencia codificantes para tRNAs de baja representación en *E. coli*. Su competencia se realiza por el método de Inoue modificado.

Genotipo: *gal*, *hsdS_B*, *lacY*, *ompT*, (pRARE *araW argU glyT ileX leuW proL metT thrT tyrU thrU Cam^r*)

E. coli BL21-CodonPlus-(DE3)-RP: Propiedad de Agilent. Ésta cepa se utiliza para la expresión recombinante de proteínas. Esta cepa expresa de manera estable la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV5* que responde a un análogo de lactosa (IPTG). Finalmente, esta cepa presenta un plásmido que contiene varias copias

de la secuencia codificantes para tRNAs de baja representación en *E. coli*. Su competencia se realiza por el método de CaCl₂.

Genotipo: B F⁻, *lon*, *ompT*, *hsdS*(_{IB}⁻_{MB}⁻), *dcm*⁺, *Tet*^r, *gal*, λ (DE3), *endA*, Hte, [*argU proL Cam*^r]

5.4 Líneas celulares.

HEK-293T (ATCC CRL- 11268): Línea celular de epitelio renal embrionario humana, transformada con el antígeno T grande del virus SV40, que le confiere la capacidad de replicar plásmidos con origen de replicación SV40 y bloquear la diferenciación celular por unión a la proteína reguladora del ciclo celular Rb. Obtenidas desde el laboratorio del Dr. Sergio Lavandero.

SH-SY5Y (CRL-2266): Línea celular de neuroblastoma humano correspondiente a la tercera etapa de selección clonal desde la línea SK-N-SH (obtenida desde un tumor metastásico de una niña de 4 años de edad) con el objeto de aislar la población con características neuronales. Fueron obtenidas desde ATCC.

Nota: Ambas líneas celulares fueron incubadas en una estufa de cultivo con atmósfera humidificada y presión de CO₂ controlada (5%) (NuAire).

5.5 Medios de cultivo de bacterias.

Medio LB: Extracto de Levadura 5 g/L, triptona 10 g/L (MoBio) y NaCl 10 g/L (Merck).

Agar LB: Medio LB con 1 % agar (MoBio).

Nota: Los medios fueron suplementados con ampicilina 100 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml o cloranfenicol 25 µg/ml cuando se requirió.

5.6 Medios de cultivo para líneas celulares.

Medio DMEM alto en glucosa, líquido (SH30081, Hyclone): Suplementado con 4 mM de glutamina (Hyclone). El medio fue suplementado adicionalmente con o sin 10% Suero Fetal Bovino, 100 U/ml de penicilina más 100 µg/ml de Estreptomicina (Hyclone).

Medio DMEM-F12 alto en glucosa, polvo (12400-024, Gibco): Reconstituido según especificaciones del fabricante y suplementado con 10% Suero Fetal Bovino, 100 U/ml de penicilina más 100 µg/ml de Estreptomicina (Hyclone).

Medio Neurobasal, líquido (21103-049, Gibco): Cada litro de medio fue suplementado con 10 ml de la mezcla B27 (17504-044, Gibco), 0,5 mM final de L-glutamina (Hyclone) y 100 U/ml de penicilina más 100 µg/ml de Estreptomicina (Gibco).

Nota: Particularmente para las células SH-SY5Y, y en menor medida para las células HEK293T, para la reproducibilidad en los resultados, el uso de los sueros bovinos fetales para el cultivo celular fue realmente importante. A todos los sueros se les inactivaron las proteínas del sistema complemento por incubación a 56°C por 30 min. Probamos un número de sueros, observando resultados similares al emplear dos tipos distribuidos por la compañía Hyclone: *Fetal Bovine Serum (Canada) Standard* (SH30397.03) y *Hyclone USDA Tested Fetal Bovine Serum Central American Sourced* (SH30910.03).

5.7 Oligonucleótidos y fragmentos de DNA.

Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por la empresa IDT y fueron resuspendidos en 200 µl de agua libre de nucleasas, volumen que corresponde a la solución stock. La concentración µM del stock fue determinada a partir de la concentración obtenida por absorbancia a 260 nm. Las soluciones stock de oligonucleótidos fueron almacenados a -20°C.

En cursiva y minúscula se indican los sitios de corte para enzimas de y en negrita se indican los sitios de unión para los factores de transcripción, y en subrayado se destacan los nucleótidos mutados para tales sitios.

Clonación de CREB1 humano:

Sentido: 5'-GT^{*gatcc*}ATGACCATGGAATCTGGAGC-3'

Antisentido: 5'-AT^{*gaattc*}TTAATCTGATTTGTGGCAGTAAAG-3'

Clonación de PRKACA1 humano:

Sentido: 5'-ACGC^{*gtcgac*}GATGGGCAACGCCGCCGCCCA-3'

Antisentido: 5'-GC^{*tctaga*}CTAAAACTCAGAAAACCTCCTTGC-3'

Clonación de PRKACB1 humano:

Sentido: 5'-ACGCgtcgacAATGGCAGCTTATAGAGAACCAC-3'

Antisentido: 5'-GcctagaTTAAAATTCACCAAATTCTTTTG-3'

Sonda C/EBP -546:

Sentido: 5'-CGGCTGGATGACTACCAATCCCAGCATGC-3'

Antisentido: 5'-GCATGCTGGGATTGGTAGTCATCCAGCCG-3'

Sonda C/EBP -482:

Sentido: 5'-GGGATAGCCCCATTGCATGCAGGG-3'

Antisentido: 5'-CCCTGCATGCAATGGGGCTATCCC-3'

Sonda C/EBP -468:

Sentido: 5'-GCAGGGAATTGCAGTCCATTTAGCGG-3'

Antisentido: 5'-CCGCTAAATGGACTGCAATTCCCTGC-3'

Sonda C/EBP β consenso:

Sentido: 5'-GACCTATTGCGCAATTGACC-3'

Antisentido: 5'-GGTCAATTGCGCAATAGGTC-3'

Sonda CRE -194:

Sentido: 5'-GAGCGGTGACGTCGCGGGGT-3'

Antisentido: 5'-ACCCGCGACGTCACCGCTC-3'

Sonda CRE -164:

Sentido: 5'-GGGCGGTGACGTCGGGCCGG-3'

Antisentido: 5'-CCGGCCCGACGTCACCGCCC-3'

Sonda CRE consenso:

Sentido: 5'-AGAGATTGCCTGACGTCAGAGAGCTAG-3'

Antisentido: 5'-CTAGCTCTCTGACGTCAGGCAATCTCT-3'

Mutante CRE -164:

Sentido: 5'-GGGCGGTGATATCGGGCCGG-3'

Antisentido: 5'-CCGGCCCGATATCACCGCCC-3'

Mutante CRE -194:

Sentido: 5'-GAGCGGTGATATCGCGGGGT-3'

Antisentido: 5'-ACCCGCGATATCACCGCTC-3'

Mutante C/EBP -468:

Sentido: 5'-GCAGGGAACCGCAGTCCATTTAGCGG-3'

Antisentido: 5'-CCGCTAAATGGACTGCGGTTCCCTGC-3'

Mutante C/EBP -482:

Bloque: 5'-

*gaattc*TTTCCGGCTGGATGACTACCAATCCCAGCATGCCATTCGGCACGCCAG
TAAATTAGATGGAAGAGCGGGATAGCCCCACCGCATGCAGGGAATTGCAG
TCCATTTAGCGGCTGGTTCATAGATGGGCGGGGAAGAGCCGGGTTGCTCTAG
TCCTTTGAGAATGATTCATAGAGGGGTCAGGAAAGAAGAACGGTTCAGT
CTGTGAAAGCCCCCTTAAAAGACTGGACAGTTCTCCGAGGGAGGGAGAGGC
AGGAGAGCAAGCAGGGCCTTGGGCCTGACTCCGCCTCGGTCC*gctagc*-3'

Mutante C/EBP -546:

Sentido: 5'-GG*gaattc*TTTCCGGCTGGATGACTACCCTCCCAGCATG-3'

Antisentido: 5'-*Actcgag*CCCAAGCCGCTGCCTCCAGG-3'

Fragmento Región Distal del Promotor:

Sentido: 5'-GTACCACAGTTCCCAGCATG-3'

Antisentido: 5'-*Caagctt*GCTAGCGGACCGAGGCGG-3'

Fragmento Región Proximal del Promotor:

Sentido: 5'-GAGTCCTGGGCCTTGTCAG-3'

Antisentido: 5'-*Actcgag*CCCAAGCCGCTGCCTCCAGG -3'

ChIP-PCR de los elementos C/EBP:

Sentido: 5'-GTACCACAGTTCCCAGCATG-3'

Antisentido: 5'-TCTTCCCCGCCCATCTATG-3'

ChIP-PCR de los elementos CRE:

Sentido: 5'-GAGTCCTGGGCCTTGTCAG-3'

Antisentido: 5'-CAGCTTCCTTCCTTCCCTC-3'

ChIP-PCR exón 9 del gen *RIC8B* humano:

Sentido: 5'-AGGAACCAATGCCAAACCCC-3'

Antisentido: 5'-GCATGTTGACAAGTTTCATGG-3'

Oligo-(dT) 18mer:

Antisentido: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

RT-qPCR *RIC8B* humano:

Sentido: 5'-TTCCGTGTAATGGCAGCTGT-3'

Antisentido: 5'-TTGCCTCTTGGGCTGTTTCT-3'

RT-qPCR *GAPDH* humano:

Sentido: 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3'

Antisentido: 5'-TGGTTCACCCCATGACGAACATGG-3'

RT-qPCR *B2M* humano:

Sentido: 5'-GTGCTCGCGCTACTCTCTCT-3'

Antisentido: 5'-TCAATGTCGGATGGATGAAA-3'

5.8 Vectores de expresión y construcciones.

Los plásmidos indicados en la tabla 1 fueron preparados como una solución stock empleando el método de purificación por precipitación con PEG (Maureira Moya, 2010) e ingresados en la base de plásmidos del laboratorio.

En el caso de los vectores a ser transfectados, regularmente se transformaron bacterias DH5 α para la purificación de cada plásmido mediante cromatografía de intercambio aniónico empleando el kit comercial *NucleoBond Xtra Midi* (Macherey-Nagel). Estos plásmidos fueron disueltos en *buffer* Tris-Cl 5 mM pH 8.0 estéril.

Tabla 1: Vectores de clonación y expresión usados en ésta tesis.

N°	Nombre	Descripción
1	pBlueScript-KS(+)	Obtenido desde Stratagene, este vector fagómido fue diseñado para clonación, mutación y transcripción <i>in vitro</i> . Posee el gen que codifica para porción amino terminal de la β -galactosidasa (<i>lacZ</i>) dentro del cual posee la región de MCS y carece de regiones promotoras eucariontes. Este plásmido deriva de la familia pUC, de alto número de copias, y presenta dos orígenes de replicación: <i>f1 ori</i> y pMB1 (replicón <i>rep</i> mutado, procarionte). Posee el gen para la β -lactamasa (<i>bla</i>) que confiere resistencia <i>Amp^r</i> .
2	pQE-80L, pQE-81L, pQE-82L	Obtenido desde Qiagen, este vector de expresión en bacterias fue diseñado a partir del vector pDS56/RBSII por lo que es de bajo número de copias al presentar un origen de replicación ColE1. Permite la expresión de proteínas recombinantes para su purificación mediante cromatografía IMAC, debido a que contiene una secuencia que codifica para un epítipo de 6 histidinas río arriba del MCS. La expresión del RNA mensajero está bajo el control del promotor del fago T5 (reconocido por la RNA polimerasa de <i>E. coli</i>) seguido de dos copias del operador <i>lac</i> (<i>lacO</i>) lo que permite el control de la expresión en respuesta a la inducción con IPTG.

Tabla 1: Vectores de clonación y expresión usados en ésta tesis (continuación)

N°	Nombre	Descripción
2	pQE-80L, pQE-81L, pQE-82L (Continuación)	Además, río abajo del promotor se incluye una secuencia sintética de unión al ribosoma (RBSII) que permite una alta tasa de traducción. Río abajo del MCS, presenta dos secuencias de término de la transcripción (<i>to</i> y T1). Posee el gen para la β -lactamasa (<i>bla</i>) que confiere resistencia <i>Amp^r</i> .
3	pQE-80L-hCREB1A	Variante del vector pQE-80L que permite la expresión de la proteína humana CREB1A. El gen fue subclonado entre los sitios BamHI y Sall.
4	pQE-80L-hCREB1B	Variante del vector pQE-80L que permite la expresión de la proteína humana CREB1B. El gen fue subclonado entre los sitios BamHI y Sall.
5	pQE-80L-hC/EBP β 1	Variante del vector pQE-80L que permite la expresión de la proteína humana C/EBP β 1. El gen fue subclonado entre los sitios BamHI y Sall.
6	pQE-80L-hC/EBP β 2	Variante del vector pQE-80L que permite la expresión de la proteína humana C/EBP β 2. El gen fue subclonado entre los sitios BamHI y Sall.
7	pQE-80L-hC/EBP β 3	Variante del vector pQE-80L que permite la expresión de la proteína humana C/EBP β 3. El gen fue subclonado entre los sitios BamHI y Sall.

Tabla 1: Vectores de clonación y expresión usados en ésta tesis (continuación)

N°	Nombre	Descripción
8	pcDNA3.1His (A, B y C)	<p>Obtenido desde Invitrogen, este vector fagómido de expresión en eucariontes fue diseñado a partir del vector pcDNA3.1. Deriva de la familia pUC, de alto número de copias, y presenta dos orígenes de replicación: <i>fl ori</i> y pUC <i>Ori</i>. Permite una alta expresión de proteínas recombinantes con epítipo de 6 histidinas seguido de un epítipo Xpress hacia el extremo amino de la proteína recombinante. Los epítipos pueden ser removidos debido a la presencia de un sitio de corte para la proteasa enteroquinasa. La expresión del mensajero es regulada por la actividad del promotor viral fuerte CMV en eucariontes o por el promotor para la RNA polimerasa del fago T7 para transcripción <i>in vitro</i>. La proteína codificada presenta una alta traducción debido a la presencia de una secuencia Kosak dentro de la que se encuentra en el codón de inicio del epítipo de 6 histidinas y una secuencia de poliadenilación y término de la transcripción (BGH pA). Este vector puede replicar de manera episomal en líneas celulares que expresen de manera estable el antígeno T mayor del virus SV40 (como las células HEK293T). Posee el gen para la β-lactamasa (<i>bla</i>) que confiere resistencia a</p>

Tabla 1: Vectores de clonación y expresión usados en ésta tesis (continuación)

N°	Nombre	Descripción
8	pcDNA3.1His (A, B y C) (Continuación)	<i>Amp^r</i> en bacterias y el gen <i>Neo^r</i> que le confiere resistencia a neomicina en eucariontes para la selección de células transfectantes estables.
9	pcDNA3.1His C-hC/EBPβ1	Variante del vector pcDNA3.1His C que permite la expresión de la proteína humana C/EBPβ1 (CEBPB1). El gen fue subclonado entre los sitios BamHI y XhoI.
10	pcDNA3.1His C-hC/EBPβ2	Variante del vector pcDNA3.1His C que permite la expresión de la proteína humana C/EBPβ2 (CEBPB2). El gen fue subclonado entre los sitios BamHI y XhoI.
11	pcDNA3.1His C-hC/EBPβ3	Variante del vector pcDNA3.1His C que permite la expresión de la proteína humana C/EBPβ3 (CEBPB3). El gen fue subclonado entre los sitios BamHI y XhoI.
12	pcDNA3.1His B-hPRKACB1	Variante del vector pcDNA3.1His B que permite la expresión de la subunidad catalítica de la enzima PKA B1 (PRKACB1). El gen fue subclonado entre los sitios XhoI y XbaI.
13	pcDNA3.1-V5His	Vector fagómico de expresión en eucariontes diseñado a partir del vector pcDNA3.1/Sal2-V5-His-TOPO por digestión con BstXI y religación. Permite una alta expresión de proteínas recombinantes con epítotope de 6 histidinas seguido de un epítotope V5 hacia el extremo carboxilo de la proteína recombinante.

Tabla 1: Vectores de clonación y expresión usados en ésta tesis (continuación)

N°	Nombre	Descripción
13	pcDNA3.1-V5His (Continuación)	Presenta las mismas características que el vector pcDNA3.1His.
14	pcDNA3.1-hPRKACA1-V5His	Variante del vector pcDNA3.1-V5His que permite la expresión de la subunidad catalítica de la enzima PKA A1 (PRKACA1). El gen fue subclonado entre los sitios XhoI y XbaI.
15	pRL-SV40	Obtenido desde Promega, este vector control posee el gen reportero luciferasa desde <i>Renilla reniformis</i> (<i>RLuc</i>) bajo el control de la región promotora/potenciadora desde el virus vacuolizante del simio 40 (SV40) que permite la expresión constitutiva de la proteína. En la región 3' del gen se incorporó la señal de poliadenilación SV40. Entre el promotor y el gen se insertó un intrón quimérico lo cual aumenta su nivel de expresión. Tras esta región quimérica se encuentra el promotor del fago T7 que permite la transcripción <i>in vitro</i> del mensajero de <i>Rluc</i> con la RNA polimerasa T7. El plásmido posee un origen de replicación <i>ori</i> desde <i>E. coli</i> . Este plásmido posee el gen de la β -lactamasa que confiere resistencia al antibiótico ampicilina (<i>Amp^r</i>).
16	pGL3b	Obtenido desde Promega, es un vector modificado que carece de promotores

Tabla 1: Vectores de clonación y expresión usados en ésta tesis (continuación)

N°	Nombre	Descripción
16	pGL3b (Continuación)	eucariontes río arriba del gen reportero luciferasa de <i>Photinus pyralis</i> y MCS. Esta versión del plásmido emplea un gen mutado de luciferasa (<i>luc+</i>) que a diferencia del gen nativo, presenta un menor número de sitios de unión a factores de transcripción en la región codificante. Presenta dos orígenes de replicación: <i>fl ori</i> que permite la producción de DNA fagómico mono hebra y uno <i>ori</i> desde <i>E. coli</i> . Para favorecer el término de la transcripción y la estabilidad del mensajero de <i>luc+</i> se adicionó río abajo la señal de poliadenilación (<i>SV40 late poly(A) signal</i>). Finalmente, vector presenta el gen de β -lactamasa que confiere resistencia al antibiótico ampicilina (<i>Amp^r</i>).
17	phRIC8B/-600bp(WT)	Corresponde a la región entre la posición -600 pb del promotor de Ric-8B humano, hasta la -36 pb con respecto al codón de inicio del gen, subclonado en el vector pGL3basic entre los sitios KpnI y XhoI. Se obtuvo por digestión del vector phRic-8B 1,0kb con la enzima de restricción KpnI y posterior religación del vector digerido y purificado (Maureira Moya, 2010). Con esto se perdió la región distal del promotor.
18	phRIC8B/600bp(-164)mut	Variante del Vector phRIC8B/-600(WT) que presenta una mutación en el sitio de unión CRE -164.

Tabla 1: Vectores de clonación y expresión usados en ésta tesis (continuación)

N°	Nombre	Descripción
19	phRIC8B/600bp(-194)mut	Variante del Vector phRIC8B/-600(WT) que presenta una mutación en el sitio de unión CRE -194.
20	phRIC8B/600bp(-468)mut	Variante del Vector phRIC8B/-600(WT) que presenta una mutación en el sitio de unión C/EBP -468.
21	phRIC8B/600bp(-482)mut	Variante del Vector phRIC8B/-600(WT) que presenta una mutación en el sitio de unión C/EBP -482.
22	phRIC8B/600bp(-546)mut	Variante del Vector phRIC8B/-600(WT) que presenta una mutación en el sitio de unión C/EBP -546.
Fuente: Elaboración Propia		

5.9 Anticuerpos.

IgG monoclonal de conejo contra CREB humano: 17-600; sobrenadante de cultivo de hibridoma, Millipore. Dilución para *western blot*: 1:5000 toda la noche (o 1:1000 por 1 hora).

IgG policlonal de conejo contra C/EBP β humano, rata y ratón: 200 μ g/ml, C/EBP β (C-19): sc-150, Santa Cruz Biotechnology. Dilución para *western blot*: 1:1.000 por 6 horas.

IgM monoclonal de ratón contra la subunidad α de GAPDH: Clon 1D4, NB300-221, sobrenadante del cultivo de hibridoma, Novus Biologicals. Dilución para *western blot*: 1:5000 toda la noche (o 1:1000 por una hora).

IgG_{2a} monoclonal de ratón contra epítipo de 6-histidina: 0,5 mg/ml, #631212, Clontech. Dilución para *western blot*: 1:1000 por 1 hora.

IgG_{2a} monoclonal de ratón contra epítipo V5: 100 μ g/ml, clon sv5-pk, sc-58052, Santa Cruz Biotechnology. Dilución para *western blot*: 1:5000 toda la noche.

IgG normal de ratón: 400 μ g/ml, SC-2025, Santa Cruz Biotechnology.

IgG normal de conejo: 400 μ g/ml, SC-2027, Santa Cruz Biotechnology.

IgG policlonal de cabra contra IgG de conejo conjugado con peroxidasa: 0,8 mg/ml, H+L, 111-035-003, Jackson ImmunoResearch.

IgG policlonal de cabra contra IgG de ratón conjugado con peroxidasa: 0,8 mg/ml, H+L, 115-035-003, Jackson ImmunoResearch.

Nota: El control para el anticuerpo IgG monoclonal de conejo contra CREB humano es proporcionado en conjunto con ese anticuerpo y a partidores para amplificar la región del promotor de *C-FOS* humano (*FOSB*) que contiene sitios CRE en el kit ChIPAb + CREB (#17-600, lote #NRG1653922, Millipore)

6 Métodos

6.1 Cultivo celular y diferenciación de las células SH-SY5Y.

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en viales criogénicos dentro de un tanque de nitrógeno líquido. Las células fueron criopreservadas en medio de cultivo completo con 10% DMSO, y enfriadas lentamente (30 minutos a -20°C, 1 día a -80°C y luego en nitrógeno líquido). Todas las células fueron cultivadas en placas de cultivo celular de 10 cm con 10 ml de medio de cultivo completo. Las células son sacadas de criogenia de forma rápida a 37°C, centrifugadas para eliminar el medio con DMSO y cultivadas en medio completo. Todos los medios son almacenados a 4°C pero son calentados a 37°C para su uso con las células. Todos los procedimientos se realizaron dentro de una cámara de bioseguridad clase II tipo A2 (LabGard ES UN-425, NuAire).

Las células HEK293T presentaban pasaje inicial 17 y fueron cultivadas hasta pasaje 30. Las células HEK293T presentan baja adhesión a la placa, por lo que los lavados y cambios de medio deben hacerse considerando ese aspecto. Su cultivo se realizó hasta alcanzar el 100% de confluencia en la placa, el que se obtuvo al cabo de 4 días, con cambio de medio cada 2 días. En este punto, las células fueron lavadas con 10 ml de PBS 1× estéril, despegadas de la placa con 1 ml de tripsina 0,005%, la tripsina inactivada con 10 ml de DMEM 10% FBS y centrifugadas por 5 min a 160×g. El *pellet* de células fue suspendido en DMEM 10% FBS, inoculando un veinteaño del volumen en una placa nueva de 100 mm con 10 ml de DMEM 10% FBS.

Las células SH-SY5Y se obtuvieron en pasaje 20 y fueron cultivadas hasta pasaje 40, punto en el cual presentaron pérdida del fenotipo inicial. Su cultivo se realizó hasta alcanzar como máximo un 50% de confluencia, la cual se alcanzó regularmente entre 5 a 8 días de cultivo en la placa, con cambio de medio cada 4 días. Este tipo celular crece de forma mixta (adhesión y suspensión) por lo que ambas poblaciones deben recuperarse en cada pasaje. Una vez alcanzada la confluencia, el medio de cultivo se traspasó a un tubo cónico de 20 ml. Las células fueron lavadas con 10 ml de PBS 1× estéril, volumen que fue depositado en el tubo con el medio de cultivo anterior. Se adicionó a la placa 1 ml de tripsina 0,025%, y se incubó por 5 min. Las células despegadas fueron traspasadas al

mismo tubo cónico del sobrenadante y mezcladas. Después de una centrifugación a $630\times g$ por 5 min, el *pellet* celular (débilmente adherido) fue suspendido en DMEM F12 10% FBS y dividido en 20 placas de 10° mm. Los ensayos de diferenciación para este tipo celular se basaron en una modificación de un protocolo descrito previamente (Encinas, et al., 2000) y que se encuentra descrito con detalle en la tesis de Magister de Rodolfo Sánchez (Sánchez Ramírez, 2015). Brevemente, el día previo a comenzar el ensayo de diferenciación se inoculó 2×10^6 células por placa de 60 mm (o 4×10^6 por placa de 100 mm). Al día siguiente, se cambió el medio de las células por DMEM F12 5% FBS más ATRA 10 μM (o el vehículo DMSO). Durante 5 días, se redujo secuencialmente en 1% la concentración de FBS en el medio de cultivo más ATRA 10 μM hasta utilizar DMEM F12 sin suero. Posteriormente, el medio fue reemplazado por medio Neurobasal/B27 más la neurotrofina BDNF 10 ng/ml, y el cultivo continuó hasta llegar al noveno día de diferenciación. Entre cada cambio, las células fueron lavadas suavemente con PBS 1 \times . El curso de la diferenciación fue determinado por el cambio morfológico observado durante los días de diferenciación *in vitro* (DIV).

Nota 1: Un pasaje se define como el número de veces que un cultivo creció hasta confluencia máxima y las células fueron despegadas de la placa e inoculadas en una placa nueva en una dilución determinada.

Nota 2: La confluencia corresponde a un parámetro visual que relaciona el área que ocupa el cultivo de células con el área de la placa de cultivo.

6.2 Construcción de los vectores de expresión

Las técnicas de biología molecular empleadas para la generación de las distintas construcciones se encuentran previamente descritas en detalle (Maureira Moya, 2010). Para aumentar la eficiencia de ligación, todos los vectores aceptores fueron digeridos y desfosforilados en su extremo 5'. Las regiones codificantes para los genes *CREB1A*, *CREB1B* y para las subunidades catalíticas de las isoformas de la proteína quinasa A *PRKACA1* y *PRKACB1* fueron clonadas para éste trabajo. *CREB1A* sólo carece del exón 4, presente en la isoforma *CREB1B*, por lo que ambos genes fueron amplificados con el mismo set de partidores. Estos dos genes fueron clonados mediante RT-PCR desde RNA total de células SH-SY5Y empleando las enzimas *SuperScript II* y *Herculasa II Fusion*.

El producto de PCR fue digerido con las enzimas BamHI y XhoI y ligado en del vector de traspaso pCS2+, desde el cual fueron subclonadas en el vector pQE-80L entre los sitios BamHI y SalI. El gen que codifica para C/EBP β humano (*CEBPB*) no presenta intrones y las isoformas corresponden a distintos productos de inicios de traducción alternativos, por lo que las isoformas de C/EBP β fueron amplificadas por PCR a partir de ADN genómico, empleándose distintos partidores 5', y subclonados entre los sitios BamHI y XhoI del vector pGEX-4T1 (Steinberg, et al., 2012). A partir de estos vectores, y mediante digestión dirigida mediante enzima de restricción, las distintas isoformas fueron subclonados entre los sitios BamHI y SalI en el vector pQE-80L. Las subunidades catalíticas de las isoformas de la proteína quinasa A fueron amplificadas mediante RT-PCR desde ARN total de células HeLa empleando las enzimas *SuperScript II* y la enzima *Herculasa II Fusion*. Los oligonucleótidos empleados en la amplificación del gen para la subunidad *PRKACA1* permitieron su posterior clonación entre los sitios XhoI y XbaI del vector pcDNA3.1His, mientras que los empleados para la isoforma *PRKACB1* permitieron clonarla entre los sitios XhoI y XbaI del vector pcDNA3.1-V5His.

La región del promotor de *RIC8B* humano entre la posiciones -600 a -37 pb (respecto del codón de inicio de la traducción) fue clonada desde DNA genómico de células HEK293T y subclonado en el vector pGL3basic entre los sitios KpnI y XhoI (Maureira Moya, 2010). A partir de este vector, se generaron las mutantes en los sitios C/EBP y CRE. Las mutaciones de los sitios -164, -194 y -468 fueron generados mediante un protocolo de mutagénesis sitio dirigida descrito previamente (Laible & Boonrod, 2009). La mutación del sitio -482 requirió de la síntesis previa de un fragmento de DNA, el cual fue subclonado en el vector de traspaso pCR-II-TOPO ZERO Blunt (Invitrogen), digerido con las enzimas EcoRI y NheI y ligado dentro del vector phRIC8B/-600bp(WT). La mutación del sitio -546 fue generada mediante PCR con un partidador de portaba la mutación y el oligonucleótido antisentido usado para amplificar la región proximal del promotor. El fragmento amplificado fue digerido con las enzimas EcoRI y XhoI, y ligado en el vector phRIC8B/-600bp(WT). Todas las construcciones y mutaciones fueron corroboradas por secuenciación mediante el método de Sanger automatizado y las secuencias se encuentran en el apéndice 12.5.

6.3 Transformación por calcio de *E. coli* DH5 α , BL21 Rosetta (DE3) y BL-21 Codon Plus (DE3) RP.

Se tomó aproximadamente 50 ng de DNA plasmidial y se mezcló con 50 μ l de bacterias competentes, incubando por 30 min en hielo. Luego, se dio un *shock* térmico incubando la suspensión a 42°C por 2 min y posteriormente en hielo por 5 min. Finalmente, se recuperaron las bacterias incubándolas con medio LB a 37°C por 1 hr en agitación, y se sembraron en placas de agar LB conteniendo la concentración adecuada de antibiótico como método de selección.

6.4 Transfección de cultivos celulares eucariontes.

Transfección por el método de fosfato de calcio: Este protocolo fue empleado en los ensayos de actividad promotora en células HEK293T y corresponde a una modificación del protocolo original (Sambrook & Russell, 2001). Se prepararon stocks de 100 ng/ μ l para cada plásmido, excepto para el vector pRL-SV40, para el cual se preparó uno 1 ng/ μ l. El día previo a la transfección, se sembraron $0,5 \times 10^5$ células/ pocillo en una placa de 24 pocillos, hasta que se alcanzó una confluencia del 50-60% el día de la transfección. Dos horas antes de la transfección, el medio de cultivo fue reemplazado con 0,5 ml de medio fresco. Durante este tiempo, se preparó la mezcla de transfección en un tubo de 1,5 ml estéril compuesta por 30 μ l de HBS $1 \times$ más 1 μ g DNA plasmidial total (2,5 ng pRL-SV40, 200 ng del vector pGL3basic, 400 ng del vector de sobreexpresión y completando la cantidad total de DNA con el vector pBlueScript KS(+)). Se mezclaron los plásmidos con movimiento de vórtice y la mezcla fue llevada al fondo del tubo por centrifugación. Se agregó entonces 2 μ l de CaCl₂ 2M en la tapa del tubo, para evitar que se deslizara al fondo del tubo antes de mezclar. Empleando vórtice, se mezcló el contenido del tubo por 15 s. Posteriormente se incubó la mezcla por 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la coprecipitación del DNA plasmidial con los microcristales de fosfato de calcio. El coprecipitado fue resuspendido con micropipeta y se agregó gota a gota sobre la placa de cultivo. Las células transfectadas fueron analizadas 24 a 48 hrs postransfección.

Transfección con Lipofectamina: Este protocolo fue empleado en los ensayos de sobreexpresión de proteínas en células HEK293T. Se emplearon cultivos celulares a una

confluencia de 80-90% en placas de 100 mm. El día de la transfección, en un tubo de 1,6 ml estéril se mezclaron 14 µg de DNA plasmidial con 700 µl de DMEM sin suero. En otro tubo de 1,6 ml estéril se mezclaron 42 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) con 700 µl del mismo medio sin suero y se incubó por 5 minutos. El contenido de éste tubo se traspasó al tubo con la solución de DNA plasmidial y se mezcló con movimiento rotatorio. La mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente, tiempo durante el cual se removió el medio de cultivo desde la placa de 100 mm y fue reemplazado por 10 ml de DMEM sin suero. Al cabo de la incubación, se adicionó la mezcla de transfección gota a gota por toda la placa. Se incubó la placa durante 6 hrs en la estufa de cultivo, tras lo cual se reemplazó el medio de cultivo por DMEM 10% FBS. Finalmente las células fueron incubadas a 37°C por 24 hrs con 5% de CO₂.

Electroporación: Ésta técnica fue utilizada para la transfección de las células SH-SY5Y. El día de la transfección, las células cultivadas en placas de 10 cm al 50% de confluencia fueron despegadas y contadas. Luego, 6×10^6 células fueron traspasadas a un tubo de 1,6 ml y resuspendidas en 50 µl de *buffer cytomix* (van den Hoff, et al., 1992), más 2 µg de cada construcción del promotor de RIC8B, 100 ng de pRL-SV40 y 6 µg pBlueScript KS(+). Rápidamente, las células fueron suspendidas y traspasadas a una cubeta de electroporación de 2 mm (BioRad), enfriadas en hielo y electroporadas empleando un pulso de onda cuadrada de 200 V por 20 ms en un equipo de electroporación *Gene Pulser Xcell* (BioRad). La cubeta fue enfriada nuevamente en hielo para luego sembrar las células en una placa de 60 mm con 5 ml de DMEM F12 10% FBS e incubarlas toda la noche a 37°C y 5% CO₂. Un día después, el total de células transfectadas fue dividido entre 3 pocillos de una placa de 24 pocillos.

6.5 Ensayos de actividad luciferasa en células HEK293T.

Se procedió de acuerdo a lo descrito en el kit *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega). Brevemente, se removió el medio de cultivo de cada pocillo de una placa de 24 pocillos y se adicionó 100 µl de *buffer* de lisis pasiva 1×. Se incubó por 20 min a temperatura ambiente con agitación moderada. Se homogenizó el lisado a través de una punta usando una micropipeta y se traspasó a un tubo de 0,6 ml. El tubo fue centrifugado a $8.000 \times g$ por 30 s y se tomó una alícuota de 40 µl del sobrenadante, la cual fue transferida

a un pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo blanco. Cada 10 s se le agregó a cada pocillo 10 μ l de reactivo del sustrato para luciferasa de *P. pyralis* (LAR II). La emisión de luz fue medida en un multilector de placa (VICTOR3 *luminometer*, Perkin Elmer) programado para leer cada 10 s. Posterior a esto, se adicionó 10 μ l del reactivo con el sustrato para luciferasa de *R. reniformis* (*Stop & Glo*), el que además detiene la reacción de luciferasa de *P. pyralis* y se midió cada 10 s. Los resultados fueron procesados y graficados como Unidades Relativas de Luminiscencia (RLU), que corresponden a la razón entre las unidades de luminiscencia de luciferasa de *P. pyralis* y las unidades de luminiscencia de luciferasa de *R. reniformis*.

