



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Magíster en Bioquímica y  
Bioinformática

**Efecto de variaciones de distancia entre elementos  
regulatorios en el ADN sobre la dinámica de remodelación  
nucleosomal**

Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

CRISTIÁN ALFREDO GIDI FAÚNDEZ  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2016

Profesor Guía: 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.

Profesor tutor

---

Dr. José L. Gutiérrez Contreras  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

---

Dra. Violeta Marilyn Morín Muñoz  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. Fernando Antonio Cruzat Cruzat  
Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción

Director de Programa

---

Dra. Violeta Marilyn Morín Muñoz  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Tesis de Magíster financiada por:

*Proyectos:*

Fondecyt 1130818.

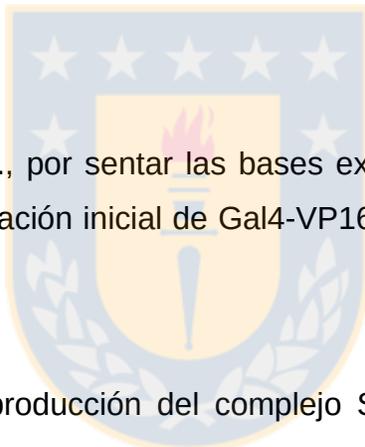
*Becas:*

Escuela de Graduados, Universidad de Concepción.



## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

- A CONICYT por el financiamiento otorgado por el proyecto CONICYT, FONDECYT/Regular 1130818.
- Al Dr. José Leonardo Gutiérrez, investigador principal del Laboratorio de Regulación Transcripcional, por más razones de las que es posible enumerar aquí.
- Al Dr. Matías Hepp, por su invaluable guía y perspectiva durante mi formación de magíster y la generación de los plásmidos, producción de oligonucleosomas cortos y largos y la generación de los protocolos de marcaje radioactivo utilizados en el desarrollo de esta tesis.
- A Valentina Alarcón, M.Sc., por sentar las bases experimentales sobre las que se funda este trabajo, la purificación inicial de Gal4-VP16 y las bacterias recombinantes utilizadas.
- A Axel Arriagada por la producción del complejo SWI/SNF de levadura utilizado durante este trabajo.
- Al Laboratorio de Regulación Transcripcional y todos sus integrantes, presentes y pasados, por la colaboración académica.
- A las Dras. Marta Bunster Balocchi y Violeta Morín, directoras del programa de Magíster en Bioquímica y Bioinformática durante mi estadía en el mismo.

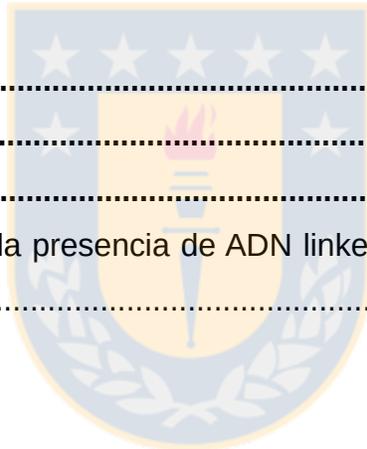


## TABLA DE CONTENIDOS.

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Compactación de ADN en el núcleo eucarionte. Estructura y organización de cromatina.....	1
1.2 Remodelación de cromatina ATP-dependiente.....	4
1.3 Posicionamiento nucleosomal y su rol en la regulación de la expresión génica	6
1.4 Polimorfismos de inserción/delección: Su distribución en el genoma humano y posibilidades para la alteración de la expresión génica.....	10
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:.....</b>	<b>13</b>
2.1 Hipótesis:.....	13
2.2 Objetivo general:.....	13
2.3 Objetivos específicos:.....	13
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
3.1 Generación de probadores mononucleosomales con variaciones de longitud del extremo 3'.....	14
3.1.1 Marcaje radioactivo de los partidores.....	14
3.1.2 PCR radioactiva.....	15
3.1.3 Reconstitución de probadores mononucleosomales a partir de las sondas radioetiquetadas.....	19
3.2 Generación de probadores mononucleosomales para las variaciones de extensión entre el nucleosoma posicionado y el sitio de unión para Gal4.....	21
3.2.1 Marcaje radioactivo de los partidores.....	23

3.2.2 PCR radioactiva.....	23
3.2.3 Reconstitución de probadores mononucleosomales a partir de las sondas marcadas.....	24
3.3 Expresión y purificación del factor de transcripción quimérico Gal4-VP16.....	25
3.3.1 Expresión, lisis y purificación por afinidad de Gal4-VP16.....	25
3.3.2 Análisis de la purificación de Gal4-VP16.....	26
3.4 Ensayos de unión de la proteína Gal4-VP16, reclutamiento del complejo SWI/SNF por Gal4-VP16 y desplazamiento en <i>trans</i> del octámero a los probadores mononucleosomales marcados.....	28
3.4.1 Ensayos de unión de Gal4-VP16 a los probadores:.....	28
3.4.2 Ensayos de reclutamiento ( <i>targeting</i> ) del complejo SWI/SNF por Gal4- VP16 a los probadores nucleosomales.....	29
3.4.3 Ensayos de remodelación de cromatina (desplazamiento en <i>trans</i> del octámero o <i>eviction</i> ) por el complejo SWI/SNF sobre los probadores mononucleosomales.....	29
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
4.1 Generación de probadores mononucleosomales para las variaciones de longitud del extremo 3'.....	31
4.2 Expresión y purificación del factor de transcripción quimérico Gal4-VP16.....	33
4.3 Ensayos de unión de la proteína Gal4-VP16, reclutamiento del complejo SWI/SNF por Gal4-VP16 y desplazamiento en <i>trans</i> del octámero para los probadores nucleosomales marcados con variaciones de extensión del ADN corriente abajo del sitio Gal4.....	34
4.3.1 Efecto de variaciones en la extensión del ADN corriente abajo del sitio de unión de Gal4 sobre la unión del factor de transcripción Gal4-VP16 y el reclutamiento de $\gamma$ SWI/SNF a los probadores mononucleosomales.....	34
4.3.2 Ensayos de remodelación de cromatina (desplazamiento en <i>trans</i> del octámero o <i>eviction</i> ) por el complejo SWI/SNF sobre los probadores mononucleosomales.....	38

4.4 Ensayos de unión de la proteína Gal4-VP16, reclutamiento del complejo SWI/SNF por Gal4-VP16 y desplazamiento en <i>trans</i> del octámero a los probadores mononucleosomales marcados (variaciones de extensión entre el nucleosoma posicionado y el sitio de unión Gal4).....	43
4.4.1 Efecto de variaciones en la extensión del ADN entre un nucleosoma posicionado y el sitio de unión de Gal4 sobre la unión del factor de transcripción Gal4-VP16 y el reclutamiento de ySWI/SNF a los probadores mononucleosomales.....	43
4.4.2 Ensayos de remodelación de cromatina (desplazamiento en <i>trans</i> del octámero o <i>eviction</i> ) por el complejo SWI/SNF sobre los 15 probadores mononucleosomales.....	46
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>51</b>
<b>6. REFERENCIAS.....</b>	<b>58</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>65</b>
Anexo 1: Relación entre la presencia de ADN linker y la afinidad de SWI/SNF por el nucleosoma.....	65



## ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1:</b> Niveles de compactación de la cromatina.....	3
<b>Figura 2:</b> Consecuencias de la remodelación de cromatina ATP-dependiente.....	5
<b>Figura 3:</b> Mecanismo propuesto para el cambio en la consecuencia del proceso de remodelación de cromatina ATP-dependiente al reclutarse un complejo por un factor de transcripción con respecto a lo que se observa al unirse de forma inespecífica al nucleosoma.....	7
<b>Figura 4:</b> Organización consenso de nucleosomas en genes de levadura.....	8
<b>Figura 5:</b> Esquema de la reconstitución de mononucleosomas por transferencia de octámero.....	20
<b>Figura 6:</b> Marcaje de sondas y reconstitución de mononucleosomas para evaluación del efecto del ADN corriente abajo del sitio Gal4 sobre la remodelación de cromatina ATP-dependiente por el complejo SWI/SNF.....	32
<b>Figura 7:</b> Curva de BSA para cuantificación de la purificación de Gal4-VP16. MW: Marcador de peso molecular.....	33
<b>Figura 8:</b> Efecto de la extensión del ADN corriente abajo del sitio de unión de Gal4 sobre el binding de Gal4-VP16 a los probadores mononucleosomales.....	36
<b>Figura 9:</b> Reclutamiento de $\gamma$ SWI/SNF por Gal4-VP16 a los probadores mononucleosomales.....	37
<b>Figura 10:</b> Ensayo de remodelación de cromatina (desplazamiento en trans del octámero o eviction) por el complejo SWI/SNF sobre los probadores	

mononucleosomales.....	40
<b>Figura 11:</b> Cuantificación de grado de eviction para los probadores nucleosomales. .....	41
<b>Figura 12:</b> Comparación del grado de eviction para los probes mononucleosomales utilizando dos complejos $\gamma$ SWI/SNF purificados por dos laboratorios diferentes.....	42
<b>Figura 13:</b> Unión de Gal4-VP16 a los 15 probadores mononucleosomales marcados. .....	44
<b>Figura 14:</b> Reclutamiento de $\gamma$ SWI/SNF por Gal4-VP16 a los probadores mononucleosomales con distintas distancias entre el nucleosoma posicionado y el sitio Gal4.....	45
<b>Figura 15:</b> Ensayo de remodelación de cromatina (desplazamiento en trans del octámero o eviction) por el complejo SWI/SNF sobre los probadores mononucleosomales.....	48
<b>Figura 16:</b> Cuantificación del grado de eviction para los 15 probadores mononucleosomales.....	49
<b>Figura 17:</b> Ensayo de remodelación de cromatina (desplazamiento en trans del octámero o eviction) por el complejo SWI/SNF sobre para los 4 probadores seleccionados.....	50

## ÍNDICE DE TABLAS.

**Tabla 1:** Oligonucleótidos y productos generados para obtención de probadores mononucleosomales a usarse para la determinación del efecto de la modificación de las distancias entre el extremo 3' y el sitio de unión de Gal4.....16

**Tabla 2:** Moléculas de ADN generadas para obtención de probadores mononucleosomales a usarse en la determinación del efecto de la variación de las distancias entre la secuencia posicionadora 601 y el sitio de unión de Gal4.....22



## ABREVIATURAS.

**A:** Adenina

**AA:bis:** Acrilamida:bisacrilamida

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ANOVA:** *Analysis of Variance* (Análisis de varianza)

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ATP:** Adenosina trifosfato

**BCFR:** Buffer de condiciones finales de reconstitución

**BSA:** Albúmina de suero bovino

**C:** Citosina

**CHD:** *Chromodomain, Helicase, DNA binding*

**Ci:** Curie

**CI:** *Confidence Interval* (Intervalo de confianza)

**CRE:** *cis regulatory element* (Elemento regulatorio en *cis*)

**dNTP:** Desoxinucleótido trifosfato

**DBP:** *DNA binding protein*, Proteína de unión a ADN

**DTT:** Ditiotreitól

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**EGTA:** Ácido tetraacéticoetilenglicol

**EtOH:** Alcohol etílico

**G:** Guanina

**H1:** Histona 1

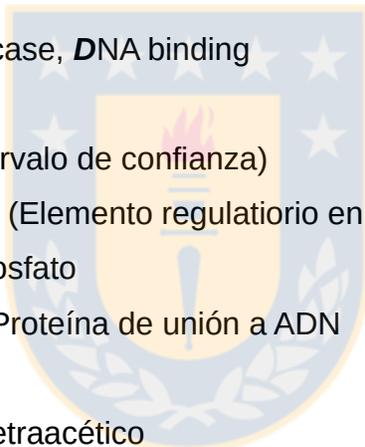
**H2a:** Histona 2a

**H2b:** Histona 2b

**H3:** Histona 3

**H4:** Histona 4

**INDEL:** Polimorfismo de inserción o delección



**INO80:** *Inositol*-requiring **80**

**IPTG:** Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido **ISWI:** *Imitation switch*

**LB:** Medio Luria Bertani

**LON:** *Long Oligonucleosomes* (Oligonucleosomas largos)

**Mb:** Megabase (1000000 pares de bases de ADN)

**NFR:** *Nucleosome Free Region* (Región libre de nucleosomas)

**pb:** Par de bases de ADN

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)

**PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

**SDS:** Dodecilsulfato sódico

**SNP:** *Single nucleotide polymorphism* (Polimorfismo de nucleótido único)

**SON:** *Short Oligonucleosomes* (Oligonucleosomas cortos)

**SWI/SNF (y ySWI/SNF):** *Switching defective/Sucrose Non-Fermentative*

**T:** Timina

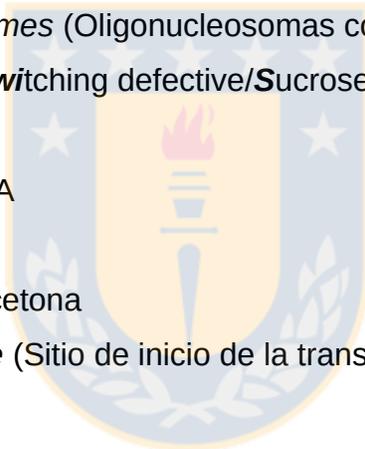
**TBE:** Tris-Ácido bórico-EDTA

**TE:** Tris-EDTA

**TPCK:** Fenilalanilclorometilcetona

**TSS:** *Transcription Start Site* (Sitio de inicio de la transcripción)

**U:** Unidad enzimática



## RESUMEN.

La dinámica de la cromatina es fundamental para la regulación de la expresión genética en organismos eucariontes y los complejos remodeladores de cromatina ATP-dependientes cumplen un importante rol en ésta. El complejo SWI/SNF de levadura fue el primero de ellos en ser caracterizado y posee diversas actividades de remodelación; entre ellas el desplazamiento en *trans* de los nucleosomas (*nucleosome eviction*), el cual está vinculado a activación transcripcional en muchos genes, desde levaduras a humanos. Nuestro laboratorio ha demostrado previamente que la actividad en el complejo SWI/SNF se ve estimulada cuando éste es reclutado hacia un nucleosoma por un factor de transcripción. El presente trabajo está enmarcado en el contexto de comprender los efectos que pequeños polimorfismos de inserción/delección (INDELS) que aparezcan en los promotores de genes puedan tener sobre la actividad catalítica del complejo SWI/SNF de levaduras por medio de la alteración de la posición y/o fase rotacional que éste pueda adoptar sobre el ADN con respecto a un nucleosoma posicionado luego de ser reclutado por un factor de transcripción.