6.6 Extracción de RNA total y proteínas con el reactivo TRIzol.

Para la extracción de RNA total desde células HEK293T se utilizó el reactivo TRIzol. Este reactivo se basa en el método descrito inicialmente por Chomczynski y Sacchi, el que conjuga el poder caotrópico del tiocianato de guanidina (que inactiva todas las nucleasas intracelulares) y la solubilidad diferencial de los ácidos nucleicos presentes en una mezcla de fenol saturado en medio ácido (Chomczynski & Sacchi, 1987). El carácter apolar de estos solventes orgánicos permite además la lisis celular, y es por la alta volatilidad de éstos solventes que el protocolo se realiza en campana de extracción de gases. El protocolo empleado corresponde al indicado por el fabricante. Brevemente, tras lavar las células con PBS 1 \times frío, se adicionó 1 ml del reactivo por pocillo de una placa de cultivo de 6 pocillos. Se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente y se raspó la placa con un rastrillo para células. Todo el contenido se llevó a un tubo de 1,5 ml. Se agregó 200 μ l de cloroformo y se agitó fuertemente por 15 s. Se centrifugó a 16.000 \times g a 4°C durante 15 min, generándose dos fases: una fase orgánica (inferior) que contiene las proteínas y una fase acuosa (superior) donde está el RNA total. Ambas fases están separadas por una interfaz donde está el DNA genómico.

Purificación del RNA: La fase acuosa se retiró con sumo cuidado, evitando contaminarlo con la interfaz, empleando para ello puntas estériles de 200 μ l con extremo romo. Se trasladó la fase acuosa a un tubo de 1,6 ml nuevo y se adicionaron 500 μ l de isopropanol. Se mezcló y dejó incubar por 5 min para luego centrifugarlo a 16.000 \times g a 4°C por 15 min. Se eliminó el isopropanol y se lavó el precipitado con 500 μ l de etanol 70%. Se centrifugó

nuevamente por 10 min, se eliminó el sobrenadante y el exceso de etanol se eliminó por evaporación a temperatura ambiente por 10 min, evitando secar el precipitado totalmente. El RNA total fue solubilizado en agua libre de nucleasa y el volumen final fue ajustado dependiendo del tamaño del precipitado. Para aumentar la solubilización, la muestra fue incubada por 10 minutos a 65°C. El RNA total fue analizado en un espectrofotómetro *NanoPhotometer* (IMPLEN GmbH) y la pureza fue estimada a partir de las relaciones de absorbancias 260nm/280nm y 260nm/230nm, las que representan respectivamente la contaminación por proteínas y por compuestos fenólicos. La concentración de RNA total de cada muestra fue determinada por un análisis comparativo contra un estándar de RNA de concentración conocida. Para ello, se realizó un análisis densitométrico de una electroforesis en gel de agarosa empleando el programa ImageJ (NIH). El RNA total fue almacenadas a -80°C y empleado para sintetizar el cDNA.

Extracción de Proteínas: Una vez retirada la fase acuosa desde el tubo que contenía el lisado celular en TRIzol, se agregaron 450 µl de etanol absoluto, lo que permitió la precipitación del DNA. De esta manera, sólo las proteínas quedaron en la fase orgánica. Se centrifugó la mezcla a 2.000×g por 15 min y se desechó el precipitado de DNA. Las proteínas del sobrenadante fueron entonces precipitadas por adición de 750 µl de isopropanol. Se centrifugó a 12.000×g por 10 min a 4°C y el *pellet* obtenido fue suspendido en 500 µl de una solución alcohólica de cloruro de guanidina e incubado durante 20 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 7.500×g por 5 min a 4°C y se repitió el lavado con la solución de cloruro de guanidina dos veces más. Después de la última centrifugación, el *pellet* fue lavado con 1 ml de etanol absoluto y luego secado en un concentrador automático (*Concentrator plus*, Eppendorf) por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, el *pellet* deshidratado de proteínas fue solubilizado en 500 µl de la solución de disolución de proteínas por ebullición por 10 min. Debido al exceso de SDS, las muestras fueron cuantificadas en caliente y cargadas de igual forma.

6.7 Extracción de RNA total mediante columna de sílice.

Para la extracción de RNA total desde células SH-SY5Y se utilizó el kit *Quick-RNA MiniPrep* (R1054, Zymo Research), según las instrucciones del fabricante. Este método permite la lisis celular en presencia de un agente caotrópico y de detergente, agentes que

permiten inhibir las RNasas y que favorecen la adsorción del RNA en una columna de gel de sílice en presencia de una alta concentración de sales. Brevemente, tras lavar las células con PBS 1× se agregaron 600 µl de *RNA lysis buffer* a una placa de 60 mm. El lisado celular fue filtrado a través de una columna *spin-away filter* por centrifugación a 16.100×g por 1 min a temperatura ambiente, para remover gran parte del DNA genómico. La columna fue desechada y el filtrado presente en el tubo colector fue mezclado con 1 volumen de etanol absoluto. Ésta mezcla fue transferida a una columna de sílice *Zymo-Spin III CG*. La columna fue centrifugada a 16.100×g por un minuto y el filtrado fue guardado para la purificación de proteínas. La columna fue lavada una vez con 400 µl de *RNA wash buffer* y centrifugada un minuto a 16.100×g. Posteriormente, la columna fue tratada con 80 µl de *DNase I reaction mix* y la mezcla se dejó en la columna por 30 min a temperatura ambiente, tras lo cual se adicionaron 400 µl de *RNA prep buffer*. Al cabo de la incubación, la columna fue lavada 2 veces con 500 µl de *RNA wash buffer*, eliminando la fracción no unida después de cada centrifugación. Después del último lavado, la columna fue secada por centrifugación a 16.100×g por 5 minutos a temperatura ambiente. La columna fue colocada en un nuevo tubo colector, se agregaron 30 µl de agua libre de nucleasas en el centro de la columna, se dejó hidratar por 10 min y la columna finalmente fue centrifugada a 16.100×g por 2 min. El eluato contiene el RNA total. La pureza del RNA fue estimada a partir de las relaciones de absorbancias 260nm/280nm y 260nm/230nm mientras que la concentración fue calculada por fluorimetría empleando una sonda fluorescente específica para RNA contenida en el kit *Qubit RNA HS Assay* (Invitrogen). La integridad del RNA fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con EtBr en el que se cargó 1 µl de RNA total más un estándar de RNA de concentración conocida. El cDNA fue generado empleando 1 µg de RNA total y las muestras de RNA fueron almacenadas a -80°C.

Extracción de Proteínas: Fue realizada de acuerdo al protocolo empleado para el método de TRIzol, desde la etapa de precipitación con 750 µl de isopropanol.

6.8 Transcripción reversa.

Para la generación cDNA desde RNA total se empleó la enzima transcriptasa reversa. Es cDNA sintetizado fue empleado en la para la detección indirecta de la expresión de mRNA y para la clonación de genes. Las transcriptasas reversas utilizadas se describen a continuación.

M-MLV RT: La reacción se realizó según el protocolo descrito por la empresa. Para cada ensayo se emplearon 2 µg de RNA total, 500 ng de oligo-(dT) y se completó a 15 µl con agua libre de nucleasas. La mezcla fue incubada por 5 min a 70°C, para su posterior incubación en hielo y adición de 10 µl de mezcla de reacción (apéndice 12.2.1). Esta nueva mezcla fue incubada durante 60 min a 42°C, inactivada por incubación a 90°C por 10 minutos y el cDNA almacenado a -20°C. Se realizó un control negativo, el que no incluyó RT (No-RT).

Super Script II: La reacción se realizó según el protocolo descrito por el fabricante. Por muestra se emplearon 5 µg de RNA total, 500 ng de oligo-(dT) o 1µl del oligonucleótido antisentido 10 µM específico para el gen que se deseó clonar, 1µl dNTP 10 mM (500 µM final) y agua libre de nucleasas hasta completar 13 µl. Se calentó la mezcla a 65°C por 5 min y luego a hielo para posteriormente adicionar 4 µl 5× *First Strand Buffer* y 2 µl DTT 0,1M a cada tubo. Se calentó por 2 minutos a 42°C tras lo cual se agregó 1µl *Super Script II RT* (200 U/µl) y se mezcló a temperatura ambiente. Se incubó la reacción a 42°C por 60 min, inactivando posteriormente la enzima a 70°C por 15 minutos y los cDNA se almacenaron a -20°C. Se incluyó un control negativo de transcripción reversa (no-RT) el cual no incluyó enzima.

6.9 Amplificación de DNA mediante PCR.

A continuación se describen las DNA polimerasas utilizadas:

GoTaq Flexi DNA polimerasa: La reacción se realizó según las indicaciones de la compañía (apéndice 12.3). Sin embargo, la amplificación de los fragmentos del promotor del gen *RIC8B* humano en ensayos de ChIP se realizó empleando un protocolo de amplificación *touch down* (Korbie & Mattick, 2008), el que se muestra en el apéndice 12.3.2. Se empleó esta modalidad de PCR debido a la amplificación inespecífica obtenida

al emplear bajas cantidades de templado genómico, como fue el caso de la amplificación de la región que contiene los elementos CRE del promotor del gen *RIC8B* humano.

Herculasa II Fusion DNA polimerasa: La amplificación de fragmentos con esta enzima fue realizada en una reacción que contenía $1\times$ *Herculasa II buffer*, 250 μ M de cada dNTP, 250 nM de cada oligonucleótido, 1 μ l de enzima, templado y agua libre de nucleasas hasta completar 50 μ l. El programa empleado fue: 1 ciclo de 94°C por 2 min, 30 ciclos de 94°C por 15 s, 55°C por 30 s y 68°C por 1 min/kb, 1 ciclo de 68°C por 4 min y enfriamiento a 4°C. Cuando se amplificó sondas de DNA marcadas radiactivamente se empleó el mismo programa de amplificación regular empleado para la enzima *GoTaq Flexi* (apéndice 12.3.1).

6.10 PCR en tiempo real.

En este trabajo de tesis fue empleada para la detección relativa de los niveles de expresión de un mRNA poliadenilado de interés con respecto de un gen de referencia. Esto a través de la amplificación de un cDNA representativo de los mensajeros presentes en una muestra de RNA total, obtenida por transcripción reversa (RT-qPCR). En todos los ensayos se empleó el equipo Mx3000P (Stratagene). La sonda fluorescente empleada como agente intercalante de DNA fue “EvaGreen”, la cual posee características espectrales similares a las de “SYBR-Green”. Sin embargo, “EvaGreen” es soluble en agua y no inhibe a la DNA polimerasa, por lo que puede ser empleada a mayores concentraciones en la reacción, aumentando la sensibilidad de la misma. La reacción estándar utilizada se encuentra indicada en el apéndice 12.4. El ciclo umbral (C_t) se definió como el ciclo en el que la fluorescencia del DNA amplificado fue mayor a la fluorescencia umbral, calculada mediante el método basado en amplificación (*amplification-based threshold*). La cuantificación relativa de la muestra se realizó por el método de interpolación desde una curva estándar (Bookout, et al., 2006). Básicamente, se realizó una curva estándar a partir de diluciones seriadas (1/10) del producto de PCR obtenido para cada set de partidores. Se realizó qPCR para cada dilución, abarcando al menos 5 diluciones cuyo C_t estaban en torno al C_t de las muestras. Se interpolaron los valores del gen de interés (GOI) en las muestras y se dividieron por los valores del gen de referencia

en las mismas muestras. Finalmente, los valores se normalizaron como veces respecto de la condición control.

Nota: Los partidores para qPCR fueron diseñados empleando el programa AmplifX (*Centre de Recherche en Neurobiologie et Neurophysiologie de Marseille*), eligiendo aquellos set de partidores que fueran específicos para cada GOI (*Primer Blast*), que hibridaran en exones diferentes y cuya curva de disociación teórica mostrase un solo pico (μ Melt, University of Utah). Así, normalmente los partidores sintetizados poseían valores de eficiencia de amplificación (obtenido a partir de la pendiente de la curva estándar) superior al 95%.

6.11 Electroforesis de DNA en gel y fotodocumentación.

La resolución de los fragmentos de DNA se realizó mediante la técnica de electroforesis en gel. Cuando se requirió, se adicionó 1/5 del volumen de *buffer* de carga ácidos nucleicos A o 1/4 del volumen de *buffer* de carga ácidos nucleicos B (para fragmentos de DNA inferiores a 500 pb) a cada una de las muestras.

Electroforesis en gel de agarosa: Los geles fueron confeccionados de acuerdo al volumen y número de muestras analizar. Dependiendo del tamaño del DNA analizado, la concentración de agarosa varió entre 1 a 2% en *buffer* TAE 0,5× con EtBr a una concentración final de 0,05 μ g/ml. Las muestras fueron corridas a 50 Volts entre 6 a 7 horas para geles preparativos o a 100 Volts durante 30 a 50 minutos para geles analíticos. La resolución de algunos productos de PCR inferiores a 100 pb se realizó en geles de agarosa al 2% en *buffer* TBE 0,5× y en presencia de EtBr. La corrida se realizó a 80 Volts durante 40 a 50 minutos.

Electroforesis en gel de poliacrilamida nativo: Fue realizada empleando el sistema de electroforesis vertical C.B.S. Scientific, empleando un gel al 6% de Poliacrilamida (apéndice 12.1.1), el que fue teñido en una solución de 0,05 μ g/ml de EtBr por 20 minutos.

Fotodocumentación: Los geles fueron documentados en un transiluminador acoplado con una cámara fotográfica (Vilber Lourmat), en un formato de imagen en negativo.

6.12 Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP)

En los ensayos de ChIP se emplearon cultivos celulares confluentes en placas de 100 mm, en base a una modificación del protocolo descrito previamente (Henriquez, et al., 2011). Todo el protocolo fue llevado a cabo en hielo y empleando *buffers* enfriados a 4°C, a menos que se indique lo contrario. Las células fueron lavadas con *buffer* PBS 1× y luego fijadas a temperatura ambiente con 1% de formaldehído en PBS 1× por 10 min. La fijación fue detenida por adición de glicina 0,125 M final durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar las células dos veces más con PBS 1× más PMSF 1mM, éstas fueron separadas con rastrillo desde la placa y llevadas a un tubo cónico de 15 ml. Se centrifugó a 160×g por 5 min y el pellet de células fue resuspendido en 1 ml de *buffer* de lisis B. La liberación de los núcleos desde la suspensión de células se produjo tras aplicar 20 golpes con el émbolo ajustado en un homogeneizador Dounce. Los núcleos fueron recuperados por centrifugación a 180×g por 5 min a 4°C y resuspendidos en 0,3 ml *buffer* de sonicación. La cromatina fue fragmentada hasta conseguir fragmentos de DNA genómico de un tamaño promedio de 250 pb (resolución necesaria para la región de 600 pb del promotor en estudio), lo que fue confirmado por electroforesis en gel de agarosa al 2%. La obtención de éstos fragmentos fue posible por cavitación por ultrasonido de la muestras (*Sonicator 3000*, Misonix) durante 7,5 min con pulsos de 15 s ejecutados cada 20 s empleando el microvástago y una potencia entre 6-9 Watts. Tras centrifugar el lisado a 16.100×g por 10 min, el sobrenadante fue guardado a -80°C. Para cada reacción de inmunoprecipitación se usaron 10 µg de cromatina (definidos como 10 µg de DNA cuantificado por absorbancia a 260 nm) diluida en *buffer* de sonicación hasta un volumen de 0,3 ml. En paralelo, se separaron 10 µg de cada muestra y se diluyeron a 50 µl en *buffer* de sonicación, lo que representó la fracción de referencia o *input*. Para eliminar las interacciones inespecíficas entre la cromatina y la matriz de inmunoprecipitación se incluyó una etapa de clarificación. Para esto, las cromatina se incubó con 2 µg de IgG de conejo no relacionada (o 5 µl del sobrenadante control para el anticuerpo monoclonal contra CREB1) unida a 5 µl de resina proteína A/G-agarosa bloqueada. El *input* también fue clarificado para posteriormente ser almacenado hasta llegar a la etapa de reversión de la fijación. Después de una centrifugación a 1.000×g, la cromatina soluble y clarificada fue incubada toda la noche con 4 µg de anticuerpo policlonal contra C/EBPβ (o 5 µl de

anticuerpo monoclonal contra CREB1) a 4°C con agitación. Los inmunocomplejos fueron incubados durante 1,5 hrs con 10 µl de resina de proteína A/G-agarosa bloqueada. La fracción no unida a la resina fue eliminada por lavados sucesivos de 5 minutos con agitación a 4°C: 1 lavado con 0,5 ml de *buffer* de sonicación, 2 lavados con 0,5 ml de *buffer* de lavado de inmunoprecipitación 1 un lavado con 0,5 ml de *buffer* TE. La cromatina fue eluída desde la resina por incubación durante 15 min en 100 µl de *buffer* de elución básico a 65°C y el eluato recuperado luego de centrifugar a 16.100×g por 1 minuto a temperatura ambiente. El *input* fue llevado a 100 µl con *buffer* de elución y, junto con los eluatos que contenía la cromatina inmunoprecipitada, se incubó toda la noche a 65°C en 200 mM de NaCl y 10 µg de RNasa A, para permitir la reversión de la fijación con formaldehído y la degradación del RNA. Luego, las muestras fueron tratadas con 25 µg de Proteinasa K por 4 hrs a 42°C. El DNA genómico fue purificado mediante el kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel), usando el protocolo recomendado para muestras que contienen SDS, y para eluir el DNA se empleó un volumen de 30 µl de *buffer* TE (o 100 µl para el *input*). Finalmente, la detección de las regiones del promotor de *RIC8B* humano inmunoprecipitadas se realizó por PCR (apéndices 12.3.1 y 12.3.2) en reacciones que contenían 1/10 del inmunoprecipitado y empleando partidores que amplifican la región distal que contiene los elementos C/EBP, la región proximal que contiene los sitios CRE y una región control correspondiente al exón 9 del gen *RIC8B*. Los fragmentos amplificados fueron resueltos en un gel de poliacrilamida nativo (apéndice 12.1.1) mediante electroforesis en *buffer* TBE 0,5× a 200 Volts. El porcentaje de inmunoprecipitación respecto del *input* fue estimado mediante densitometría del gel teñido con EtBr, empleando el software *UN-SCAN-IT* (Silk Scientific).

6.13 Expresión y purificación de proteínas recombinantes.

Los factores de transcripción CREB1 y C/EBPβ fueron purificados mediante cromatografía de afinidad a Ni²⁺ inmovilizado en una matriz de agarosa-nitriloacetato en condiciones desnaturalantes. Para ello, las regiones codificantes de los genes humanos CREB1A, CREB1B, C/EBPβ1, C/EBPβ2, C/EBPβ3 fueron subclonadas en el vector pQE-80L y expresadas como proteínas recombinantes con epítipo de 6 histidinas en su extremo amino terminal. Las proteínas C/EBPβ1 y C/EBPβ2 fueron expresadas en

bacterias *E. coli* BL-21 *Codon Plus* mientras que C/EBP β 3 fue expresada en *E. coli* Rosetta (DE3). Para cada una de las isoformas, se emplearon cultivos transformados y crecidos en presencia de cloranfenicol y ampicilina para inocular 300 ml de medio LB/ampicilina, los que fueron cultivados con agitación a 20°C hasta una OD_{600nm} de 0,4. En este punto, se indujo la expresión de cada proteína por adición de IPTG a una concentración final de 200 μ M (o 100 μ M para C/EBP β 3) e incubación por 3 hrs con agitación a 20°C. Posterior a la inducción, los cultivos fueron enfriados rápidamente en hielo, centrifugados a 3.900 \times g y el *pellet* de bacterias almacenado a -80°C hasta su utilización. Cada *pellet* bacteriano fue resuspendido en 15 ml de *buffer* de lisis A y lisado mediante cavitación por ultrasonido en un homogeneizador ultrasónico *VibraCell* (Sonic) durante 2 min en ciclos de 20 s de sonicación y 20 s de descanso a un 90% de la potencia. Los lisados fueron centrifugados a 16.100 \times g por 15 min. La fracción soluble fue transferida a un tubo cónico de 50 ml, se adicionó PMSF 1 mM, se agregaron 500 μ l de resina Ni-NTA-agarosa (Qiagen) y se incubó toda la noche a 4°C con agitación suave. La resina fue entonces centrifugada a 3.500 \times g y luego cargada en una columna TALON (Clontech) y empacada por gravedad. La columna fue entonces lavada con *buffer* de lavado desnaturante hasta que la A_{280nm} de la fracción no unida fue inferior a 0,02. La proteína fue eluída empleando el mismo *buffer* de lavado con distintas concentraciones de imidazol (competidor de la unión de las 2 histidinas que coordinan los dos sitios disponibles en el ion níquel unido a la resina).

La expresión de cada isoforma de CREB1 en bacterias *E. coli* Rosetta (DE3) y la lisis celular se realizaron de acuerdo a un protocolo descrito anteriormente (Lopez, et al., 2007). Sin embargo, se reemplazó la etapa de cromatografía de afinidad en columna de heparina por una cromatografía de afinidad a níquel en condiciones desnaturantes, tal como se describió para las proteínas C/EBP β .

La proteína CREB1B fue renaturada mediante el método de dilución rápida en *buffer* de diálisis y concentrada en un dispositivo de ultrafiltración (*Amicon ultra 10k*, Millipore) de manera que la concentración final de GuHCl fue menor a 5 mM. Por su parte, las isoformas de C/EBP β fueron concentradas en un dispositivo de ultrafiltración (*Vivaspin 500 5k*, Sartorius) y luego dializadas por el método de gota flotante sobre un filtro de nitrocelulosa 0,025 μ m (Millipore) contra el *buffer* de diálisis. Los stock de cada

una de las proteínas fueron almacenados a -80°C , previa adición de glicerol a una concentración final de 15% más inhibidores de proteasas 1× (Calbiochem). La concentración de las proteínas fue estimada mediante densitometría en un gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie (*PageBlue Coomassie dye*, Fermentas) por comparación contra una curva estándar de BSA.

6.14 Generación de los extractos nucleares.

Todos los procedimientos detallados a continuación fueron realizados a 4°C . Para la generación de los extractos nucleares, se empleó el método descrito por Dignam con algunas modificaciones (Dignam & Lebovitz, 1983). Veinte placas de 100 mm confluentes fueron lavadas con *buffer* PBS 1× y las células fueron despegadas con rastrillo. Se midió el volumen del *pellet* celular, denominado PCV. El *pellet* fue resuspendido en 5 PCV del *buffer* A y lisadas con un homogeneizador Dounce aplicando 20 golpes con el émbolo A. El lisado fue centrifugado a $1.000\times g$ por 5 min. El sobrenadante, correspondiente a la fracción citoplasmática (Cit), fue guardado en 20 % glicerol a -80°C más inhibidores de proteasas 1× (*Complete mini*, Roche). El *pellet* fue lavado con otros 5 PCV del *buffer* A y centrifugado a $9.600\times g$ por 20 min. El sobrenadante correspondiente a residuos de membrana y organelos de baja densidad fue removido con pipeta. El *pellet* de núcleos fue resuspendido en 1 PCV del *buffer* C e incubado durante 60 minutos con rotación. El sobrenadante, correspondiente al extracto nuclear (EN), fue guardado en alícuotas de 100 μl a -80°C . La fracción no extraíble nuclear (FNE) fue resuspendida en igual volumen final que el EN y dividida en alícuotas. Una alícuota de cada fracción celular (Cit, EN y FNE) fue tratada con 5 U de la nucleasa inespecífica benzonaza (Novagen) y guardada a -80°C . Las proteínas correspondientes a cada fracción fueron cuantificadas con el reactivo de Bradford (BioRad) y la integridad de los factores de transcripción mediante *western blot*.

6.15 Cuantificación de proteínas totales en solución.

Se empleó el método colorimétrico descrito por Bradford (Bradford, 1976). Se realizó una curva estándar con cantidades crecientes de BSA (0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 μg) más 200 μl del reactivo (*Protein Assay*, BioRad), completando a 1 ml final con agua *nanopure*, y se midió la absorbancia de las reacciones a 595nm. Las muestras de proteínas fueron preparadas de igual forma, empleando un volumen de muestra necesario para interpolar en la curva estándar (generalmente 2 μl de lisado celular).

6.16 SDS-PAGE e inmunodetección de proteínas mediante *western blot*.

Para los ensayos de *western blot*, los cultivos celulares fueron lisados empleando el *buffer* de lisis para células SH-SY5Y (0,5 ml por placa de 100 mm en hielo). El lisado total fue centrifugado a 16.100 $\times g$ por 15 min y la fracción soluble fue considerada como el extracto celular. Las muestras de proteínas fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante (apéndice 12.1.4 y 12.1.5) en un equipo de electroforesis *Miniprotean 3 Cell* (BioRad). A los extractos de proteína se les agregó 1/5 volumen de *buffer* de carga de proteínas 6 \times , y se incubaron por 10 min a 100°C. Luego los extractos se cargaron en un gel de poliacrilamida desnaturante y la electroforesis se llevó a cabo en *buffer* de electroforesis SDS-PAGE a 120 Volts hasta que el frente de corrida, indicado por el colorante azul de bromofenol, alcanzó el extremo inferior del gel. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (*Hybond-ECL*, Amersham biosciences) en *buffer* de transferencia a 250 mA por 1 hora a 4°C. La transferencia de las proteínas se comprobó por tinción de la membrana con rojo Ponceau. A continuación se bloqueó la membrana con leche descremada al 5% en *buffer* TBS-Tween por 1 hora, y se incubó con el anticuerpo primario entre 1 a 16 hrs en la misma solución. La membrana se lavó 3 veces por 10 min con *buffer* TBS-Tween y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario por 1 hora. Finalmente, se lavó la membrana 3 veces con TBS-Tween por 10 min y se reveló con el kit *ECL Western Blotting Substrate* (Pierce), exponiendo la membrana a un film de autoradiografía (*CL-XPosure*, Thermo Scientific).

6.17 Marcaje radiactivo de las sondas.

Bajo estrictas condiciones de manejo de material radiactivo, se marcó el extremo 5' de 6,6 pmoles de cada oligonucleótido sentido en una reacción de 50 μ l que contenía 2 μ l de ATP- γ ³²P (3,3 μ M; NEG502A; Perkin Elmer) y 25 U de T4 polinucleótido quinasa (10 U/ μ l, NEB). La reacción fue incubada por 30 minutos a 37°C y detenida por la adición de EDTA a una concentración final 20 mM. El oligonucleótido marcado se purificó con una columna *Sephadex G-25* (GE) y la muestra purificada fue precipitada con 2 volúmenes de etanol absoluto frío y 0,1 volúmenes de acetato de sodio a -20°C por 2 hrs. El precipitado fue recuperado por centrifugación a 16.400 \times g por 10 minutos y se lavó posteriormente el precipitado con etanol frío al 70%, y después se centrifugó nuevamente a 16.400 \times g por 10 minutos. Se obtuvo un precipitado el cual secó y resuspendió en 20 μ l de agua *nanopure*. La generación de la sonda marcada se obtuvo por hibridación del oligonucleótido sentido con 6,6 pmoles del oligonucleótido antisentido no marcado en presencia de 60 mM Tris-HCl pH 8,0 en un volumen de reacción final de 50 μ l. La muestra fue calentada a 95°C por 5 minutos y dejada enfriar lentamente a temperatura ambiente. Se generaron diluciones de 10 fmoles/ μ l, las que fueron almacenadas a -20°C.

6.18 Ensayos de cambio de la movilidad electroforética en gel (EMSA).

Se realizaron los ensayos de EMSA empleando las sondas marcadas e incubándolas en presencia o ausencia de extractos nucleares obtenidos desde células SH-SY5Y o HEK293T, o bien de proteínas recombinantes. Se probaron distintas condiciones de reacción empleando distintos *buffers*: *buffer* de Unión, *buffer* FT-0, *buffer* FT-50, *buffer* FT-100, *buffer* de Remodelación I (éste *buffer* es empleado en ensayos de Remodelación de Cromatina) y *buffer* de Remodelación II. Cada ensayo fue realizado en una reacción de 20 μ l, incubando 20 a 50 fmoles de cada sonda marcada radioactivamente (3 μ l), 100 ng de poli-(dI-dC) (0,3 μ l), 12,2 μ l de *buffer* de reacción, 1 μ l de *buffer* Tris 10 mM (pH 8,0) o sonda no marcada (sonda fría), 1 μ l de agua libre de nucleasa y más 2,5 μ l de extracto nuclear o proteína recombinante. Las muestras fueron incubadas a 30°C por 30 minutos. En los ensayos de *super shift*, luego de la reacción de unión se agregó 1 μ l de cada anticuerpo (o control PBS 1 \times) y se incubó otros 30 minutos a 30°C. Las reacciones fueron

sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida (apéndice 12.1.2). Tras precorrer el gel por 45 min a 100 Volts, las muestras fueron cargadas directamente en un gel de poliacrilamida al 5% y sometidas a electroforesis a 200 Volts en *buffer* TBE 0,3× a 4°C. En el caso del ensayo de *super shift*, las muestras fueron resueltas en un gel al 4%. El tiempo de corrida fue de 90 min para ensayos con las sondas de oligonucleótidos y 180 min para las sondas de los fragmentos del promotor. Los geles fueron secados (*GelDryer* 583, BioRad) y expuestos a un film de autoradiografía (*CL-XPosure*, Thermo Scientific) o sobre una pantalla de almacenamiento fosforescente (*PhosphorScreen*, GE). La pantalla fue escaneada en un equipo de detección digital (*Molecular Imager FX*, BioRad) y los valores de unión fue obtenida por análisis en el software del equipo (*QuantityOne*, BioRad).

6.19 Mapa de protección a DNasa I (*DNaseI-Footprinting*).

Para el protocolo empleado (Brenowitz, et al., 1989; Gutiérrez, et al., 2000) se usaron las sondas que corresponden a las dos regiones del promotor en estudio, denominadas distal y proximal, la que fueron amplificadas por PCR empleando el partidor sentido marcado con ^{32}P en su extremo 5'. Las reacciones de unión en presencia de los factores de transcripción recombinantes CREB1B o C/EBP β 3 fueron realizadas como se describió para los ensayos de EMSA, excepto que la incubación de C/EBP β 3 fue realizada a 4° C por 90 minutos. Tras la incubación, las reacciones de unión (20 μl) a distintas concentraciones del factor de transcripción fueron tratadas con 0,625 U de DNasa I (1 μl), diluida en el momento en *buffer* de dilución de la DNasa I, e incubadas a 4° C por 2 min. La digestión fue terminada por adición a cada tubo de 75 μl de *buffer* de detención y las muestras fueron incubadas toda la noche a -20° C. Después de una centrifugación a 16.000×g por 10 minutos a 4°C, el precipitado fue lavado con 0,5 ml de etanol 70% y centrifugado nuevamente. Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado fue secado a temperatura ambiente por 10 min y luego resuspendido en 5 μl de *buffer* de carga de secuenciación. Cada una de la muestras fue desnaturada a 95° C por 2 minutos y cargadas inmediatamente en un gel de secuenciación (apéndice 12.1.3). El gel fue sometido a electroforesis en *buffer* 1× TBE a 60 W constantes hasta que el frente de migración se

encontró a 1 pulgada del extremo inferior. El gel fue secado y expuesto a un film autoradiográfico para su posterior análisis.

6.20 Análisis del posicionamiento nucleosomal y marcas epigenéticas en el promotor de *RIC8B* humano desde la base de datos ENCODE.

Desde el servidor del consorcio ENCODE (ENCODE Project Consortium, 2012) y empleando la versión del genoma humano ensamble GRCh37/hg19UCSC (Febrero 2009) mostramos la información sobre la ubicación de los nucleosomas mediante MNasa-seq (disponible para las líneas celulares GM12878 y K562) y sobre las regiones de DNA más expuesto en la cromatina mediante *DNaseI-seq* (disponible para 125 líneas celulares) para la región 5' del gen *RIC8B* humano. Se incluyó además la información de las marcas epigenéticas H3K27Ac y H3K4me3 en 7 líneas celulares. Los datos fueron consultados en la base de datos ENCODE con fecha 23 de febrero de 2016. La ventana de búsqueda fue traducida al español y modificado para incluir la localización de los elementos de unión identificados en el promotor de *RIC8B* respecto del codón de inicio (ATG, flecha verde).

Detalle de las pistas (*tracks*) de información solicitada desde la base de datos (en paréntesis se indica el nombre traducido en la figura):

1. *Genome Base Position (Ventana de Posición).*
2. *UCSC Genes RefSeq, GenBank, CCDS, Rfam, tRNAs & Comparative Genomics (Genes UCSC RefSeq, GenBank, CCDS, Rfam, tRNAs y Genómica Comparativa).*
3. *Gene Annotations from GENCODE Version 19 (Anotación Básica de Genes desde GENCODE Versión 19).*
4. *Transcription Levels Assayed by RNA-seq on 9 Cell Lines from ENCODE (Niveles transcripcionales obtenidos por RNA-seq para 9 líneas celulares desde ENCODE).*

Nota: Los niveles transcripcionales mostrados corresponden a los valores de señal obtenidos para cada mensajero poliadenilado desde las lecturas de 75 pb de ambas hembras en una ventana de 200 pb para 7 líneas celulares, cada una asignada con un color específico. La configuración de visualización corresponde a la

transformación de los datos como el $\ln(x+1)$ y a su apilamiento sin transparencia (*stacked*).

- i. GM12878: Línea celular linfoblástica.
 - ii. h1ESC: Células madres embrionarias.
 - iii. HeLa-S3: Línea celular de cáncer de cuello uterino.
 - iv. HepG2: Línea celular derivada de hepatocarcinoma.
 - v. HSMM: Mioblastos de músculo esquelético (HSM Mioblasto).
 - vi. HUVEC: Células endoteliales humanas derivadas de vena umbilical.
 - vii. K562: Línea celular leucemia mieloide crónica.
 - viii. NHEK: Queratinocitos epidermales (NHE Queratinocito).
 - ix. NHLF: Fibroblasto de pulmón (NHL Fibroblasto).
5. *H3K4Me3 Mark, Often Found Near Promoters, on 7 cell lines from ENCODE* (Marca H3K4Me3 en 7 líneas celulares desde ENCODE).
6. *H3K27Ac Mark, Often Found Near Active Regulatory Elements, on 7 cell lines from ENCODE* (Marca H3K27Ac en 7 líneas celulares desde ENCODE). Nota: La configuración de visualización corresponde al apilamiento sin transparencia (*stacked*). La escala se ajustó de forma de enfatizar los máximos.
- i. GM12878: Línea celular linfoblástica.
 - ii. h1ESC: Células madres embrionarias.
 - iii. HSMM: Mioblastos de músculo esquelético (HSM Mioblasto).
 - iv. HUVEC: Células endoteliales humanas derivadas de vena umbilical.
 - v. K562: Línea celular leucemia mieloide crónica.
 - vi. NHEK: Queratinocitos epidermales (NHE Queratinocito).
 - vii. NHLF: Fibroblasto de pulmón (NHL Fibroblasto).
7. *Nucleosome Position by MNase-seq from ENCODE/Stanford/BYU* (Posicionamiento Nucleosomal determinado por MNase-seq desde ENCODE/Stanford/BYU).
- i. GM12878: Línea celular linfoblástica.
 - ii. K562: Línea celular leucemia mieloide crónica.

8. *Open Chromatin by DNaseI HS and FAIRE Tracks.*

a. *DNaseI Hypersensitivity Uniform Peaks from ENCODE/Analysis*

(Regiones Hipersensibles a digestión con DNasa I desde ENCODE/Análisis).