Con este propósito se llevaron a cabo ensayos de remodelación de cromatina utilizando diferentes mononucleosomas reconstituidos *in vitro*, los cuales difieren en el número de pares de bases que se encuentran entre un octámero de histonas posicionado y un sitio de unión para el factor de transcripción Gal4. Se probaron 15 mononucleosomas distintos que poseían una distancia entre el octámero y el sitio de unión del factor de transcripción de entre 8 y 22 nucleótidos. Estos ensayos de remodelación fueron resueltos por medio de análisis electroforético en geles no-denaturantes.

No fueron observadas diferencias en la unión de Gal4-VP16 ni en el reclutamiento del complejo SWI/SNF por este factor de transcripción a los diferentes probadores mononucleosomales. No obstante, al probar el grado de actividad de *eviction* del complejo mediado por Gal4-VP16 se observaron rangos de distancia con actividad máxima y mínima. Estos resultados podrían apuntar a un nuevo mecanismo ligado a la dinámica de cromatina en donde ADN, factores de transcripción y complejos remodeladores jugarían un rol combinado.



## ABSTRACT.

Chromatin dynamics is fundamental for gene regulation in eukaryotic genomes and ATP-dependent remodeling complexes play an important role in it. The yeast SWI/SNF complex is the first characterized remodeling complex and has several remodeling activities; among them is nucleosome displacement in *trans* (nucleosome eviction), which is connected to transcription initiation in several genes from yeast to humans. We have previously shown that this activity is enhanced in SWI/SNF when recruited to a nucleosome by a transcription factor. The present work is in the context of understanding the effects that small insertions and deletions occurring at gene promoters can have on the catalytic activity of SWI/SNF by altering the position and/or the rotational phase taken by the complex on DNA respect to a positioned nucleosome after recruitment by a transcription factor.

0

With this purpose we carried out remodeling assays using different mononucleosomes reconstituted *in vitro*, which vary in the number of base pairs between a positioned histone octamer and a binding site for the transcription factor Gal4. We tested 15 different mononucleosomes having an “octamer to binding site” distance ranging from 8 to 22 bp. Our remodeling assays were visualized through electrophoretic analysis on non-denaturing gels. We did not observe differences in the binding activity of the transcription factor Gal4-VP16 nor in the recruitment of SWI/SNF to the nucleosome mediated by this transcription factor to the different probes. However, when testing SWI/SNF nucleosome eviction activity under recruitment by Gal4-VP16, we observed distance ranges with maximal and minimal nucleosome eviction. Our results point to a new mechanism linked to chromatin dynamics where DNA, transcription factors and chromatin remodeling complexes would play a combined role.

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1 Compactación de ADN en el núcleo eucarionte. Estructura y organización de cromatina

Los genomas eucariontes están altamente condensados dentro de los núcleos de las células. El nivel de compactación del material está en el orden de las  $2 \times 10^4$  veces, permitiendo así que un largo total de aproximadamente 2m de ADN pueda caber en un volumen de núcleo de cerca de  $10^{-5}$  m, en el caso de *Homo sapiens* (Becker y Längst 2004).

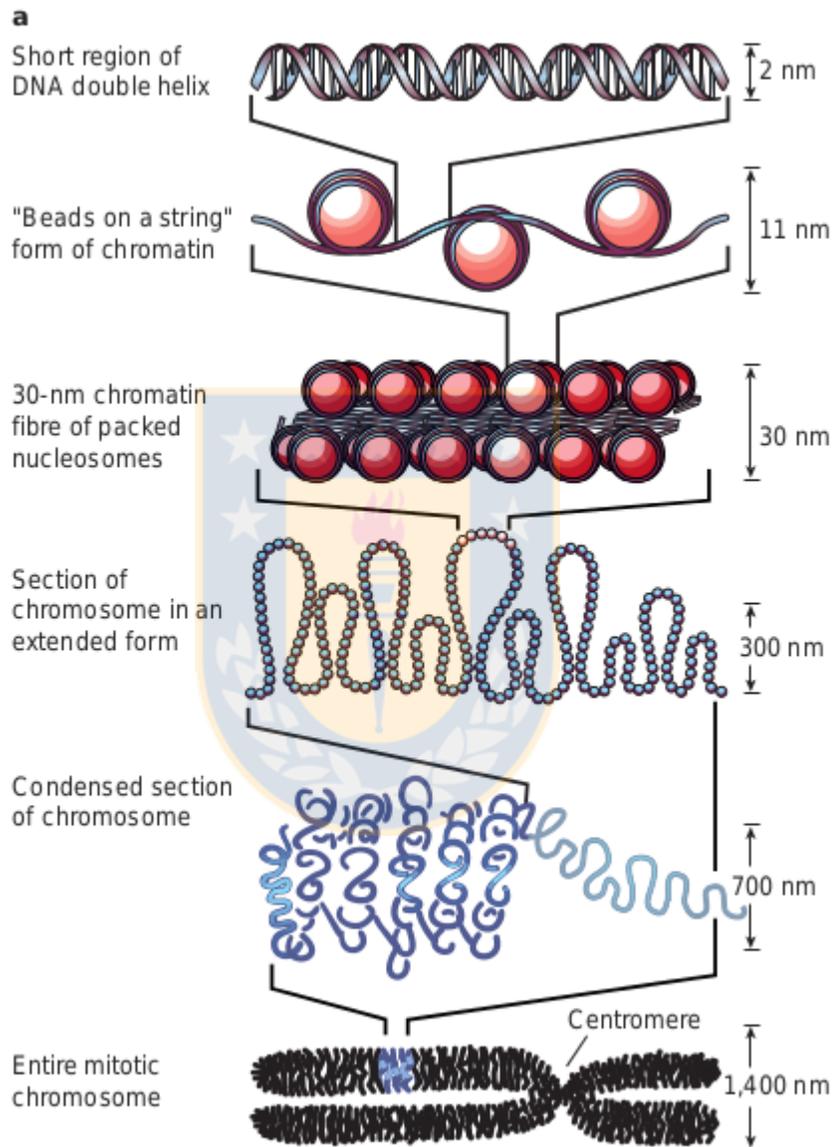
El máximo nivel de compactación del material genético dentro del núcleo de las células eucariontes es el cromosoma metafásico, un ensamblaje nucleoproteico de aproximadamente  $1,5 \mu\text{m}$  de anchura, considerando ambas cromátidas hermanas (Wolffe 1998), el cual a su vez está compuesto de múltiples plegamientos de una estructura fibrilar de 300 a 700nm de diámetro (cromátida). Esta estructura fibrilar se compone de conjuntos de fibras de cromatina unidos a proteínas de andamiaje (*scaffold*) en la forma de una estructura de aproximadamente 130nm (Németh y Längst 2004).

Bajo este nivel de compactación se encuentra la denominada *fibra de 30nm*, compuesta de arreglos de nucleosomas unidos por la histona *linker* (H1) y para su estructura se han propuesto dos modelos; el de solenoide (Finch y Klug 1976, Bartolomé y cols 1994) y el modelo de *zig-zag* (Woodcock y cols 1984). Aún existe discusión sobre la estructura *in-vivo* de la fibra de 30nm (Maeshima y cols 2010) e incluso de su existencia en condiciones fisiológicas (Fussner y cols 2011), lo que sugiere que la fibra de 30nm, de existir *in-vivo*, es una estructura altamente dinámica y sujeta a reestructuraciones y alteraciones en distintas condiciones fisiológicas.

El nivel más básico de compactación del ADN se encuentra bajo el nivel de la fibra de 30nm, en un empaquetamiento de ADN y proteínas denominado nucleosoma. El nucleosoma es una partícula de aproximadamente 200pb de ADN (Hewish y Burgoyne 1973) enrollados sobre un octámero de proteínas alcalinas llamadas histonas en arreglos unidos por ADN linker y la histona H1 (Thoma y Koller 1977) generando una disposición tipo “*collar de cuentas*” (*beads on a string*) (Kornberg 1974, Chambon 1975). Estas proteínas del octámero, denominadas H2A, H2B, H3 y H4, se encuentran organizadas en un tetrámero de H3 y H4 en su porción central y dos dímeros H2A y H2B en posición periférica (Ramakrishnan 1997) (Figura 1).

El ADN se pliega alrededor de este octámero de histonas interaccionando con el surco menor de la doble hebra en una periodicidad de 10,17pb sobre la superficie del nucleosoma, resultando en un total de 147pb enrollados sobre el octámero de histonas en 1,67 vueltas de la hebra, formando así el llamado “*core nucleosomal*”. Así, se observan cerca de 14 regiones de interacción de las histonas con el ADN en cada nucleosoma, todas de tipo no-covalente (Richmond y Davey 2003).

Este nivel de compactación hace que se dificulte el acceso al material genético por parte de la maquinaria transcripcional, lo cual hace generalmente necesario un evento de remodelación de la cromatina previo a la activación de la transcripción. La remodelación de la cromatina permite el acceso al ADN por parte de factores de transcripción específicos y generales los que a su vez son capaces de reclutar otros complejos proteicos involucrados en la activación de la transcripción.



**Figura 1: Niveles de compactación de la cromatina.**  
 Tomado de Felsenfeld y Groudine 2003. Nature, vol 421.

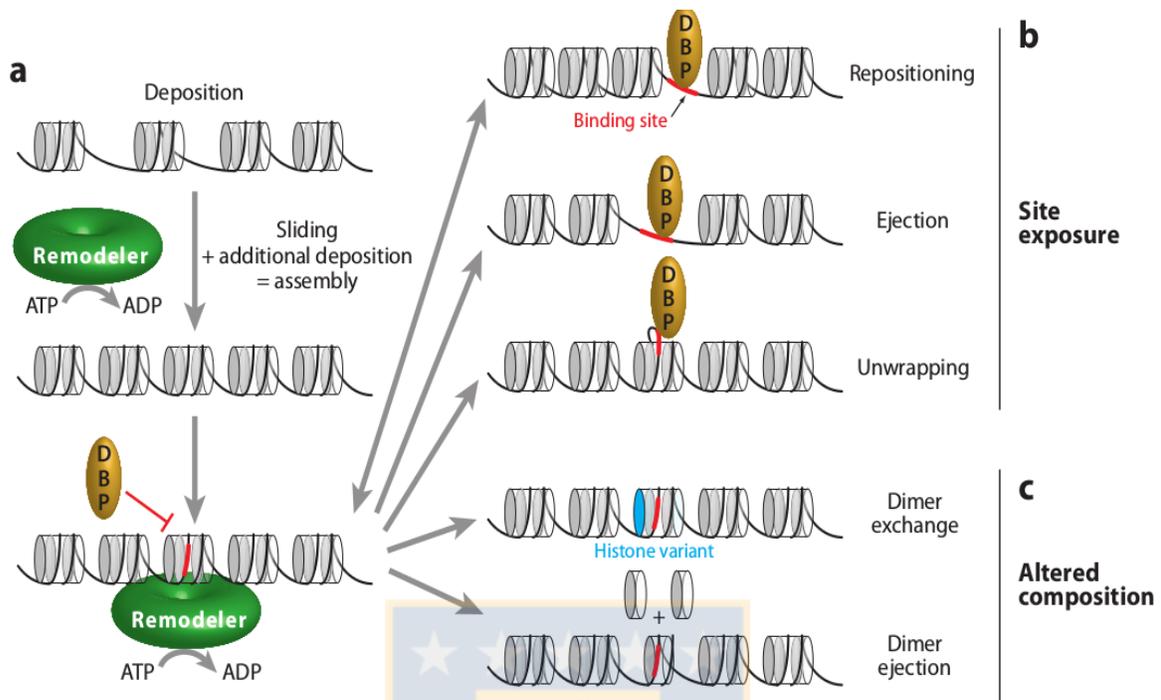
## 1.2 Remodelación de cromatina ATP-dependiente

Existen dos clases generales de complejos proteicos capaces de alterar la interacción entre el ADN y las histonas, los complejos de modificación covalente de histonas (Strall y Allis 2000) y los complejos remodeladores de cromatina ATP-dependientes (Clapier y Cairns 2009).

Los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP acoplan la reacción de hidrólisis del ATP con una variedad de actividades catalíticas, todas ellas orientadas a alterar la estructura local de la cromatina y exponer regiones de ADN contenidas, manteniendo el grado general de compactación. Estos procesos pueden o no estar ligados a la activación de la transcripción (Becker y Horz 2002).

Para exponer estas regiones del ADN los complejos remodeladores pueden realizar tres tipos de acciones: a) *Sliding* o desplazamiento en *cis* de nucleosomas previamente localizados en un locus, b) *Eviction* o eyección de nucleosomas, donde un octámero de histonas es transferido a otra hebra de ADN o a proteínas chaperonas de histonas y c) *Looping* o desenrollamiento de la hebra de ADN sobre la superficie del octámero de histonas. Dentro de la acción de los complejos remodeladores también se encuentran mecanismos de la alteración de la composición del octámero de histonas como: a) Intercambio de dímeros H2A-H2B por otros del mismo tipo o variantes (e.g., H2A.Z) y b) Eyección de dímeros H2A-H2B de un nucleosoma (Clapier y Cairns 2009) (Figura 2).