- i. GM12878: Línea celular linfoblástica.
- ii. h1ESC: Células madres embrionarias.
- iii. K562: Línea celular leucemia mieloide crónica.
- iv. HUVEC: Células endoteliales humanas derivadas de vena umbilical.
- v. A549: Línea celular de carcinoma de pulmón.
- vi. CD34+_Mobilized: Progenitores hematopoyéticos movilizados CD34+ (CD34+ HPC Movil.).
- vii. HSMM: Mioblastos de músculo esquelético (HSM Mioblasto).
- viii. NHEK: Queratinocitos epidermales (NHE Queratinocito).
- ix. NHLF: Fibroblasto de pulmón (NHL Fibroblasto).
- x. NT2-D1: Línea celular de carcinoma embrionario clon D1 (NTera2-D1).
- xi. Osteobl: Osteoblastos humanos (Osteoblasto).
- xii. SK-N-SH RA: Línea celular de neuroblastoma humano diferenciada con ácido retinoico (SK-N-SH + ATRA).

b. *European Institute of Oncology (Milan)/J. C. Venter Nuclease Accessible Sites, March 2006 (Sitios de Accesibilidad a DNasa I desde el Instituto de Oncología Europeo y el Instituto J. C. Venter).*

- i. Sitios de accesibilidad a nucleasa en progenitores hematopoyéticos CD34+ movilizados al torrente sanguíneo (CD34+ HPC Movil.).
- ii. Sitios de accesibilidad a nucleasa en progenitores hematopoyéticos CD34- movilizados al torrente sanguíneo (CD34- HPC Movil.).

c. *Open Chromatin by DNaseI HS from ENCODE/OpenChrom, Duke University (Regiones Hipersensibles a digestión con DNasa I desde ENCODE/Cromatina Abierta de la Universidad de Duke).*

Nota: La configuración utilizada fue el método de visualización de alta resolución (*Base Overlap Signal*) que gráfica las señales correspondientes al puntaje sobre cada par de bases de la región del genoma en función del número de lecturas desde la secuenciación del ensayo de accesibilidad a DNasa I.

- i. GM12878: Línea celular linfoblástica.
 - ii. SK-N-SH: Línea celular de neuroblastoma humano indiferenciada.
 - iii. Cerebellum_OC; Tejido cerebelar humano congelado (Cerebelo).
 - iv. Cerebrum_frontal_OC: Tejido cerebral frontal congelado (Corteza frontal).
 - v. HEK293T: Línea celular de epitelio renal embrionario humano.
 - vi. Olf_neurosphere: Células derivadas desde neurosféricas obtenidas desde mucosa olfatoria (Neurosfera Olfatoria).
 - vii. Osteobl: Osteoblastos humanos (Osteoblasto).
- d. *DNaseI Hypersensitive Site Master List (125 cell types) from ENCODE/Analysis* (Regiones Hipersensibles a digestión con DNasa I para 125 líneas celulares desde ENCODE/Análisis).

7 Resultados

7.1 Objetivo específico 1

“Corroborar la identidad de los elementos de unión identificados *in silico* para los factores de transcripción CREB y C/EBP β mediante aproximaciones experimentales *in vitro*”.

7.1.1 El factor de transcripción CREB presente en extractos nucleares se une a los elementos CRE presentes en el promotor de *RIC8B* humano.

Si bien los antecedentes expuestos en la introducción demuestran la unión de C/EBP β al promotor de *RIC8B* de rata, la unión directa tanto de CREB como de C/EBP β a los elementos CRE y C/EBP del promotor de *RIC8B* humano no ha sido caracterizada. Con este objetivo, realizamos ensayos de EMSA empleando extractos nucleares de células HEK293T y también de células SH-SY5Y. Se empleó la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y pues al ser un modelo de linaje neuronal representan un contexto celular adecuado para el estudio de la función de las proteínas RIC8. Evaluamos la presencia de los factores de transcripción mediante *western blot* en los extractos (figura 6). La mayor cantidad de C/EBP β y CREB1 se encuentra en la fracción no extraíble de la preparación del extracto nuclear para los dos tipos celulares analizados (figura 6, carriles 1 y 4 respecto de los carriles 3 y 6), no observándose degradación de las proteínas. Ya que ambas proteínas han sido previamente caracterizadas por ser fácilmente extraíbles a la concentración de sal empleada (420 mM KCl), decidimos realizar preparaciones de extractos nucleares analíticas usando el mismo protocolo pero con una mayor concentración de KCl en el buffer C (500 mM, datos no mostrados), en los que observamos similares resultados.

No obstante lo anterior, fue posible detectar en ambos extractos nucleares una única banda inmunoreactiva de ~43 kDa contra CREB1, mientras que sólo se logró detectar una banda inmunoreactiva contra C/EBP β 2 en el extracto nuclear de células SH-SY5Y (figura 6, carriles 4, 5 y 6). Es importante destacar que para ambos tipos celulares fue posible observar las tres isoformas de C/EBP β en la fracción no extraíble (figura 6,

carril 1) por lo que no podemos descartar la presencia de esta isoformas en ambos extractos nucleares y que no son detectables en los tiempos de exposición analizados debido a su baja concentración en el extracto nuclear. Finalmente, se observan diferencias en la expresión de las isoformas largas de C/EBP β al analizar la fracción no extraíble, observándose una mayor proporción de C/EBP β 2 en SH-SY5Y (figura 6A, carril 1) mientras que en células HEK293T sólo se detectó bandas inmunoreactivas de tamaño aparente superior a 50 kDa (figura 6B, carril 1), y que corresponden a C/EBP β 1 (Atwood, et al., 2011).



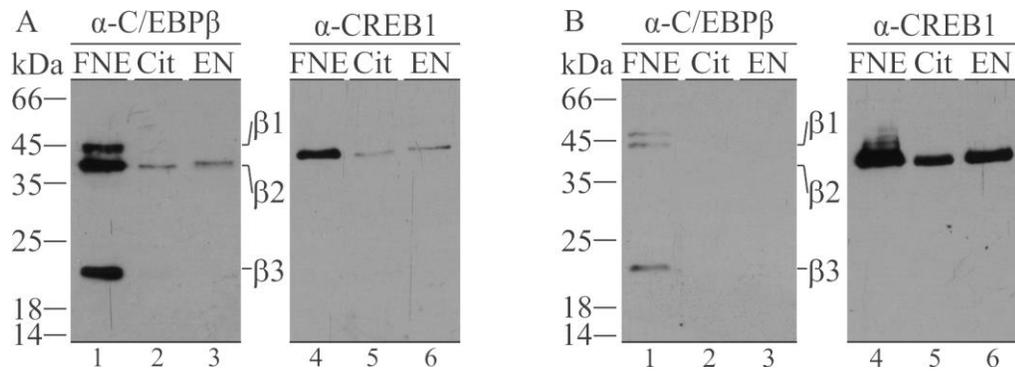


Figura 6: Inmunodetección de CREB y C/EBP β en los extractos nucleares obtenidos desde células HEK293T y SH-SY5Y.

Desde la preparación de los extractos nucleares, se obtuvieron 3 fracciones: fracción citosólica (Cit), extracto nuclear (EN) y una fracción no extraíble de la preparación del extracto nuclear (FNE). Se tomaron 20 μ g de proteínas de las fracciones Cit y EN, y un volumen de FNE equivalente al volumen de extracto nuclear analizado. Las muestras fueron resueltas en SDS-PAGE 12% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La detección de cada factor de transcripción se realizó de forma independiente por *western blot* empleando anticuerpos específicos contra C/EBP β (α -C/EBP β) o contra CREB (α -CREB1), como se indica en métodos. La detección de toda las membranas fue realizada sobre un mismo film autoradiográfico, por lo que las intensidades de las bandas inmunoreactivas de ambos extractos nucleares para el mismo anticuerpo son comparables. A) EN de células SH-SY5Y. B) EN de células HEK293T. Se indica la movilidad de las tres isoformas de C/EBP β (44 kDa β 1, 42 kDa β 2 y 20 kDa β 3). Los carriles se encuentran numerados bajo los paneles A y B. Fuente: Elaboración propia.

Se realizaron ensayos de unión empleando distintos buffers de reacción, en los que se varió esencialmente la concentración de sales (apéndice 12.6.1). Los resultados obtenidos muestran que existe unión de un factor de transcripción a la sonda consenso CRE en todas las condiciones analizadas, tal como lo demuestra el retraso en la corrida de la sonda radiactiva en presencia de extractos nucleares. Sin embargo, a la sonda consenso C/EBP β sólo observó unión débil y sólo en dos de las condiciones estudiadas: en presencia de buffer de remodelación I (86 mM KCl) y de buffer de unión 150 mM KCl (FT-100). Estos buffer difieren considerablemente en su composición, lo que puede explicar que haya unión a fuerzas iónicas diferentes. Debido a que el mayor porcentaje de unión a la sonda consenso C/EBP β se observó en condiciones de buffer de remodelación I, con el cual también se observó un gran porcentaje de unión a la sonda consenso CRE, se empleó esta condición para los ensayos de EMSA posteriores. En la figura 7 se muestra la ubicación relativa de los elementos analizados y sus secuencias. El análisis de EMSA para las sondas CRE mostró que existe un cambio en la movilidad electroforética en presencia de extractos nucleares tanto de células SHSY-5Y como de HEK293T (figuras 8A y 8B, respectivamente, carriles 7 y 12) de igual forma que se observó para la sonda consenso CRE (figuras 8A y 8B, carril 2). Para asegurar la identidad de CREB1 como el factor de transcripción unido a estos elementos, se incluyó un análisis de *super shift*. Para esto, se adicionó al ensayo de unión el anticuerpo monoclonal de conejo contra CREB1. Se aprecia la disminución de la movilidad electroforética para todas las sondas CRE estudiadas (figuras 8A y 8B, carriles 4, 9 y 14), implicando la generación del complejo de alto peso molecular compuesto por la sonda marcada y el factor de transcripción CREB unido a ella, que es reconocido por el anticuerpo. De esta forma se corroboró tanto la identidad de CREB1 como el factor de transcripción presente en los extractos nucleares así como la identidad de los elementos CRE presentes en el promotor de *RIC8B* humano como sitios de unión funcionales.

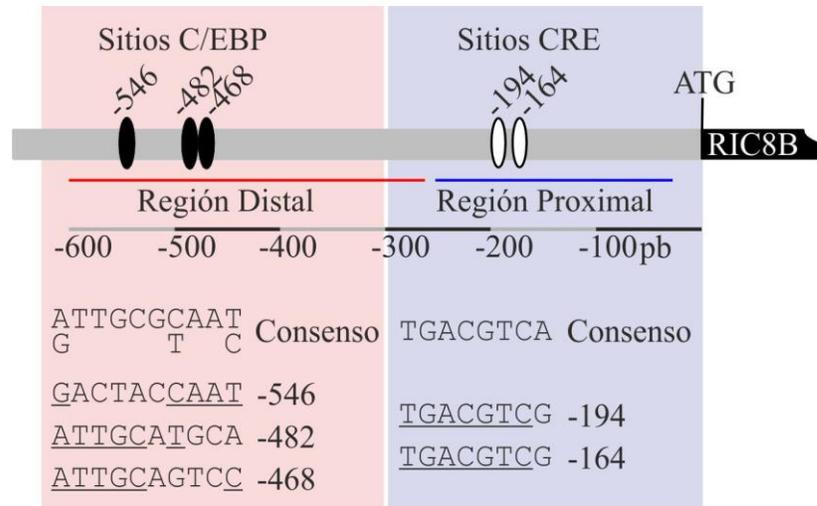


Figura 7: Representación esquemática del promotor de *RIC8B* humano en estudio y de los elementos C/EBP y CRE identificados.

Se indica la ubicación relativa (en pares de bases) desde el codón de inicio de la traducción (barras intercaladas) para cada uno de los sitios. Las secuencias para cada uno de ellos fue contrastada contra la secuencia consenso y se destaca en subrayado los nucleótidos idénticos. Además, se indican las regiones correspondientes a los fragmentos de PCR que contienen los sitios C/EBP (-599 a -264; línea roja) y CRE (-251 a -37; línea azul) y que fueron empleados como sondas para ensayos de EMSA y *DNaseI-Footprinting*. Fuente: Elaboración propia.

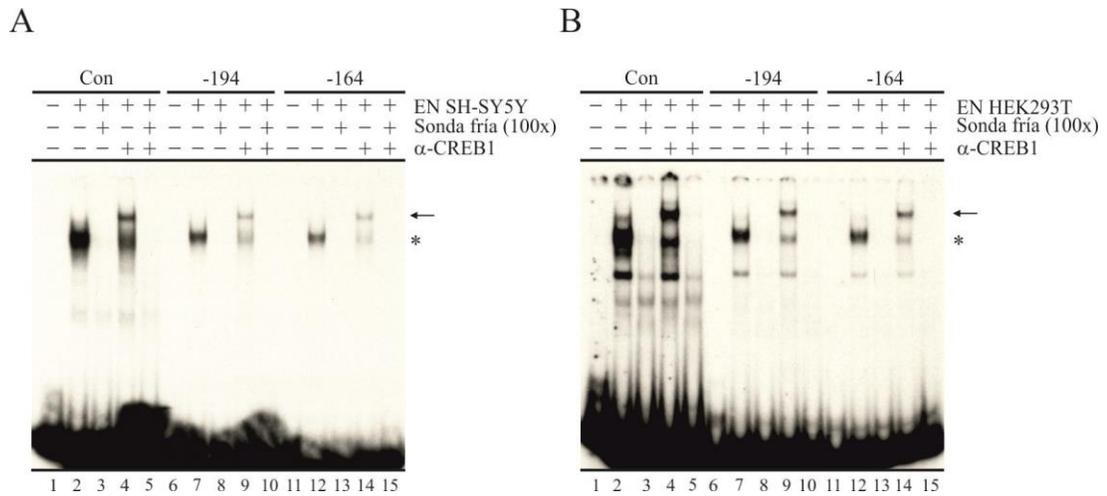


Figura 8: CREB1 Se une a los elementos CRE del promotor de *RIC8B* humano.

Ensayo de retardo en gel (EMSA) para las sondas correspondientes a los elementos CRE -194 y -164, empleando extractos nucleares (EN) de células HEK293T y SH-SY5Y. A) Ensayo de unión empleando EN de células HEK293T. B) Ensayos de unión empleando EN de células SH-SY5Y. En cada reacción de 20 μ l se utilizaron 50 fmoles de cada sonda marcada radiactivamente en su extremo 5' con 32 P. El complejo [sonda CRE · CREB1] se indica con un asterisco (carriles 2, 7 y 12). Se incluyó un ensayo de *super shift* agregando 1 μ l del anticuerpo contra CREB1 (α -CREB1); se indica el complejo formado [anticuerpo · sonda CRE · CREB1] con una flecha (carriles 4, 9 y 14). La sonda control (Con) contiene el elemento CRE consenso descrito previamente (Niehof, et al., 1997). Para corroborar la especificidad de la unión se realizaron ensayos de competencia por adición de un exceso de 100 veces la cantidad de la misma sonda empleada (100x) pero no marcada (sonda fría). Este ensayo es uno representativo de 3 ensayos realizados. Fuente: Elaboración propia.

Cuando realizamos los ensayos de unión para las sondas C/EBP empleamos el extracto nuclear de células SH-SY5Y (figura 9A). Si bien se observa unión de un factor de transcripción para todas las sondas (figura 9A, carriles 2, 5, 8 y 11), no fue posible identificar la unión de C/EBP β mediante ensayos de *super shift* (figura 9B, carriles 4 y 10), incluso para la sonda consenso. La capacidad del anticuerpo para reconocer a la proteína C/EBP β fue corroborada mediante un ensayo de *super shift* empleando C/EBP β 2 recombinante (figura 9C). Así, es muy probable que la ausencia de *super shift* sea a causa de los bajos niveles de C/EBP β en la preparación del extracto nuclear. La sonda consenso presenta en su extremo 3' la mitad de un sitio CRE, lo que puede explicar la unión de CREB1 observada como un *super shift* positivo (figura 9B, carril 3). Sin embargo, no se observó *super shift* para la sonda del elemento C/EBP -546 a pesar de que contiene medio sitio CRE. Más aún, ésta sonda mostró de forma reproducible un leve retraso en la movilidad respecto de la migración de la sonda C/EBP consenso. Este elemento corresponde a una caja CCAAT, que es reconocida también por otros factores de transcripción como NF-Y y C/EBP α . El ensayo de *super shift* contra C/EBP α no mostró unión de éste factor de transcripción a la sonda C/EBP -546 en nuestras condiciones de unión, como se muestra en la figura 9B (carril 11).

Los patrones de retardo observados para las sondas C/EBP -482 y C/EBP -468 fueron similares a los observados con la sonda C/EBP consenso (figura 9A, carriles 2, 8 y 11). La sonda del sitio C/EBP -482 es la que contiene el sitio III de unión para C/EBP β identificado previamente (Grandy, et al., 2011), el cual presenta una alta identidad con el sitio C/EBP -468.

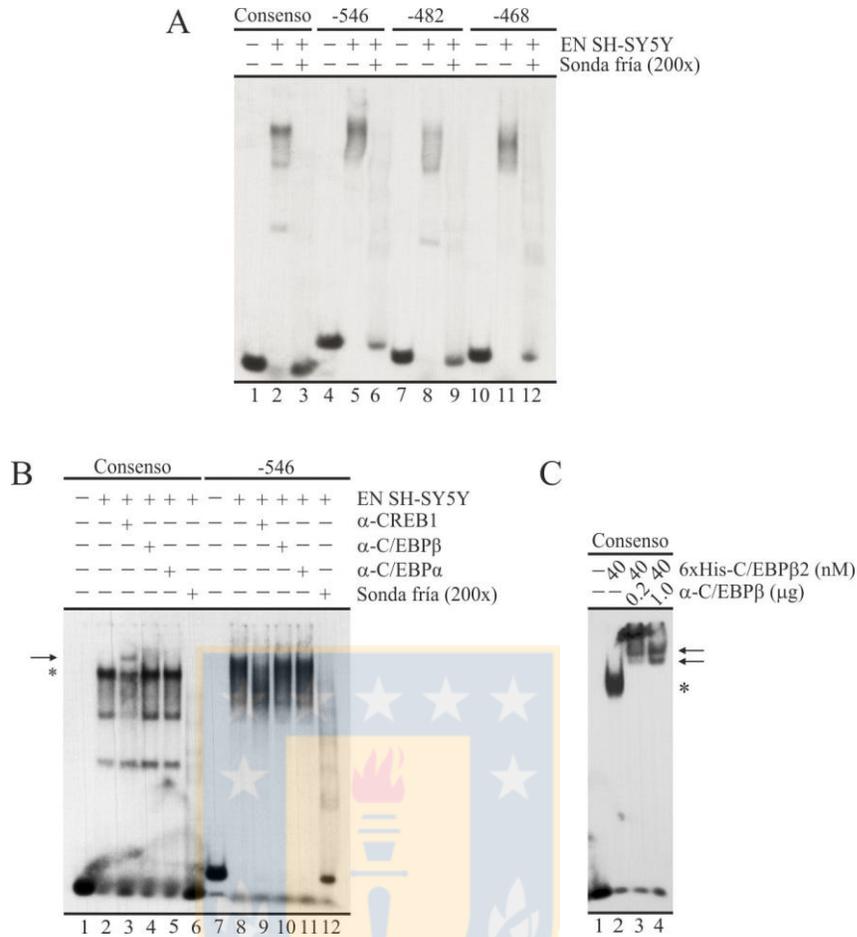


Figura 9: Las sondas que contienen los elementos C/EBP del promotor de *RIC8B* humano son reconocidas por factores de transcripción presentes en el extracto nuclear de células SH-SY5Y.

A) Ensayos de EMSA empleando 20 fmoles de las sondas doble hebra que contienen los elementos C/EBP y marcadas radioactivamente en su extremo 5' con ^{32}P . Como control de unión se empleó una sonda consenso descrita previamente (Henriquez, et al., 2011). B) Ensayos EMSA para las sondas de los sitios C/EBP consenso y -546, incorporando ensayos de *super shift* contra CREB1 (α -CREB1), C/EBP β (α -C/EBP β) y C/EBP α (α -C/EBP α). C) Ensayo de EMSA-*super shift* contra la proteína C/EBP β 2 recombinante. A una reacción de unión de 20 μl , en presencia de 20 fmoles de la sonda C/EBP β consenso y 40 nM de la proteína recombinante con epítipo de 6 histidinas C/EBP β 2, se le adicionó 1 μl de una dilución 200 ng/ μl o 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del anticuerpo α -C/EBP β C19 (carriles 3 y 4, respectivamente). A la reacción control se le adicionó 1 μl de PBS 1 \times (carril 2). La unión

de C/EBP β 2 recombinante o CREB1 a la sonda consenso se indica con un asterisco, mientras que los complejos [anticuerpo · sonda C/EBP · factor de transcripción] se indican con flechas. Para corroborar la especificidad de la unión se incluyeron reacciones con competencia por adición de un exceso de 100 veces la cantidad de la misma sonda empleada (100x) pero no marcada (sonda fría). Cada ensayo es uno representativo de al menos 2 ensayos realizados. Fuente: Elaboración propia.



7.1.2 C/EBP β recombinante se une a los elementos C/EBP del promotor de *RIC8B* humano *in vitro*.

Debido a que no fue posible confirmar mediante ensayos de *super shift* la unión de C/EBP β a los elementos C/EBP del promotor del gen *RIC8B* humano, decidimos sumar a nuestros estudios una evaluación de la afinidad de C/EBP β y CREB1 recombinantes por los elementos en estudio.

Elegimos la estrategia de expresión de las proteínas humanas con epítipo de 6 histidinas en bacterias *E. coli*, para su posterior purificación (o enriquecimiento) mediante cromatografía de afinidad a una columna de níquel inmovilizado (IMAC), tal y como se describe en métodos. Respecto de CREB1, si bien logramos expresar y purificar ambas proteínas, la isoforma CREB1A presentó un peso molecular relativo cercano a 35 kDa, menor al esperado (apéndice 12.6.2). Es por esta razón, junto con el hecho de que ambas isoformas de CREB presentan el mismo dominio de unión a DNA, es que realizamos los ensayos con la proteína recombinante CREB1B.

Por otro lado, la expresión y purificación de las isoformas de C/EBP β se intentó hacer bajo las mismas condiciones que las proteínas CREB, sin embargo resultó en cantidades de proteínas detectables sólo mediante *western blot* (datos no mostrados). Así, decidimos emplear un protocolo de expresión estandarizado previamente para la proteína GST-C/EBP β (Verónica del Río Pinilla, comunicación personal) y que implicaba el uso de otra cepa de *E. coli* y la reducción de la temperatura de crecimiento e inducción a 20°C; logramos obtener una buena cantidad de proteína soluble desde los lisados totales y se procedió a su purificación en condiciones nativas. Lamentablemente, este protocolo rendía una muy baja cantidad de proteínas, lo que podía dar cuenta de la degradación de la proteína. Sin embargo, el análisis de la resina mostró que las proteínas no eran eluidas eficientemente (datos no mostrados). Con estos antecedentes, decidimos purificar las proteínas en condiciones desnaturalantes. Con esta metodología, logramos obtener una cantidad aceptable de proteína diluida la que fue concentrada en condiciones desnaturalantes y luego dializada para su renaturalización. Ya que la cantidad de C/EBP β 1 fue insuficiente para realizar los ensayos de unión, sólo se utilizaron las isoformas C/EBP β 2 y C/EBP β 3. Es importante destacar que, a diferencia del grado de pureza obtenida para CREB1B sorprendentemente alta considerando una sola etapa de

purificación (figura 10, carril 2), las proteínas C/EBP β presentaron en todas las purificaciones las mismas contaminantes de bajo peso molecular (figura 10, carriles 3 y 4).



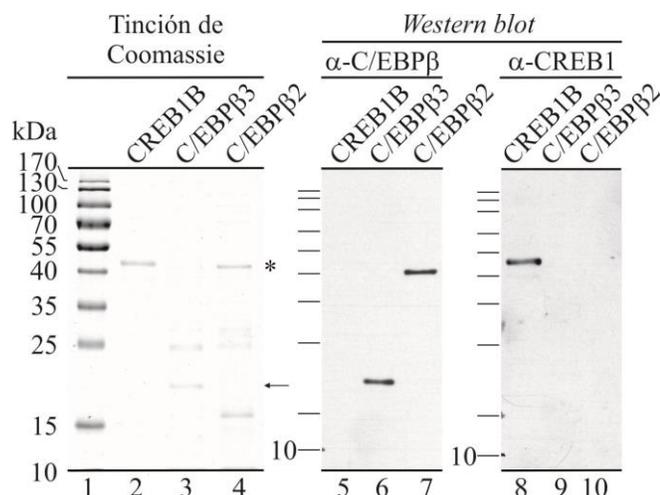


Figura 10: Análisis de los factores de transcripción recombinantes purificados CREB1B, C/EBPβ2 y C/EBPβ3.

El grado de pureza y la concentración de las proteínas recombinantes fueron estimadas mediante SDS-PAGE y tinción de azul de Coomassie (panel izquierdo), en el que se incorporó una curva estándar de BSA. La identidad de las proteínas fue corroborada mediante inmunodetección por *western blot* (paneles central y derecho), empleando anticuerpos tanto contra CREB (α -CREB) como contra C/EBP β (α -C/EBP β). En el gel teñido se cargó 200 ng de cada proteína, mientras que para *western blot* se analizaron 50 ng. Carril 1: Estándar de peso molecular. Carriles 2, 5 y 8: 6xHis-CREB1B. Carriles 3, 6 y 9: 6xHis-C/EBP β 3. Carriles 4, 7 y 10: 6xHis-C/EBP β 2. Las bandas correspondientes a C/EBP β 2 y C/EBP β 3 se indican con un asterisco y una flecha, respectivamente. Fuente: Elaboración propia.

Iniciamos los ensayos evaluando la unión de cada uno de los factores a sus respectivos sitios de unión (figura 11). El buffer de reacción fue modificado (*buffer* de remodelación II) de forma de igualar la fuerza iónica en la reacción respecto de aquella empleando extractos nucleares, ya que las proteínas recombinantes se encuentran en un *buffer* de menor concentración de sales (150 mM NaCl). Estos ensayos demostraron la unión de C/EBP β 2 a los elementos C/EBP del promotor de *RIC8B*. Sin embargo, la afinidad por estos sitios es menor que la observada para el sitio consenso, claramente visible al comparar la condición de unión a 20 nM del factor de transcripción (figura 11A, comparar carril 2 con los carriles 6, 10 y 14).

Por otro lado, estos ensayos confirmaron la unión de CREB1B a los elementos CRE del promotor de *RIC8B* humano, tal y como se había observado en los ensayos empleando extractos nucleares. Como se observa en la figura 11B, se encontró una afinidad similar de CREB1B por la secuencia CRE consenso y los sitios presentes en el promotor de Ric-8B. En consideración a la pureza de la proteína CREB1B recombinante, decidimos determinar la constante de disociación aparente (apéndice 12.6.3) para los distintos elementos CRE, lo que confirmó que CREB1B se une con igual afinidad tanto a los sitios CRE -194 (22 ± 4 nM) y CRE -164 (18 ± 9 nM), así como lo hace al elemento consenso (21 ± 5 nM).

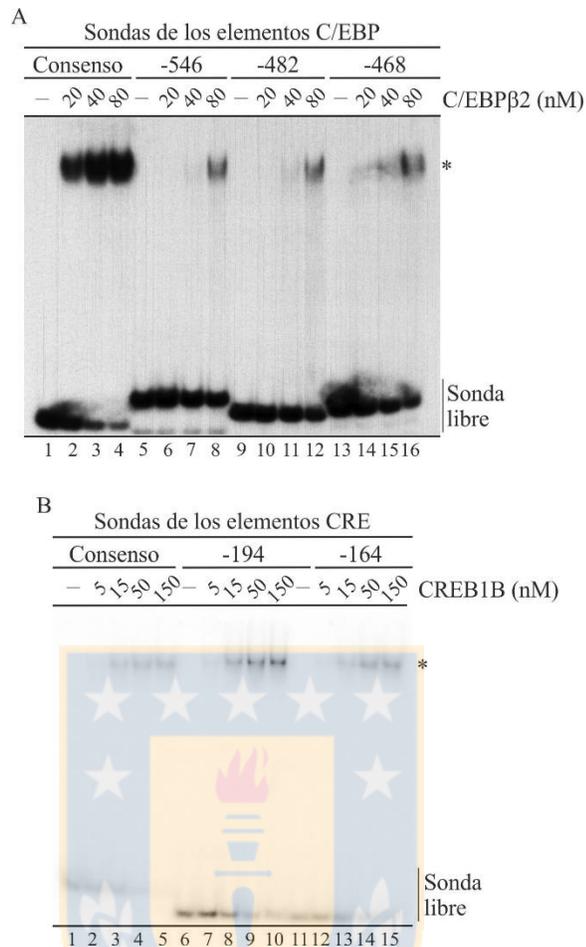


Figura 11: Las proteínas recombinantes C/EBPβ2 y CREB1B se unen a los elementos C/EBP y CRE presentes en el promotor de *RIC8B* humano, respectivamente.

Se realizaron los ensayos de movilidad electroforética en gel (EMSA) empleando el *buffer* de remodelación II. Cada reacción de unión contenía 20 fmoles de sonda marcada radioactivamente en presencia de distintas concentraciones de las proteínas recombinantes. A) EMSA empleando C/EBPβ2. B) EMSA empleando CREB1B. Las reacciones de unión fueron incubadas a 30°C por 30 min y luego tanto la sonda libre como los complejos [TF · sonda] generados, indicados con un asterisco, fueron resueltos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% en condiciones nativas. Cada ensayo es representativo de 3 ensayos realizados. Fuente: Elaboración propia.

Debido a la evidencia existente acerca de la unión promiscua de los factores de transcripción CREB/ATF y C/EBP entre sus secuencias de unión (Park, et al., 1990; Bakker & Parker, 1991; Moll, et al., 2002; Rishi, et al., 2010) decidimos realizar ensayos de unión incubando las sondas CRE con la proteína C/EBP β 2 y de las sondas C/EBP con CREB1B, resultados que se muestran en la figura 12. Estos ensayos mostraron que CREB1 se une con alta afinidad sólo a los elementos CRE -194 y -164 (figura 12B), mientras que C/EBP β 2 a iguales concentraciones se une a exclusivamente los elementos C/EBP -546, -482 y -468 (figura 12A). Se observa además que la afinidad de C/EBP β 2 por el sitio -468 es aparentemente mayor que aquella por los otros sitios C/EBP (figura 12A, carril 9 comparado con los carriles 3 y 6; figura 11A, carril 16 versus los carriles 8 y 12). Sólo al usar concentraciones mucho más altas de C/EBP β 2 observamos unión a los sitios CRE (apéndice 12.6.4). Es interesante notar interacción, aunque débil, de CREB1 con el sitio C/EBP -546 (figura 12B, carriles 2 y 3;apéndice 12.6.4, carril 7), y que corresponde a un sitio quimérico CRE-C/EBP.

En su conjunto, estas significativas diferencias de afinidad recién descritas nos sugieren fuertemente una distribución de elementos en *cis* en el promotor del gen *RIC8B* humano en donde CREB1 presenta una alta afinidad por la región proximal y C/EBP β por la región distal. Sin embargo, debido a que el análisis fue realizado con sondas cortas que contienen sólo el elemento en estudio, hasta este punto de nuestros estudios no se podía descartar la existencia de otros sitios críticos para estos factores de transcripción.

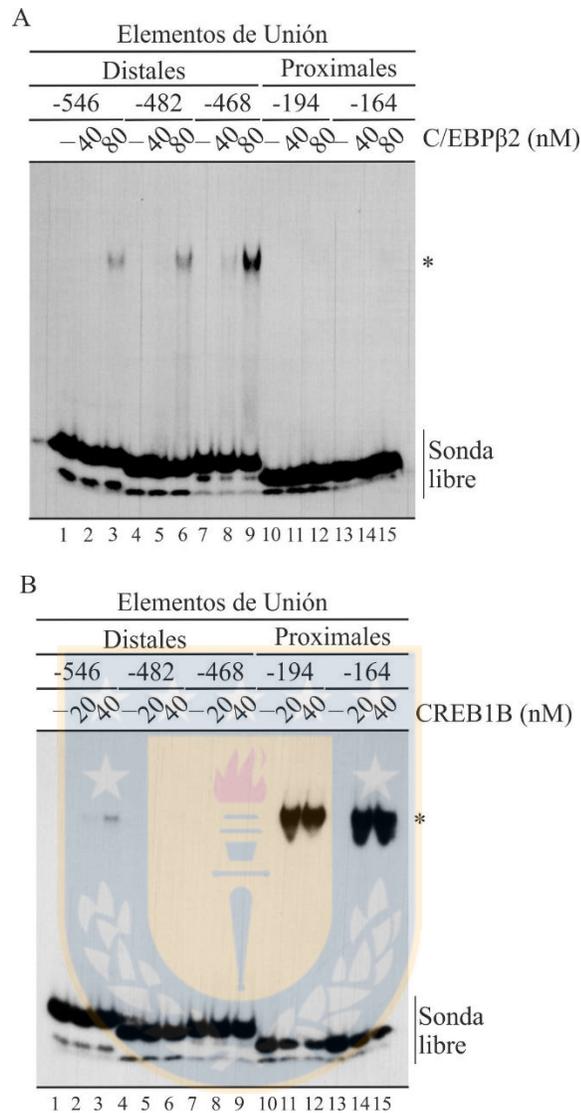


Figura 12: CREB1B se une preferencialmente a los elementos proximales CRE, mientras que C/EBPβ2 reconoce específicamente a los elementos distales C/EBP.

Se realizaron los ensayos de retardo en gel (EMSA) empleando el *buffer* de remodelación II. Cada reacción contenía 20 fmoles de sonda marcada radioactivamente en presencia de distintas concentraciones de las proteínas recombinantes. A) EMSA empleando C/EBPβ2. B) EMSA empleando CREB1B. Las reacciones fueron resueltas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% en condiciones nativas. Las sondas fueron agrupadas según su localización en las regiones proximal y distal dentro del promotor de -600 pb del gen *RIC8B* humano. Los complejos [TF · sonda] son indicados con un asterisco. Cada ensayo es representativo de 3 ensayos realizados. Fuente: Elaboración propia.

7.1.3 CREB1 y C/EBP β se unen de manera preferencial a la región proximal y distal de promotor del gen *RIC8B* humano, respetivamente.

Para confirmar la unión preferencial de CREB y C/EBP β por las regiones proximal y distal del promotor, realizamos ensayos de EMSA empleando como sondas fragmentos amplificados por PCR y que comprenden la región distal o la región proximal (figura 13A). Estos fragmentos fueron diseñados de forma que pudieran ser utilizados en ensayos de *DNaseI-Footprinting*, por lo que los sitios en estudio se encuentran hacia el 5'-³²P de cada fragmento. En la figura 13B se muestra que ambos factores de transcripción poseen afinidades de unión diferentes para las regiones del promotor de *RIC8B* humano; CREB1B posee una alta afinidad por la región proximal mientras C/EBP β 2 posee una alta afinidad por la región distal. Si bien existe unión de CREB1B por la región distal, esta es mucho menor que la observada para la región proximal, situación que se evidencia, por ejemplo, al comparar la condición de unión a 80 nM del factor (figura 13B, carril 12 versus carril 16). Para C/EBP β también se observó unión a la región proximal, pero en su caso menor que la observada para la región distal (figura 13B, comparar como ejemplo carril 3 versus carril 7).