Los complejos remodeladores de cromatina ATP-dependientes se han clasificado de acuerdo a las características estructurales de sus subunidades catalíticas (i.e., la presencia y distribución de distintos



**Figura 2: Consecuencias de la remodelación de cromatina ATP-dependiente. (a)** Eventos de deposición inicial de octámeros sobre una hebra de ADN, reposicionamiento de los octámeros por sliding y bloqueo de la unión de una proteína de unión a ADN (DBP). **(b)** Exposición de sitio de unión para la proteína de unión por tres consecuencias de la remodelación (sliding, eviction y looping). **(c)** Remodelación por alteración de la composición del octámero de histonas, por intercambio de dímeros H2A-H2B y eyección de dímeros. Modificado de Clapier y Cairns 2009. Annual Review of Biochemistry 78.

dominios estructurales y funcionales dentro de ellas) y se les ha agrupado en cuatro subfamilias de complejos: SWI/SNF (**S**witching defective/**S**ucrose **N**on-**F**ermentative), INO80 (**I**nositol-requiring **80**), ISWI (**I**mitation **s**witch) y CHD (**C**hromodomain, **H**elicase, **D**N A binding) (Clapier y Cairns 2009). En el presente trabajo se estudiará la acción del complejo SWI/SNF presente en levaduras (ySWI/SNF).

El complejo SWI/SNF está altamente conservado en eucariontes y ha sido

relacionado con activación y represión transcripcional en levaduras y humanos (Fry y Peterson 2001). En levaduras, SWI/SNF se compone de 11 subunidades (Smith y cols 2003) y su subunidad catalítica presenta un alto grado de homología en eucariontes.

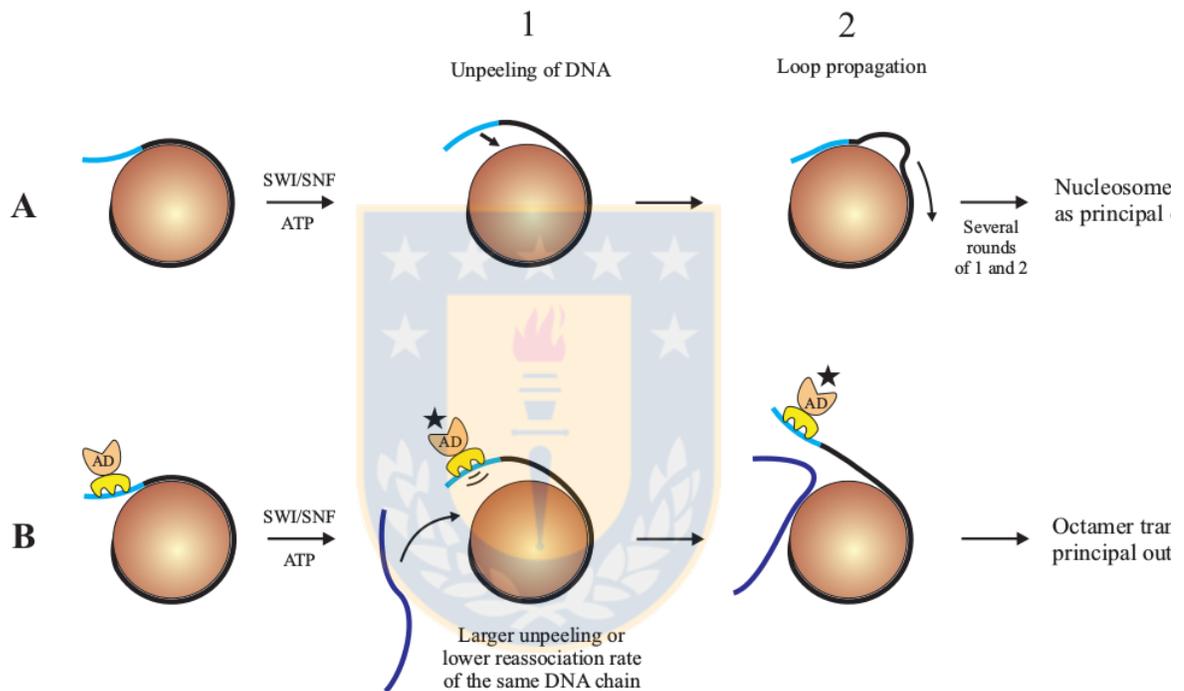
Los complejos de la subfamilia SWI/SNF se caracterizan por poseer en su subunidad catalítica un dominio HSA (*Helicase-SANT*) hacia el extremo N-terminal de su dominio ATPasa y un bromodominio en su extremo C-terminal. Así mismo, el dominio ATPasa está compuesto de dos regiones separadas por una inserción pequeña: DExx y HELICc. (Clapier y Cairns 2009).

SWI/SNF presenta actividad de *sliding* (desplazamiento en *cis*) en nucleosomas (Whitehouse y cols 1999), así como actividad de *eviction* o transferencia de octámero en ciertas condiciones (Gutiérrez y cols 2007) (Figura 3) y se puede unir de forma inespecífica al ADN o ser reclutado por factores de transcripción (*targeting*) (Yudkovsky y cols 1999, Owen-Hughes y cols 1996).

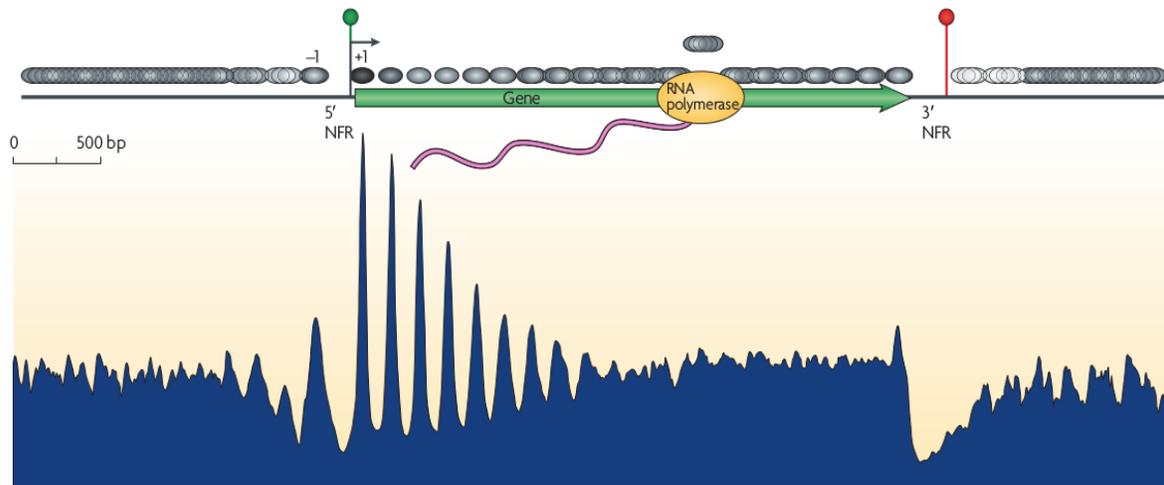
### **1.3 Posicionamiento nucleosomal y su rol en la regulación de la expresión génica**

Si bien estas propiedades de los complejos remodeladores de cromatina permiten la reestructuración de los nucleosomas con fines regulatorios o estructurales, éstos no afectan su deposición inicial (e.g., durante la replicación del ADN, mediada por chaperonas de histonas). Dicho esto, del 75% al 90% del genoma está a la forma de ADN de *core* nucleosomal, separados por aproximadamente 20 a 50 pb de ADN *linker* (Segal y Widom 2009). Estos nucleosomas están distribuidos de forma no-aleatoria a lo largo del genoma, identificándose regiones con nucleosomas fuertemente posicionados, así también como regiones con un posicionamiento difuso (Lee y cols 2004). En general, tanto en levaduras como metazoos se han

identificado, mediante el uso de microarreglos de ADN o secuenciación de nueva generación, regiones específicas en el genoma asociadas a regiones regulatorias de genes que aparecen consistentemente empobrecidas en nucleosomas (Jiang y Pugh 2009). A partir de esto se establecen “regiones libres de nucleosomas” (NFR, *nucleosome-free regions*) en los extremos 5´ y 3´ de gran parte de los genes eucariontes, las cuales presentan un paisaje de nucleosomas individuales



**Figura 3: Mecanismo propuesto para el cambio en la consecuencia del proceso de remodelación de cromatina ATP-dependiente al reclutarse un complejo por un factor de transcripción con respecto a lo que se observa al unirse de forma inespecífica al nucleosoma. (a) Mecanismo de sliding (b) Mecanismo de eviction. AD: *Activation domain* (Dominio de activación de un factor de transcripción). Tomado de Gutiérrez y colaboradores 2007. The EMBO Journal 26.**



**Figura 4: Organización consenso de nucleosomas en genes de levadura.** En azul se observa el grado de posicionamiento de los nucleosomas relativo al sitio de inicio de la transcripción (TSS, indicado por la flecha horizontal en el esquema). Aparecen marcadas las regiones libres de nucleosomas en 5' y 3' (NFR). El círculo rojo representa el sitio de término de la transcripción. Aparecen fuertemente posicionados los nucleosomas +1 y -1. Modificado de Jiang y Pugh 2009. Nature Reviews Genetics vol 10.

fuertemente posicionados en sus extremos 5' y 3' y posicionamiento nucleosomal difuso en el cuerpo génico (Jiang y Pugh 2009) (Figura 4). En el 5'NFR los nucleosomas más fuertemente posicionados son los llamados nucleosomas -1 y +1, refiriéndose esta denominación a su posición con respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS). El establecimiento de regiones empobrecidas en nucleosomas es un componente importante en la regulación de genes eucariontes (Raveh-Sadka y cols 2012), dado que el empaquetamiento del ADN en nucleosomas desfavorece el acoplamiento de factores de transcripción y otras proteínas de unión a ADN. Este posicionamiento preferencial está influenciado por una serie de factores; entre ellos elementos contenidos dentro de la propia secuencia de ADN, la presencia de modificaciones post-traduccionales de histonas (e.g., metilación, acetilación), presencia de metilación de ADN e influencia de factores de transcripción (Segal y Widom 2009).

En general existen dos mecanismos en los que la secuencia de ADN puede influenciar el posicionamiento nucleosomal. El primero de ellos refiere a la preferencia de ciertos motivos de secuencia para el ensamble y estabilidad del nucleosoma. El segundo guarda relación con la presencia de motivos que desfavorecen significativamente la estabilidad del nucleosoma (Struhl y Segal 2013).

En términos de secuencia, la estabilidad del nucleosoma está termodinámicamente determinada. Distintos motivos de secuencia poseen distintos perfiles de torsión sobre el octámero de histonas, habiéndose identificado motivos que favorecen su conformación en nucleosomas así como motivos que las desfavorecen (e.g., Trifonov 2011, Struhl y Segal 2013), en forma de patrones de dinucleótidos AA, TT o AT alternados cada aproximadamente 10 pb con dinucleótidos CG para el primer caso y, por ejemplo, largos tramos de poli(dA:dT) para el segundo (Iyer y Struhl 1995).

Los tramos de poli(dA:dT) se han identificado fundamentalmente en los NFR de

genes eucariontes, próximos a los nucleosomas +1 y -1. Dado que estos nucleosomas son generalmente remodelados para iniciar la transcripción, alteraciones del contenido de la secuencia sobre elementos regulatorios en estas regiones o bien variaciones en la distancia entre estos elementos en el NFR podrían llevar a cambios en la actividad transcripcional de estos genes.

Un mecanismo por el cual estas secuencias podrían alterarse es por la aparición de mutaciones *de novo* en el ADN. Alteraciones del contenido de la secuencia pueden darse por ejemplo en polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), vinculados a la generación de sitios de unión a factores de transcripción o eliminación por medio de la sustitución de un nucleótido. Variaciones en la extensión de la secuencia pueden comportar diversos tipos de polimorfismos, siendo los más frecuentes los polimorfismos de inserción/delección (INDELs).

#### **1.4 Polimorfismos de inserción/delección: Su distribución en el genoma humano y posibilidades para la alteración de la expresión génica**

Un polimorfismo de inserción/delección involucra la introducción o eliminación de uno o más nucleótidos en una secuencia de ADN particular. Se han reportado ~2 millones de polimorfismos de inserción/delección en el genoma humano, tanto por laboratorios independientes como por parte de iniciativas de mayor envergadura como el proyecto 1000 genomas (Mills y cols 2011).

Según un reporte del equipo de Devine, la mayor parte de estos polimorfismos son de menos de 100pb en extensión, se presentan en promedio a razón de 1 INDEL por cada 1589pb y abarcan combinadamente 11.9Mb del genoma (comparado con ~15Mb abarcados por SNPs), lo que nos indica que la cantidad de variación genética generada por INDELs es significativa y comparable a la generada por SNPs (Mills y cols 2011).

Así mismo, la abundancia de estos polimorfismos no se presenta de forma homogénea en el genoma. Se ha reportado una disminución significativa en la densidad de INDELS en los exones del genoma humano, así como un incremento de los mismos en las regiones intergénicas (Montgomery y cols 2013).