A la luz de estos antecedentes, se observa que no hay otros elementos de secuencia en las regiones distal y proximal del promotor que puedan modificar la tendencia ya observada con los elementos CRE y C/EBP ya analizados individualmente. En conjunto con los resultados descritos en la sección anterior, estos resultados indican además que los elementos -546/-482/-468 y -194/-164 son los que gravitan en la interacción de C/EBP β y CREB1, respectivamente, dentro de esta extensión del promotor de *RIC8B*. Así, se define una distribución de elementos en *cis* de promotor donde, en términos de interacción entre el factor de transcripción y el DNA, CREB1 se vincula con la región proximal mientras que C/EBP β lo hace con la región distal.

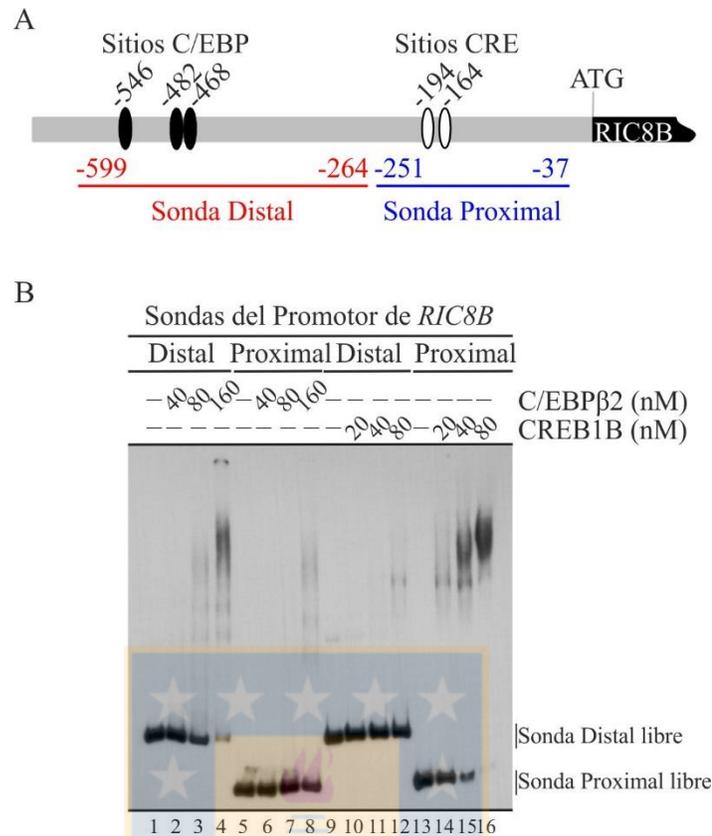


Figura 13: CREB1B se une con alta afinidad sólo a la región proximal del promotor mientras que C/EBPβ2 se une preferencialmente a la región distal del promotor del gen *RIC8B* humano.

A) Esquema del promotor de *RIC8B* humano en donde se indica la ubicación, respecto del codón de inicio de la traducción, de las sondas correspondientes a las regiones distal (rojo) y proximal (azul) y de los elementos de unión en estudio. B) Ensayos de retardo en gel (EMSA) empleando sondas correspondiente a las regiones distal y proximal, amplificada mediante PCR usando como templado el plásmido que contiene el promotor de -600 pb del promotor de *RIC8B* humano más el partidor sentido marcado en su extremo 5' con ^{32}P . Las sondas fueron diseñadas para contener los elementos en estudio hacia la región 5' para poder ser usadas en los ensayos de *DNaseI-Footprinting*. Las reacciones de unión se realizaron en presencia del buffer de Remodelación II e incubadas a 30°C por 30 min y fueron cargadas directamente en un gel de poliacrilamida al 5% en condiciones nativas. Los complejos [TF · sonda] fueron resueltos por electroforesis a 200 Volts por 180 min.

Se indica en cada imagen las bandas correspondientes a las sondas libres. Este ensayo es uno representativo de tres replicas. Fuente: Elaboración propia.



Sobre las reacciones de unión estandarizadas para los ensayos de EMSA realizamos ensayos de protección a DNasa I. Debido a que C/EBP β 3 recombinante presenta una afinidad mayor al DNA que la isoforma larga C/EBP β 2 (Descombes & Schibler, 1991), decidimos emplear la isoforma corta para ensayos de protección. Para ello, evaluamos la unión de C/EBP β 3 bajo las condiciones estandarizadas para la isoforma C/EBP β 2, resultados que se muestran en el apéndice 12.6.5.

Durante el curso de la estandarización de las reacciones de protección con DNasa I obtuvimos buenos resultados sobre las reacciones de unión para CREB1B y la sonda proximal, sin embargo los patrones de protección obtenidos para C/EBP β 3 y la sonda distal fueron débiles. Decidimos probar entonces un protocolo diferente descrito anteriormente para C/EBP α , el que implica realizar la unión en hielo (Johnson, 1993). En la figura 14 se muestran los patrones de protección obtenidos tras el tratamiento con DNasa I. Se aprecia que la unión de CREB1B protege a los elementos -194 y -164 de la región proximal (figura 14B). Adicionalmente, CREB1B genera una protección débil hacia el extremo 5' de la sonda, la que debido a se encuentra en el extremo de la sonda y no genera un patrón creciente de protección como el observado para los sitios -194 y -164 no fue considerada (figura 14B, línea cortada). Por su parte, C/EBP β 3 protege principalmente los elementos -482 y -468 y, en menor medida, el elemento -546 de la sonda distal (figura 14A).

De esta forma, y en base a todos los antecedentes previamente indicados, se define una distribución de elementos en *cis* en el promotor del gen *RIC8B* humano en la cual la región proximal presenta dos elementos CRE de alta afinidad para CREB en la posiciones -194 y -164, mientras que la región distal presenta 3 sitios C/EBP a los que se une C/EBP β en la posiciones -546, -482 y -468.

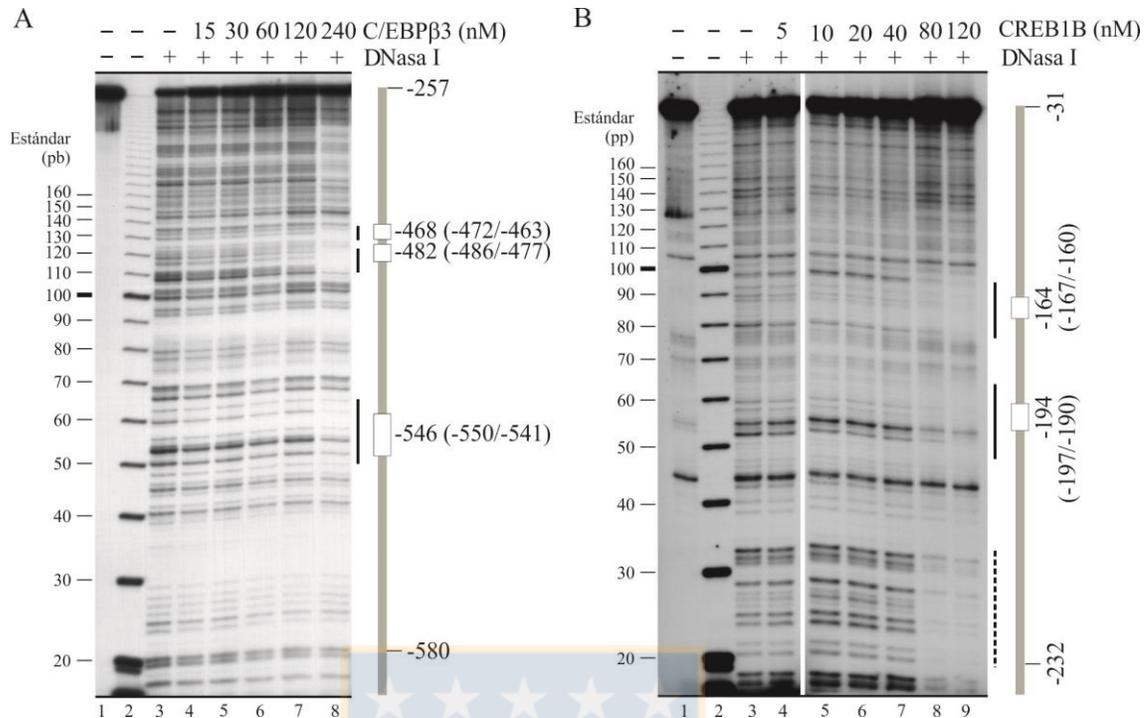


Figura 14: Ensayos de protección a digestión por DNasa I (*DNaseI-Footprinting*) para los segmentos de DNA de las regiones proximal y distal del promotor de *RIC8B* humano, dada por los factores de transcripción CREB1B y C/EBPβ3.

Se realizó el tratamiento con DNasa I (0,25 U) sobre las reacciones de unión de las sondas distal y proximal (marcadas en su extremo 5' de la hebra sentido) en presencia de los factores C/EBPβ3 y CREB1B, respectivamente. A) Sonda distal incubada en presencia de distintas concentraciones de C/EBPβ3. B) Sonda proximal incubada en presencia de distintas concentraciones de CREB1B. Luego de las incubaciones de unión y digestión con DNasa I, los fragmentos mono hebra fueron resueltos en un gel de secuenciación y detectados por autoradiografía sobre un film. A la derecha de cada figura se indican posiciones de los sitios en estudio relativas al inicio de la traducción del gen *RIC8B*. A la izquierda se muestra el estándar marcado radioactivamente con ³²P en ambos extremos 5'. Cada ensayo de representa uno representativo de un triplicado para la sonda proximal y de un duplicado para la sonda distal. Fuente: Elaboración propia.

7.2 Objetivo Específico 2

“Evaluar el rol de los elementos CRE y C/EBP y de sus respectivos factores de transcripción en la actividad del promotor de *RIC8B* humano”.

7.2.1 Los elementos CRE y C/EBP del promotor de *RIC8B* humano son necesarios para la actividad transcripcional en células proliferativas.

Decidimos evaluar la participación de cada uno de los sitios de unión identificados sobre la actividad de la región promotora en estudio del gen *RIC8B* humano. Para ello, elegimos la estrategia de ensayos de gen reportero luciferasa, empleando las mutantes individuales para cada sitio en estudio, las que fueron diseñadas siguiendo algunos criterios. Para el caso de los elementos CRE, previamente se ha determinado que la mutación del dinucleótido central CpG del sitio consenso (TGACCGTCA) inhibe totalmente la unión de los factores de la subfamilia CREB/ATF (Jones & Lee, 1991). La mutación empleada por nosotros corresponde a la sustitución por el dinucleótido TpA y que ha sido reportada previamente (Muchardt, et al., 1990; Li, et al., 2003). Por su parte, las mutaciones de los elementos de unión para C/EBP β -482 y -468 fueron realizadas mutando el dinucleótido TpT del medio sitio 5'-C/EBP β consenso (ATTGC) por el dinucleótido CpC mientras que para el sitio -546 reemplazamos el dinucleótido ApA del medio sitio 3'-C/EBP β consenso (CCAAT) por el dinucleótido CpC. Ambas mutantes no son reconocidas por el factor de transcripción C/EBP β (Osada, et al., 1996). Estas mutantes fueron obtenidas mediante mutagénesis sitio dirigida del plásmido p hRIC8B/-600bp (WT). Cada una de las mutantes fue secuenciada exhaustivamente (por ambos lados y más de una vez) en búsqueda de alguna otra mutación insertada durante las etapas de subclonación y que pudieran invalidar nuestros resultados. Los cromatogramas que indican la presencia de las mutaciones para todos los sitios en las construcciones finales se muestran en los apéndices 12.5.5 a 12.5.9.

Una vez obtenidas las mutantes, se realizaron los ensayos de actividad luciferasa en células HEK293T y SH-SY5Y, cuyos resultados se muestran en la figura 15. Si bien se observa claramente una disminución significativa de la actividad promotora para cada una de las mutantes analizadas en ambos tipos celulares, existen diferencias importantes. En células HEK293T, las mutaciones que producen las mayores disminuciones en la

actividad de promotor de -600pb son las del sitio CRE -194 (88% reducción) y la del sitio C/EBP -482 (68% de reducción) (figura 15A). Por otro lado, en células SH-SY5Y las mutaciones más relevantes corresponden a las mutaciones de los elementos CRE -194 y -164, que reducen la actividad en un 65% y 75%, respectivamente (figura 15B).



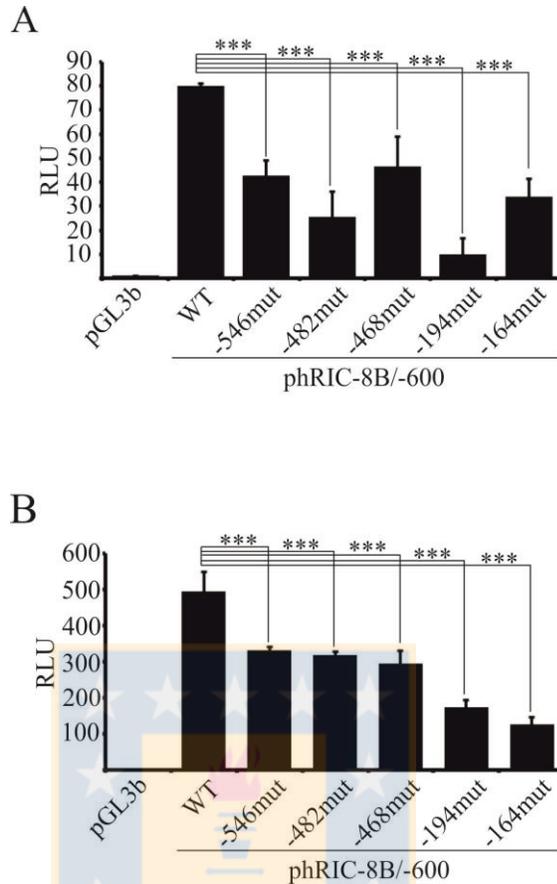


Figura 15: La mutación tanto de los sitios C/EBP (-546, -482, 468) como de los elementos CRE (-194 y -164) reducen significativamente la actividad del promotor de *RIC8B* de -600 pb en células HEK293T y SH-SY5Y.

Ensayos de actividad luciferasa en células transfectadas (como se indica en métodos) con las construcciones del promotor de *RIC8B* humano de -600 pb (phRIC-8B/-600) que presentan las mutaciones para alguno de los sitios C/EBP (-546, -482, -468) o alguno de los elementos CRE (-194, -164). A) Ensayo en células HEK293T. B) Ensayo en células SH-SY5Y. Para cada figura se grafican los promedios \pm desviación estándar de 9 réplicas provenientes de tres ensayos independientes hechos en triplicado. Las diferencias entre los promedios fue analizadas mediante un test *t* (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Fuente: Elaboración propia.

7.2.2 La activación de la quinasa PKA reduce la actividad del promotor de *RIC8B* humano

Ya habiendo determinado la contribución de los elementos de unión para los factores de transcripción bZIP en estudio, decidimos analizar el rol regulador de estos factores de transcripción en la expresión del mensajero de *RIC8B* en las líneas celulares en estudio.

CREB1 posee una concentración nuclear muy alta, cercana a ~400 nM (Hagiwara, et al., 1993). Es por esta razón que en general este factor de transcripción se encuentra unido a sus promotores blancos, particularmente a sus elementos de unión al DNA no metilados (Zhang, et al., 2005). Así, la fosforilación del residuo serina 133 en el dominio KID de CREB, que permite el reclutamiento del coactivador CBP, sería el principal mecanismo de regulación transcripcional positiva. Un amplio número de quinasas puede fosforilar específicamente este residuo, siendo la proteína quinasa A el activador clásico (Mayr & Montminy, 2001). De forma de analizar el efecto de la activación de CREB, durante esta tesis clonamos las subunidades catalíticas de las isoformas $\alpha 1$ y $\beta 1$ denominadas PRKACA1 y PRKACB1, respectivamente. Las secuenciaciones parciales de los plásmidos de expresión se encuentran en los apéndices 12.5.3 y 12.5.4. Transfectamos células HEK293T con estas construcciones y confirmamos por *western blot* la sobreexpresión de cada una de las subunidades catalíticas, observando además la fosforilación de CREB1 en su serina 133 dependiente de la cantidad de plásmido utilizado (figura 16A). Al realizar RT-qPCR de estas condiciones observamos una reducción significativa cercana a un 50% en los niveles del mensajero de *RIC8B* humano (figura 16B).

Estudios previos de sobreexpresión de las distintas isoformas de C/EBP β permitieron determinar el efecto represor de LAP* (C/EBP $\beta 1$ humano) sobre la actividad del promotor del gen *RIC8B* de ratón (Grandy, et al., 2011). Es por esto que decidimos evaluar el efecto de la sobreexpresión de las isoformas de C/EBP β en la expresión del mensajero de *RIC8B* en células HEK293T. Para ello, transfectamos las células HEK293T con tres cantidades de los vectores de expresión respectivos, analizando por *western blot* los niveles de C/EBP β en lisados totales. Como lo muestra la figura 16C, no se detectó

ninguna banda inmunoreactiva para el anticuerpo contra C/EBP β en la condición control transfectada con el vector vacío. Sin embargo, la sobreexpresión de cada una de las proteínas en las distintas condiciones de transfección fue evidente. Bajo estas condiciones, no observamos cambios significativos en los niveles de expresión del mensajero de *RIC8B* (figura 16D).

Con estos antecedentes, decidimos evaluar si la regulación negativa de la expresión del mensajero de *RIC8B* en respuesta a la activación de la proteína quinasa A se debía a una disminución en la actividad del promotor. Como se mostró anteriormente, en ambos tipos celulares el sitio CRE -194 demostró controlar fuertemente la actividad del promotor, por lo que también decidimos evaluar el efecto de la mutación para ambos sitios CRE en estas mismas condiciones.

Como control, realizamos ensayos de actividad luciferasa empleando un vector que responde de forma positiva a la activación de la vía dependiente de cAMP, observando una fuerte activación transcripcional en presencia de cualquiera de las subunidades catalíticas de PKA (apéndice 12.7.1). Por el contrario, al realizar los ensayos de actividad luciferasa para el promotor de -600 pb bajo las mismas condiciones, observamos una reducción significativa en su actividad de alrededor de un 50% (figura 17). Es interesante notar que la mutación independiente de cada uno de los elementos CRE no revierte la regulación negativa observada bajo la condición de activación de PKA.

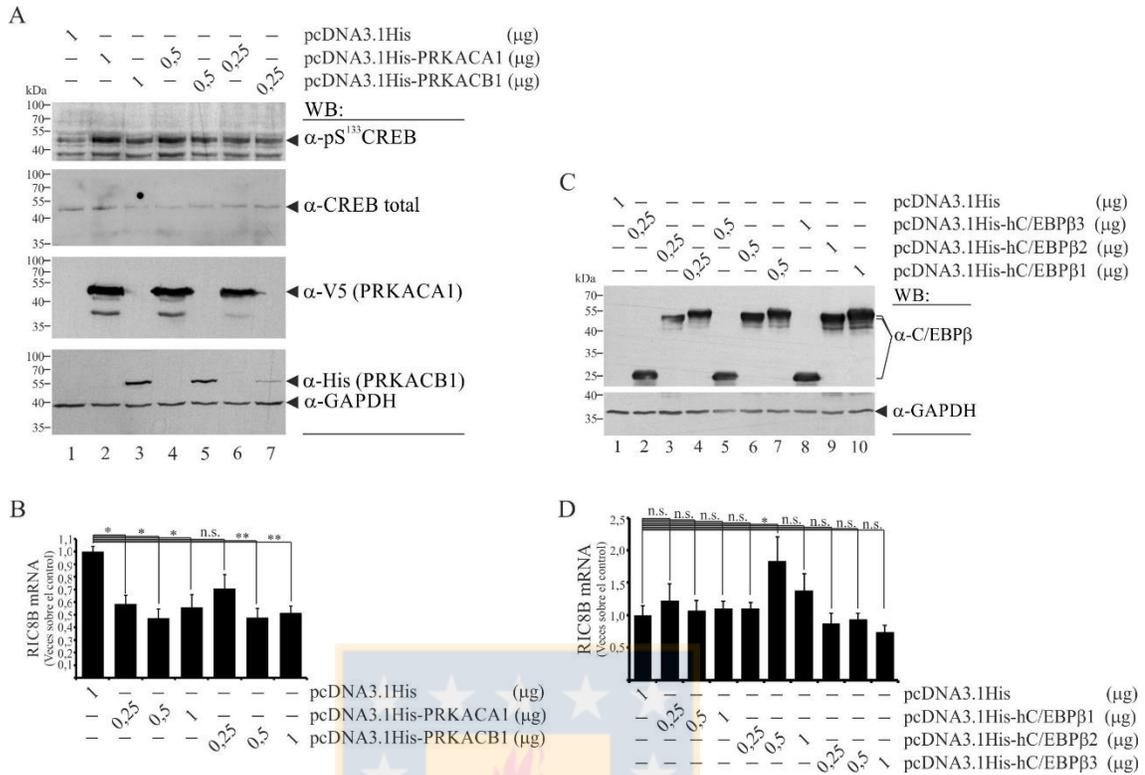


Figura 16: La activación de PKA reduce la expresión del mRNA de *RIC8B* humano en células HEK293T.

Se evaluó el efecto sobre los niveles del mensajero para *RIC8B* de la sobreexpresión de las subunidades catalíticas de la quinasa PKA o de las isoformas del factor de transcripción C/EBPβ. Para ello, células HEK293T fueron transfectadas con distintas cantidades de cada uno de los vectores de expresión en estudio (1 μg total de DNA por pocillo de placa de 12 pocillos). Como control, se usó el vector vacío (pcDNA3.1-His). Los niveles de expresión de las proteínas fueron analizados mediante *western blot* de lisados totales. A) Inmunodetección de las isoformas PRKACA1 y PRKACB1 de la quinasa PKA. También se analizó el estado de fosforilación de CREB1 en su serina 133. B) Cuantificación relativa del mensajero del gen *RIC8B* humano mediante RT-qPCR, respecto del gen de referencia GAPDH, en condiciones de sobreexpresión de las subunidades catalíticas de PKA. C) Inmunodetección de las distintas isoformas de C/EBPβ. Como control de carga se empleó la proteína GAPDH. D) Análisis de la expresión del mensajero en condiciones de sobreexpresión de las isoformas de C/EBPβ. Los gráficos de barra muestran el promedio ± desviación estándar del triplicado técnico de una de dos réplicas biológicas. Las medias

fueron analizadas mediante un test t (n.s.: no significativo; $*p < 0,05$, $**p < 0,01$). Fuente:
Elaboración propia.



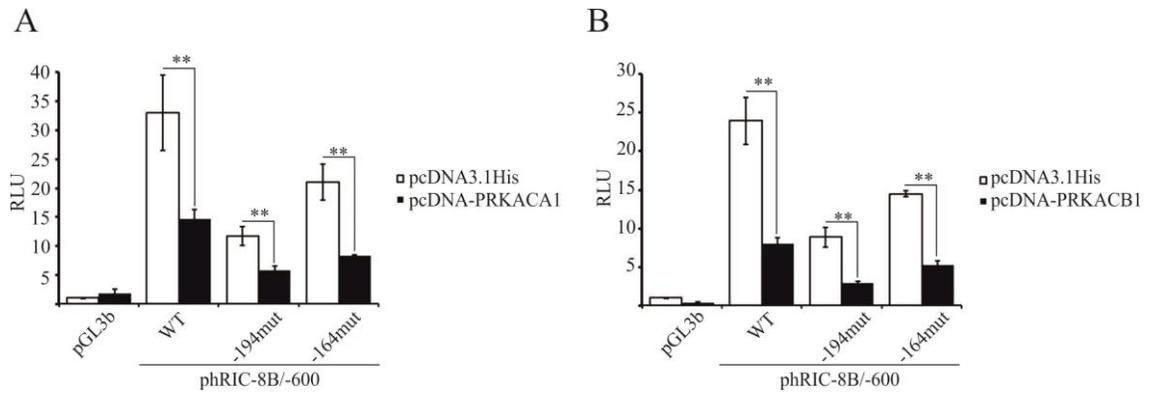


Figura 17: La activación de PKA inhibe la actividad del promotor de -600 pb del gen *RIC8B* en células HEK293T.

Ensayo de actividad luciferasa en células HEK293T transfectadas con 200 ng del vector pGL3basic, vector con promotor -600 pb del gen *RIC8B* (phRIC-8B/-600WT) o de las construcciones mutantes para los CRE (-194mut o -164mut). Las células fueron cotransfectadas además con 400 ng del vector vacío pcDNA3.1His o con los vectores de expresión para las subunidades catalíticas de la quinasa PKA, completando a 1 µg de DNA total por pocillo de una placa de 24 pocillos. A) Sobreexpresión de la isoforma A (pcDNA-PRKACA1). B) Sobreexpresión de la isoforma B1 (pcDNA-PRKACB1). La actividad promotora fue definida como la luminiscencia emitida por el gen reportero luciferasa, cuya expresión está bajo el control del promotor en estudio, normalizada respecto de la luminiscencia del control de transfección Renilla luciferasa, bajo el control del promotor viral SV40 (pRL-SV40). Se graficaron las unidades relativas de luminiscencia (RLU) como veces sobre la actividad promotora del control (pGL3basic). Se muestran el promedio \pm desviación estándar de tres réplicas técnicas de una réplica biológica representativa de tres. Las medias fueron comparadas mediante un test t ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$). Fuente: Elaboración propia.

7.3 Objetivo Específico 3

“Estudiar el reclutamiento de CREB, de su forma fosforilada pSer133CREB, del coactivador clásico CBP/p300 y de C/EBP β al promotor de *RIC8B* humano *in vivo*, utilizando distintos tipos celulares”.

7.3.1 CREB1 se une a la región promotora del gen *RIC8B* en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y indiferenciadas.

De forma de corroborar la unión de C/EBP β , y especialmente CREB1, al promotor del gen *RIC8B* humano en un contexto celular y de manera de asociar ésta unión a una función biológica relevante, decidimos realizar ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para ambos factores de transcripción en las líneas celulares HEK293T y SH-SY5Y, frente a diferentes condiciones de cultivo.

Iniciamos los estudios de ChIP en cultivos proliferativos, indiferenciados y subconfluentes de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. El DNA inmunoprecipitado fue empleado como templado para amplificar por PCR las regiones que contienen los elementos C/EBP distales y CRE proximales, empleando partidores específicos. De manera de obtener la resolución necesaria para poder diferenciar entre ambas regiones, la cromatina fue sonicada hasta alcanzar un tamaño promedio de DNA de 250 pb (apéndice 12.8.1). De esta forma, se obtuvieron fragmentos de DNA que abarcan de manera esencialmente excluyente la región distal o la región proximal del promotor en estudio, como lo indica la PCR empleando los partidores extremos de las regiones distal y proximal (apéndice 12.8.2).

Los resultados de estos ensayos se muestran en la figura 18A, donde se aprecia claramente la unión de CREB1 a la región distal y proximal del promotor en estudio. Si bien este ensayo muestra una mayor unión a la región proximal, el análisis comparativo de todas las réplicas biológicas no muestra diferencias de la unión de CREB1 entre ambas regiones (figura 18B). En nuestras condiciones experimentales de ChIP, no se detectó unión de C/EBP β a ninguna de las dos regiones del promotor de *RIC8B* humano (figura 18A y figura 18C).

La línea celular SH-SY5Y adquiere un fenotipo neuronal noradrenérgico por incubación secuencial con ácido retinoico (ATRA) y la neurotrofina BDNF (Encinas, et al., 2000). Al inducir la diferenciación de este tipo celular (que conlleva la detención del ciclo celular en las células que diferencian) observamos una disminución cercana al 50% en la expresión del mRNA de *RIC8B*, visible ya en etapas tempranas de la diferenciación inducida por ATRA (figura 19). Este resultado sugiere que en la línea SH-SY5Y indiferenciada la unión de CREB1 contribuye con el estado transcripcionalmente activo del promotor de *RIC8B*. Apoyando esta hipótesis, un ensayo preliminar de ChIP en células SH-SY5Y mostró que la unión de CREB1 al promotor de *RIC8B* humano en células indiferenciadas se pierde al quinto día de diferenciación inducida por el tratamiento con ATRA (apéndice 12.8.3).



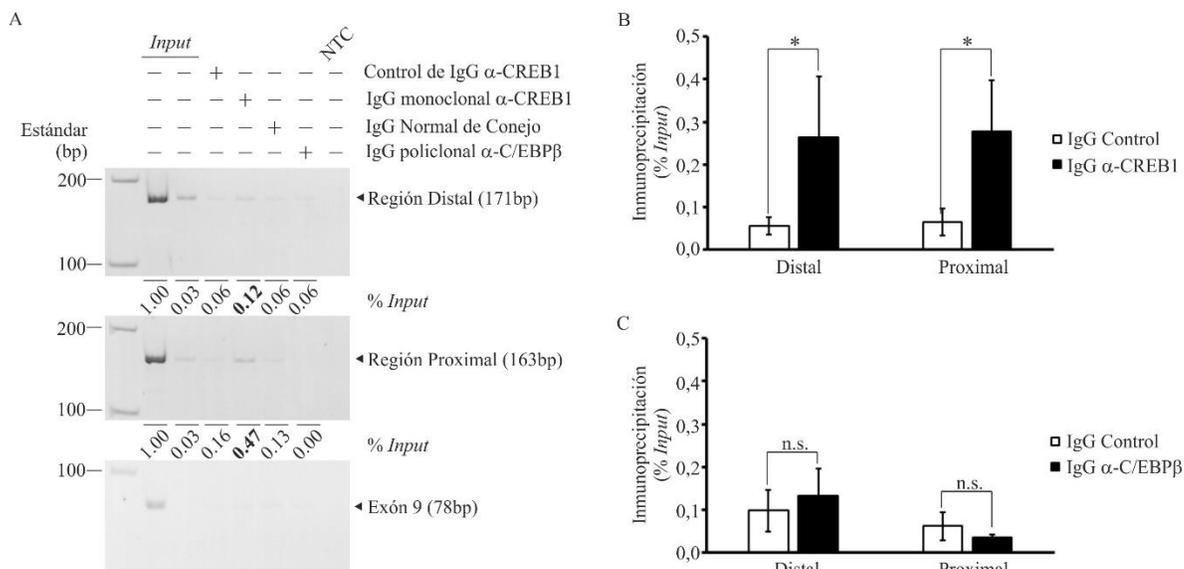


Figura 18: CREB1 se une a la región promotora del gen *RIC8B* en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y indiferenciadas.

La unión tanto de CREB1 como de C/EBP β al promotor de *RIC8B* fue determinada mediante ChIP para cada factor de transcripción en células SH-SY5Y indiferenciadas cultivadas a subconfluencia. La detección de las regiones distal y proximal del promotor de *RIC8B* se realizó mediante PCR convencional, empleando como templado el DNA obtenido desde cada condición de inmunoprecipitación. A) Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% teñido con EtBr de los fragmentos de PCR, el cual fue analizado por densitometría en el software *QuantityOne* (BioRad). El porcentaje de inmunoprecipitación fue estimado a partir de la intensidad de la banda en la condición de estudio respecto de la intensidad de la banda correspondiente a la amplificación de una fracción de la cantidad total de DNA obtenido desde la cromatina usada en cada reacción de ChIP (*Input*). Bajo cada carril del gel se indican los porcentajes de inmunoprecipitación para ésta réplica técnica representativa de 3 réplicas biológicas. Se incluyó como control negativo de unión una región genómica ubicada dentro del exón 9 del gen *RIC8B*. B) Gráfico de barras del promedio de los porcentajes de inmunoprecipitación obtenidos para el factor de transcripción CREB1. C) Gráfico de barras del promedio de los porcentajes de inmunoprecipitación para el factor de transcripción C/EBP β . Se muestra el promedio \pm desviación estándar para tres réplicas biológicas. Las medias fueron comparadas mediante un test *t* (n.s.: no significativo; * $p < 0,05$). Fuente: Elaboración propia.

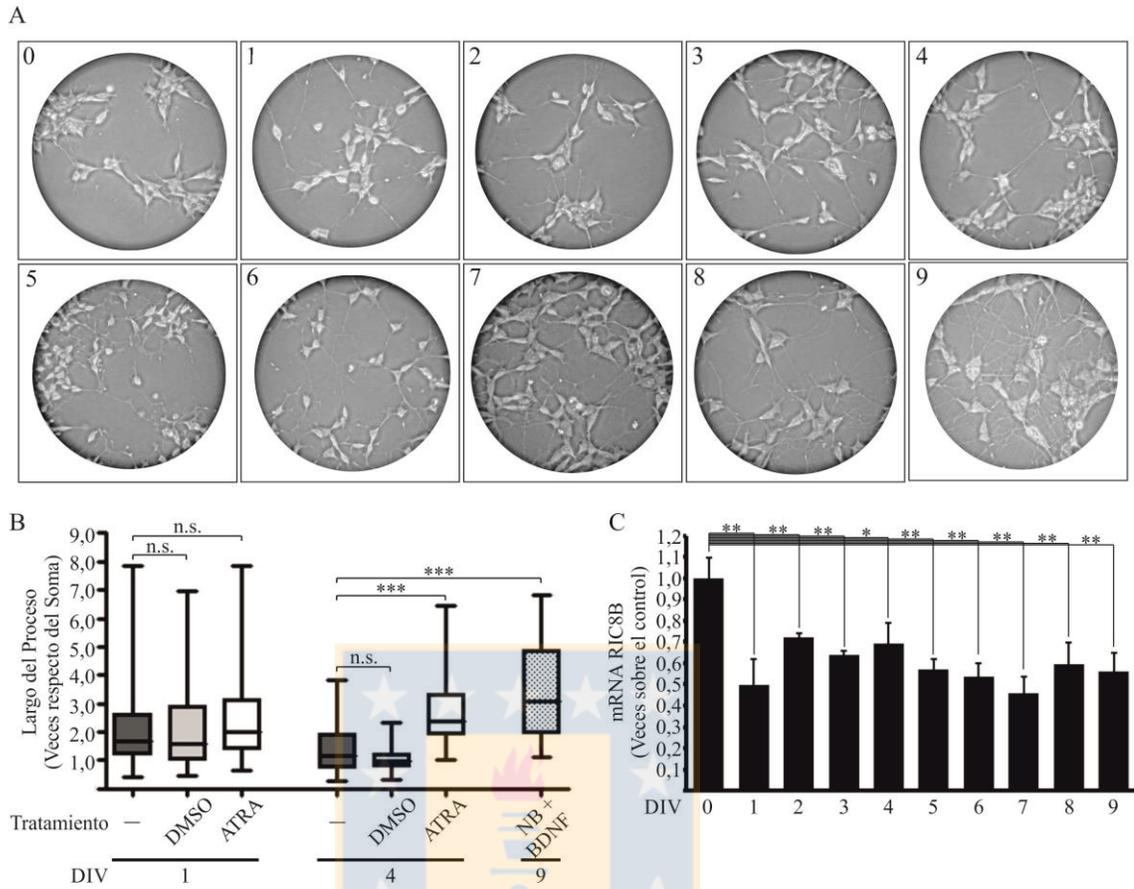


Figura 19: El mRNA de *RIC8B* disminuye durante la diferenciación de células SH-SY5Y.

Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y fueron inducidas a diferenciarse a células tipo neurona por incubación con ácido retinoico (ATRA) durante 9 días (paneles de 1 a 9), según el protocolo indicado en métodos. A) Los cambios morfológicos fueron registrados en un microscopio de contraste de fase. Todas las fotografías fueron tomadas con el mismo aumento (400×). El panel 0 representa a las células en cultivo antes de iniciar la diferenciación. B) Gráfico de caja y bigotes del largo de los procesos observados en las células inducidas a diferenciarse y normalizados respecto del diámetro del cuerpo celular (soma). La cuantificación se realizó con el programa *ImageJ* y la aplicación *NeuronJ*. Se indican las condiciones control sin tratamiento (-), control con vehículo (DMSO), inducida a diferenciarse (ATRA) y la condición de inducción final en medio Neurobasal más la neurotrofina BDNF (NB + BDNF) para los días 1, 4 y 9 de diferenciación *in vitro* (DIV). Las medianas fueron comparadas mediante un análisis de Mann-Whitney

desapareado de dos colas (n.s.: no significativo; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). C) Cuantificación relativa del mensajero del gen *RIC8B* humano, respecto del gen de referencia B2MG, durante la diferenciación de células SH-SY5Y mediante RT-qPCR. Se muestra el promedio \pm desviación estándar del triplicado técnico de una réplica biológica, representativa de al menos tres réplicas biológicas. Las medias fueron analizadas mediante un test t (n.s.: no significativo; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Fuente: Elaboración propia.



7.3.2 La activación de PKA promueve la disociación de CREB1 y C/EBP β del promotor de *RIC8B* humano.

Debido a que no se logró detectar unión de C/EBP β en el promotor de *RIC8B* humano en células SH-SY5Y, resultó necesario evaluar la unión de éste factor de transcripción al promotor de *RIC8B* humano en células HEK293T. Debido a que la sobreexpresión de PKA produce una disminución significativa en la expresión del mensajero de *RIC8B* en éste tipo celular, similar a la observada durante la diferenciación de las células de neuroblastoma, los ensayos de ChIP se realizaron tanto en condiciones basales como de activación de la quinasa por sobreexpresión de su subunidad catalítica.

Los ensayos de ChIP contra C/EBP β se muestran en la figura 20. En ellos se puede observar la unión del factor de transcripción a la región distal del promotor de *RIC8B* en estudio en las células que no sobreexpresan PKA. Ésta ocupación del promotor se pierde al activar PKA por sobreexpresión (figura 12, panel superior). Por otro lado, resultó interesante observar unión de C/EBP β a la región proximal del promotor, esto a pesar de no identificar en ésta región elementos C/EBP de alta afinidad. Igualmente interesante es observar que en la condición de sobreexpresión de la subunidad PRKACA1 se perdió esta unión (figura 12, panel inferior; apéndice 12.8.4A).

El análisis de la unión de CREB1 al promotor de *RIC8B* se muestra en la figura 21. CREB1 se une tanto a la región distal como proximal del promotor en la condición con PKA inactiva. Además, la sobreexpresión de las dos isoformas de PKA promueve la disociación del factor de transcripción desde la región distal del promotor. En el caso de la región proximal, se observa disociación sólo en la condición de sobreexpresión de la isoforma α de la subunidad catalítica, lo que se evidencia mejor al analizar el promedio de enriquecimiento entre todas las réplicas (apéndice 12.8.4B).

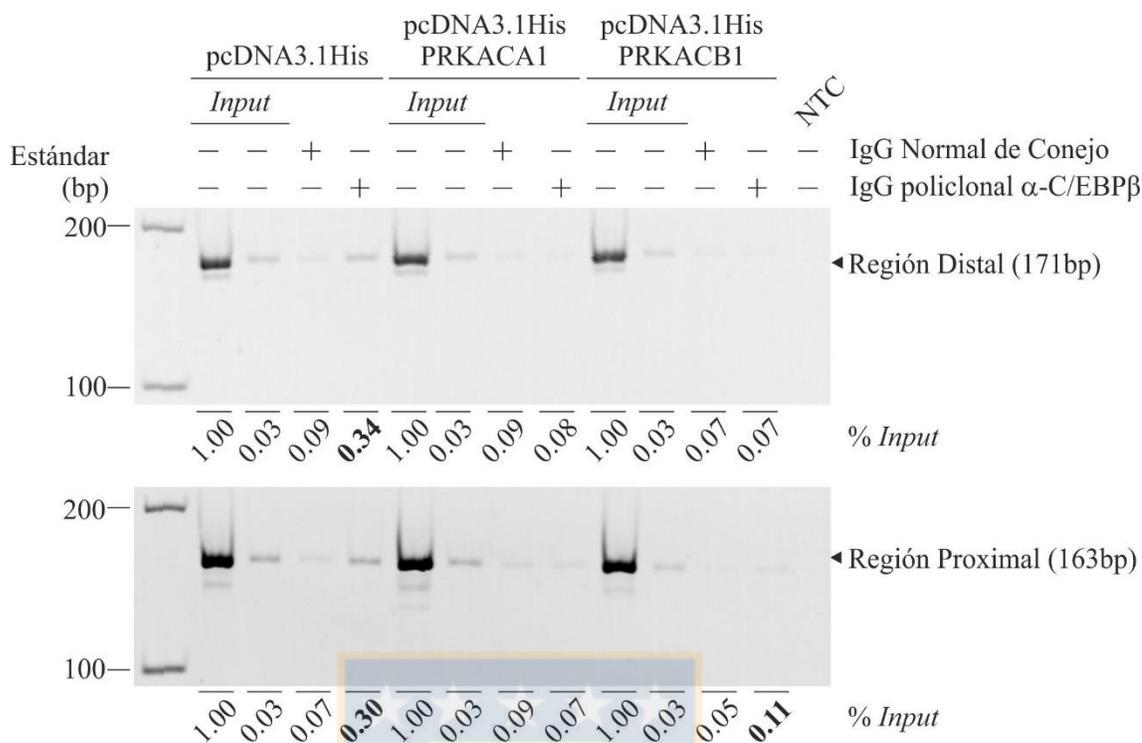


Figura 20: La activación de PKA disminuye la unión de C/EBP β a la región distal del promotor de *RIC8B* en células HEK293T.

La unión de C/EBP β al promotor de *RIC8B* fue determinada mediante ChIP contra el factor de transcripción en células HEK293T transfectadas con los plásmidos de expresión para las subunidades catalíticas α y β de la quinasa PKA (PRKACA1 y PRKACB1, respectivamente). Los fragmentos obtenidos desde la amplificación por PCR de las regiones distal y proximal del promotor de *RIC8B* de -600 pb fueron resueltos en un gel de poliacrilamida al 6% teñido con EtBr y analizados por densitometría en el software *QuantityOne* (BioRad). El porcentaje de inmunoprecipitación fue estimado a partir de la intensidad de la banda en la condición de estudio respecto de la intensidad de la banda correspondiente a la amplificación de una fracción de la cantidad total de DNA obtenido desde la cromatina usada en cada reacción de ChIP (*Input*). Los porcentajes se indican bajo cada carril del gel. Se muestra un ensayo representativo de 2 réplicas biológicas. Fuente: Elaboración propia.

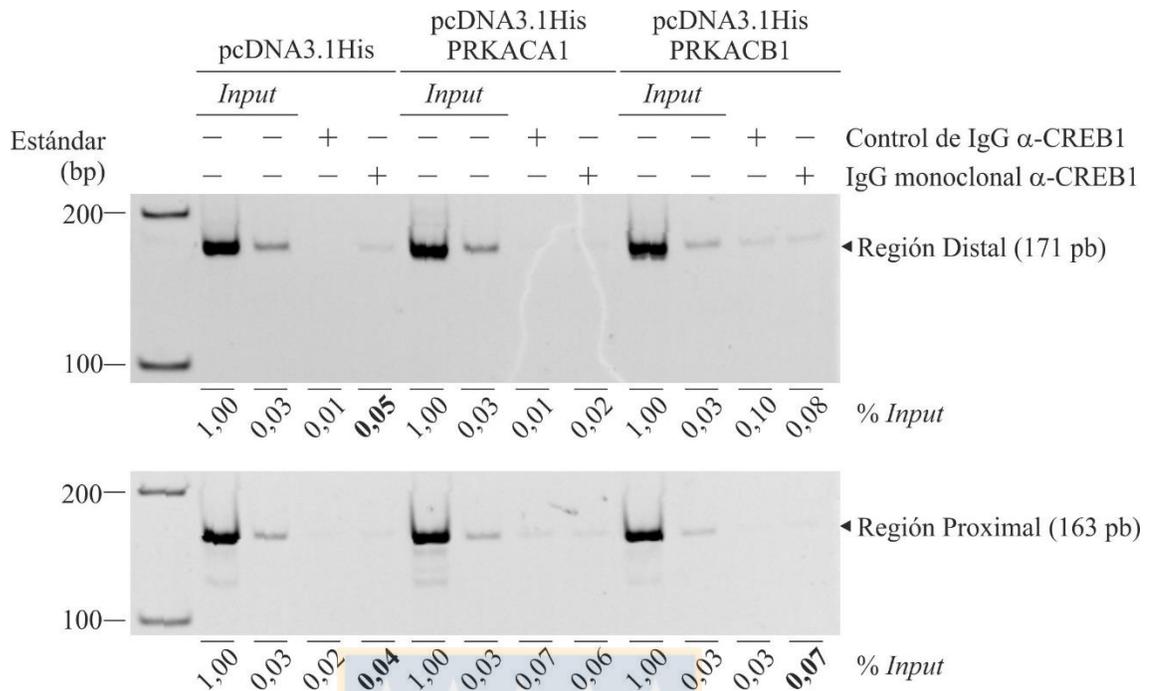


Figura 21: La activación de PKA disminuye la unión de CREB1 al promotor de *RIC8B* en células HEK293T.

La unión de CREB1 al promotor de *RIC8B* fue determinada mediante ChIP contra el factor de transcripción en células HEK293T transfectadas con los plásmidos de expresión para las subunidades catalíticas α o β de la quinasa PKA (PRKACA1 y PRKACB1, respectivamente). La detección de las regiones distal y proximal del promotor de *RIC8B* se realizó mediante PCR convencional, empleando como templado el DNA obtenido desde cada condición de inmunoprecipitación. Los fragmentos de PCR fueron resueltos en un gel de poliacrilamida al 6% teñido con EtBr, el cual fue analizado por densitometría en el software *QuantityOne* (BioRad). El porcentaje de inmunoprecipitación fue estimado a partir de la intensidad de la banda en la condición de estudio respecto de la intensidad de la banda correspondiente a la amplificación de un porcentaje de la cantidad total de DNA obtenido desde la cromatina usada en cada reacción de ChIP (*Input*); los valores se indican bajo cada carril del gel. Se muestra un ensayo representativo de 2 réplicas biológicas. Fuente: Elaboración propia.

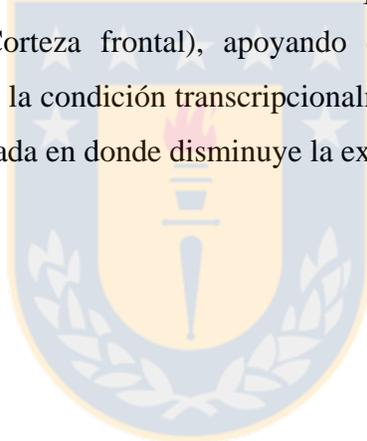
7.3.3 Estructura del promotor de *RIC8B* humano en base a la comparación de nuestros resultados y al análisis bioinformático de la base de datos ENCODE.

El análisis bioinformático sobre los resultados experimentales existentes en la base de datos ENCODE (ENCODE Project Consortium, 2012) sobre el promotor del gen *RIC8B* humano se muestra en la figura 22. En el se observa una región de alta sensibilidad a nucleasa (*DNase I Hypersensitive Site*, DHS) presente en 125 líneas celulares aproximadamente desde la posición -434 a -583 pb respecto del codón de inicio de la traducción, y que comprende la región que contiene los elementos C/EBP distales del promotor del *RIC8B* (DNasa I HS Consolidado). Además, se aprecia una segunda región DHS que se localiza en la región proximal del promotor, desde la posición -134 a -283 pb, y que contiene los elementos CRE. Entre estas regiones hipersensibles los ensayos de MNasa-seq ubican un nucleosoma que protege una zona aproximada de 130 pb, desde la posición -260 a -389 pb. Debido a que el análisis por MNasa-seq no muestra ningún otro nucleosoma río debajo de este, y a que la región DHS proximal cubre prácticamente toda la región donde se encuentran los TSS y donde se observa transcripción activa (Figura 22, pistas Genes UCSC, GENCODE y Niveles Transcripcionales), el nucleosoma antes descrito correspondería al nucleosoma -1. Éste nucleosoma presenta la marca de acetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27Ac), y que es mayor a la observada en el nucleosoma río arriba (nucleosoma -2, aproximadamente desde la posición -686 a -809 pb). De forma opuesta, la marca de trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) es menor para el nucleosoma -1 que para el nucleosoma -2.

De forma de demostrar la conservación de estas regiones de alta accesibilidad se muestran los resultados particulares para las líneas celulares desde la cuales se obtuvieron los valores de las marcas epigenéticas H3K27Ac y H3K4me3 y del posicionamiento nucleosomal por MNasa-seq. Entre éstos resultados se muestran los obtenidos para la línea celular HEK293T, en la que la región DHS distal comprende aproximadamente desde la posición -398 a -699 pb (302 pb) mientras que la región DHS proximal abarca desde la posición -53 a -304 pb (252 pb).

La base de datos no dispone de los análisis de sensibilidad a DNasa I para la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, sin embargo sí posee ensayos sobre su línea celular parental SK-N-SH (Biedler, et al., 1978). Se indujo la diferenciación celular de la

línea de neuroblastoma por incubación con ácido retinoico a una concentración de 6 μM en medio RPMI más 10% FBS durante 48 horas (SK-N-SH + ATRA). Bajo éstas condiciones, este tipo celular representa nuestra condición de estudio de células SH-SY5Y diferenciadas. En la condición indiferenciada se identifica una región DHS proximal entre la posición -68 a -267 pb, similar a la observada en la condición diferenciada (-94 a -243 pb). Sin embargo, la región DHS distal en la condición indiferenciada abarca desde la posición -412 a -685 (274 pb) mientras que en la condición diferenciada se reduce notoriamente, comprendiendo desde -534 a -683 (150 pb). La reducción de la accesibilidad observada en la condición diferenciada ocurre sobre la región que contiene los elementos de unión a C/EBP β -468 y -482. Resulta interesante el hecho que en la condición indiferenciada las dos regiones DHS coinciden perfectamente con las observadas en tipos celulares neuronales maduros que expresan RIC8B (Neuroesfera olfatoria, Cerebelo y Corteza frontal), apoyando de ésta forma que la condición indiferenciada representa la condición transcripcionalmente más activa del gen, respecto de la condición diferenciada en donde disminuye la expresión del gen (figura 19).



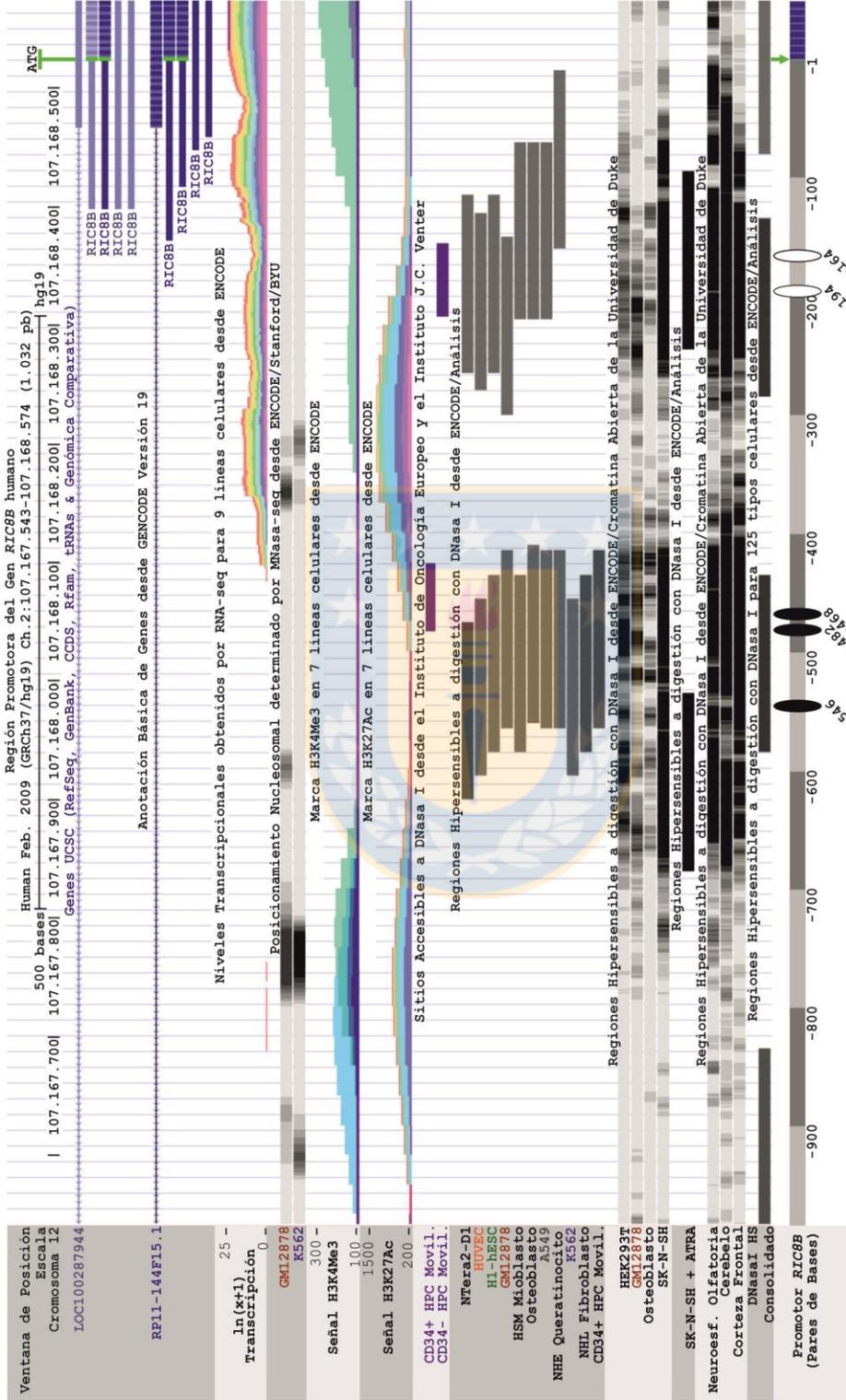


Figura 22: Análisis bioinformático de la información estructural obtenida para el promotor de *RIC8B* humano desde la base de datos ENCODE.

La ventana de búsqueda fue traducida al español y modificado para incluir la localización de los elementos de unión identificados en el promotor de *RIC8B* respecto del codón de inicio (ATG, flecha verde). Fuente: Modificado desde (ENCODE Project Consortium, 2012).

8 Discusión

En el presente trabajo de tesis fue determinado que tanto CREB1 como C/EBP β se unen a promotor del gen *RIC8B* humano, debido a la presencia de elementos de unión específicos para cada factor de transcripción. Además, se determinó que cambios en los niveles del mRNA para *RIC8B* se asocian a cambios en la unión de estos dos factores de transcripción a la región promotora estudiada, cuya actividad depende de los sitios de unión para C/EBP β y CREB1. Estos resultados confirman que la acción conjunta de ambos factores de transcripción bZIP contribuye a regular la actividad del promotor del gen *RIC8B* humano.

8.1 Distribución de los elementos *in cis* de la región promotora del gen de *RIC8B* estudiada.

Durante el estudio, determinamos que los elementos de unión identificados se encuentran distribuidos en dos regiones dentro de la zona del promotor analizada (comprendida hasta -600 pb): una con interacción muy preferencial de C/EBP β , definida como región distal y contenedora de los sitios C/EBP, y la otra con interacción preferencial de CREB, definida como región proximal y contenedora de los elementos CRE. Existen pocos casos caracterizados de promotores que presenten sitios CRE y C/EBP segregados a pesar de que cerca de un 18% de los genes humanos que contienen elementos CRE presentan además una caja CCAAT (Zhang, et al., 2005), secuencia que corresponde a medio sitio C/EBP (Osada, et al., 1996). Por ejemplo, el promotor del gen humano ciclooxigenasa 2 presenta un elemento CRE cercano del TSS y distante a sólo 64 pb de un sitio C/EBP río arriba (Klein, et al., 2007). Por otro lado, la región distal del promotor mínimo de 3 kb del gen humano prointerleuquina-1 β presenta un módulo de 406 pb, esencial para la actividad en ausencia de estímulo y en respuesta a señales proinflamatorias, que consiste en un elemento CRE pseudosimétrico proximal distanciado de un elemento de unión a C/EBP β distal por 52 pb (Shirakawa, et al., 1993; Gray, et al., 1993; Tsukada, et al., 1994). Finalmente, el promotor del gen *PEPCK*, extensamente estudiado y conservado en mamíferos, posee dos elementos CRE proximales al inicio de

la transcripción y que están separados por unos 70 pb de 2 elementos de unión a factores de la familia C/EBP en las regiones distales P3 y P4, dentro del promotor mínimo de -460 pb (Roesler, et al., 1989; Croniger, et al., 1998). Aun así, la distancia entre los elementos CRE y C/EBP en estos promotores es relativamente corta (menor a 100 pb) respecto de la observada en el promotor de *RIC8B* humano, de 265 pb. Más aún, en estos ejemplos mencionados, los elementos CRE identificados corresponden a medios sitios, a sitios no canónicos o sitios quiméricos, distinto de los observados en el promotor de *RIC8B*, que posee dos elementos CRE de alta identidad respecto del sitio canónico simétrico. Este hecho es importante ya que estos sitios son también sitios de unión para C/EBP α y C/EBP β , mientras que nuestros resultados indican que C/EBP β no se une a los elementos CRE del promotor de *RIC8B* y presenta una afinidad mínima por toda región proximal que contiene los sitios CRE, esto último según lo determinado a través de los ensayos de EMSA que utilizaron como sondas fragmentos extensos de DNA que abarcan las regiones proximal o distal. En este contexto, el ensayo de protección a DNasa I sobre la sonda proximal mostró una tercera zona de protección producida por CREB1 a muy altas concentraciones y que al ser analizada su secuencia mostró la presencia de un sitio CRE (TGAGGCGC) en la posición -219 del promotor, la que no fue analizada de forma independiente mediante EMSA. Este sitio posee baja identidad y corresponde más bien a medio sitio CRE, por lo que sería interesante analizar su identidad como elemento de unión a CREB1.

En la región distal, los tres sitios de unión para C/EBP β identificados presentan características particulares que los hacen diferentes. Los resultados muestran que el sitio -546 corresponde un elemento quimérico, compuesto por medio elemento CRE y medio sitio C/EBP (TGACTACCAAT) y que es reconocido tanto por los factores de transcripción CREB1 como C/EBP β , aunque con una afinidad muy reducida en el caso de CREB1. Este sitio presenta una alta identidad de secuencia con otros sitios quiméricos, que difieren entre ellos sólo en su orientación y posición dentro de la región promotora, sitios que han demostrado controlar la expresión tejido específica de ciertos genes (Maguire, et al., 1991; Baler, et al., 1997; Qian, et al., 2001).

En contraste, los elementos C/EBP -482 y -468 sólo son reconocidos por C/EBP β . Específicamente, como se ha determinado previamente, LAP* (C/EBP β 1) se une al sitio

-482 y permite el reclutamiento del complejo SWI/SNF (Grandy, et al., 2011). Si bien en la región proximal y río abajo de los elementos CRE se concentra el mayor número de TSS descritos para el gen *RIC8B*, se han descrito dos TSS localizados en la región distal, hacia el 3' de los elementos C/EBP -482 y -468. De hecho, el elemento -482 forma parte de un elemento XCPE-2 (*X Core Promoter Element-2*; CCCATTGCAT), que ha sido identificado como un posible sitio de inicio de la transcripción para genes con promotores TATA-less (Anish, et al., 2009). Ambos TSS para *RIC8B* se ubican a 29 pb (transcrito X3 *RIC8B*) y a 15 pb (EST de testículo DB024639.1) río abajo de este sitio. Más aún, el TSS del transcrito obtenido desde el EST DB024639.1 inicia exactamente a +1 pb desde sitio C/EBP -468 el cual, al presentar alta identidad con el sitio -482, podría ser también un sitio putativo de inicio de la transcripción.

8.2 Relación funcional de los elementos CRE y C/EBP dependiente de la arquitectura del promotor del gen *RIC8B* humano.

Ensayos de mutantes de delección sobre la región promotora analizada del gen *RIC8B* humano mostraron en células HEK293T que tanto la región distal como proximal son necesarias para obtener la actividad transcripcional máxima del promotor mínimo de -600 pb (Maureira Moya, 2010). En base a la disminución en la actividad transcripcional observada para cada una de las mutantes de los sitios C/EBP y CRE generadas en esta tesis, logramos confirmar la hipótesis de que los sitios C/EBP y CRE presentes en la región distal y proximal, respectivamente, contribuyen en su conjunto a la actividad del promotor en células HEK293T. Esta regulación debería ocurrir en función del reclutamiento de los factores de transcripción CREB1 y C/EBP β a cada una de las regiones que contiene sus elementos. No obstante, los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina mostraron unión de C/EBP β y CREB1 en ambas regiones. Estos resultados podrían deberse a limitaciones propias de la técnica de ChIP relacionadas con la fragmentación heterogénea de la cromatina que puede generar fragmentos de tamaños mayores a 250 pb y que pueden contener a las dos regiones en estudio. Sin embargo, algunos de nuestros controles apoyan los resultados en el sentido de una interacción real de C/EBP β con la región proximal en células HEK293T y de CREB1 con la región distal en células SH-SY5Y, ya que se requieren fragmentos de cromatina de al menos 400 pb para lograr amplificar la región

vecina a la región a la que se une el factor de transcripción en estudio, considerando la ubicación de los sitios C/EBP y CRE y los partidores externos utilizados en los ensayos de ChIP que cubrieron ambas zonas del promotor. Ya que no existen sitios de alta afinidad para C/EBP β en la región proximal ni para CREB1 en la región distal, la unión de los factores de transcripción con la región vecina debe de ser indirecta. Entonces, ¿cómo se produciría esta interacción?

Los análisis masivos de accesibilidad de la cromatina de la base de datos ENCODE muestran la existencia de dos regiones con hipersensibilidad a DNasa I; una de ellas abarca los sitios C/EBP -546, -482 y -468 (DHS distal) mientras que la otra comprende los sitios CRE -194 y -164 (DHS proximal). Entre estas dos regiones se localiza el nucleosoma -1 posicionado en una región de 130 pb comprendida en la región de 150 pb entre ambas regiones de alta accesibilidad. Esta región protegida por el nucleosoma menor a los 147 pb esperados ha sido observada por otros autores por digestión prolongada con la nucleasa y que afecta particularmente a los nucleosomas adyacentes a las regiones libres de nucleosomas (Tolstorukov, et al., 2009; Henikoffa, et al., 2011).

De esta forma, tanto la región distal como proximal del promotor del gen se encontrarían aledañas a los puntos de entrada y salida de ese nucleosoma. Dado esto, presentamos un modelo en que ambas regiones podrían estar espacialmente cercanas, pudiendo interactuar con cofactores y permitiendo así el reclutamiento del complejo de preiniciación. Este modelo de interacción entre ambas regiones, mostrado en la figura 23, podría explicar por qué en células HEK293T la actividad del promotor depende tanto del sitio C/EBP -482 como del sitio CRE -194. Ya que las proteínas con actividad HAT de la familia CBP/p300 han mostrado interactuar con CREB y C/EBP β en dominios diferentes (KIX y CH3, respectivamente) es factible que esta enzima modificadora pueda ser un puente entre ambas regiones del promotor de *RIC8B* así como con los complejos de la maquinaria transcripcional basal, como ha sido descrito para otros pares de factores de transcripción en otros promotores (Mink, et al., 1997; Kovács, et al., 2003; Chan & La Thangue, 2001; Chen & Li, 2011).

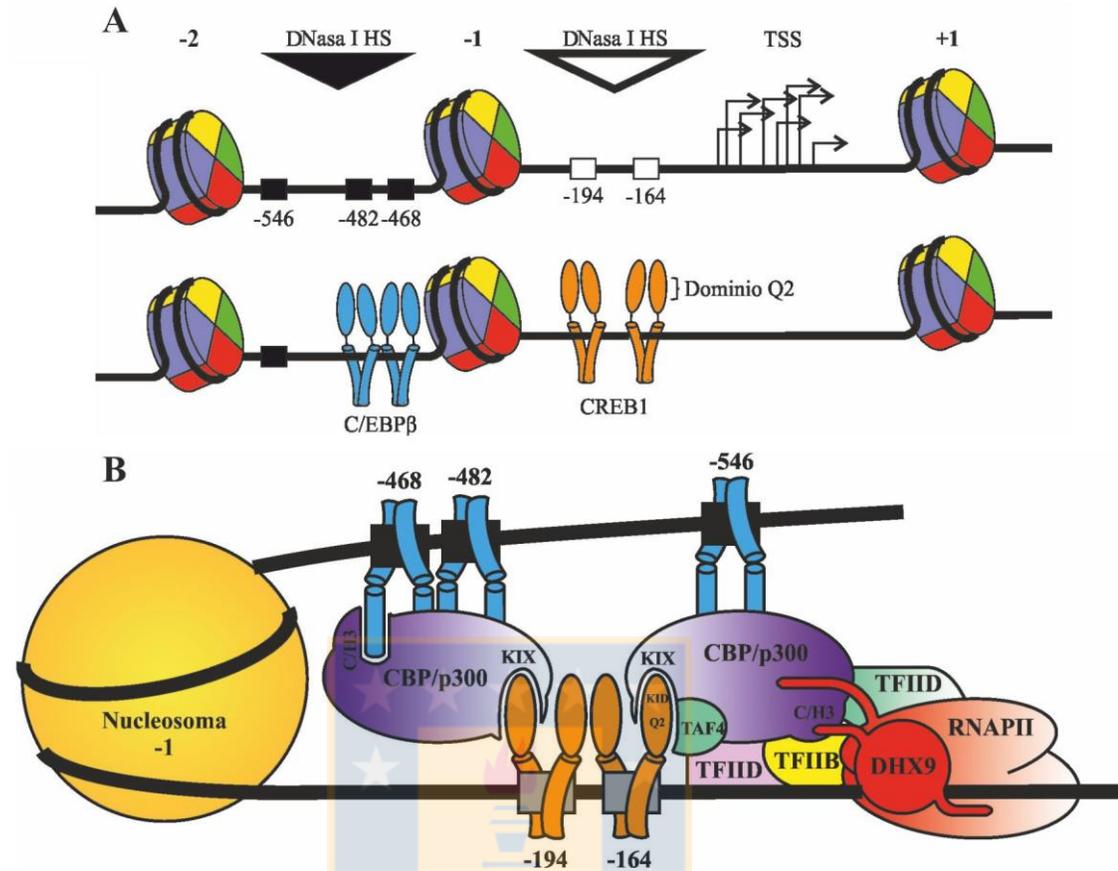


Figura 23: Modelo para la arquitectura de la región promotora de -600 pb del gen *RIC8B* humano.

A: Empleando la posición de los elementos de unión a C/EBPβ (-546, -482 y -468) y CREB1 (-194 y -164) se indica la localización aproximada de las regiones hipersensibles a DNasa I (DHS) distal (cabeza de flecha negra) y proximal (cabeza de flecha blanca), en conjunto con la posición de los nucleosomas -1 y -2. Los múltiples inicios de la transcripción (TSS) se indican como flechas quebradas sobre la región donde han sido mapeados. B) Modelo propuesto para la arquitectura de la región promotora de -600 pb del gen *RIC8B* humano. Se incluye información estructural sobre los dominios de interacción presentes tanto en los factores de transcripción como en los coactivadores transcripcionales CBP/p300 y algunos componentes del complejo de preiniciación de la transcripción. DHX9: RNA helicasa A. RNAPII: RNA polimerasa II. Fuente: Elaboración propia.

Una idea que surge de este modelo es que la unión de CREB1 a los sitios CRE proximales, cercanos a la región donde se ubica el mayor número de TSS, mantienen accesible esta región al restringir el posicionamiento nucleosomal. A este respecto, se ha determinado *in vitro* para el promotor de *C-FOS* humano que la unión previa de CREB1 al elemento CRE proximal impide el posicionamiento nucleosomal sobre esa región (Schild-Poulter, et al., 1996). Así, cualquier perturbación incluso distal que disminuya la unión de CREB1 podría promover el posicionamiento nucleosomal sobre la región proximal del promotor de *RIC8B*.

8.3 La regulación de la actividad transcripcional del promotor de *RIC8B* es definida por la unión de los factores de transcripción CREB1 y C/EBP β .

En los dos tipos celulares analizados observamos condiciones que derivan en una reducción en la expresión del mRNA del gen *RIC8B*, aunque corresponden a eventos celulares diferentes. En ambos contextos, la disminución de la expresión se asocia a una disminución en la ocupancia de los elementos distales y proximales por C/EBP β y CREB1, respectivamente. Es necesario preguntarse entonces acerca del mecanismo involucrado en la pérdida de unión de los factores de transcripción en estudio y si este mecanismo sería común en ambos eventos celulares.

A pesar de que la mutación de los elementos CRE del promotor en estudio no afecta la represión transcripcional del vector reportero en respuesta a la activación de PKA, esta condición de estimulación sí provoca una pérdida de ocupancia de CREB1 en el promotor endógeno en células HEK293T. De esta forma, no se puede descartar la participación de los elementos CRE en los eventos de represión transcripcional *in vivo*, más aún si tomamos en cuenta nuestros resultados preliminares que asocian la pérdida de unión del CREB1 con la disminución de la actividad del promotor en células SH-SY5Y (apéndice 12.8.3). Si la pérdida de la ocupancia de CREB1 es un requisito para la represión transcripcional, entonces ¿Cómo se regula la unión de CREB? Durante la diferenciación de las células de neuroblastoma existen numerosas vías de señalización que se activan y apagan, lo que representa un complejo modelo a disectar. En cambio, en células HEK293T es la activación de PKA quien promueve esta disociación. Sin embargo, los eventos gatillados por PKA comúnmente se relacionan con aumentar la unión de CREB,

particularmente por activación de la familia de coactivadores transcripcionales CRTC (*CREB-Regulated Transcriptional Coactivator*) (Altarejos & Montminy, 2011). Así, el efecto negativo de PKA sobre la unión de CREB1 pareciera ser indirecto.

Se sabe que la activación de la vía dependiente de AMPc y PKA produce la inducción de la expresión del represor transcripcional ICER (*Inducible cAMP Early Repressor*) por activación del promotor alternativo P2 presente en el gen *CREM* (*CRE modulator*), y que codifica para un factor de transcripción de la familia de ATF/CREB. Éste represor es capaz de inhibir la unión de CREB1 debido a que comparte del dominio de unión a DNA pero carece del dominio de transactivación (Borlikova & Endo, 2009). Sería entonces necesario evaluar si existe inducción de ICER en células HEK293T en nuestras condiciones experimentales.