Al analizarse la ocurrencia de INDELS en función de la arquitectura nucleosomal en estas regiones, así como dentro de genes, se ha observado que el ADN *linker* está particularmente enriquecido en INDELS con respecto a las regiones de ADN con tendencia a estructurarse en nucleosomas, así como en posiciones canónicas de nucleosomas (e.g., nucleosomas +1 y -1) y que este enriquecimiento sigue una periodicidad de aproximadamente 200pb a lo largo de la secuencia (Sasaki y cols 2009). Este empobrecimiento relativo de INDELS en secuencias canónicas de posición de nucleosomas y secuencias con tendencia a estructurarse como nucleosomas se ve contrastado con la frecuencia de SNPs en estas regiones, observándose lo opuesto como la norma, vale decir un enriquecimiento en la densidad de SNPs en las regiones nucleosomales en desmedro de las secuencias de ADN *linker*, así como un mayor contenido de nucleótidos AT en los INDELS hallados. Esto sugiere fuertemente que la estructura de la cromatina puede influenciar los patrones de variación natural en los genomas (Tolstorukov y cols 2012).

Los INDELS en regiones regulatorias de genes pueden afectar la transcripción en una serie de formas. Por ejemplo, y tal vez de forma más evidente, un INDEL puede generar o eliminar un CRE (*cis regulatory element*) alterando la secuencia de unión de un factor de transcripción, (e.g., Sander y cols 2005) o de formas más sutiles, como por ejemplo INDELS generados entre dos sitios de unión de factores de transcripción cooperativos de tal manera que se interrumpa su interacción, o INDELS de menos de 5pb afectando la fase rotacional de la hebra de ADN y dejando un sitio de unión de un factor de transcripción en la cara opuesta de dicha hebra o alterando

la distancia entre los sitios de unión de factores de transcripción y las regiones genómicas diana de las proteínas que reclutan (Mullaney y cols 2010).

Considerando lo anteriormente expuesto, es la propuesta de nuestro laboratorio que polimorfismos de inserción/delección cortos que alteren la distancia entre un sitio de unión de un factor de transcripción y un nucleosoma posicionado pueden afectar la actividad catalítica de complejos remodeladores de cromatina sobre el nucleosoma. Trabajos previos en nuestro laboratorio (Alarcón V 2013, trabajo de tesis) han sugerido que factores como la distancia entre el sitio de unión de la proteína quimérica Gal4-VP16 y un nucleosoma en un probador mononucleosomal, así como la estructura del ADN en esa región pueden alterar la actividad catalítica de *eviction* o eyección de octámero del complejo ySWI/SNF.

Es entonces el objetivo de este trabajo verificar la hipótesis de que alteraciones en la distancia entre el sitio de reclutamiento del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF y un nucleosoma posicionado pueden alterar la actividad catalítica del mismo, con consecuencias importantes para el estudio de nuevos mecanismos de regulación transcripcional en eucariontes, así como una posible importancia en la evolución de la diversidad biológica.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:**

### **2.1 Hipótesis:**

La eficiencia de la actividad catalítica de *eviction* del complejo remodelador de cromatina  $\gamma$ SWI/SNF, al ser reclutado por un factor de transcripción, se ve afectada por la distancia entre el sitio de reclutamiento del complejo y el nucleosoma a ser remodelado.

### **2.2 Objetivo general:**

Determinar el efecto que pueden tener distintas variaciones en la distancia entre un nucleosoma y una secuencia diana de un factor de transcripción (variaciones que reflejan los polimorfismos de inserción/delección) sobre la actividad de *eviction* nucleosomal catalizada por el complejo  $\gamma$ SWI/SNF al ser reclutado por un factor de transcripción.

### **2.3 Objetivos específicos:**

1. Establecer en probadores mononucleosomales si la extensión de ADN *linker* entre el sitio de unión a Gal4 y el extremo opuesto de donde se encuentra el nucleosoma influye sobre la actividad remodeladora del complejo  $\gamma$ SWI/SNF.
2. Determinar el efecto de la alteración en las distancias entre el sitio de unión del factor de transcripción Gal4 y el nucleosoma sobre la actividad remodeladora del complejo  $\gamma$ SWI/SNF en 15 probadores mononucleosomales de extensión total de ADN fija, pero que difieren en 1 nucleótido de distancia entre el sitio Gal4 y el nucleosoma posicionado.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Generación de probadores mononucleosomales con variaciones de longitud del extremo 3'.

Para generar los probadores mononucleosomales requeridos para evaluar si existe variación de la actividad remodeladora del complejo  $\gamma$ SWI/SNF se utilizó el plásmido pGEM-3Z/601-22-Gal4 generado previamente en nuestro laboratorio (Gutiérrez et al 2007), el cual posee un inserto que contiene la secuencia 601 posicionadora de nucleosomas (Lowary y Widom 1998), luego 22 pares de bases corriente abajo y seguidamente un sitio de unión para el factor de transcripción Gal4.

##### 3.1.1 Marcaje radioactivo de los partidores

Todos los fragmentos de ADN generados poseen un extremo común, por el costado en que se encuentra la secuencia 601, y uno variable. Cada vez que se debió generar probadores se comenzó con el marcaje radioactivo de un oligonucleótido correspondiente al extremo común a todos los probadores en su extremo 5' (25pmoles). Para esto se utilizó la enzima T4 polinucleótido kinasa<sup>1</sup> (0,5 $\mu$ L/10pmol) en presencia de 25pmol de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP<sup>2</sup> (reacción en 25 $\mu$ L final). La reacción se incubó por 30 minutos a 37°C y posteriormente se detuvo con 20mM final de EDTA pH 8.0. Los oligonucleótidos marcados fueron purificados utilizando columnas Sephadex G-25<sup>3</sup> y posteriormente precipitados con etanol (2,5 volúmenes de EtOH 100% frío, 0,1 volúmenes de NaAc<sup>4</sup> 3M pH 5,2, incubados a -20°C por 60 minutos

---

1 T4 PNK, New England Biolabs

2 NEG035C, 6000 Ci/mmol, 150 mCi/mL. En solución 10mM Tricine pH 7.6. Perkin Elmer

3 Roche

4 Acetato de sodio, C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>

mínimo. Luego fueron centrifugados a 16000g a 4°C por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. El *pellet* fue lavado con 600µL de EtOH 70% frío, posteriormente centrifugado y se eliminó el sobrenadante como en el paso anterior. El precipitado fue secado al aire por 3-5 minutos) y resuspendidos en 10µL de H<sub>2</sub>O nanopura filtrada por cada 25pmoles marcados.

Después de tener este oligonucleótido 5' marcado (denominado *forward*) se procedió a realizar cada PCR con este más el oligonucleótido 3' no marcado correspondiente al otro extremo (denominado *reverse*) para obtener cada uno de los probadores descritos en la tabla 1.

### **3.1.2 PCR radioactiva**

Las amplificaciones se realizaron a partir de 1ng de ADN plasmidial en presencia de 1,5U de Ex Taq DNA polymerase<sup>5</sup> y su correspondiente buffer de reacción, 0,2mM de cada dNTP, 25pmoles de partidor *reverse* no marcado y 25pmoles de partidor radioetiquetado *forward* (marcado) en un volumen final de 50µL. El programa de amplificación para todas las sondas fue: 95°C por 5 minutos para denaturación inicial, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos para alineación y 72°C por 30 segundos para elongación, con un ciclo de elongación final de 72°C por 10 minutos.

Cada sonda fue purificada con columnas Sephadex G-50 y posteriormente sometida a precipitación con etanol según protocolo previamente descrito (Sección 3.1.1). Las sondas fueron resuspendidas en 10µL de buffer TE 1X, pH 8.0.

Finalmente las muestras fueron cuantificadas por densitometría, resolviendo una alícuota de cada una en gel de agarosa al 1% en presencia de un marcador de peso molecular estándar<sup>6</sup>. El análisis se realizó utilizando el *software* UN-SCAN-IT 6.1<sup>7</sup>,

---

5 TaKaRa Bio Inc.

6 100bp DNA Ladder, New England Biolabs.

7 Silk Scientific Inc.

considerando al menos 3 puntos del *ladder* como referencias para la recta de cuantificación.

**Tabla 1: Oligonucleótidos y productos generados para obtención de probadores mononucleosomales a usarse para la determinación del efecto de la modificación de las distancias entre el extremo 3' y el sitio de unión de Gal4.**

Fragmento de PCR	Partidor	Fragmento a generar	Tamaño (pb)
Partidor Fwd para todos los fragmentos a generar	5' - acaggatgtatatctgacacgtgcctgg - 3'		n/a
196	5' - tgcagggtccgaggactg - 3'	5' - acaggatgtatatctgacacgtgcctgggactagggagtaatcccctggcgttaaacaacgcggggacagcgcgtacgtcgtttaagcgggtgctagagctgtctacgaccaattgagcggcctcggcaccgggattctccagggcggccgcgtatctcgagcatcggaggacagtcctccgcggacctgca - 3'	196
206	5' - cttgcatgcctgcagggtccg - 3'	5' - acaggatgtatatctgacacgtgcctgggactagggagtaatcccctggcgttaaacaacgcggggacagcgcgtacgtcgtttaagcgggtgctagagctgtctacgaccaattgagcggcctcggcaccgggattctccagggcggccgcgtatctcgagcatcggaggacagtcctccgcggacctgca - 3'	206

		cggacctgcaggcatgcaag - 3'	
216	5' - aataactcaagcttgcatgcc - 3'	5' - acaggatgtatatatctgacacgtgcct ggagactagggagtaatccccttggcg gttaaaacgcgggggacagcgcgtac gtgCGTTAAGCGGTGCTAGAGCTGTCT acgaccaattgagcggcctcggcacc gggattctccagggcggccgctatct cgagcat <b>cggaggacagtcctccg</b> ggcggccgctatctcgagcatcggg ggacagtctccgaggacctgcaggc atgcaagcttgagtatt - 3'	216
226	5' - gacactatagaataactcaag - 3'	5' - acaggatgtatatatctgacacgtgcct ggagactagggagtaatccccttggcg gttaaaacgcgggggacagcgcgtac gtgCGTTAAGCGGTGCTAGAGCTGTCT acgaccaattgagcggcctcggcacc gggattctccagggcggccgctatct cgagcat <b>cggaggacagtcctccg</b> ggattctccagggcggccgctatct gagc atcggaggacagtcctccgaggacct gcaggcatgcaagcttgagtattctata gtgtc - 3'	226
236	5' - ctatttagtgacactatag - 3'	5' - acaggatgtatatatctgacacgtgcct ggagactagggagtaatccccttggcg gttaaaacgcgggggacagcgcgtac gtgCGTTAAGCGGTGCTAGAGCTGTCT acgaccaattgagcggcctcggcacc gggattctccagggcggccgctatct cgagcat <b>cggaggacagtcctccg</b>	236

		ggattctccagggcggccgcgtatctc gagc atcggaggacagtctccgcggacct gcaggcatgcaagcttgagtattctata gtgtcacctaaatag – 3´	
246	5´- ttacgccaagctatttagt – 3´	5' – 246 acaggatgtatatctgacacgtgcct ggagactagggagtaatcccctggcg gttaaacgcgggggacagcgcgtac gtgcgtttaagcggtagagctgtct acgaccaattgagcggcctcggcacc gggattctccaggcggccgcgtatct cgagcat <b>cgaggacagtcctccg</b> ggattctccagggcggccgcgtatctc gagc atcggaggacagtctccgcggacct gcaggcatgcaagcttgagtattctata gtgtcacctaaatagcttggcgtaa – 3´	

En azul aparece la secuencia posicionadora de nucleosomas 601 y en negrita y cursiva el sitio de unión de Gal4.

### **3.1.3 Reconstitución de probadores mononucleosomales a partir de las sondas radioetiquetadas**

Para reconstituir los probadores mononucleosomales se utilizó el método de transferencia de octámeros de histonas descrito por el equipo de Workman (Utley et al, 1996, ver Figura 5). Para la reconstitución de cada fragmento se mezclaron 0,5pmoles de ADN marcado radioactivamente con una solución conteniendo 2µg de

oligonucleosomas cortos (*short oligonucleosomes*, SON) purificados desde células HeLa (Utlely et al, 1996) en un *buffer* de dilución (10 mM Tris-Cl pH 7.4; 1 mM EDTA; 0.5mM PMSF; 5mM DTT) , y con una concentración inicial de NaCl de 1M resultando un volumen inicial de 12,5µl. La mezcla se incubó a 37°C por 20 minutos para lograr la disociación del octámero de histonas de los SON de su ADN. Seguidamente se realizaron cuatro pasos de dilución seriada utilizando *buffer* de dilución, con incubaciones de 20 minutos a 30°C cada una hasta llegar a concentraciones de NaCl de 0,8, 0,6, 0,4 y 0,2M. Finalmente se llegó a una concentración de NaCl de 0,1M con un *buffer* de dilución final (10 mM Tris-Cl pH 7.4; 1 mM EDTA; 0.5 mM PMSF; 5 mM DTT; 0.1% NP-40; 20% Glicerol; 200 ug/mL BSA) y se incubó por 20 minutos a 30°C llegando a un volumen final de 125µl. Luego se incubó a 4°C por 10 minutos.