Por otro lado, en células HEK293T, se observó que la región distal del promotor es responsable de la represión transcripcional en respuesta a la incubación con isoproterenol. Ya que C/EBP β se une a esta región, es plausible que el efecto de PKA proceda a través de este factor de transcripción y que de forma indirecta afecta la unión de CREB en la región proximal.

Se ha propuesto que el factor de transcripción C/EBP β se encuentra en una conformación estructural inactiva, caracterizada por un enmascaramiento de los dominios de transactivación transcripcional y de unión al DNA por su interacción con las regiones reguladoras centrales RD1 y RD2 de la proteína, respectivamente (Williams, et al., 1995). En función de este modelo se han identificado numerosas modificaciones postraduccionales sobre la proteína C/EBP β que permiten su activación al impedir la interacción entre los dominios de la proteína, abriendo su estructura y posibilitando la activación del factor de transcripción. Una de las primeras fue la fosforilación de la treonina 235 de C/EBP β 1 humano (T188, 189 y 220 en ratón, rata y pollo, respectivamente) (Nakajima, et al., 1993). Se sabe que esta treonina es fosforilada por la quinasa MAPK y que es necesaria para su posterior reconocimiento y fosforilación por la quinasa GSK3 β en su serina 231 y en su treonina 226. Estos residuos se encuentran dentro del dominio RD2, por lo que una vez fosforilado, el factor de transcripción puede unirse con alta afinidad al DNA *in vitro* y permitir la transactivación de sus genes blancos en un modelo de adipogénesis (Tang, et al., 2005). En este mismo modelo se ha determinado

que existe un desfase de 14 horas entre la inducción de la expresión de C/EBP β y su activación por fosforilación, diferencia que se debe al tiempo necesario para la translocación de GSK3 β al núcleo. De esta forma, una baja actividad de esta quinasa en el núcleo podría explicar por qué no observamos cambios en la expresión de *RIC8B* tras la sobreexpresión de cualquiera de las tres isoformas de C/EBP β en células HEK293T. Este resultado es diferente a lo descrito previamente en la línea celular osteoblástica MC3T3, en donde la sobreexpresión de C/EBP β 1 genera una represión transcripcional en el promotor que es revertida al coexpresar C/EBP β 3 (Grandy, et al., 2011), aunque bajo el mismo argumento, tales diferencias se pueden deber a la actividad de la quinasa GSK3 β en cada tipo celular. Ahora bien, si la fosforilación en estos residuos permite la unión de C/EBP β a su elemento en *cis*, entonces su desfosforilación puede ser un mecanismo que explique la disociación observada a los elementos distales del promotor de *RIC8B*. De esta forma, PKA ejercería un efecto indirecto sobre C/EBP β . PKA ha mostrado en células HEK293 fosforilar a GSK3 β en su serina 9, lo que se asocia a su inhibición, así como ha mostrado fosforilar la subunidad reguladora PPP2R5D de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), activándola (Fang, et al., 2000; Ahn, et al., 2007). Entonces, PKA podría mediar la disociación de C/EBP β incluso a través de los dos mecanismos antes indicados. En contra de esta teoría están los hechos de que C/EBP β recombinante (libre de modificaciones postraduccionales como la fosforilación) es capaz de unirse con alta afinidad a su elemento consenso *in vitro*, como lo demostramos nosotros y como lo han observado otros autores, junto con el hecho de que sólo la desfosforilación por PP2A podría explicar la disociación de C/EBP β unido, y que aún no ha sido demostrada.

Por otro lado, existen antecedentes que muestran que PKA puede modular la unión de C/EBP β de forma directa, por fosforilación de algunos residuos. PKA fosforila principalmente el residuo serina 105 de C/EBP β 1 (LAP*) de rata *in vitro* y esta fosforilación aumenta la transactivación de la proteína *in vivo* en células de hepatoma humano HepG2 (Trautwein, et al., 1993; Trautwein, et al., 1994). Sin embargo, la fosforilación sobre este residuo no modula la unión del factor de transcripción y más importante aún, este residuo no es conservado en los ortólogos para C/EBP β de humano y ratón. También se identificó que PKA puede fosforilar *in vitro* la serina 240 de LAP* de rata (serina 288 de C/EBP β 1 humano) (Trautwein, et al., 1994). Este residuo se

encuentra presente dentro del dominio de unión al DNA, en una región con una secuencia idéntica entre C/EBP β y C/EBP α de ratón, rata y humano (RRERNNIAVRKSRDKAK). A pesar de ser un sitio de baja afinidad para PKA, su fosforilación inhibe la unión de tanto C/EBP α como de C/EBP β a su secuencia de unión en ensayos *in vitro* (Mahoney, et al., 1992; Trautwein, et al., 1994). Por otro lado, el estado de fosforilación de C/EBP β se asocia a su localización nuclear, como se ha observado en células feocromocitoma de rata PC-12 estimuladas con forskolina (Metz & Ziff, 1991). Específicamente, la fosforilación del residuo serina 288 de C/EBP β 1 en células de cáncer colorectal DKO-1 en respuesta a la activación de la quinasa PKA permite su entrada al núcleo (Chinery, et al., 1997). En base a esto, los resultados obtenidos al sobreexpresar las diferentes isoformas de C/EBP β pudieran deberse a una saturación de la maquinaria que permite su translocación al núcleo y que depende de ésta fosforilación. No obstante, en células HEK293T, C/EBP β endógena es una proteína residente nuclear y su localización subcelular no cambia en respuesta a la estimulación con forskolina (figura 6 y datos no mostrados), por lo que el principal efecto de la fosforilación en el residuo serina 288 sería la disociación de C/EBP β desde los elementos distales del promotor. Se requiere entonces evaluar experimentalmente el estado de fosforilación de los residuos treonina 235, serina 231, treonina 226 y serina 288 de C/EBP β 1 y así proponer un mecanismo por el cual la activación de PKA promueve una disminución de la actividad transcripcional del promotor de *RIC8B* en células HEK293T.

Por otro lado, en células SH-SY5Y no detectamos unión de C/EBP β al promotor de *RIC8B*. En cambio, sí observamos unión de CREB1 en ambas regiones del promotor. Esto es posible ya que en ambas regiones existen elementos de unión a CREB1. No obstante, y debido a que el sitio de unión a CREB distal es de baja afinidad, es probable que la unión de CREB a la región distal sea resultado de la interacción indirecta como la propuesta anteriormente para células HEK293T. Para esto, se requeriría de la unión de un factor de transcripción distinto de C/EBP β a la región distal de promotor en células SH-SY5Y indiferenciadas. Ahora bien, al inducir la diferenciación de estas células por incubación con ácido retinoico (ATRA) observamos una disminución de la expresión del mensajero para *RIC8B*. Nuestros resultados preliminares muestran que esta disminución se relaciona con la disociación de CREB1 desde el promotor tras 5 días de incubación con ATRA. Al analizar la información disponible en ENCODE se observa que los elementos C/EBP no

están accesibles en células SK-N-SH tratadas con ATRA, probablemente por el desplazamiento del nucleosoma -1 hacia la región distal. Estos resultados podrían ser extrapolables a la línea celular SH-SY5Y, debido a que la línea celular SK-N-SH es su línea parental. De esta forma, y en base al modelo propuesto en células HEK293T, la disociación de CREB1 desde el promotor podría deberse a la disociación de un factor de transcripción, distinto de C/EBP β , reclutado sobre la región distal y que estabilizaría la unión en la región proximal de CREB1. En la figura 24 se presenta el modelo de represión transcripcional propuesta en células SH-SY5Y durante su diferenciación en respuesta a ácido retinoico en base a la evidencia disponible. Este modelo de regulación sería diferente al observado en células de linaje osteoblástico, donde el sitio C/EBP -482 se expone durante la diferenciación, permitiendo la unión de C/EBP β 1 (LAP*) al promotor de *RIC8B* y el resultante reclutamiento de un complejo remodelador de cromatina de la familia SWI/SNF (Grandy, et al., 2011). Nuestros resultados, sin embargo, no nos permiten descartar este mecanismo ni otro en donde un factor de transcripción desplace a CREB desde su sitio de unión proximal (del tipo ATF, por ejemplo). De hecho, se ha observado expresión de C/EBP β en cerebro adulto (Sterneck & Johnson, 1998) y en células de neuroblastoma de ratón Neuro2A diferenciadas (Cortés-Canteli, et al., 2002), además de observarse exposición de los elementos C/EBP distales del promotor de *RIC8B* en neuronas derivadas de neuroesferas olfatorias y en neuronas de cerebelo y corteza frontal (figura 22). Estas hipótesis requieren de confirmar los cambios en la unión del factor de transcripción CREB1, analizar la unión de C/EBP β durante la diferenciación y determinar los cambios en la posición del nucleosoma -1 y en la accesibilidad de las regiones adyacentes conforme ocurre la diferenciación de las células SH-SY5Y. De existir cambios en el posicionamiento nucleosomal en esta zona del promotor del gen *RIC8B*, sería esencial identificar el complejo remodelador responsable. En este sentido, la enzima remodeladora de cromatina CHD5 aumenta durante la diferenciación de células SH-SY5Y inducida por ácido retinoico (Higashi, et al., 2015). Esta proteína forma parte de un complejo remodelador específico neuronal del tipo NuRD, junto con HDAC2 y p66 β , los que han mostrado actuar como represores transcripcionales (Clapier & Cairns, 2009; Potts, et al., 2011).

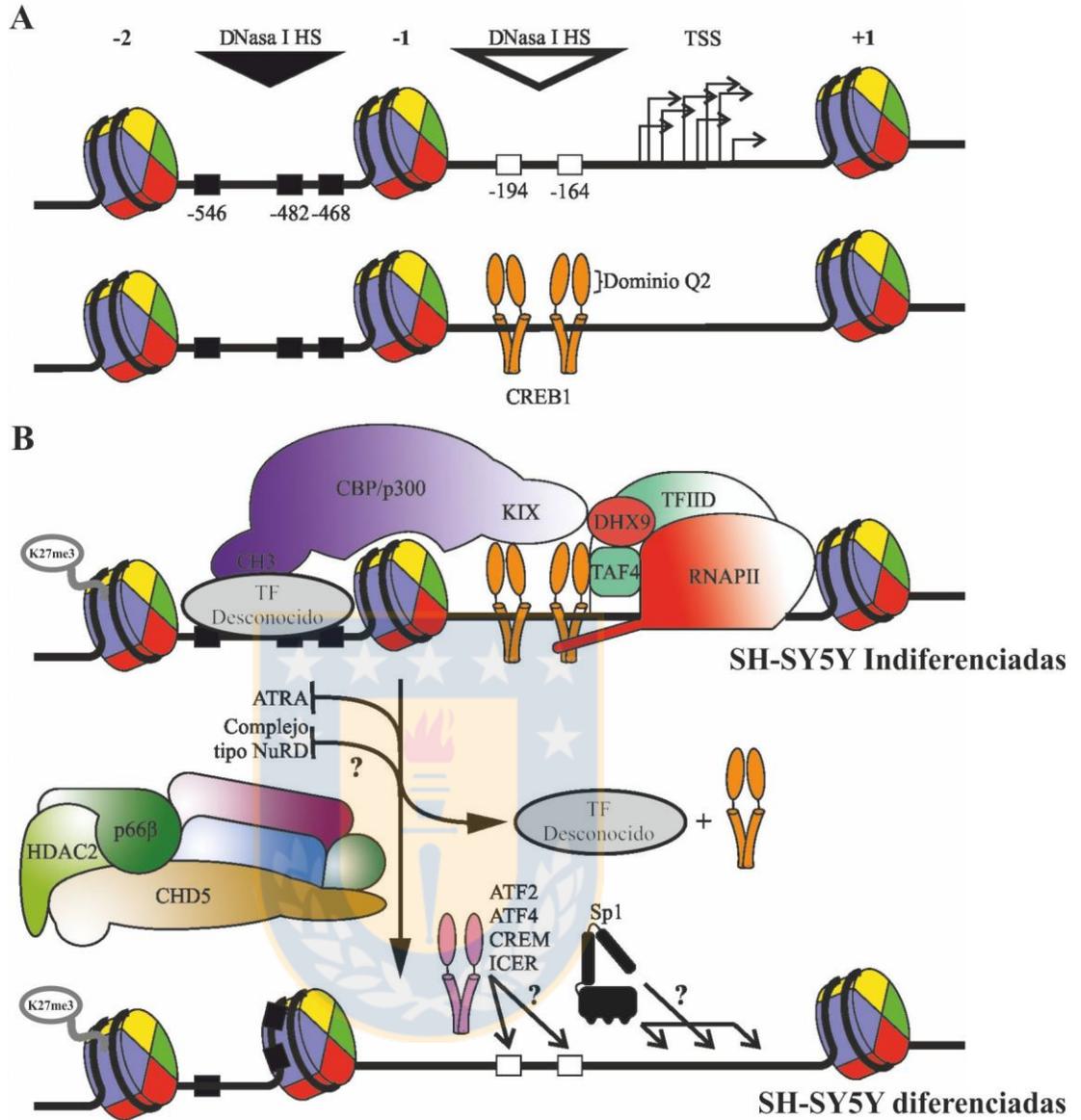


Figura 24: Modelo de regulación de la actividad del promotor de -600 pb del gen RIC8B durante la diferenciación de células SH-SY5Y en respuesta a ácido retinoico.

A: Empleando la posición de los elementos de unión a C/EBPβ (-546, -482 y -468) y CREB1 (-194 y -164) se indica la localización aproximada de las regiones hipersensibles a DNasa I (DHS) distal (cabeza de flecha negra) y proximal (cabeza de flecha blanca), en conjunto con la posición de los nucleosomas -1 y -2. Los múltiples inicios de la transcripción (TSS) se indican como flechas quebradas sobre la región donde han sido mapeados. B) Modelo propuesto para la regulación de la actividad del promotor de -600

pb del gen *RIC8B* durante la diferenciación de células SH-SY5Y en respuesta a ácido retinoico (ATRA). Se indica la marca epigenética H3K27me3 como un requisito para el reclutamiento del complejo NuRD/CHD5 (Egan, et al., 2013). DHX9: RNA helicasa A. RNAPII: RNA polimerasa II. NuRD: Complejo remodelador con actividad desacetilasa. ATF2, ATF4, CREM, ICER y Sp1: factores de transcripción. Fuente: Elaboración propia.



8.4 La represión transcripcional del gen *RIC8B* se relaciona con su función en los tipos celulares analizados.

Nuestro estudio del rol de CREB y C/EBP β en la regulación transcripcional del gen *RIC8B* ocurrió en un contexto de represión transcripcional. Previamente, nosotros propusimos un modelo de retroalimentación negativa de la vía dependiente de cAMP sobre la expresión de *RIC8B* en células HEK293T. En él, la activación del eje de señalización G α /cAMP/PKA es regulada al controlar negativamente los niveles de expresión de la proteína *RIC8B* (Maureira Moya, 2010). Nuestros resultados apoyan este mecanismo y sugieren que de manera directa C/EBP β y de forma indirecta CREB conectarían en conjunto la respuesta genómica con la actividad de la vía de señalización mediada por proteína G en este tipo celular.

De igual forma, en células SH-SY5Y observamos una reducción cercana al 50% en la expresión del mensajero pero en respuesta a la inducción de la diferenciación. Este nivel de reducción es relevante en el contexto fisiológico en base a dos evidencias experimentales. La primera, es que las proteínas G $\beta\gamma$ son las subunidades más abundantes del sistema nervioso central (Jiang & Bajpayee, 2009) y para las cuales *RIC8B* no es un GEF ni chaperona. De igual forma, durante la diferenciación inducida por ATRA de células SH-SY5Y se determinó que existe una inducción en la expresión de las proteínas G α , que es acompañada de una disminución de la subunidad G $\beta\gamma$ (Ammer & Schulz, 1994); de esta forma es coherente que disminuya *RIC8B*. De hecho, nuestro grupo de investigación determinó que el silenciamiento del mRNA de *RIC8B* inhibe completamente la diferenciación inducida por ATRA en esta línea de neuroblastoma, mientras que la sobreexpresión de la proteína acelera el proceso (Sánchez Ramírez, 2015). El establecimiento de neuritas y su definición como dendritas o axón requieren de una fina regulación espacial y temporal de la señalización mediada por cAMP (Hutchins, 2010). Es por esto que, si bien la sobreexpresión no impide la diferenciación en nuestro modelo, sí podría alterar su programa. De ahí que variaciones de los niveles del mensajero de *RIC8B* en un rango estrecho podrían derivar en variaciones de los niveles de la proteína en un rango también estrecho pero con impacto sobre la ejecución de un programa de diferenciación particular. La segunda evidencia es que tanto el *knockout* como el transgénico para *RIC8B* en ratón son inviábiles, a diferencia de lo observado con *RIC8A*

para el cual sólo el *knockout* es letal (Gabay, et al., 2011). De esta forma se refuerza el hecho de que se requiere de niveles de *RIC8B* en un rango estrecho para ejecutar su función dentro del programa celular.

Ahora, algunos programas de diferenciación requieren de la activación transcripcional del gen *RIC8B*, como es en el caso de las neuronas olfatorias, neuronas de proyección espinosa media del núcleo accumbens y células de Sertoli maduras (Von Dannecker, et al., 2005; Ernst, et al., 2007; Bhattacharya, et al., 2015). Sería muy interesante entonces el analizar los mecanismos de activación implicado en estos tipos celulares y los roles que les competen a los factores de transcripción CREB1 y C/EBP β en estas respuestas.



9 Conclusiones

Los antecedentes expuestos indican que CREB1 y C/EBP β controlan la actividad del promotor de *RIC8B*, que la unión de estos factores se asocia a un estado transcripcionalmente activo en los tipos celulares estudiados y sugieren que esta activación transcripcional depende de la interacción entre las regiones distal y proximal del promotor. Además, postulamos que la unión de CREB1 a los sitios proximales impide el posicionamiento nucleosomal en la región donde se concentran los TSS y que la unión de CREB1 depende de su interacción con proteínas como p300/CBP, que a su vez interaccionan con los factores que se unen a los elementos C/EBP distales.

10 Perspectivas

Este trabajo se realizó enfocando nuestra búsqueda en elementos de unión a factores de transcripción que respondieran a fenómenos biológicos en los cuales, a la fecha de inicio de este proyecto, *RIC8B* participaba. A la luz del conocimiento actual sobre estas proteínas, es coherente la gran variedad de elementos de unión putativos que encontramos en los análisis *in silico* iniciales e insta a estudiar en distintos tipos celulares cada uno de los eventos de señalización que controlan la expresión del gen y por ende su actividad. Proponemos como candidatos al factor NF-Y que puede unirse a la caja CCAAT del sitio C/EBP -548, al factor Sp1 que se puede unir a un gran número de secuencias consenso ubicadas a lo largo del promotor y por último a otros miembros de la familia ATF/CREB que pudieran unirse a los elementos CRE una vez que se disocia CREB1 desde el promotor. Estos factores podrían sostener la actividad transcripcional en ausencia de C/EBP β y CREB1 evitando así el silenciamiento total de la expresión del gen *RIC8B*.

11 Bibliografía

Ahlquist, R. P., 1948. A study of adrenotropic receptors. *American Journal of Physiology*, pp. 153: 586-600.

Ahn, J. H. y otros, 2007. Protein kinase A activates protein phosphatase 2A by phosphorylation of the B56delta subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(8), pp. 2979-2984.

Allfrey, V., Faulkner, R. & Mirsky, A., 1964. Acetylation and Methylation of Histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51(5), p. 786–794.

Altarejos, J. Y. & Montminy, M., 2011. CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(3), pp. 141-151.

Ammer, H. & Schulz, R., 1994. Retinoic acid-induced differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is associated with changes in the abundance of G proteins. *Journal of Neurochemistry*, 62(4), pp. 1310-1318.

Anish, R., Hossain, M., Jacobson, R. & Takada, S., 2009. Characterization of transcription from TATA-less promoters: identification of a new core promoter element XCPE2 and analysis of factor requirements. *PLoS One*, p. 4(4): e5103.

Asahara, H. y otros, 2001. Chromatin-dependent cooperativity between constitutive and inducible activation domains in CREB. *Molecular and Cellular Biology*, 21(23), pp. 7892-7900.

Atwood, A. A., Jerrell, R. & Sealy, L., 2011. Negative regulation of C/EBPbeta1 by sumoylation in breast cancer cells. *PLoS One*, 9(e25205), p. 6.

Bakker, O. & Parker, M., 1991. CAAT/enhancer binding protein is able to bind to ATF/CRE elements. *Nucleic Acid Research*, p. 19(6): 1213–1217.

Baler, R., Covington, S. & Klein, D. C., 1997. The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter. cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex. *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 272(11): 6979-6985.

Bannister, A. J. & Kouzarides, T., 2005. Reversing histone methylation. *Nature*, pp. 436: 1103-1106.

Beavo, J. A. & Brunton, L. L., 2002. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, 3(9), pp. 710-718.

Bhattacharya, I. y otros, 2015. Low levels of Gas and Ric8b in testicular sertoli cells may underlie restricted FSH action during infancy in primates. *Endocrinology*, pp. 156(3): 1143-1155.

Biedler, J. L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M. & Freedman, L. S., 1978. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer research*, 11 Pt 1(3751-3757), p. 38.

Biggar, K. K. & Li, S. S.-C., 2015. Non-histone protein methylation as a regulator of cellular signalling and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, pp. 16(1): 5-17.

Bookout, A. L. y otros, 2006. High-Throughput Real-Time Quantitative. UNIT 15.8. En: *Current Protocols in Molecular Biology*. Hoboken, New Jersey, EE.UU.: John Wiley & Sons, Inc., pp. 15.8.1-15.8.28.

Borlikova, G. & Endo, S., 2009. Inducible cAMP Early Repressor (ICER) and Brain Functions. *Molecular Neurobiology*, 40(1), pp. 73-86.

Bradford, M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, pp. 72: 248-254.

Brenowitz, M., Senear, D. F. & Kingston, R. E., 1989. DNaseI Footprinting Analysis of Protein-DNA Binding Unit 12.4. En: *Current Protocols in Molecular Biology*. Hoboken, New Jersey, EE.UU.: John Wiley & Sons, Inc., pp. 12.4.1-12.4.16.

Buxton, I. L. & Brunton, L. L., 1983. Compartments of cyclic AMP and protein kinase in mammalian cardiomyocytes.. *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 258(17): 10233-10239. .

Cairns, B. y otros, 1994. A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, and SNF6 gene products isolated from yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, pp. 91(5): 1950-1954.

Cairns, B. R., 2007. Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies. *Nature Structural & Molecular Biology*, pp. 14(11): 989-996.

Calkhoven, C., Müller, C. & Leutz, A., 2000. Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression. *Genes & Development*, pp. 14(15): 1920-1932.

Caron, M. y otros, 1979. Affinity chromatography of the beta-adrenergic receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 254(8): 2923-2927.

Cerione, R. A. y otros, 1984. Reconstitution of a Hormone-sensitive Adenylat Cyclase System. *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 259(16): 9979-9982.

Cerione, R. y otros, 1983. Pure beta-adrenergic receptor: the single polypeptide confers catecholamine responsiveness to adenylate cyclase. *Nature*, pp. 306(5943): 562-566.

Ceseña, T. y otros, 2008. Acetylation and deacetylation regulate CCAAT/enhancer binding protein beta at K39 in mediating gene transcription. *Molecular and Cellular Endocrinology*, pp. 289(1-2): 94-101.

Ceseña, T. I., Cardinaux, J.-R., Kwok, R. & Schwartz, J., 2007. CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) beta is acetylated at multiple lysines: acetylation of C/EBPbeta at lysine 39 modulates its ability to activate transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 282(2): 956-967.

Chan, H. M. & La Thangue, N. B., 2001. p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *Journal of Cell Science*, pp. 114(Pt 13): 2363-2373.

- Chan, P. y otros, 2011. Purification of heterotrimeric G protein alpha subunits by GST-Ric-8 association: primary characterization of purified G alpha(olf). *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 286(4): 2625-2635.
- Chen, C. A. & Manning, D. R., 2001. Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene*, pp. 20: 1643-1652.
- Chen, J. & Li, Q., 2011. Life and death of transcriptional co-activator p300. *Epigenetics*, pp. 6(8): 957-961.
- Chinery, R., Brockman, J., Dransfield, D. & Coffey, R., 1997. Antioxidant-induced nuclear translocation of CCAAT/enhancer-binding protein beta. A critical role for protein kinase A-mediated phosphorylation of Ser299. *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 272(48): 30356-30361.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N., 1987. Single-Step Methods of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*, pp. 162(1): 156-159.
- Clapier, C. R. & Cairns, B. R., 2009. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual Review of Biochemistry*, Volumen 78, pp. 273-304.
- Codina, J., Hildebrandt, J. D. & Birnbaumed, L., 1984. Effects of Guanine Nucleotides and Mg on Human Erythrocyte Ni and Ns, the Regulatory Components of Adenylyl Cyclase. *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 259(18): 11408-11418.
- Conkright, M. y otros, 2003. Genome-wide analysis of CREB target genes reveals a core promoter requirement for cAMP responsiveness. *Molecular Cell*, pp. 11(4): 1101-1108.
- Cortés-Canteli, M., Pignatelli, M., Santos, A. & Perez-Castillo, A., 2002. CCAAT/enhancer-binding protein beta plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(7), pp. 5460-5467.

Creyghton, M. y otros, 2010. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, pp. 107(50): 21931-21936.

Croniger, C., Leahy, P., Reshef, L. & Hanson, R. W., 1998. C/EBP and the control of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription in the liver. *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 273(48): 31629-31632.

Das, C. & Kundu, T. K., 2005. Transcriptional Regulation by the Acetylation of Nonhistone Proteins. *IUBMB Life*, pp. 57(3): 137-148.

De Cesare, D. & Sassone-Corsi, P., 2000. Transcriptional regulation by cyclic AMP-responsive factors. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, pp. 64: 343-69.

De Lean, A., Stadel, J. & Lefkowitz, R., 1980. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 255: 7108-7117.

Descombes, P. & Schibler, U., 1991. A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell*, 3(569-579), p. 67.

Dignam, J. & Lebovitz, R. R. R., 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Research*, pp. 11(5): 1475-1489..

Dillon, N., 2004. Heterochromatin structure and function. *Biology of the Cell*, pp. 96(8): 631-617.

Dixon, R. y otros, 1986. Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*, pp. 321(6065): 75-79.

Dror, R. y otros, 2015. Structural basis for nucleotide exchange in heterotrimeric G proteins. *Science*, pp. 348(6241): 1361-1365.

Egan, C. M. y otros, 2013. CHD5 is required for neurogenesis and has a dual role in facilitating gene expression and polycomb gene repression. *Developmental Cell*, 26(3), pp. 223-236.

Encinas, M. y otros, 2000. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *Journal of Neurochemistry*, pp. 75(3): 991-1003.

ENCODE Project Consortium, 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489(7414), pp. 57-74.

Ensembl Project, RIC8A, 2015. *Ensembl Human GRCh38.p5 Genome Browser, Versión 83*. [En línea] Available at: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000177963;r=11:207511-215113;t=ENST00000325207 [Último acceso: 10 Enero 2016].

Ensembl Project, RIC8B, 2015. *Ensembl Human GRCh38.p5 Genome Browser, Versión 83*. [En línea] Available at: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000111785;r=12:106774595-106889316;t=ENST00000392837 [Último acceso: 10 Enero 2016].

Ensembl Project, 2016. Ensembl 2016. *Nucleic Acid Research*, 44(Database issue), pp. D710-D716.

Ernst, C. y otros, 2007. Confirmation of region-specific patterns of gene expression in the human brain. *Neurogenetics*, p. 8: 219–224.

Fang, X. y otros, 2000. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), pp. 11960-11965.

Fenech, C. y otros, 2009. Ric-8A, a G α Protein Guanine Nucleotide Exchange Factor Potentiates Taste Receptor Signaling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, p. 3: 11.

Flammer, J. R., Popova, K. N. & Pflum, M. K. H., 2006. Cyclic AMP Response Element-Binding Protein (CREB) and CAAT/Enhancer-Binding Protein β (C/EBP β) Bind Chimeric DNA Sites with High Affinity. *Biochemistry*, pp. 45(31): 9615-9623.

Francis, S., Blount, M. & Corbin, J., 2011. Mammalian Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Molecular Mechanisms and Physiological Functions. *Physiological Reviews*, pp. 91(2): 651-690.

Gabay, M. y otros, 2011. Ric-8 proteins are molecular chaperones that direct nascent G protein α subunit membrane association. *Science Signaling*, p. 4(200): ra79.

García-Marcos, M., Ghosh, P. & Farquhar, M., 2015. GIV/Girdin transmits signals from multiple receptors by triggering trimeric G protein activation. *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 290(11): 6697-6704.

Gill, D. M. & Meren, R., 1978. ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: Basis of the activation of adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(7), pp. 3050-3054.

Gilman, A. G., 1970. A Protein Binding Assay for Adenosine 3':5'-Cyclic Monophosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 67(1), p. 305-312.

Gilman, A. G., 1997. Alfred G. Gilman - Nobel Lecture: G Proteins and Regulation of Adenilicilclase. En: *Nobel Lectures, Physiology or Medicine, 1991-1995*. Singapur: Wold Scientific Publishing Co., pp. 182-212.

Goddard, A. D. & Watts, A., 2012. Regulation of G protein-coupled receptors by palmitoylation and cholesterol. *BMC Biology*, p. 10: 27.

Goll, M. G. & Bestor, T. H., 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*, Volumen 74, pp. 481-514.

Gomperts, B. D., Kramer, I. M. & Tatham, P. E., 2009. Prologue: Signal Transduction, Origins, and Ancestors. En: *Signal Transduction*. Oxford: Academic Press.

Grandy, R. y otros, 2011. The Ric-8B gene is highly expressed in proliferating preosteoblastic cells and downregulated during osteoblast differentiation in a SWI/SNF- and C/EBPbeta-mediated manner. *Molecular and Cellular Biology*, pp. 31(14): 2997-3008.

Gray, J. y otros, 1993. A CRE/ATF-like site in the upstream regulatory sequence of the human interleukin 1 beta gene is necessary for induction in U937 and THP-1 monocytic cell lines. *Molecular and Cellular Biology*, pp. 13(11): 6678-6689.

Greer, E. L. & Shi, Y., 2012. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature Reviews Genetics*, 13(5), pp. 343-357.

Grünberg, S. & Hahn, S., 2013. Structural insights into transcription initiation by RNA polymerase II. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(12), pp. 603-611.

Gu, C., Cali, J. J. & Cooper, D. M. F., 2002. Dimerization of mammalian adenylate cyclases. *European Journal of Biochemistry*, pp. 269(2): 413-421.

Gutiérrez, J. y otros, 2000. Interaction of CBF alpha/AML/PEBP2 alpha transcription factors with nucleosomes containing promoter sequences requires flexibility in the translational positioning of the histone octamer and exposure of the CBF alpha site. *Biochemistry*, 39(44), pp. 13565-13574.

Hagiwara, M. y otros, 1993. Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Molecular and Cellular Biology*, 13(8), pp. 4852-4859.

Han, M. & Grunstein, M., 1988. Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo. *Cell*, pp. 55(6), 1137-1145.

Hargreaves, D. C. & Crabtree, G. R., 2011. ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Research*, pp. 21(3): 396-420.

Heimburg, T., 2007. Membranes-An Introduction. En: *Thermal Biophysics of Membranes*. Berlín: Wiley-VCH, pp. 1-14.

Henikoffa, J. G. y otros, 2011. Epigenome characterization at single base-pair resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(45), pp. 18318-18323.

Henriquez, B. y otros, 2011. C/EBP β binds the P1 promoter of the Runx2 gene and up-regulates Runx2 transcription in osteoblastic cells. *Journal of Cellular Physiology*, pp. 226(11): 3043-3052.

Higashi, M. y otros, 2015. Retinoic acid-induced CHD5 upregulation and neuronal differentiation of neuroblastoma. *Molecular Cancer*, p. 14: 150.

Hinrichs, M. V., Torrejón, M., Montecino, M. & Olate, J., 2012. Ric-8: different cellular roles for a heterotrimeric G-protein GEF. *Journal of Cellular Biochemistry*, pp. 113(9): 2797-2805.

Hurwitz, J., 2005. The Discovery of RNA Polymerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(52), pp. 42477-42485.

Hutchins, B. I., 2010. Competitive outgrowth of neural processes arising from long-distance cAMP signaling. *Science Signaling*, p. 3(118): jc1.

Iguchi-Arigo, S. M. & Schaffner, W., 1989. CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes & Development*, pp. 3(5): 612-619.

Iizuka, M. & Smith, M. M., 2003. Functional consequences of histone modifications. *Current Opinion in Genetics Development*, pp. 13(2): 154-160.

Illingworth, R. S. & Bird, A. P., 2009. CpG islands – ‘A rough guide’. *FEBS letters*, pp. 583(11): 1713-1720.

Impey, S. y otros, 2004. Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell*, pp. 119(7): 1041-1054.

- Jenuwein, T. & Allis, C. D., 2001. Translating the histone code. *Science*, 293(5532), pp. 1074-1080.
- Jiang, C. & Pugh, B. F., 2009. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nature Reviews Genetics*, pp. 10: 161-172.
- Jiang, M. & Bajpayee, N. S., 2009. Molecular Mechanisms of Go Signaling. *Neurosignals* 2009;17:23-41, 17(1), pp. 23-41.
- Johannessen, M., Delghandi, M. & Moens, U., 2004. What turns CREB on?. *Cellular Signaling*, 16(11), pp. 1211-1227.
- Johnson, P. F., 1993. Identification of C/EBP basic region residues involved in DNA sequence recognition and half-site spacing preference. *Molecular and Cellular Biology*, 11(6919-6930), p. 13.
- Jones, C. & Lee, K. A. W., 1991. E1A-Mediated Activation of the Adenovirus E4 Promoter Can Occur Independently of the Cellular Transcription Factor E4F. *Molecular and Cellular Biology*, pp. 11(9): 4297-4305.
- Jones, D. O., Cowell, I. G. & Singh, P. B., 2000. Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *BioEssays*, pp. 22(2): 124-137.
- Kadonaga, J. T., 2012. Perspectives on the RNA polymerase II core promoter. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(1), pp. 40-51.
- Kapiloff, M. & Chandrasekhar, K., 2011. A-kinase Anchoring Proteins: Temporal and Spatial Regulation of Intracellular Signal Transduction in the Cardiovascular System. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, pp. 58(4): 337-338.
- Karlič, R. y otros, 2010. Histone modification levels are predictive for gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, pp. 107(7): 2926-2931.

Katritch, V., Cherezov, V. & Stevens, R. C., 2013. Structure-Function of the G Protein–Coupled Receptor Superfamily. *The Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, p. 53: 531–556.

Kelley, R. I., 1973. Isolation of a histone IIb1-IIb2 complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, pp. 54(4): 1588-1594.

Kent, R. S., De Lean, A. & Lefkowitz, R. J., 1979. A Quantitative Analysis of Beta-Adrenergic Receptor Interactions: Resolution of High and Low Affinity States of the Receptor by Computer Modeling of Ligand Binding Data. *Molecular Pharmacology*, pp. 17: 14-23.