La eficiencia de la reconstitución y la integridad de los probadores se verificaron por electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante 40:1 al 5%, la cual fue realizada a 4°C, 200V por 150 minutos con *buffer* TBE 0,3X. El gel seco se expuso a Phosphorscreen<sup>8</sup> y fue escaneado utilizando el instrumento Molecular Imager FX<sup>9</sup>. La cuantificación del ADN nucleosomal y libre en cada sonda fue realizada utilizando el *software* Quantity One 4.6.3<sup>10</sup>

---

8 GE Healthcare.

9 Bio-Rad.

10 Bio-Rad.

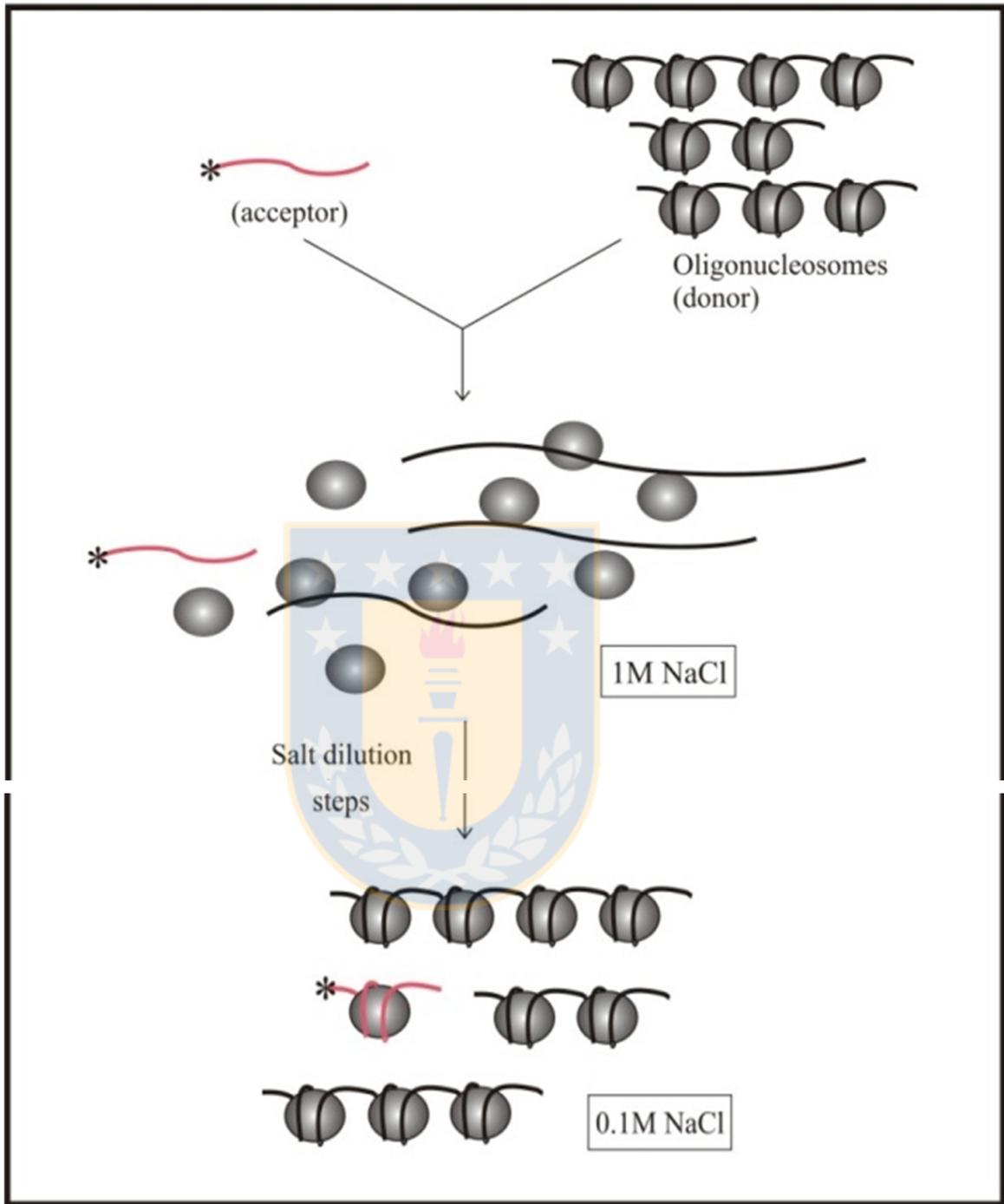
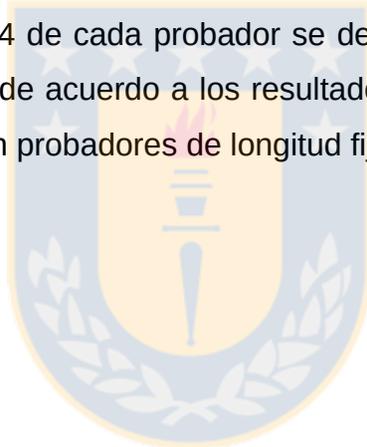


Figura 5: Esquema de la reconstitución de mononucleosomas por transferencia de octámero. Tomado desde Tesis Doctoral de Gutiérrez, J.L.

### **3.2 Generación de probadores mononucleosomales para las variaciones de extensión entre el nucleosoma posicionado y el sitio de unión para Gal4.**

Para generar los probadores mononucleosomales requeridos para evaluar si existe variación de la actividad remodeladora del complejo  $\gamma$ SWI/SNF se utilizaron los plásmidos pGEM-3Z/601-X-Gal4 generados previamente en nuestro laboratorio (modificación desde pGEM-3Z/601-Gal4 en Gutiérrez et al 2007), los cuales poseen un inserto que contiene la secuencia 601 posicionadora de nucleosomas (Lowary y Widom 1998), luego X pares de bases corriente abajo y seguidamente un sitio de unión para el factor de transcripción Gal4, donde X es una cantidad de nucleótidos que va de 8 a 22, para un total de 15 probadores diferentes (Tabla 2). La extensión corriente abajo del sitio Gal4 de cada probador se definió en mínimo 30 nucleótidos (para la distancia de 22pb) de acuerdo a los resultados de los ensayos descritos en la sección 2.2, resultando en probadores de longitud fija de 216pb.



**Tabla 2: Moléculas de ADN generadas para obtención de probadores mononucleosomales a usarse en la determinación del efecto de la variación de las distancias entre la secuencia posicionadora 601 y el sitio de unión de Gal4.**

Distancia entre secuencia 601 y sitio Gal4 (nt)	Fragmento obtenido
8	ACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCGGAGGACAGTCCTCCGCGTATCTCGAGCATCGGACCTGCAG...
9	ACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCGCGGAGGACAGTCCTCCGGTATCTCGAGCATCGGACCTGCAG...
10	ACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCGCGGAGGACAGTCCTCCGTATCTCGAGCATCGGACCTGCAG...
11	ACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCGTACGAGGACAGTCCTCCGATCTCGAGCATCGGACCTGCAG...
12	ACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCGTACGAGGACAGTCCTCCGTCTCGAGCATCGGACCTGCAG...
13	ACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCGTATCGAGGACAGTCCTCCGCTCGAGCATCGGACCTGCAG...
14	ACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCGTATCTCGAGGACAGTCCTCCGTCGAGCATCGGACCTGCAG...
15	ACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCGTATCTCGAGGACAGTCCTCCGCGAGCATCGGACCTGCAG...
16	ACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCGTATCTCGAGGACAGTCCTCCGGAGCATCGGACCTGCAG...
17	ACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCGTATCTCGAGGACAGTCCTCCGAGCATCGGACCTGCAG...
18	ACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCGTATCTCGAGGAGGACAGTCCTCCGGCATCGGACCTGCAG...
19	ACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCGTATCTCGAGCGAGGACAGTCCTCCGCATCGGACCTGCAG...
20	ACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCGTATCTCGAGCCGAGGACAGTCCTCCGATCGGACCTGCAG...
21	ACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCGTATCTCGAGCAGGAGGACAGTCCTCCGTCGGACCTGCAG...
22	ACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCGTATCTCGAGCATCGAGGACAGTCCTCCGCGGACCTGCAG...

Se muestra sólo una sección de los segmentos de ADN utilizados, en donde se encuentra la secuencia variable de estas sondas. En rojo se marca una parte de la secuencia 601, en amarillo un sitio para PstI y en gris el sitio de unión para Gal4. En todos los casos la extensión total es de 216 nucleótidos.

### **3.2.1 Marcaje radioactivo de los partidores**

Se procedió de igual forma que la descrita en la sección 3.1.1.

### **3.2.2 PCR radioactiva**

Se procedió de igual forma que la descrita en la sección 3.1.2, con modificaciones en la purificación del producto generado, dado que resultó necesario separar la sonda de un producto inespecífico generado durante la PCR.

Luego de la precipitación del producto con etanol los 10 $\mu$ L de cada sonda fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida no-denaturante (AA:bis 40:1, 5%, TBE 0,3X) a 4°C y se corrieron por 90 minutos a 200V. Las bandas con el producto fueron visualizadas por medio de autoradiografía del gel húmedo y cortadas con bisturí para ponerlas en un microtubo de 0,6mL previamente perforado en el fondo. Los microtubos fueron a su vez puestos en un tubo de 1,5mL y fueron centrifugados por 5 segundos para fragmentar el gel que contiene el fragmento separado. Al gel fragmentado en el tubo se agregaron 400 $\mu$ L de TE 1X pH8 y se agitó por dos minutos con los dedos para suspender los fragmentos en la solución. Los fragmentos se dejaron en agitación fuerte por un mínimo de 6 horas protegidos de la luz y posteriormente fueron centrifugados para recuperar el eluato a un tubo limpio. El eluato fue sometido a precipitación estándar con etanol como fue descrito previamente y cada producto se resuspendió en 10 $\mu$ L de TE 1X pH8 y fue cuantificado según fue descrito en la sección 3.1.2.

### **3.2.3 Reconstitución de probadores mononucleosomales a partir de las sondas marcadas**

Se procedió de igual forma que la descrita en la sección 3.1.3 para cada una de las 15 sondas.



### 3.3 Expresión y purificación del factor de transcripción quimérico Gal4-VP16

#### 3.3.1 Expresión, lisis y purificación por afinidad de Gal4-VP16

Para la purificación de Gal4-VP16 se partió de un stock de *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLys previamente transformado con el plásmido pET28a, el cual contiene un cassette de expresión para el factor de transcripción quimérico Gal4-VP16 fusionado a un *tag* de histidinas.

Las bacterias se cultivaron en placas con medio LB-Agar en presencia de kanamicina y cloranfenicol (10µg/mL de cada uno) por 16 horas aproximadamente a 37°C.

Posteriormente se seleccionaron colonias y se cultivaron en tubos con 5mL de medio LB con 10µg/mL de kanamicina y cloranfenicol por 16 horas aproximadamente a 37°C, para luego inocular con esta solución matraces con 200mL de medio LB y 10µg/mL de kanamicina en una razón 1:100 (2µL del inóculo por matraz). Se cultivó en agitación a 28°C hasta una densidad óptica de 0,6 a 0,8 y se indujo la expresión de la proteína adicionando 0,1mM de IPTG e incubando en agitación a 28°C por 2 horas.

Para la obtención de un pellet bacteriano, se centrifugó a 5000g por 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante.

Para realizar la lisis bacteriana el *pellet* se resuspendió en 10mL de buffer de lisis (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 20mM Imidazol, equilibrada a pH 8.0 con NaOH) en presencia de inhibidores de proteasas (0,5 mM PMSF, TPCK 7µg/mL, Pepstatina A 1µg/mL e inhibidor de tripsina 10µg/mL) y se procedió a fraccionar las células por sonicación (4°C, 4 ciclos de 20 segundos a 40% de amplitud con 20 segundos de descanso). Luego la mezcla se centrifugó a 8000g, 4°C por 15 minutos y el sobrenadante se sometió a una segunda centrifugación en las mismas condiciones. Posteriormente se realizó una purificación por afinidad de Gal4-VP16, para la cual se

utilizaron 200µL de resina Ni-NTA<sup>11</sup>, los cuales fueron previamente puestos en una columna y tratados con 200µL de buffer de lavado sin inhibidores de proteasas (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 20mM Imidazol) y luego con el mismo buffer en presencia de inhibidores de proteasas (0,5 mM PMSF, TPCK 7µg/mL, Pepstatina A 1µg/mL e inhibidor de tripsina 10µg/mL).

El sobrenadante obtenido como producto de la lisis bacteriana se incubó en contacto con la resina a 4°C en rotación suave, se dejó pasar con la columna en posición vertical y el pasado de largo se aplicó nuevamente a la columna.

Posteriormente se traspasó el material a un tubo y se centrifugó a 500g por 3 minutos eliminándose el sobrenadante antes de traspasar a un tubo limpio.

Para eluir la proteína desde la resina se realizaron 5 lavados en columna con 400µL de buffer de lavado con 10mM de Imidazol a 4°C, un lavado con buffer de lavado 50mM Imidazol a 4°C y finalmente 5 eluciones con 100mM Imidazol, también en columna, las cuales fueron almacenadas con Glicerol al 15% final. Todos los lavados y eluciones se realizaron en presencia de inhibidores de proteasas (0,5 mM PMSF, TPCK 7µg/mL, Pepstatina A 1µg/mL e inhibidor de tripsina 10µg/mL).

### **3.3.2 Análisis de la purificación de Gal4-VP16**

Alícuotas de las eluciones resultantes fueron denaturadas por adición de 1 volumen de solución Laemmli 2X (125mM Tris-Cl pH 6.8, 6% SDS, 200mM DTT, 20% Glicerol, 0,05% Azul de Bromofenol) e incubando a 95°C por 5 minutos.

Luego de centrifugar a 13.000xg durante 1 minuto, las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida denaturante (SDS-PAGE) al porcentaje correspondiente al ensayo. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 100V, por 30 minutos y luego a 150V hasta finalizar la corrida, utilizando buffer de corrida (25mM

---

11 Qiagen

Tris-HCl, 192mM Glicina, 0.1% SDS). El gel se tiñó durante toda la noche en solución colorante azul de coomassie (50% Metanol, 10% Ácido acético, 0.05% Azul de coomassie), luego se fijó por 45 minutos con solución fijadora (50% Metanol, 10% Ácido acético) y acto seguido se decoloró por 90 minutos con solución decolorante (5% Metanol, 7% Ácido acético). Finalmente se realizaron varios lavados con agua nanopure. La imagen del gel se digitalizó mediante escáner<sup>12</sup> y las bandas fueron cuantificadas por medio de análisis densitométrico utilizando el software UN-SCAN-IT gel, versión 6.1.

Posteriormente se realizó una inmunodetección de la proteína por medio de Western Blot (Towbin et al 1979) utilizando un anticuerpo primario dirigido contra la cola de histidinas de la proteína recombinante<sup>13</sup>.