Khan, S. M. y otros, 2013. The Expanding Roles of G β g Subunits in G Protein–Coupled Receptor Signaling and Drug Action. *Pharmacological Reviews*, p. 65: 545–577.

Khan, S. N. & Khan, A. U., 2010. Role of histone acetylation in cell physiology and diseases: An update. *Clinica Chimica Acta*, pp. 411(19-20):1401-1411.

Klattenhoff, C. y otros, 2003. Human brain synembryn interacts with G α and G α and is translocated to the plasma membrane in response to isoproterenol and carbachol. *Journal of Cellular Physiology*, p. 195: 151–157.

Klein, T., Shephard, P., Kleinert, H. & Kömhoff, M., 2007. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by cyclic AMP. *Biochimica et Biophysica Acta*, pp. 1773(11): 1605-1618.

Klose, R. J. & Bird, A. P., 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences*, pp. 31(2): 89-97.

Kobilka, B. K., 2007. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, p. 1768(4): 794–807.

Korbie, D. J. & Mattick, J. S., 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3(9), pp. 1452-1456.

Kornberg, R. D., 1974. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*, pp. 184(139): 868-871.

Kornberg, R. D. & Lorch, Y., 1999. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, pp. 98(3): 285-294.

Kornberg, R. D. & Thomas, J. O., 1974. Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science*, pp. 184(139): 865-868.

Kovács, K. y otros, 2003. CCAAT/enhancer-binding protein family members recruit the coactivator CREB-binding protein and trigger its phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 278(38):36959-65.

Kowenz-Leutz, E. & Leutz, A., 1999. A C/EBP beta isoform recruits the SWI/SNF complex to activate myeloid genes. *Molecular Cell*, pp. 4(5): 735-743.

Kowenz-Leutz, E. P. O., Dittmar, G., Knoblich, M. & Leutz, A., 2010. Crosstalk between C/EBPbeta phosphorylation, arginine methylation, and SWI/SNF/Mediator implies an indexing transcription factor code. *The EMBO Journal*, pp. 29(6): 1105-1115.

Kowenz-Leutz, E., Twamley, G., Ansieau, S. & Leutz, A., 1994. Novel mechanism of C/EBP beta (NF-M) transcriptional control: activation through derepression. *Genes & Development*, pp. 8(22): 2781-2791.

Laemmli, U., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, pp. 227 (5258): 680-685.

Laible, M. & Boonrod, K., 2009. Homemade site directed mutagenesis of whole plasmids. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, p. 11: (27).

Lambright, D. G., Noel, J. P., Hamm, H. E. & Sigler, P. B., 1994. Structural determinants for activation of the α -subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature*, p. 369: 621-628.

Lands, A. M. y otros, 1967. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*, Volumen 214, pp. 597-598.

Lefkowitz, R. J., 2012. *Nobel Lecture: A Brief History of G Protein Coupled Receptors*. [En línea] Available at: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2012/lefkowitz-lecture.html [Último acceso: 23 Diciembre 2015].

Levitt, E. S. y otros, 2009. Differential Effect of Membrane Cholesterol Removal on μ - and δ -Opioid Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, pp. 284(33): 22108-22122.

Levitzki, A., Atlas, D. & Steer., M. L., 1974. The Binding Characteristics and Number of β -Adrenergic Receptors on the Turkey Erythrocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, p. 71(7): 2773–2776.

Li, B., Carey, M. & Workman, J. L., 2007. The role of chromatin during transcription. *Cell*, pp. 128(4): 707-719.

Li, K. y otros, 2003. The melanocyte inducing factor MITF is stably expressed in cell lines from human clear cell sarcoma. *British Journal of Cancer*, pp. 89(6): 1072-1078.

Limbird, L. E. & Lefkowitz, R. J., 1977. Resolution of beta-adrenergic receptor binding and adenylate cyclase activity by gel exclusion chromatography. *The Journal of Biological Chemistry*, Volumen 252, pp. 799-802.

Lomasney, J. y otros, 1986. Mammalian alpha 1-adrenergic receptor. Purification and characterization of the native receptor ligand binding subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 261(17): 7710-7716.

Lopez, D. I., Mick, J. E. & Nyborg, J. K., 2007. Purification of CREB to Apparent Homogeneity; Removal of Truncation Products and Contaminating Nucleic Acid. *Protein Expression and Purification*, 55(2), pp. 406-418.

Lorberbaum, T., 2013. *Pouring a gradient gel*. [En línea] Available at: <https://www.youtube.com/watch?v=zu5a-kpMK8k> [Último acceso: 15 Enero 2016].

Luger, K. y otros, 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, pp. 389(6648): 251-260.

Maguire, H. F., Hoeffler, J. P. & Siddiqui, A., 1991. HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science*, pp. 252(5007): 842-844.

Mahoney, C. y otros, 1992. Phosphorylation of CCAAT-enhancer binding protein by protein kinase C attenuates site-selective DNA binding. *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 267(27): 19396-19403.

Malik, S. & Roeder, R. G., 2010. The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. *Nature Reviews Genetics*, 11(11), pp. 761-772.

Manglik, A. y otros, 2015. Structural Insights into the Dynamic Process of β 2-Adrenergic Receptor Signaling. *Cell*, pp. 161(5): 1101-1011.

Martin, C. & Zhang, Y., 2005. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), pp. 838-849.

Maston, G. A., Evans, S. K. & Green, M. R., 2006. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, Volumen 7, pp. 29-59.

Mattick, J. S., 2004. RNA regulation: a new genetics?. *Nature Reviews Genetics*, 5(4), pp. 316-323.

Matuoka, K. & Chen, K., 2002. Transcriptional regulation of cellular ageing by the CCAAT box-binding factor CBF/NF-Y. *Ageing Research Reviews*, 1(4), pp. 639-651.

Maureira Moya, A. S., 2010. *Estudio de la Actividad del Promotor de Ric-8B humano*, Concepción, Chile: Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción.

Mayr, B. & Montminy, M., 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, 2(8), pp. 599-609.

McCartney, S., Little, B., Langeberg, L. & Scott, J., 1995. Cloning and characterization of A-kinase anchor protein 100 (AKAP100). A protein that targets A-kinase to the sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 270(16): 9327-9393.

McCudden, C. R. y otros, 2005. G-protein signaling: back to the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, p. 62(5): 551-577.

McDonald, D., 2005. Nature Milestones in Gene Expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, pp. 6: S10-S11.

McGhee, J. D. & Ginder, G. D., 1979. Specific DNA methylation sites in the vicinity of the chicken beta-globin genes. *Nature*, pp. 280(5721): 419-420.

McKnight, S. L., 2001. McBindall--a better name for CCAAT/enhancer binding proteins?. *Cell*, pp. 107(3): 259-261.

Metz, R. & Ziff, E., 1991. cAMP stimulates the C/EBP-related transcription factor rNFIL-6 to trans-locate to the nucleus and induce c-fos transcription. *Genes & Development*, pp. 5(10): 1754-1766.

Michel, J. & Scott, J., 2002. AKAP mediated signal transduction. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, pp. 42(4): 235-257.

Miller, K. y otros, 1996. A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp. 93: 12593-12598.

Miller, K. G., Emerson, M. D., McManus, J. R. & Rand, J. B., 2000. RIC-8 (Synembryn): a novel conserved protein that is required for G(q)alpha signaling in the *C. elegans* nervous system. *Neuron*, 27(2), pp. 289-299.

Miller, K. & Rand, J., 2000. A role for RIC-8 (Synembryn) and GOA-1 (G(o)alpha) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 156(4), pp. 1649-1460.

Milligan, G. & Kostenis, E., 2006. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British Journal of Pharmacology*, p. 147: S46–S55.

Mink, S., Haenig, B. & Klempnauer, K.-H., 1997. Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBPbeta. *Molecular and Cellular Biology*, pp. 17(11): 6609-6617.

Moll, J. y otros, 2002. Magnesium is required for specific DNA binding of the CREB B-ZIP domain. *Nucleic Acid Research*, pp. 30(5): 1240-1246.

Montoya, M., 2005. (1969) Identification of three eukaryotic RNA polymerases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Volumen 6, pp. S8-S9.

Mucharadt, C., Li, C., Kornuc, M. & Gaynor, R., 1990. CREB regulation of cellular cyclic AMP-responsive and adenovirus early promoters. *Journal of Virology*, pp. 64(9): 4296-4305.

Nakajima, T. y otros, 1993. Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(6), pp. 2207-2211.

Ndlovu, M., Denis, H. & Fuks, F., 2011. Exposing the DNA methylome iceberg. *Trends in Biochemical Sciences*, pp. 36(7): 381-387.

Niehof, M., Manns, M. P. & Trautwein, C., 1997. CREB controls LAP/C/EBP beta transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 17(7), pp. 3600-3613.

Nikolov, D. B. & Burley, S. K., 1997. RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(1), pp. 15-22.

Nishimura, A. y otros, 2006. Ric-8A potentiates Gq-mediated signal transduction by acting downstream of G protein-coupled receptor in intact cells. *Genes to Cells*, pp. 11(5): 487-498.

Northup, J. K., Smigel, M. D., Sternweis, P. C. & Gilman, A. G., 1983. The Subunits of the Stimulatory Regulatory Component of Adenylate Cyclase. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(18), pp. 11369-11376.

Northup, J. y otros, 1980. Purification of the regulatory component of adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(1), p. 6516-6520.

Oldham, W. M. & Hamm, H. E., 2008. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, pp. 9(1): 60-71.

Osada, S., Yamamoto, H., Nishihara, T. & Imagawa, M., 1996. DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 271(7): 3891-3896.

Papasergi, M., Patel, B. & Tall, G., 2015. The G protein α chaperone Ric-8 as a potential therapeutic target. *Molecular pharmacology*, pp. 87(1): 52-63.

Park, E. y otros, 1990. The role of the CCAAT/enhancer-binding protein in the transcriptional regulation of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). *Molecular and Cellular Biology*, pp. 10(12): 6264-6272.

Patikoglou, G. & Burley, S., 1997. Eukaryotic transcription factor-DNA complexes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, Volumen 26, pp. 289-325.

Pfeuffer, T., 1977. GTP-binding Proteins in Membranes and the Control of Adenylate Cyclase Activity. *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 252(20): 1224-1234.

Pontier, S. M. y otros, 2008. Cholesterol-dependent separation of the beta2-adrenergic receptor from its partners determines signaling efficacy: insight into nanoscale organization of signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 283(36): 24659-24672.

Potts, R. y otros, 2011. CHD5, a brain-specific paralog of Mi2 chromatin remodeling enzymes, regulates expression of neuronal genes. *PLOS One*, p. 6(9): e24515.

Qian, J. y otros, 2001. Cloning of human preprotachykinin-I promoter and the role of cyclic adenosine 5'-monophosphate response elements in its expression by IL-1 and stem cell factor. *The Journal of Immunology*, pp. 166(4): 2553-2561.

Ramji, D. P. & Foka, P., 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *The Biochemical Journal*, Volumen 365(Pt 3), pp. 561-575.

Rasmussen, S. y otros, 2011. Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, pp. 477(7366): 549-555.

Regan, J. W. y otros, 1982. Affinity chromatography of human platelet α_2 -adrenergic receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, p. 79(23): 7223-7227.

Reuss, L., 2008. Water Transport across Cell Membrane. En: *Encyclopedia of Life Science (ELS)*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.

Reuss, L., 2011. Ion Transport across Nonexcitable Membrane. En: *Encyclopedia of Life Science (eLS)*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd..

Rishi, V. y otros, 2010. CpG methylation of half-CRE sequences creates C/EBP α binding sites that activate some tissue-specific genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, pp. 107(47): 20311-20316.

Rodbell, M., 1997. Martin Rodbell - Nobel Lecture: Signal Transduction: Evolution of an Idea. En: *Nobel Lectures, Physiology or Medicine, 1991-1995*. Singapur: World Scientific Publishing Co., pp. 220-237.

Roesler, W., Vandenbark, G. & Hanson, R., 1989. Identification of multiple protein binding domains in the promoter-regulatory region of the phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene. *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 264(16): 9657-9664.

Rybin, V. O., Xu, X., Lisanti, M. P. & Steinberg, S. F., 2000. Differential targeting of beta-adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 275(52): 41447-41457.

Salon, J. A., Lodowski, D. T. & Palczewski, K., 2011. The Significance of G Protein-Coupled Receptor Crystallography for Drug Discovery. *Pharmacological Reviews*, pp. 63(4): 901-937.

Sambrook, J. & Russell, D., 2001. Calcium-phosphate-mediated Transfection of Eukaryotic Cells with Plasmid DNAs. En: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd edition*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 16.14-16.20.

Sánchez Ramírez, R. A., 2015. *Participación de RIC-8B humano en el proceso de diferenciación neuronal de las células SH-SY5Y*, Concepción, Chile: Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Sanchez, R. & Zhou, M.-M., 2009. The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 12(5), pp. 659-665.

Sato, M., Blumer, J., Simon, V. & Lanier, S., 2006. Accessory proteins for G proteins: partners in signaling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, pp. 46: 151-187.

Schild-Poulter, C., Sassone-Corsi, P., Granger-Schnarr, M. & Schnarr, M., 1996. Nucleosome assembly on the human c-fos promoter interferes with transcription factor binding. *Nucleic Acid Research*, pp. 24(23): 4751-4758.

Shirakawa, F. y otros, 1993. The human prointerleukin 1 beta gene requires DNA sequences both proximal and distal to the transcription start site for tissue-specific induction. *Molecular and Cellular Biology*, pp. 13(3): 1332-1344.

Siderovski, D. P. & Willard, F. S., 2005. The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *International Journal of Biological Sciences*, pp. 1(2): 51-66.

Simpson, R. T., 1978. Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry*, pp. 17(25): 5524-5531.

Somboonthum, P. y otros, 2005. cAMP-responsive element in TATA-less core promoter is essential for haploid-specific gene expression in mouse testis. *Nucleic Acids Research*, pp. 33(10): 3401-3411.

Sprang, S., 2001. GEFs: master regulators of G-protein activation.. *Trends in Biochemical Sciences*, pp. 26(4): 266-267.

Sprang, S. R., 1997. G Protein Mechanisms: Insights from Structural Analysis. *Annual Review of Biochemistry*, pp. 66: 639-678.

Steinberg, S. F. & Brunton, L. L., 2001. Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, pp. 41(1): 751-773 .

Steinberg, X. y otros, 2012. Human CCAAT/Enhancer-Binding Protein β Interacts with Chromatin Remodeling Complexes of the Imitation Switch Subfamily. *Biochemistry*, pp. 51(5): 952-962.

Sterneck, E. & Johnson, P. F., 1998. CCAAT/enhancer binding protein beta is a neuronal transcriptional regulator activated by nerve growth factor receptor signaling. *Journal of Neurochemistry*, 70(6), pp. 2424-2433.

Sterner, D. E. & Berger, S. L., 2000. Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, pp. 64(2): 435-459..

Strahl, B. D. & Allis, C. D., 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*, pp. 403(6765): 41-45.

Tall, G., Krumins, A. & Gilman, A., 2003. Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric G α protein guanine nucleotide exchange factor. *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 278(10): 8356-8362.

Tang, Q. Q. y otros, 2005. Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(28), pp. 9766-9771.

Tang, W. J., Stanzel, M. & Gilman, A. G., 1995. Truncation and Alanine-Scanning Mutants of Type I Adenylyl Cyclase. *Biochemistry*, pp. 34(44): 14563-14572.

Tolstorukov, M. Y. y otros, 2009. Comparative analysis of H2A.Z nucleosome organization in the human and yeast genomes. *Genome Research*, 19(6), pp. 967-977.

Tõnissoo, T. y otros, 2010. Nucleotide Exchange Factor RIC-8 Is Indispensable in Mammalian Early Development. *Developmental Dynamics*, p. 239: 3404–3415.

Tost, J., 2010. DNA Methylation: An Introduction to the Biology and the Disease-Associated Changes of a Promising Biomarker. *Molecular Biotechnology*, 44(1), pp. 71-81.

Trautwein, C. y otros, 1993. Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain. *Nature*, pp. 364(6437): 544-547.

Trautwein, C. y otros, 1994. Protein kinase A and C site-specific phosphorylations of LAP (NF-IL6) modulate its binding affinity to DNA recognition elements. *The Journal of Clinical Investigation*, pp. 93(6): 2554-2561.

Trifonov, E. N., 2011. Cracking the chromatin code: precise rule of nucleosome positioning. *Physics of Life Reviews*, p. 8(1): 39–50.

Tsukada, J. y otros, 1994. Transcription factors NF-IL6 and CREB recognize a common essential site in the human prointerleukin 1 beta gene. *Molecular and Cellular Biology*, pp. 14(11): 7285-7297.

van den Hoff, M., Moorman, A. & Lamers, W., 1992. Electroporation in 'intracellular' buffer increases cell survival. *Nucleic Acid Research*, p. 20(11): 2902.

Von Dannecker, L., Mercadante, A. & Malnic, B., 2005. Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein Galphao1f. *The Journal of Neuroscience*, 25(15), pp. 3793-3800.

Wakaguri, H. y otros, 2008. DBTSS: database of transcription start sites, progress report 2008. *Nucleic Acids Research*, pp. 36: D97-D101.

Wang, W. y otros, 2008. Sumoylation of LAP1 is involved in the HDAC4-mediated repression of COX-2 transcription. *Nucleic Acids Research*, 36(19), pp. 6066-6079.

Wedegaertner, P. B., Wilson, P. T. & Bourne, H. R., 1995. Lipid Modifications of Trimeric G Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 270: 503-506.

Willard, F., Kimple, R. & Siderovski, D., 2004. Return of the GDI: the GoLoco motif in cell division. *Annual Review of Biochemistry*, pp. 73: 925-951.

Williams, S. C., Baer, M., Dillner, A. J. & Johnson, P. F., 1995. CRP2 (C/EBP beta) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *The EMBO journal*, pp. 14(13): 3170-3183.

Wingender, E., Schoeps, T., Haubrock, M. & Dönitz, J., 2015. TFClass: a classification of human transcription factors and their rodent orthologs. *Nucleic Acids Research*, pp. 43(D1): D97-D102.

Yaniv, M., 2011. The 50th anniversary of the publication of the operon theory in the Journal of Molecular Biology: past, present and future. *Journal of Molecular Biology*, 409(1), pp. 1-6.

Yin, J.-w. & Wang, G., 2014. The Mediator complex: a master coordinator of transcription and cell lineage development. *Development*, 141(5), pp. 977-987.

Zahnow, C. A., 2009. CCAAT/enhancer-binding protein β : its role in breast cancer and associations with receptor tyrosine kinases. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, p. 11: e12.

Zhang, X. y otros, 2005. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, pp. 102(12): 4459-4464.

Zhong, H. & Neubig, R., 2001. Regulator of G protein signaling proteins: novel multifunctional drug targets. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 297(3), pp. 837-845.

12 Apéndices

12.1 Apéndice 1: Tablas de preparación de geles de poliacrilamida.

12.1.1 Geles nativos de poliacrilamida para DNA

Reactivos	Volumen de Gel (ml)		
	40	50	60
AA:BisAA (29:1; 30%) (ml)	8	10	12
TBE 5× (ml)	4	5	6
Agua <i>nano pure</i> (ml)	27,56	34,5	41,4
APS 10% (μl)	400	500	600
TEMED (μl)	40	50	60

12.1.2 Geles de poliacrilamida para EMSA

Concentración del Gel	5%		4%
Volumen del Gel (ml)	40	50	40
AA:BisAA (40:1; 41%) (ml)	4,88	6,1	3,9
TBE 5× (ml)	2,4	3,0	2,4
Agua <i>nano pure</i> (ml)	32,28	40,35	33,26
APS 10% (μl)	400	500	400
TEMED (μl)	40	50	40

12.1.3 Gel de secuenciación de DNA

Reactivos	
AA:BisAA (19:1; 40%) (ml)	9
Urea (g)	30
TBE 5× (ml)	12
Agua nano pure (ml)	15
APS 10% (µl)	150
TEMED (µl)	30
Volumen Final	60 ml
<p>Primero se disolvió la urea en el agua más la acrilamida calentando la solución a 50°C, con agitación muy suave para evitar gasificar la solución. Luego de dejar enfriar, se agregaron el APS y el TEMED y rápidamente se armó el gel.</p>	

12.1.4 Gel de poliacrilamida desnaturante para proteínas al 12%

Reactivos	Gel Separador	Gel Concentrador
Buffer separador 2× (ml)	2,0	–
Buffer concentrador 2× (ml)	–	0,75
AA:BisAA (29:1; 30%) (ml)	1,6	0,3
Agua nano pure (ml)	0,4	0,45
TEMED (µl)	2,5	5
APS 12% (µl)	20	10
Volumen Final (ml)	4,0	1,5
<p>Volúmenes de acuerdo a un gel de 0,75 mm de espesor. Basado en el protocolo original (Laemmli, 1970).</p>		

12.1.5 Gel de poliacrilamida desnaturante en gradiente 8-15%

Reactivos	Separador 15%	Separador 8%	Gel Concentrador
<i>Buffer separador 2× (ml)</i>	2,0	2,0	–
<i>Buffer concentrador 2× (ml)</i>	–	–	1,5
<i>AA/BisAA (29:1; 30%) (ml)</i>	2,0	1,06	0,6
<i>Agua nano pure (ml)</i>	–	0,94	0,9
TEMED (µl)	3	3	10
APS 12% (µl)	24	24	24
Azul de bromofenol 0,1% (p/v)	20	–	–
Volumen Final (ml)	4,0	4,0	3,0
Volúmenes de acuerdo a un gel de 1,5 mm de espesor. La preparación fue realizada según Tal Lorberbaum (Lorberbaum, 2013).			

12.2 **Mezcla de transcripción reversa**

12.2.1 Tabla de reacción para la enzima M-MLV RT

	1 reacción (µl)
M-MLV RT 5× <i>Reaction buffer</i>	5,0
dNTP (10 mM)	1,25
RNasin Plus (40 U/µl)	0,5
M-MLV RT (200 U/µl)	1,0
Agua libre de nucleasas	2,25
Volumen final	10

12.3 Mezcla y programa de amplificación por PCR de la enzima *GoTaq Flexi* DNA polimerasa.

12.3.1 Tabla de reacción para la amplificación

	Amplificación Regular	Amplificación de Inmunoprecipitados	Amplificación de los elementos CRE del Promotor de <i>RIC8B</i> humano
5× <i>Green GoTaq Flexi Buffer</i> (µl)	5	5	5
MgCl₂ 25 mM (µl)	1,5	2	2
dNTP 10 mM (µl)	0,5	0,5	0,5
Partidor Sentido 10 µM (µl)	0,5	0,75	0,5
Partidor Antisentido 10 µM (µl)	0,5	0,75	1,25
<i>GoTaq</i> DNA polimerasa (5 U/µl) (µl)	0,125	0,125	0,125
Templado (µl)	5	3	3
Agua libre de nucleasas (µl)	12	12,875	12,75
Volumen final (µl)	25	25	25

12.3.2 Programa de amplificación

Amplificación Regular		
95°C	2 min	
95°C	30 s	35 ciclos
55°C	30 s	
72°C	1 min/kb	
72°C	5 min	
4°C	∞	

Amplificación de Inmunoprecipitados		
95°C	2 min	
95°C	30 s	35 ciclos
55°C	15 s	
72°C	15 s	
72°C	5 min	
4°C	∞	

Amplificación de los elementos CRE del Promotor de <i>RIC8B</i> humano		
95°C	2 min	
95°C	30 s	3 ciclos
72°C	30 s	
95°C	30 s	5 ciclos
68°C	15 s	
72°C	15 s	
95°C	30 s	35 ciclos
55°C	15 s	
72°C	15 s	
72°C	5 min	
4°C	∞	

12.4 Mezcla y programa de amplificación por qPCR de la enzima *GoTaq Hot Start Flexi* DNA polimerasa.

12.4.1 Tabla de reacción para la amplificación

	1 reacción
5× Colorless GoTaq Flexi Buffer (μl)	2,5
MgCl₂ 25 mM (μl)	1,5
EvaGreen 20×	0,625
Reference Dye 10×	0,125
dNTP 10 mM (μl)	0,25
Partidor Sentido 10 μM (μl)	0,625
Partidor Antisentido 10 μM (μl)	0,625
GoTaq Hot Start DNA polimerasa (5 U/μl) (μl)	0,125
Templado (μl)	2
Agua libre de nucleasas (μl)	4,125
Volumen final (μl)	12,5

12.4.2 Programa de amplificación

Temperatura	Tiempo	
95°C	3 min	
95°C	30 s	40 ciclos
60°C	15 s	
72°C	15 s	
95°C	30 s	
55°C	30 s	
95°C	30 s	
Las lecturas de fluorescencia (<i>EvaGreen</i> y <i>Reference Dye</i>) fueron realizadas en durante la etapa de <i>annealing</i> a 60°C y durante la etapa de desnaturación entre 55°C y 95°C).		

12.5 Secuenciaciones y cromatogramas

12.5.1 Secuenciación parcial del vector pCS2+/hCREB1A (región 5')

atgacagctcaagcccaaccacagattgccacattagcccaggtatccatgccagcagct
M T A Q A Q P Q I A T L A Q V S M P A A
catgcgacatcatctgctcccactgtaaccttagtgcagctgcccattgggcagacagtc
H A T S S A P T V T L V Q L P N G Q T V
caagtccatggagttattcaggcggcccagccatcagttattcagtctccacaagtccaa
Q V H G V I Q A A Q P S V I Q S P Q V Q
acagttcagatttcaactattgcagaaagtgaggattcacaggaatctgtggatagtga
T V Q I S T I A E S E D S Q E S V D S V
actgattccaaaagcgaagggaaattctttcaaggaggccttcctacagggaaaattttg
T D S Q K R R E I L S R R P S Y R K I L
aatgacttatcttctgatgcaccaggggtgccaaggattgaagaagaaaagtgcggaagag
N D L S S D A P G V P R I E E E K S E E
gagacttcagccccctgccatcaccactgtgacagtgccaactccgatttaccagacaagc
E T S A P A I T T V T V P T P I Y Q T S
agtgggcagtatattgccattaccagggaggagctatacagctggctaacaatggtacc
S G Q Y I A I T Q G G A I Q L A N N G T
gatgggggtacagggccttcagacattaacatgaccaatgcagctgccactcagccgggt
D G V Q G L Q T L T M T N A A A T Q P G
accactattctacagtatgcacagaccactgatggacagcagatttctagtgccagcaac
T T I L Q Y A Q T T D G Q Q I L V P S N
caagttgttgttaagctgcctctggcgatgtacaaacataccaaattcgtacagcacc
Q V V V Q A A S G D V Q T Y Q I R T A P
actagcaccatcgcccctggagttgttatggcatcctccccagcacttctacgcagcct
T S T I A P G V V M A S S P A L P T Q P
gctgaagaagcagcccggaagagagaggttctcgtcta
A E E A A R K R E V R L

12.5.2 Secuenciación parcial del vector pCS2+/hCREB1B (región 5')

atgacagctcaagcccaaccacagattgccacattagcccaggtatccatgccagcagct
M T A Q A Q P Q I A T L A Q V S M P A A
catgcgacatcatctgctcccactgtaaccttagtgcagctgcccattgggcagacagtc
H A T S S A P T V T L V Q L P N G Q T V
caagtccatggagttattcaggcggcccagccatcagttattcagtctccacaagtccaa
Q V H G V I Q A A Q P S V I Q S P Q V Q
acagttcagttcttctgtaaggacttaaaaagacttttctccggaactcagatttcaact
T V Q **S S C K D L K R L F S G T Q** I S T
attgcagaaagtgaggattcacaggaatctgtggatagtgtactgattccaaaagcga
I A E S E D S Q E S V D S V T D S Q K R
agggaaattctttcaaggaggccttcctacagggaaaattttgaatgacttatcttctgat
R E I L S R R P S Y R K I L N D L S S D
gcaccaggggtgccaaggattgaagaagaaaagtgcggaagaggagacttcagccccctgcc
A P G V P R I E E E K S E E E T S A P A
atcaccactgtgacagtgccaactccgatttaccagacaagcagtgggcagtatattgcc
I T T V T V P T P I Y Q T S S G Q Y I A
attaccagggaggagctatacagctggctaacaatggtagcaccgatgggggtacagggcctt
I T Q G G A I Q L A N N G T D G V Q G L
cagacattaacatgaccaatgcagctgccactcagccgggtaccactattctacagtat
Q T L T M T N A A A T Q P G T T I L Q Y

gcacagaccactgatggacagcagattctagtgccagcaaccaagttggtgttcaagct
 A Q T T D G Q Q I L V P S N Q V V V Q A
 gcctctggcgatgtacaaacatacacaatttcgtacagcaccactagcaccatcgcccct
 A S G D V Q T Y Q I R T A P T S T I A P

Nota: En gris se muestra la región codificada por el exón 4 del gen hCREB1.

12.5.3 Secuenciación parcial del vector pcDNA3.1-hPRKACA1-V5His (región 5')

atgggcaacgcccgcgcccgaagaagggcagcgcagcaggagagcgtgaaagaattctta
 M G N A A A A K K G S E Q E S V K E F L
 gccaaagccaaagaagattttcttaaaaaatgggaaagtcccgcctcagaacacagcccac
 A K A K E D F L K K W E S P A Q N T A H
 ttggatcagtttgaacgaatcaagaccctcggcagcgggctccttcggggcgggtgatgctg
 L D Q F E R I K T L G T G S F G R V M L
 gtgaaacacaaggagaccgggaaccactatgccatgaagatcctcgacaaacagaagggtg
 V K H K E T G N H Y A M K I L D K Q K V
 gtgaaactgaaacagatcgaacacaccctgaatgaaaagcgcacatcctgcaagctgtcaac
 V K L K Q I E H T L N E K R I L Q A V N
 tttccgcttcctcgtcaaactcgagttctccttcaaggacaactcaaacttatacatggct
 F P F L V K L E F S F K D N S N L Y M V
 atggagtagcgtgcccggcggggagatggtctcacacctacggcgggatcggaaggttcagt
 M E Y V P G G E M F S H L R R I G R F S
 gagccccatgcccgtttctacgcccagatcgtcctgacctttgagtatctgcactcg
 E P H A R F Y A A Q I V L T F E Y L H S
 ctggatctcatctacagggacctgaagccggagaatctgctcattgaccagcagggctac
 L D L I Y R D L K P E N L L I D Q Q G Y
 attcaggtgacagacttcgggttcgccaagcgcgtgaagggccgcacttggaccttgtgc
 I Q V T D F G F A K R V K G R T W T L C
 ggcacccctgagtacctggcccctgagattatcctgagcaaaggctacaacaaggccgtg
 G T P E Y L A P E I I L S K G Y N K A V
 gactgggtgggcccctgggggttcttatctatgaaatggccgctggctacccgccccttcttc
 D W W A L G V L I Y E M A A G Y P P F F
 gcagaccagcccacccagatctatgagaagatcgtctctctgggaaa
 A D Q P I Q I Y E K I V S G K

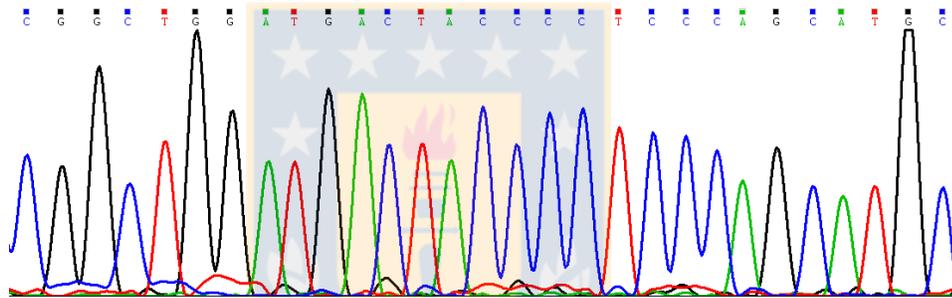
12.5.4 Secuenciación parcial del vector pcDNA3.1His B-hPRKACB1 (región 5')

atgggggggttctcatcatcatcatcatcatgggtatggctagcatgactgggtggacagcaa
 M G G S H H H H H H G M A S M T G G Q Q
 atgggtcgggatctgtacgacgatgacgataaggtacctaaggatccagtgtgggtggaat
 M G R D L Y D D D D K V P K D P V W W N
 tctgcagatatccagcacagtgccggcgcctcgcacaatggcagcttatagagaaccacct
 S A D I Q H S G G R S T M A A Y R E P P
 tgtaaccagtatacaggtacaactacagctcttcagaaattggaagggttttgctagccgg
 C N Q Y T G T T T A L Q K L E G F A S R
 ttatttcatagacactctaaaggtactgcacatgatcagaaaacagctctggaaaatgac
 L F H R H S K G T A H D Q K T A L E N D
 agccttcatttctctgaacatactgccttatgggacagatcaatgaaagagtttctagcc
 S L H F S E H T A L W D R S M K E F L A
 aaagccaaagaagactttttgaaaaaatgggagaatccaactcagaataatgccggactt
 K A K E D F L K K W E N P T Q N N A G L
 gaagattttgaaaggaaaaaaccttggaaacaggttcatttggaaagagtcaggttggta
 E D F E R K K T L G T G S F G R V M L V

aaacacaaagccactgaacagtattatgccatgaagatcttagataagcagaaggttggt
K H K A T E Q Y Y A M K I L D K Q K V V
aaactgaagcaaatagagcatactttgaatgagaaaagaatattacaggcagtgaaat
K L K Q I E H T L N E K R I L Q A V N F
cctttccttggttcgactggagtgatgcttttaaggataattctaatttatacatgggtatg
P F L V R L E Y A F K D N S N L Y M V M
gaatatgtccctgggggtgaaatgttttcacatctaagaagaattggaaggttcagtgag
E Y V P G G E M F S H L R R I G R F S E
ccccatgcacggttctatgcagctcagatagtgtaacattcgagtacctccattcacta
P H A R F Y A A Q I V L T F E Y L H S L
gacctcatctacagagatctaaaacctgaaaatctcttaattgaccatcaaggctata
D L I Y R D L K P E N L L I D H Q G Y I
caggtcacagactttgggtttgccaaaagagttaaaggg
Q V T D F G F A K R V K G

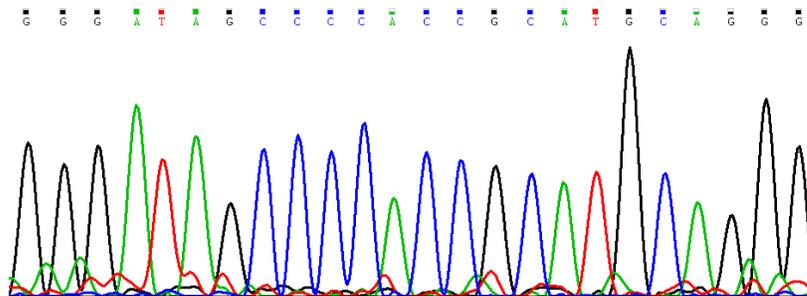
12.5.5 phRIC8B/600bp(-546)mut

5'-CGGCTGGATGACTACCcTCCCAGCATGC-3'



12.5.6 phRIC8B/600bp(-482)mut

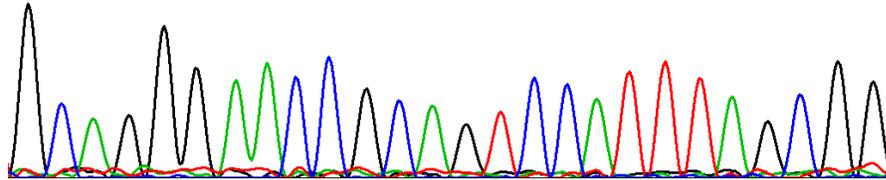
5'-GGGATAGCCCCAccGCATGCAGGG-3'



12.5.7 phRIC8B/600bp(-468)mut

5'-GCAGGGAA**ccGCAGTCCATT**AGCGG-3'

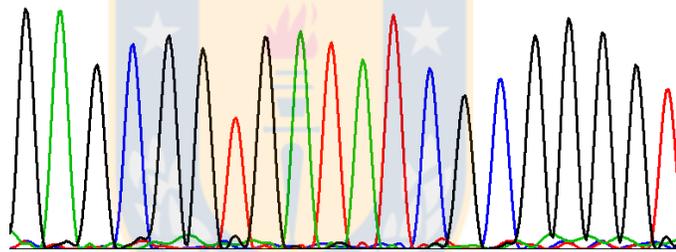
G C A G G G A A C C G C A G T C C A T T A G C G G



12.5.8 phRIC8B/600bp(-194)mut

5'-GAGCGGTG**AtaTCGCGGGG**T-3'

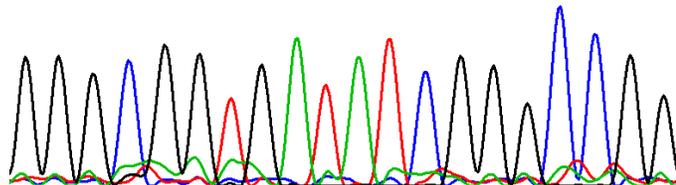
G A G C G G T G A T A T C G C G G G G T



12.5.9 phRIC8B/600bp(-164)mut

5'-GGGCGGTG**AtaTCGGGCCG**G-3'

G G G C G G T G A T A T C G G G C C G G

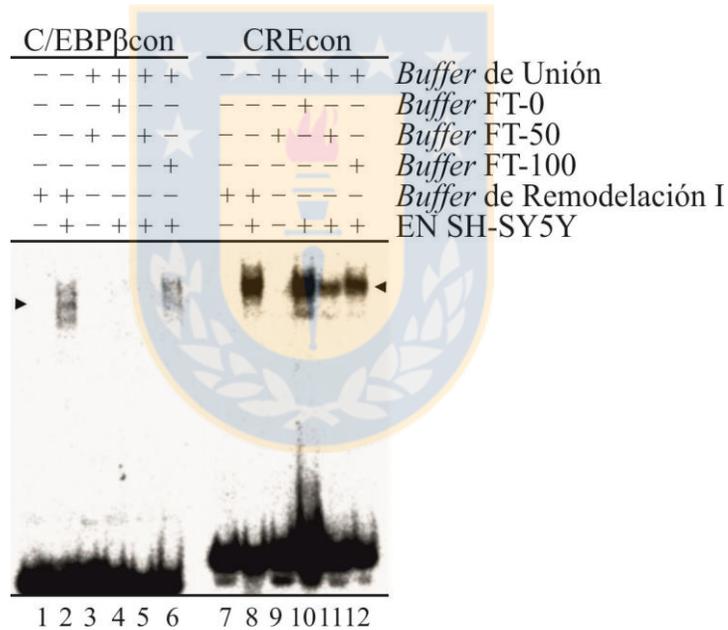


Nota: Los sitios de unión se indican en negrita, mientras en minúsculas se muestran los nucleótidos mutados.

12.6 Estandarización de los ensayos de EMSA

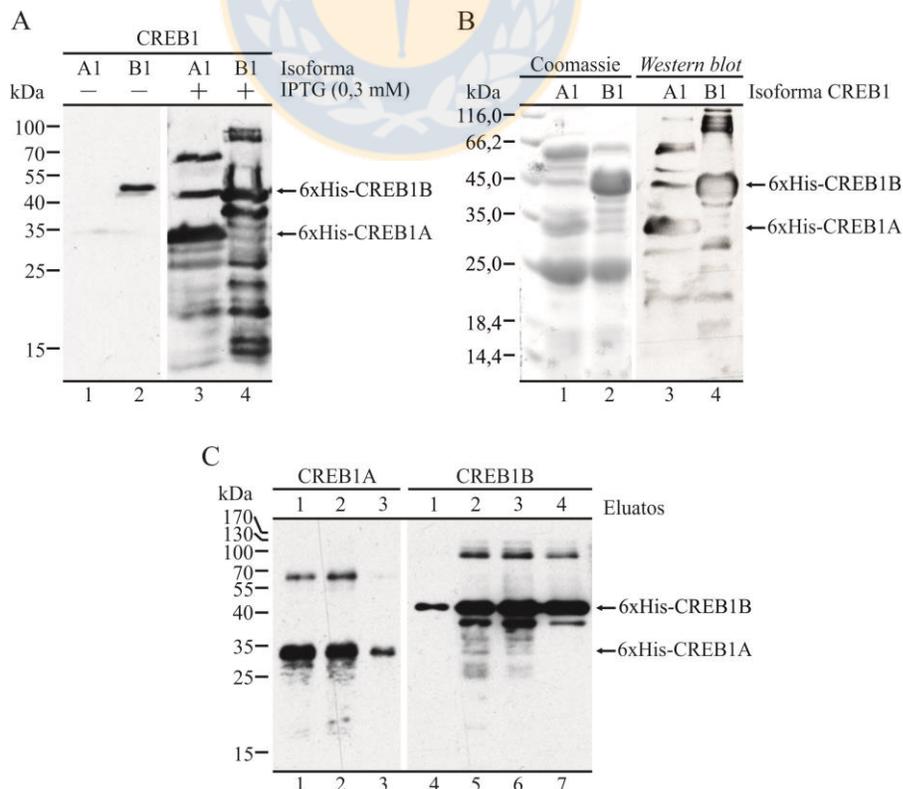
12.6.1 Estandarización de las condiciones de unión de los ensayos de EMSA empleando sondas consenso para C/EBP β y CREB.

Todas las reacciones (20 μ l final) se realizaron empleando 50 fmoles (5 μ l) de las sondas consensos para C/EBP β (C/EBP β con) y CRE (CREcon), poli dI/dC 2,5 μ g/ μ l (0,3 μ L) en presencia o ausencia del extracto nuclear de células SH-SY5Y (EN, 2 μ l). Se agregó un volumen de *buffer* de 12,7 μ l por reacción. En el caso de las reacciones con *buffer* de unión y *buffer* FT, se adicionaron 4 μ l y 8,7 μ l, respectivamente. Las cabezas de flechas indican las bandas de retardo correspondiente al complejo [sonda/FT]. Fuente: Elaboración propia.



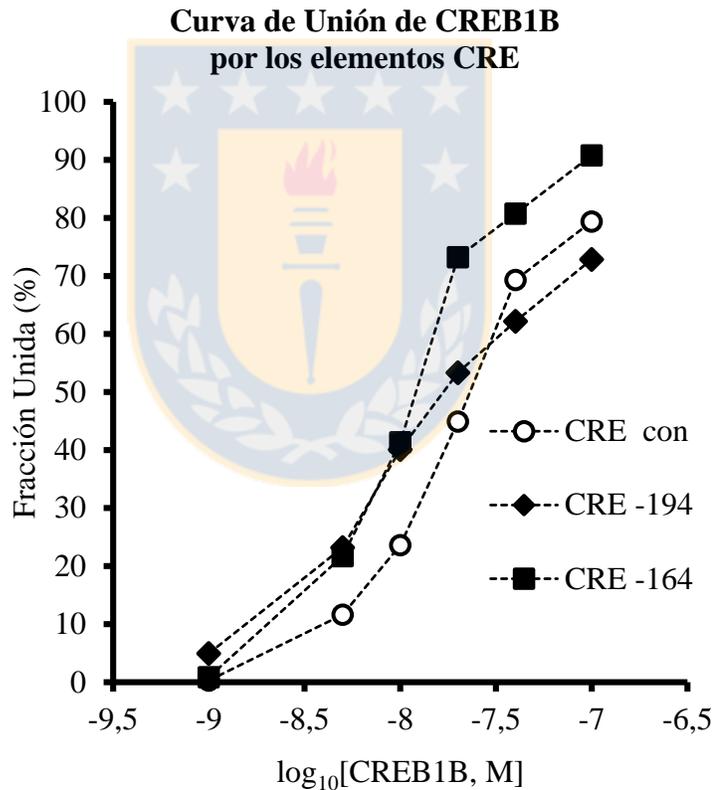
12.6.2 Expresión y purificación de CREB1 humano recombinante con epítipo de 6 histidina.

A) *Western blot* contra el epítipo de 6 histidina de los lisados bacterianos antes y después de la inducción con IPTG. Se aprecia un grado de degradación en las proteínas expresadas. B) Caracterización de las proteínas recombinantes en el lisado clarificado. Los lisados fueron tratados con RNasa A, tras lo cual se aplicó un choque térmico a 65°C por 15 minutos para finalizar con un tratamiento con DNasa I, logrando así enriquecer en la fracción soluble la proteína CREB1 termoestable, como se aprecia en la tinción con azul de Coomassie. La inmunodetección por *western blot* contra el epítipo de 6 histidina arrojó un gran número de bandas inmunoreactivas que pudieran dar cuenta de degradación. C) Análisis de los eluatos obtenidos desde la cromatografía IMAC mediante *western blot* contra el epítipo de 6 histidinas. El lavado y las eluciones fueron realizadas en condiciones desnaturalantes. Se aprecia un menor número de bandas de degradación, observándose una banda inmunoreactiva para 6xHis-CREB1B del tamaño esperado (~45 kDa), mientras que para la proteína 6xHis-CREB1A fue levemente inferior a 35 kDa. Fuente: Elaboración propia.



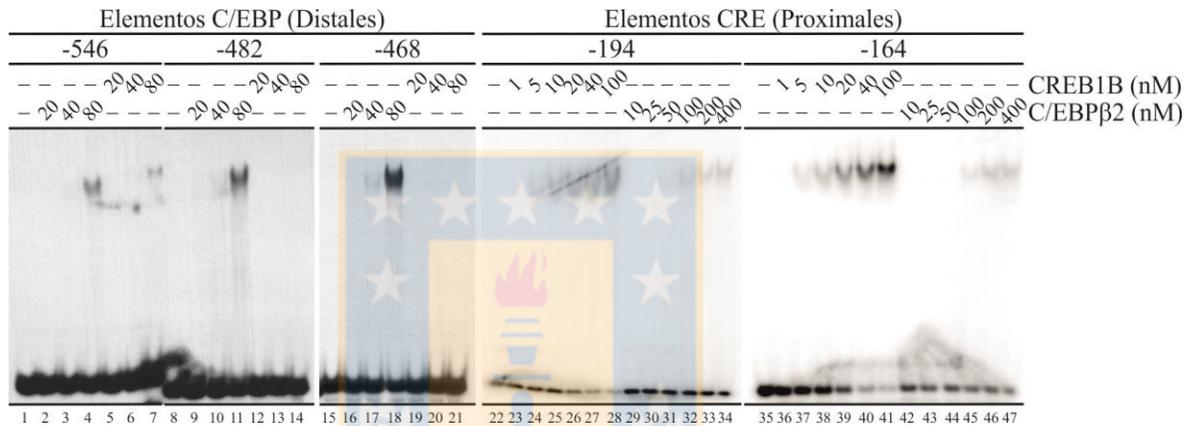
12.6.3 Cálculo de la constante de disociación aparente de CREB1B por los elementos CRE.

En un total de dos ensayos de EMSA, se determinó el porcentaje de unión (a partir de la señal de la sonda libre respecto de la señal total en el carril) para cada uno de las condiciones mediante densitometría y se graficó respecto del logaritmo de la concentración molar de factor en cada reacción, como en el gráfico adjunto. La constante de disociación se obtuvo como el valor promedio entre réplicas de la concentración necesaria para alcanzar un 50% de la unión total (IC50), ajustando los datos a una curva sigmoidea por regresión no lineal y limitada entre 0 y 100 de unión, empleando el software *Prism* (GraphPad). Fuente: Elaboración propia.



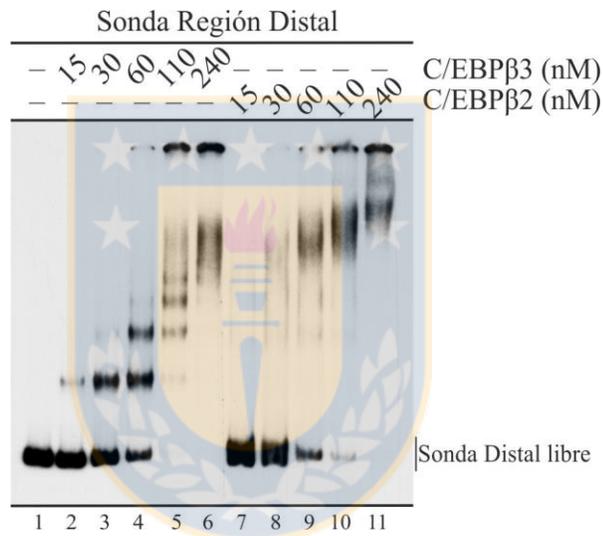
12.6.4 Ensayo de EMSA para las sondas que contienen los elementos CRE y C/EBP del promotor de *RIC8B* en presencia de los factores de transcripción recombinantes CREB1B y C/EBP β 2.

El ensayo fue realizado en las mismas condiciones que las indicadas en la figura 12. Se aprecia la unión de C/EBP β 2 a los elementos CRE a concentraciones mucho más altas que las necesarias para observar la unión de CREB1B. También se observa que a concentraciones muy altas, CREB1B se une al elemento C/EBP -546 (carril 7). Fuente: Elaboración propia.



12.6.5 Ensayo de EMSA para la sonda distal del promotor de *RIC8B* en presencia de los factores de transcripción recombinantes C/EBP β 3 y C/EBP β 2.

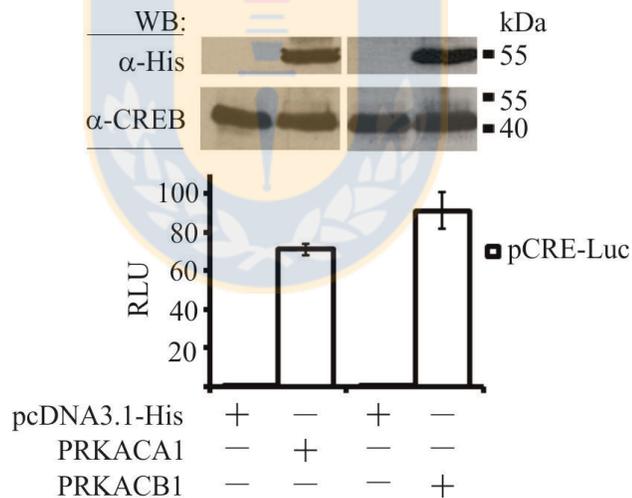
El ensayo fue realizado en las mismas condiciones que las indicadas en la figura 13. Se aprecia que la afinidad de C/EBP β 3 por la sonda distal es mayor que la de la isoforma 2 (comparar el carril 5 versus el carril 10). Los patrones obtenidos con C/EBP β 3 fueron diferentes a los observados con C/EBP β 2. Esto parece atribuible al menor tamaño de la isoforma 3, lo que resultaría en complejos de mayor movilidad electroforética, complejos que en el caso de contener C/EBP β 2 no pudieron ser resueltos eficientemente en la condiciones de electroforesis usadas. Fuente: Elaboración propia.



12.7 Estandarización de los ensayos de actividad luciferasa

12.7.1 Las sobreexpresión de las subunidades catalíticas de PKA producen una fuerte activación transcripcional de un promotor con elementos CRE y caja TATA.

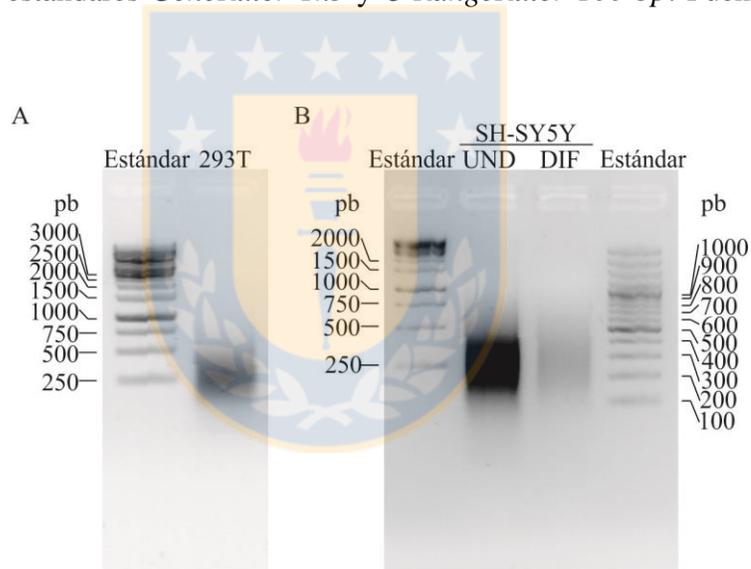
Se realizaron ensayos de actividad luciferasa empleando el vector pCRE-Luc (Clontech) el cual codifica el gen reportero luciferasa bajo el control de un promotor sintético que contiene 2 elementos CRE río arriba del promotor mínimo del gen que codifica para la enzima timidilato quinasa del virus de Herpes simple (HSV-TK) y que posee una caja TATA. Este vector responde positivamente a la fosforilación de CREB en su serina 133, por ejemplo al activar la vía dependiente de cAMP. Como se aprecia en la figura, la sobreexpresión de ambas subunidades catalíticas de PKA (PRKACA1 y PRKACB1) en células HEK293T produce una fuerte activación transcripcional del promotor sintético. Mediante *western blot* contra el epítipo de 6 histidinas corroboramos la expresión de ambas proteínas. Fuente: Elaboración propia.



12.8 Estandarización de los ensayos de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP).

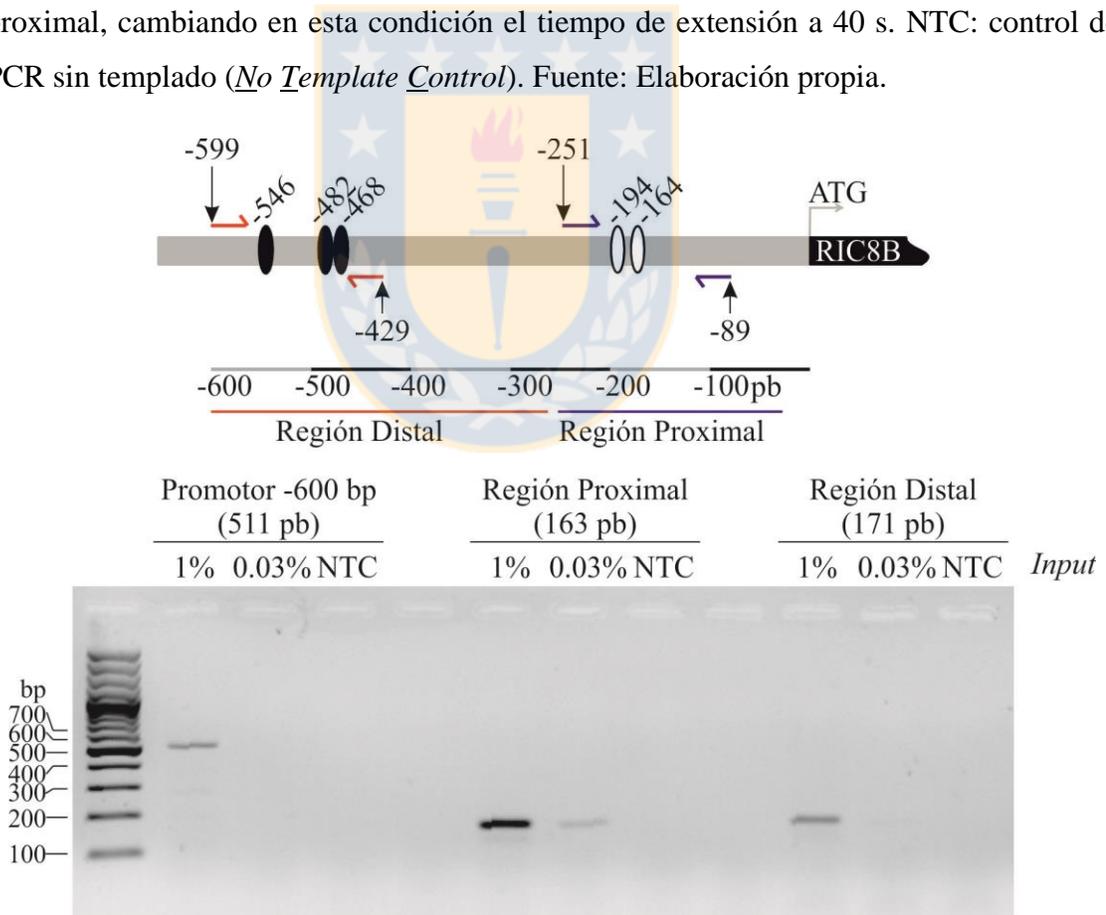
12.8.1 Análisis del tamaño de los fragmentos de DNA obtenidos desde la cromatina sonicada.

Posterior a la cavitación por ultrasonido (sonicación) de la cromatina y desentrecruzamiento, los fragmentos de DNA obtenidos fueron resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en *buffer* TAE 0,5×. A) Muestra de DNA desde cromatina sonicada desde células HEK293T sin transfectar (293T). B) Muestras de DNA obtenido desde cromatina sonicada desde células SH-SY5Y indiferenciadas (UND) y diferenciadas a células tipo neurona (DIF). Como estándares de tamaño de DNA se emplearon los estándares *GeneRuler 1kb* y *O'RangeRuler 100 bp*. Fuente: Elaboración propia.



12.8.2 Los fragmentos de cromatina presentan una pequeña fracción de fragmentos que abarcan ambas regiones analizadas del promotor de *RIC8B* humano.

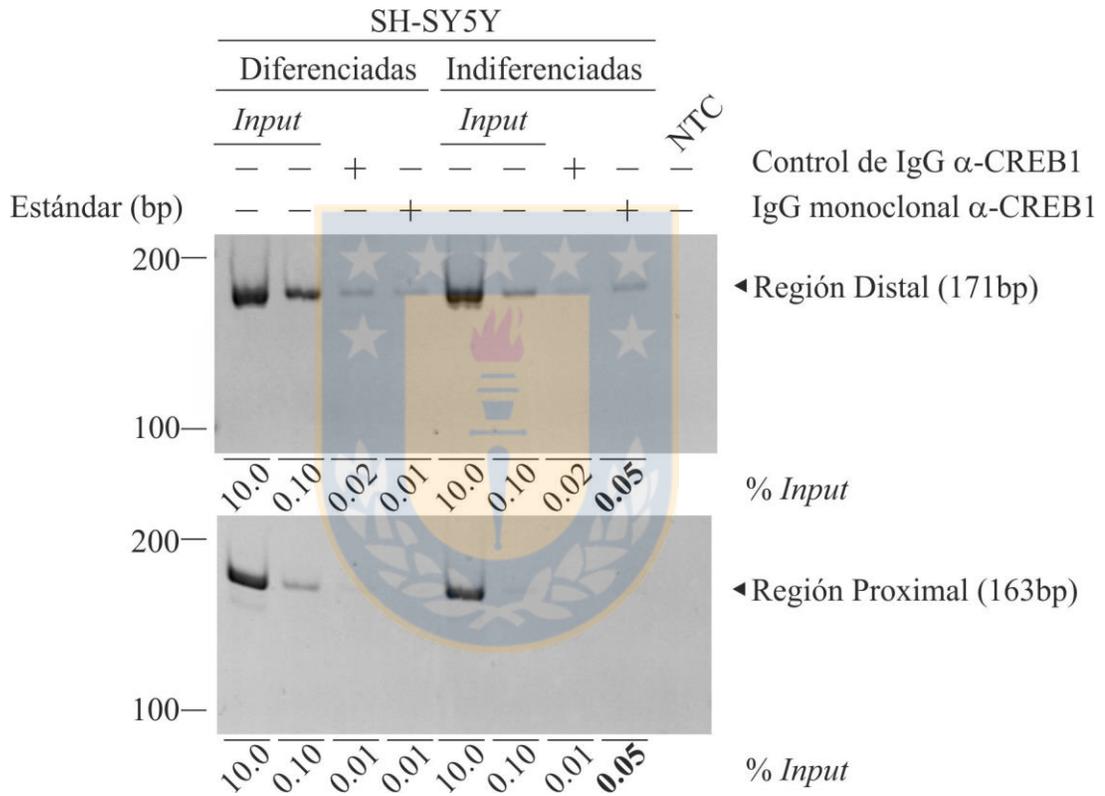
Para determinar la proporción de fragmentos de cromatina que contienen ambas regiones del promotor respecto de aquellos que contienen sólo una región del promotor (que son nuestros fragmentos de interés), realizamos PCR en las mismas condiciones en la que se analizaron los inmunoprecipitados, empleando como templado el DNA obtenido desde la purificación de los fragmentos de DNA del material de entrada de las inmunoprecipitaciones (*Input*) y como partidores aquellos utilizados para detectar los elementos distales (Región Distal, flechas rojas) o proximales (Región Proximal, flechas azules) del promotor, además de una reacción que incluyó el partidior sentido de amplificación de la región distal y el partidior antisentido de amplificación de la región proximal, cambiando en esta condición el tiempo de extensión a 40 s. NTC: control de PCR sin templado (*No Template Control*). Fuente: Elaboración propia.



12.8.3 La disminución en la expresión del mRNA de *RIC8B* durante la diferenciación de células SH-SY5Y, se correlaciona con la disociación de CREB1 desde promotor del gen.

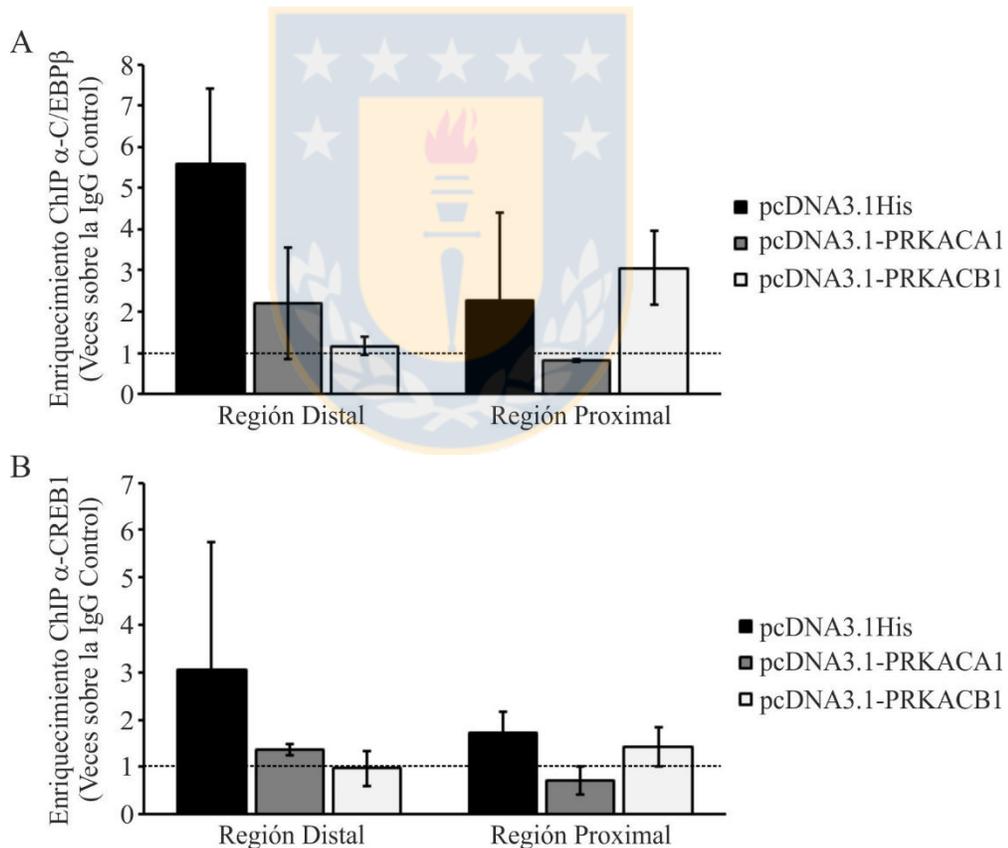
Ensayo de CHIP contra el factor de transcripción CREB1 en células SH-SY5Y indiferenciadas y diferenciadas (al 5° día de incubación *in vitro*). Se empleó 1 µg de cromatina (como unidades de absorbancia a 260 nm) por reacción de inmunoprecipitación.

Fuente: Elaboración propia.



12.8.4 Análisis del enriquecimiento en la unión de CREB1 y C/EBP β al promotor del gen *RIC8B* humano mediante ChIP en células HEK293T.

Los resultados de los ensayos de ChIP contra ambos factores de transcripción en las distintas condiciones de sobreexpresión de las subunidades catalíticas de la quinasa PKA fueron analizados mediante densitometría (*QuantityOne*, BioRad) de las bandas correspondiente a la amplificación mediante PCR convencional de las regiones distal y proximal de promotor de *RIC8B*. Los gráficos muestran el enriquecimiento promedio (como veces sobre la señal obtenida para la IgG Control) entre todas la réplicas biológicas. A) Enriquecimiento del factor de transcripción CREB1. B) Enriquecimiento para el factor de transcripción C/EBP β . Las barras de error indican el error estándar (SEM) entre dos réplicas biológicas de inmunoprecipitación. Fuente: Elaboración propia.



13 Anexo

13.1 Valores de unión de CREB y CREB fosforilado al promotor de *RIC8B* humano obtenidos desde el análisis de *ChIP-on-chip* en células HEK293T.

El análisis genómico masivo descrito por el grupo de Marc Montminy [Fuente: (Zhang, et al., 2005)] fue realizado en células HEK293T en condiciones basales o de estimulación de la producción de cAMP por incubación con forskolina a distintos tiempos. La sonda empleada fue diseñada dentro de la región de 1 kb definida como el promotor (entre los nucleótidos -750 y +250 respecto del origen de la transcripción). Los autores consideraron al gen como uno regulado por CREB si el valor de unión obtenido de unión fue ≥ 2 y el valor $P \leq 0.001$. Sin embargo, los mismos autores indican que si un gen presenta un valor de unión entre 1,5 y 2 existe una alta probabilidad de que sea un gen blanco de CREB, sobre todo si presenta sitios CRE de alta identidad. Los autores recomiendan entonces evaluar mediante ChIP-PCR la unión de CREB a este tipo de genes, como es el caso del gen *RIC8B* (*hSyn*). En la tabla además se indican los valores de unión para otros genes:

- 1) Dos genes blancos de CREB conocidos, con unión entre 1,5 y 2.
 - 1.1) *C-FOS* (*FOSB*) (Roccio *et al.*, 2006, Ahn *et al.*, 1998, Berkowitz *et al.*, 1989)
 - 1.2) *C/EBP β* (*CEBPB*) (Niehof *et al.*, 1997)
- 2) Un gen blanco de CREB, con un valor de unión de CREB muy alto.
 - 2.1) *PCNA* (Lee *et al.*, 1997)
- 3) Un gen que no mostró unión de CREB, pero que en la misma publicación mostró unión de CREB mediante ChIP-PCR.
 - 3.1) *Nr4a2* (*Nurr1*) (Impey *et al.*, 2004)

Incubación con forskolina	ChIP-on-chip contra CREB				ChIP-on-chip contra CREB fosforilado (pS133)			
	0 horas		4 horas		0 horas		4 horas	
	Valor <i>P</i>	Valor de Unión	Valor <i>P</i>	Valor de Unión	Valor <i>P</i>	Valor de Unión	Valor <i>P</i>	Valor de Unión
RIC8B	1,3E-03	1,8	1,5E-02	1,6	3,0E-02	1,3	4,1E-03	1,6
FOS	7,2E-01	0,8	3,1E-01	1,1	6,2E-01	0,9	3,5E-01	1,1
CEBPB	1,4E-02	1,5	2,9E-02	1,5	3,9E-02	1,3	6,4E-02	1,3
PCNA	2,9E-11	7,2	1,4E-8	5,9	2,2E-11	3,9	6,6E-12	6,1
NR4A2	---	---	---	---	3,2E-1	1,1	---	---

13.2 Publicaciones

13.2.1 Publicación generada a partir de esta Tesis Doctoral.

Maureira, A., Sánchez, R., Valenzuela, N., Torrejón, M., Hinrichs, M. V., Olate, J., y Gutiérrez, J. L. (2016). The CREB Transcription Factor Controls Transcriptional Activity of the Human RIC8B Gene. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117(8): 1797-1805. DOI: 10.1002/jcb.25479.

13.2.2 Otras publicaciones generadas durante la permanencia en el programa de Doctorado en Ciencias Biológicas área Biología Celular y Molecular.

Fuentealba, J., Toro-Tapia, G., Rodriguez, M., Arriagada, C., Maureira, A., Beyer, A., Villaseca, S., Leal, J. I., Hinrichs, M. V., Olate, J., Caprile, T., Torrejón, M. (2016). *Gene Expression Patterns*, 22(1): 15:25. DOI: 10.1016/j.gep.2016.09.001.

13.2.3 Presentaciones a Congresos Internacionales durante la permanencia en el programa de Doctorado en Ciencias Biológicas área Biología Celular y Molecular.

Characterization of CREB and C/EBP β binding sites in human RIC-8B gene promoter. Maureira, A. S., Sánchez, R. A., Hinrichs, M. V., Olate, J. A., Gutiérrez, J. L. Meeting on Mechanisms of Eukaryotic Transcription, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA. 27 al 31 de agosto de 2013.

The transcription factor CREB binds to the proximal region of the human Ric-8b promoter. Maureira, A., Torrejon, M., Hinrichs, M. V., Gutierrez, J. L., Olate, J. Cell Signaling Networks Conference, Mérida, México, 22 al 27 de octubre de 2011.

The activity of the human Ric-8b promoter is repressed in response to cAMP. Maureira, A., Grandy, R., Hinrichs, M. V., Olate, J. EMBO Meeting 2010 Barcelona, España. 4 al 7 de septiembre de 2010.

13.2.4 Presentaciones a Congresos Nacionales durante la permanencia en el programa de Doctorado en Ciencias Biológicas área Biología Celular y Molecular.

Human RIC8B Gene Expression Is Downregulated by PKA Activation and Cell Differentiation Through CREB and CEBPB Transcription Factors. Maureira, A. S., Sánchez, R. A., Hinrichs, M. V., Olate, J. A., Gutiérrez, J. L., Torrejón M. XXIX Reunión anual de la Sociedad de Biología Celular de Chile. Puerto Varas, Chile. 25 al 29 de octubre de 2015.

Biochemical and Functional Analysis of CREB and C/EBP β binding sites in the human RIC-8B gene promoter. Maureira, A. S., Sánchez, R. A., Hinrichs, M. V., Olate, J. A., Gutiérrez, J. L. XII Meeting of Pan American Biochemistry & Molecular Biology Societies, Puerto Varas, Chile. 9 al 14 de noviembre de 2013.