---

12 UMAX PowerLook 2100XL-USB

13 Anti-His Monoclonal (Mouse) Clontech. Cat #631212, Lote #1311198A

### 3.4 Ensayos de unión de la proteína Gal4-VP16, reclutamiento del complejo SWI/SNF por Gal4-VP16 y desplazamiento en *trans* del octámero a los probadores mononucleosomales marcados

#### 3.4.1 Ensayos de unión de Gal4-VP16 a los probadores:

Estos ensayos se realizaron utilizando 10 fmoles (2,5  $\mu$ L) de probador mononucleosomal marcado (Sección 3.1.2 y 3.1.3) en presencia de 20nM final de Gal4-VP16 (0,5  $\mu$ L de stock 600 nM), 8,4 $\mu$ L de *buffer* de remodelación (HEPES-KOH 20mM pH 7.9; KCl 85,7mM; PMSF 0.5mM; DTT 2mM; NP-40 0.05%; Glicerol 10%; BSA 100 ug/mL; MgCl<sub>2</sub> 9.5mM), 0,6 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O nanopura filtrada y 3 $\mu$ L de *buffer* de SWI/SNF (10mM Tris-Cl pH 8.0; EGTA 2mM; PMSF 0,5mM; DTT 1 mM; Imidazol 1 mM; NP-40 0,1%; Mg(CHCOO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 1mM; Glicerol 10%; NaCl 150mM) en un volumen final de 15 $\mu$ L y una concentración final de Na/KCl de 100mM. Las reacciones fueron incubadas a 30°C por 30 minutos y posteriormente a 4°C por 5 minutos. Finalmente las muestras se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida no-denaturante (AA:bis 40:1, 5%, TBE 0,3X), la cual fue realizada a 4°C, 200V por 150 minutos. El gel seco se expuso a Phosphorscreen<sup>14</sup> y fue escaneado utilizando el instrumento Molecular Imager FX<sup>15</sup>. La cuantificación del grado de unión en cada sonda fue realizada utilizando el *software* Quantity One 4.6.3. Estos ensayos se realizaron de igual forma para todos los probadores en este trabajo.

---

14 GE Healthcare.

15 Bio-Rad.

### 3.4.2 Ensayos de reclutamiento (*targeting*) del complejo SWI/SNF por Gal4-VP16 a los probadores nucleosomales

Estos ensayos se realizaron utilizando 10 fmoles (2,5  $\mu$ L) de probador mononucleosomal marcado en presencia de 20nM final de Gal4-VP16, 7,9 $\mu$ L de *buffer* de remodelación, 0,6 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O nanopura filtrada y 200ng de SON (0,5  $\mu$ L) para estrictez del ensayo, dando un volumen final de 12 $\mu$ L. Las reacciones fueron incubadas a 30°C por 20 minutos (paso de unión de Gal4-VP16 a los probadores) y posteriormente se añadió el complejo SWI/SNF purificado o *buffer* de SWI/SNF según el caso (para controles), llegando a un volumen final de 15 $\mu$ L y una concentración de Na/KCl de 100mM. Las reacciones se incubaron por 45 minutos a 30°C, luego a 4°C por 5 minutos y fueron resueltas por electroforesis en gel de poliacrilamida no-denaturante al 3.5% (60:1), a 4°C y 200V por 210 minutos con *buffer* TBE 0,3X. El gel seco se expuso a Phosphorscreen y fue escaneado utilizando el instrumento Molecular Imager FX o expuesto a films autoradiográficos<sup>16</sup>. La cuantificación del grado de unión y reclutamiento en cada sonda fue realizada utilizando el *software* Quantity One 4.6.3. Estos ensayos se realizaron de igual forma para todos los probadores en este trabajo.

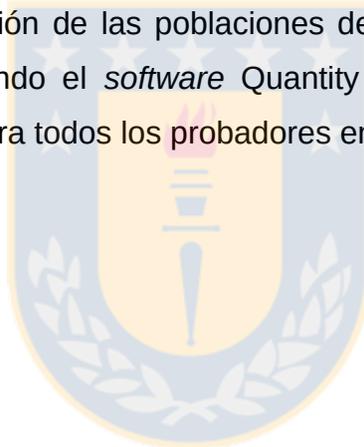
### 3.4.3 Ensayos de remodelación de cromatina (desplazamiento en *trans* del octámero o *eviction*) por el complejo SWI/SNF sobre los probadores mononucleosomales

Estos ensayos se realizaron utilizando 10 fmoles (2,5  $\mu$ L) de probador mononucleosomal marcado en presencia de 20nM final de Gal4-VP16 (0,5  $\mu$ L de stock 600 nM), 7,9 $\mu$ L de *buffer* de remodelación, 2mM de ATP (0,6  $\mu$ L de stock 50 mM) y de 150 a 200ng de SON (0,5  $\mu$ L) para estrictez del ensayo, dando un volumen final de 12 $\mu$ L. Las reacciones fueron incubadas a 30°C por 20 minutos (paso de unión

---

16 Kodak

de Gal4-VP16 a los probadores) y posteriormente se añadió el complejo SWI/SNF purificado o buffer de SWI/SNF según el caso (para controles), llegando a un volumen final de 15µL y una concentración de Na/KCl de 100mM. Las reacciones se incubaron por 45 minutos a 30°C y posteriormente se agregó una solución removedora (500ng de ADN plasmidial digerido y purificado y 2µM de un oligonucleótido doble hebra que contiene la secuencia de unión para Gal4) y se incubó por 30 minutos a 30°C con el objeto de disociar los complejos formados entre el nucleosoma, Gal4-VP16 y el complejo SWI/SNF. Finalmente las muestras se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida no-denaturante 40:1 al 5%, la cual fue realizada a 4°C, 200V por 150 minutos con *buffer* TBE 0,3X. El gel seco se expuso a Phosphorscreen<sup>17</sup> y fue escaneado utilizando el instrumento Molecular Imager FX<sup>18</sup>. La cuantificación de las poblaciones de ADN y nucleosomas en cada sonda fue realizada utilizando el *software* Quantity One 4.6.3. Estos ensayos se realizaron de igual forma para todos los probadores en este trabajo.



---

17 GE Healthcare.

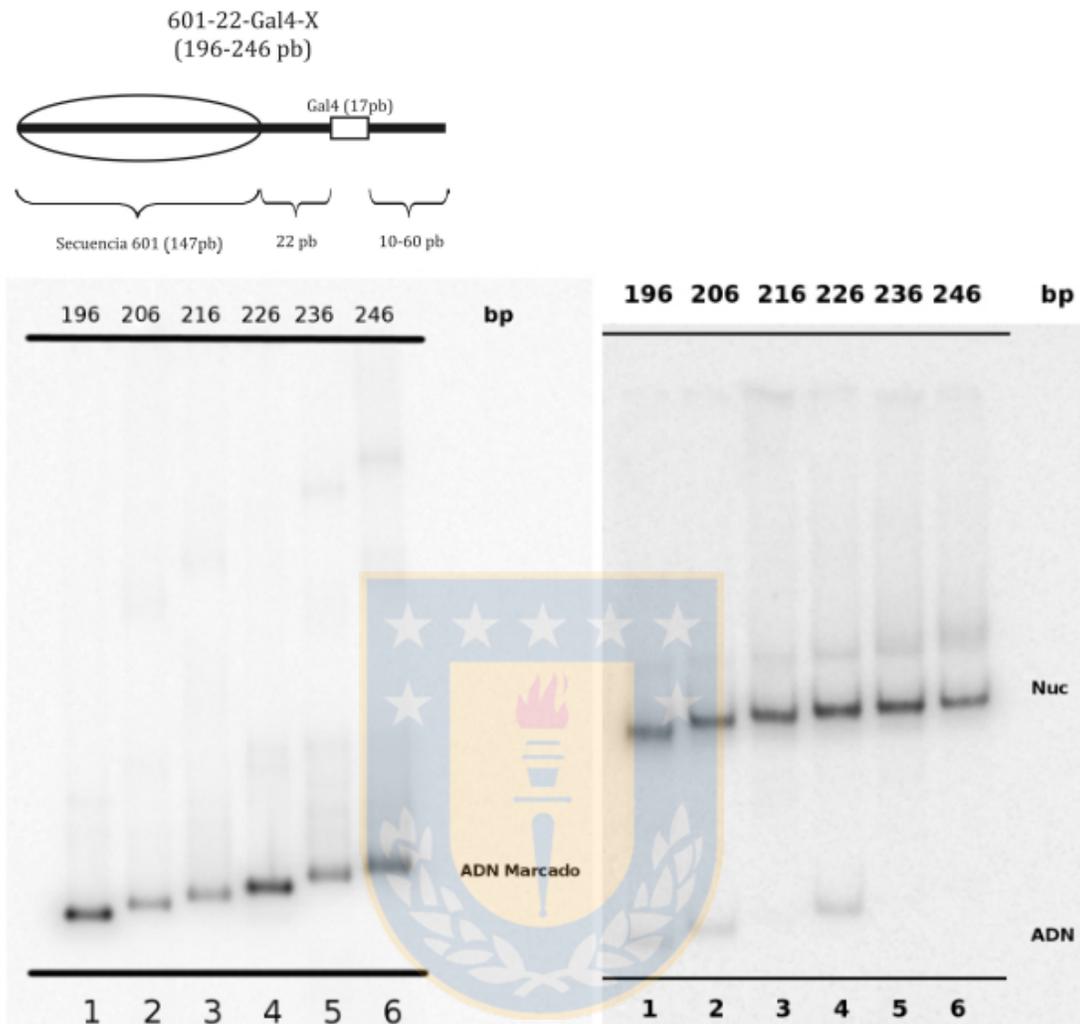
18 Bio-Rad.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Generación de probadores mononucleosomales para las variaciones de longitud del extremo 3'.

Los probadores generados en esta etapa fueron producidos mediante un marcaje radioactivo del extremo 5' como fue descrito en la sección 3.1.1, mediante PCR contra el plásmido que contenía la secuencia de interés y posterior purificación antes de ser reconstituidos como mononucleosomas por el método de transferencia de octámero (sección 3.1.3). El marcaje radioactivo y el rendimiento de la PCR fueron los esperados (Figura 6b) y la eficiencia de reconstitución fue >90% en todos los casos (Figura 6c).



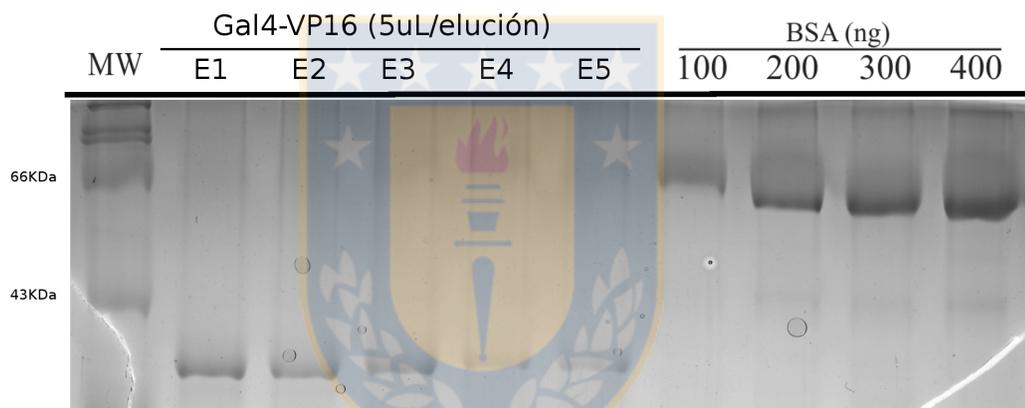


**Figura 6: Marcaje de sondas y reconstitución de mononucleosomas para evaluación del efecto del ADN corriente abajo del sitio Gal4 sobre la remodelación de cromatina ATP-dependiente por el complejo SWI/SNF. A)** Representación esquemática de los probadores, el óvalo representa la posición adoptada por el octámero de histonas luego de la reconstitución. **B)** Análisis electroforético de las sondas marcadas. **C)** Nucleosomas reconstituidos a partir de estas sondas. En ambos casos la electroforesis se realizó en condiciones nativas en un gel de poliacrilamida al 5% (AA:Bis 40:1). En el caso de la figura 6B se sembraron 10 uL de diluciones 1:240 del probador purificado. En el análisis electroforético mostrado en la figura 6C se sembraron 10fmoles de probador reconstituido. **bp:** Tamaño del probe; ADN: Migración del ADN; Nuc: Migración del nucleosoma.

## 4.2 Expresión y purificación del factor de transcripción quimérico Gal4-VP16

La proteína recombinante quimérica Gal4-VP16 fue obtenida por medio de expresión en bacterias y purificación por afinidad como está descrito en la sección 2.3.

Se obtuvieron 5 eluciones de la proteína recombinante, las cuales muestran presencia de Gal4-VP16 (migración aparente 30kDa). La concentración mayor obtenida (Elución 1) fue de 170,73 ng/uL y la identidad de las bandas fue confirmada por inmunodetección.



**Figura 7: Curva de BSA para cuantificación de la purificación de Gal4-VP16.** MW: Marcador de peso molecular. E1-E5: Eluciones de la proteína obtenidas. 5uL de cada elución fueron analizados para la cuantificación.

### **4.3 Ensayos de unión de la proteína Gal4-VP16, reclutamiento del complejo SWI/SNF por Gal4-VP16 y desplazamiento en *trans* del octámero para los probadores nucleosomales marcados con variaciones de extensión del ADN corriente abajo del sitio Gal4.**

Estos ensayos se realizaron con el objeto de determinar si diferencias en la extensión del ADN corriente abajo del sitio de unión para Gal4 pueden alterar la eficiencia de unión del factor de transcripción quimérico Gal4-VP16, el reclutamiento del complejo  $\gamma$ SWI/SNF por este factor al probador mononucleosomal y la actividad catalítica del complejo al ser reclutado por el mismo.

El propósito de verificar esto fue el definir un rango de extensión del probador corriente abajo del sitio Gal4 donde no se altere ni la unión del factor ni el reclutamiento de SWI/SNF ni la actividad catalítica del complejo, para luego usar esta información en la generación de los probadores descritos en la sección 3.2. De esta forma, el fin fue que en los ensayos subsecuentes donde se evaluó el efecto de la distancia entre un nucleosoma posicionado y el sitio de unión para Gal4 sobre la actividad del complejo  $\gamma$ SWI/SNF no exista influencia de la extensión del ADN corriente abajo del sitio, dado que esta extensión necesariamente varía al alterar la distancia entre el nucleosoma y el sitio del factor, para segmentos de ADN que son todos de la misma extensión total.

#### **4.3.1 Efecto de variaciones en la extensión del ADN corriente abajo del sitio de unión de Gal4 sobre la unión del factor de transcripción Gal4-VP16 y el reclutamiento de $\gamma$ SWI/SNF a los probadores mononucleosomales**

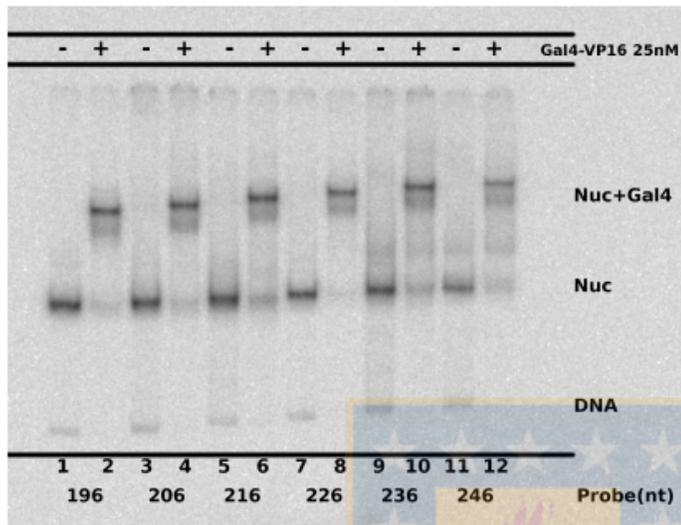
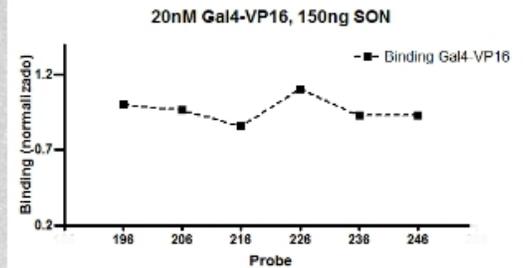
Como se puede ver en la figura 8, no se observan variaciones importantes en el grado de unión del factor de transcripción quimérico Gal4-VP16 a los seis probadores mononucleosomales considerados, vale decir, su eficiencia de unión se mantiene

constante independiente de la extensión del ADN corriente abajo de su sitio de unión. En este caso, se utilizó una concentración nominal de Gal4-VP16 de 25nM, sin embargo a concentraciones menores (hasta 20nM), las cuales también fueron probadas la eficiencia de unión es la misma y no presenta variaciones en ninguno de los seis probadores (resultados no mostrados).

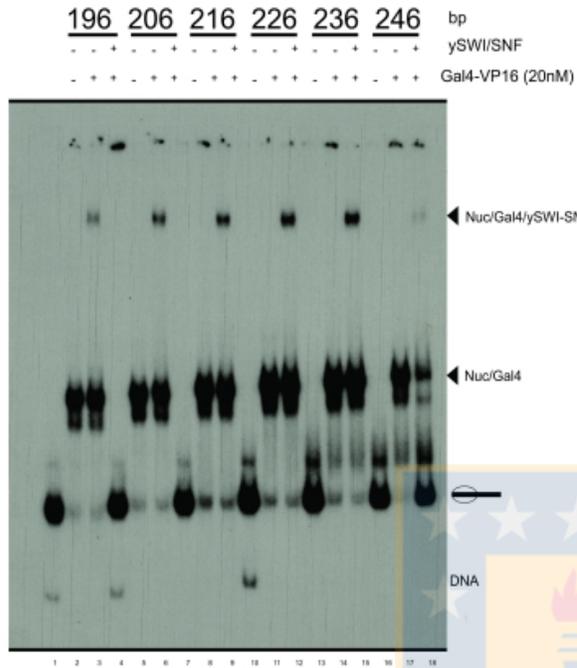
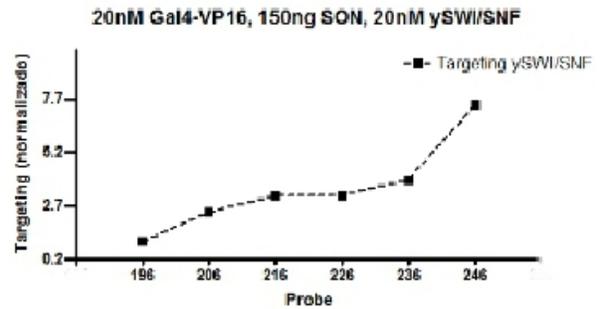
En el caso del reclutamiento de  $\gamma$ SWI/SNF por Gal4-VP16 a los probadores mononucleosomales se realizaron una serie de ensayos según lo descrito en la sección 2.4.2. No se observaron diferencias en el grado de reclutamiento, con la excepción del probe de 196pb, el cual muestra un reclutamiento inferior al resto de las sondas y el probe 246, el cual muestra un reclutamiento mayor (Figura 9, representativa de la serie de ensayos<sup>19</sup>) Cabe mencionar que dadas las condiciones de estrictez del experimento (generadas mediante la adición de un exceso de SON),  $\gamma$ SWI/SNF no es capaz de unirse por si mismo al nucleosoma marcado, fenómeno observado de forma consistente en nuestro laboratorio y reportado en publicaciones previas (Gutiérrez y cols 2007). Esto indica que, a una concentración constante de Gal4-VP16 (20nM, correspondiente a casi una totalidad de la sonda marcada unida a Gal4-VP16), las variaciones en el grado de reclutamiento del complejo se deben exclusivamente a las diferencias inter-individuales entre las sondas en estudio.

---

<sup>19</sup> Probe 246 aparece con bajo *targeting* por error experimental. En todos los otros aspectos, el experimento es representativo de la serie de ensayos realizados.

**A****B:**

**Figura 8: Efecto de la extensión del ADN corriente abajo del sitio de unión de Gal4 sobre el binding de Gal4-VP16 a los probadores mononucleosomales. Probe(nt):** Extensión total del probe mononucleosomal; **DNA:** Patrón de migración del ADN desnudo; **Nuc:** Patrón de migración del probador mononucleosomal; **Nuc+Gal4:** Patrón de migración del complejo formado entre Gal4-VP16 y el probador mononucleosomal. Electroforesis en gel de poliacrilamida no-denaturante al 5%(40:1). **A:** Análisis electroforético del grado de unión de Gal4-VP16 a los probadores. **B:** Cuantificación densitométrica del experimento de unión a los probadores. Resultados normalizados contra probe 196.

**A****B**

**Figura 9: Reclutamiento de ySWI/SNF por Gal4-VP16 a los probadores mononucleosomales.** DNA: Patrón de migración del ADN; ○: Patrón de migración del nucleosoma; Nuc/Gal4: Patrón de migración del complejo de nucleosoma con Gal4-VP16; Nuc/Gal4/ySWI-SNF: Patrón de migración del complejo ternario del nucleosoma con Gal4-VP16 y ySWI/SNF. Ensayo realizado a alta estrictez (200ng SON) y resuelto en gel de poliacrilamida 3,5% (60:1) no-denaturante. **A:** Análisis electroforético del grado de reclutamiento de ySWI/SNF a los probadores. **B:** Cuantificación densitométrica de la serie de experimentos de reclutamiento. Resultados normalizados contra el probe 196.

#### **4.3.2 Ensayos de remodelación de cromatina (desplazamiento en *trans* del octámero o *eviction*) por el complejo SWI/SNF sobre los probadores mononucleosomales**

Con el objetivo de verificar si la extensión del ADN corriente abajo del sitio de unión de Gal4 afecta la actividad del complejo ySWI/SNF se realizó una serie de ensayos de remodelación de cromatina en presencia de Gal4-VP16 como factor de transcripción reclutando al complejo hacia el nucleosoma y se evaluó si existían diferencias en su actividad catalítica. Esta verificación se realizó cuantificando el grado de desensamble del nucleosoma (*eviction*), lo que se midió determinando la cantidad de ADN libre en el carril con el nucleosoma remodelado, restándole la cantidad (si la hubiere) de ADN libre previamente existente en la sonda y dividiéndolo por la señal del nucleosoma sin remodelar. Cabe mencionar que los ensayos de remodelación realizados en esta tesis se realizaron a alta estrictez. Esto significa que en la reacción se adicionan nucleosomas no marcados (oligonucleosomas, SON, ver Materiales y Métodos para más detalles) con el objeto de que la interacción del complejo SWI/SNF sólo ocurra por reclutamiento mediado por el factor de transcripción, en este caso Gal4-VP16. El razonamiento es que a baja estrictez el complejo podría interaccionar por sí mismo con el probador nucleosomal y entonces no tendría lugar algún efecto que pueda tener la variación en las distancias entre el sitio de unión del factor y el nucleosoma posicionado (o el extremo opuesto del segmento de ADN). Cabe mencionar que en la figura 10 aparece una banda de migración más lenta que el nucleosoma sin remodelar. Estudios previos (Gutiérrez y cols 2007) demuestran que esta banda corresponde a un nucleosoma posicionado centralmente en la sonda y que esto es un producto transitorio, no final, de la reacción de remodelación. En concordancia con lo anterior, nuestro laboratorio ha observado este fenómeno de forma reiterada y regular en este tipo de experimentos. Para determinar si existen diferencias en el grado de *eviction* entre las sondas en

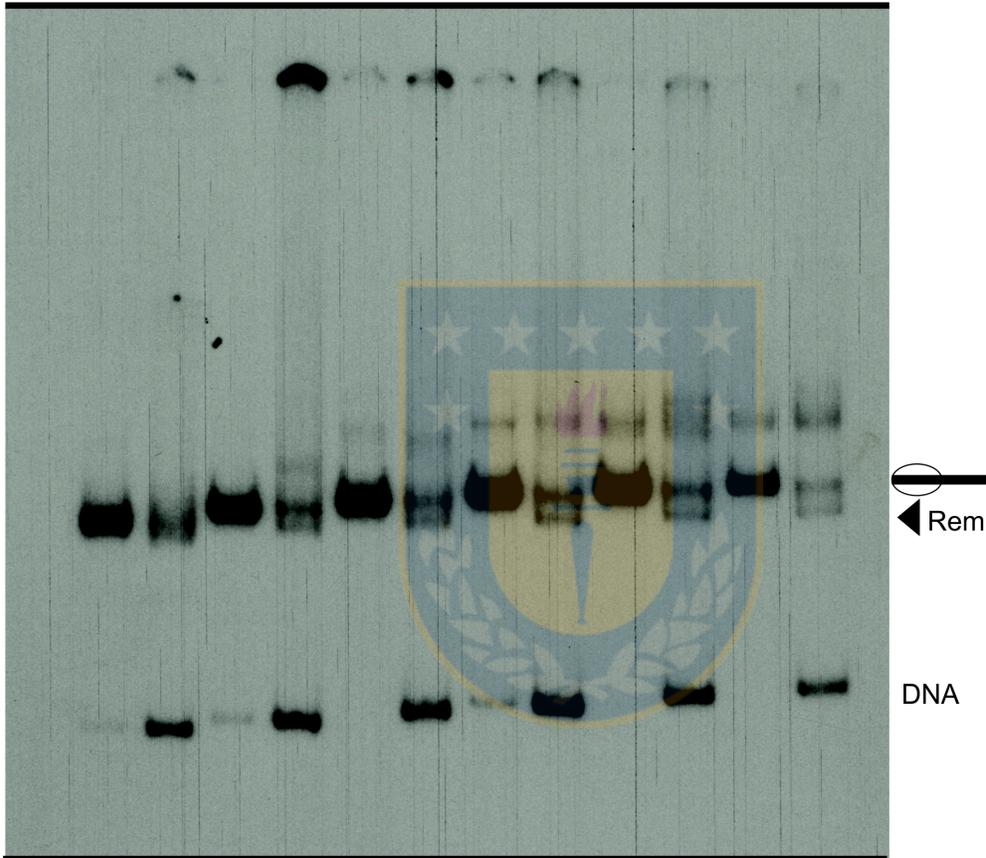
análisis se realizó un ANOVA de una vía y posteriormente la prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak utilizando el paquete estadístico R con uso de un intervalo de confianza del 95%. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

En las figuras 10 y 11 se observa que no existen diferencias significativas en la actividad de *eviction* del complejo  $\gamma$ SWI/SNF que puedan ser atribuidas a la extensión del ADN corriente abajo del sitio de unión para Gal4. A su vez, en la figura 12 observamos que incluso al utilizar dos complejos  $\gamma$ SWI/SNF purificados por diferentes laboratorios se mantiene la tendencia cinética general, a pesar de que el complejo purificado en nuestro laboratorio posee menor actividad en general.

Es entonces en base a estos ensayos que se decide construir los probadores con modificaciones en la distancia entre el nucleosoma posicionado y el sitio de unión de Gal4 con una longitud fija de 216pb, vale decir con 30pb a 45pb corriente abajo del sitio Gal4 para los probadores con distancia variable entre el nucleosoma posicionado y el sitio Gal4.



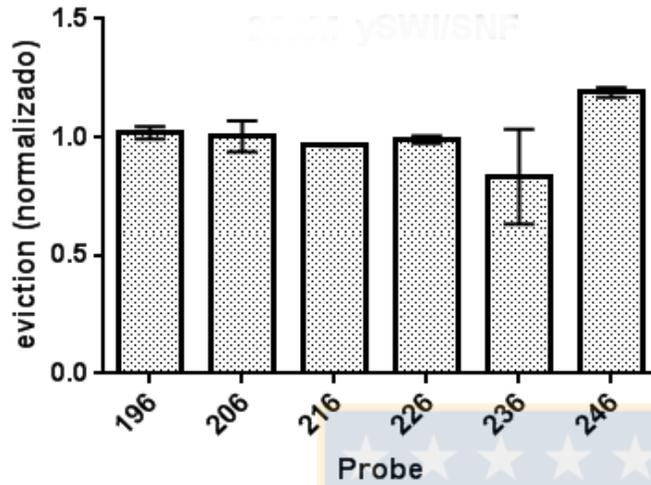
<u>196</u>	<u>206</u>	<u>216</u>	<u>226</u>	<u>236</u>	<u>246</u>	bp
- +	- +	- +	- +	- +	- +	Gal4-VP16 (20nM)
- +	- +	- +	- +	- +	- +	ySWI/SNF



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

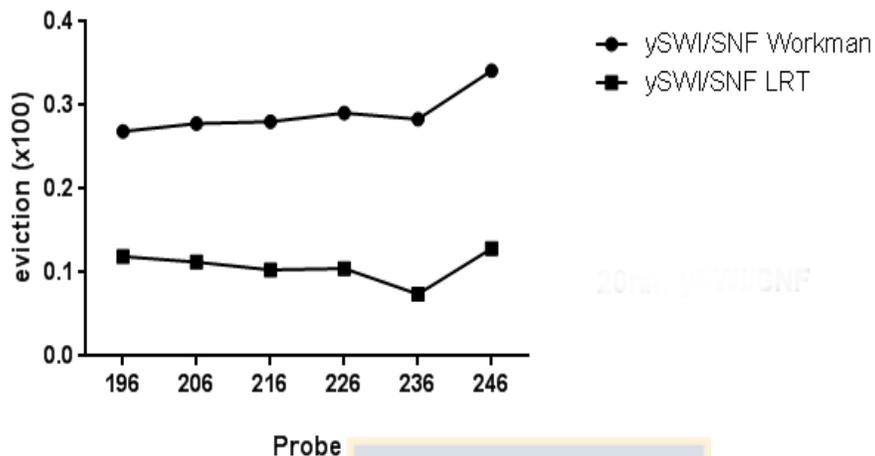
**Figura 10: Ensayo de remodelación de cromatina (desplazamiento en trans del octámero o evicción) por el complejo SWI/SNF sobre los probadores mononucleosomales. DNA:** Patrón de migración del ADN; **Rem:** Patrón de migración del nucleosoma remodelado por *sliding*; : Patrón de migración del nucleosoma sin remodelar. Ensayo realizado a alta estrictez (150ng SON) y resuelto en gel de poliacrilamida 5% (AA:Bis 40:1) no-denaturante.

20nM Gal4-VP16, 150ng SON, 20nM ySWI/SNF



**Figura 11: Cuantificación de grado de eviction para los probadores nucleosomales.** En cada réplica, el grado de desensamble de los probadores fue normalizado contra la media de su ensayo correspondiente. Diferencias no significativas para todos los probes (95% CI).

20nM Gal4-VP16, 150ng SON, 20nM ySWI/SNF



**Figura 12: Comparación del grado de eviction para los probes mononucleosomales utilizando dos complejos ySWI/SNF purificados por dos laboratorios diferentes. ySWI/SNF Workman:** Complejo purificado en el laboratorio del Dr. Jerry Workman, Stowers Institute for Medical Research; **ySWI/SNF LRT:** Complejo purificado en el Laboratorio de Regulación Transcripcional, UdeC. Ambos resultados sin normalizar. Se observa una diferencia en la actividad total de los complejos y una conservación del patrón general de actividad para los 6 probadores en cuestión.

#### **4.4 Ensayos de unión de la proteína Gal4-VP16, reclutamiento del complejo SWI/SNF por Gal4-VP16 y desplazamiento en *trans* del octámero a los probadores mononucleosomales marcados (variaciones de extensión entre el nucleosoma posicionado y el sitio de unión Gal4)**

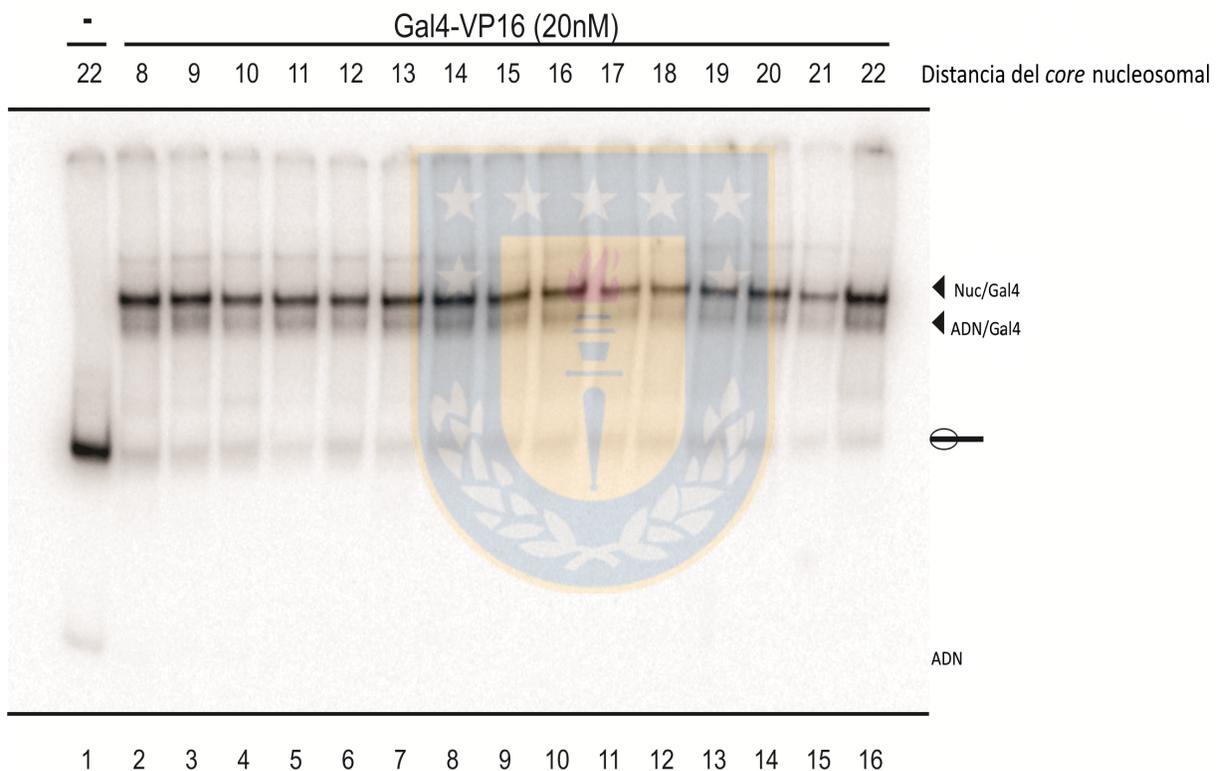
Estos ensayos se realizaron con el objeto de determinar si diferencias en la extensión del ADN entre el nucleosoma posicionado por la secuencia 601 y el sitio de unión para Gal4 pueden alterar la eficiencia de unión del factor de transcripción quimérico Gal4-VP16, el reclutamiento del complejo  $\gamma$ SWI/SNF por este factor al probador mononucleosomal, y/o la actividad catalítica del complejo al ser reclutado por el mismo.

##### **4.4.1 Efecto de variaciones en la extensión del ADN entre un nucleosoma posicionado y el sitio de unión de Gal4 sobre la unión del factor de transcripción Gal4-VP16 y el reclutamiento de $\gamma$ SWI/SNF a los probadores mononucleosomales**

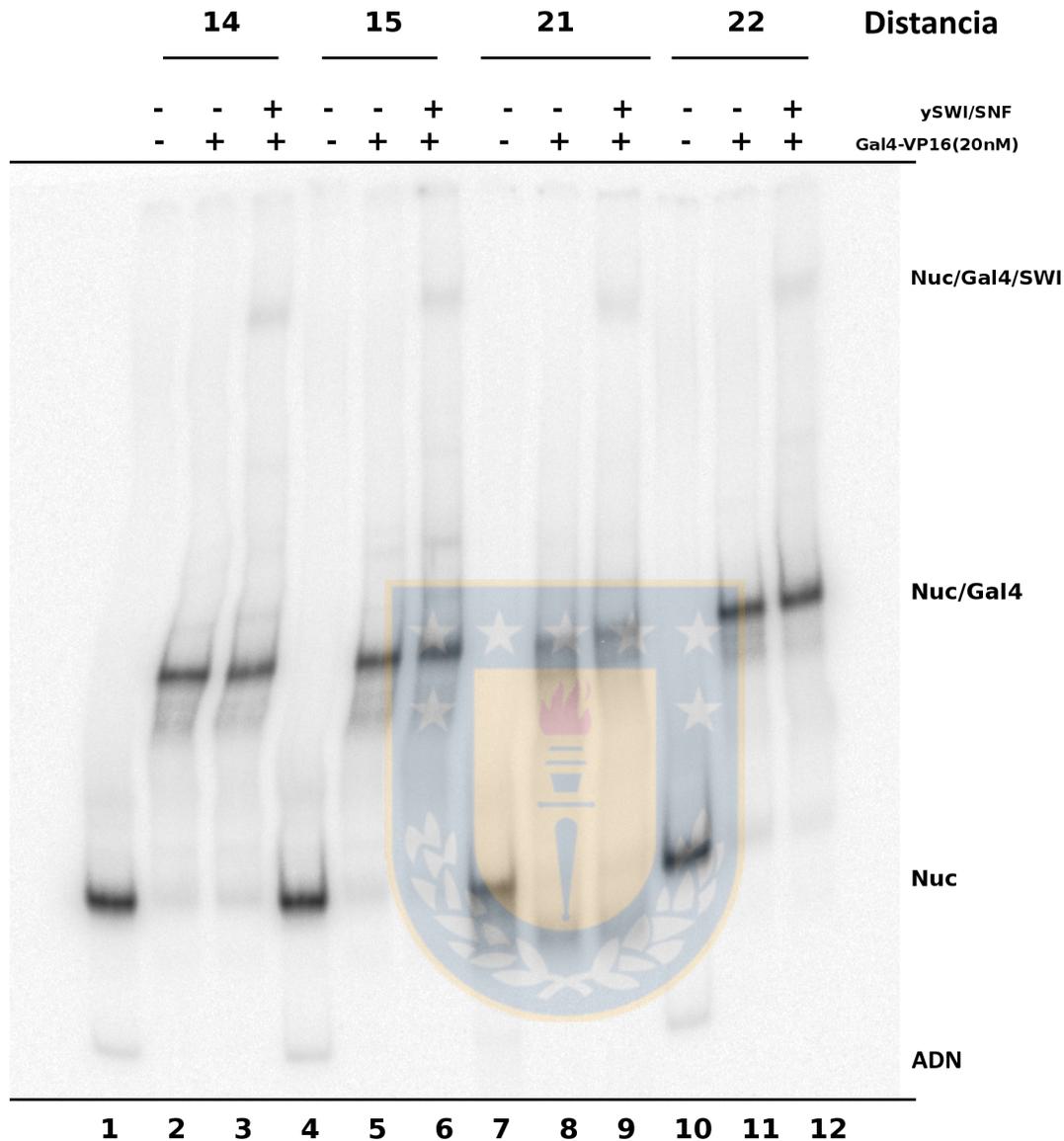
Como se observa en la figura 13 no se aprecian variaciones importantes en el grado de unión del factor de transcripción quimérico Gal4-VP16 a los 15 probadores mononucleosomales considerados, vale decir, su eficiencia de unión se mantiene relativamente constante independiente de la extensión del ADN entre el nucleosoma posicionado y el sitio de unión para el factor, la que resultó ser >90% en todos los casos.

En el caso del reclutamiento de  $\gamma$ SWI/SNF por Gal4-VP16 a los probadores mononucleosomales se realizaron una serie de ensayos según lo descrito en la sección 2.4.2. Estos ensayos comprendieron una primera serie de análisis considerando el reclutamiento para los 15 probadores simultáneamente y, luego fueron realizados los ensayos de *eviction* para estos probadores (sección 3.4.2, más adelante). De esta manera se seleccionaron los probadores con máximos y mínimos

de *eviction*, se realizó otra serie de análisis con los 4 probadores seleccionados. Tanto en los primeros ensayos como en los realizados con estos 4 probadores (Figura 14) no se observaron diferencias significativas en el grado de reclutamiento de SWI/SNF; lo que sugiere que tanto el grado de unión de Gal4-VP16 y el reclutamiento de  $\gamma$ SWI/SNF son independientes de la distancia entre el nucleosoma posicionado y el sitio de unión para Gal4.



**Figura 13: Unión de Gal4-VP16 a los 15 probadores mononucleosomales marcados. DNA:** Patrón de migración del ADN; : Patrón de migración del probador mononucleosomal; **Nuc/Gal4:** Patrón de migración del complejo formado entre Gal4-VP16 y el probador mononucleosomal. **DNA/Gal4:** Patrón de migración del complejo formado entre Gal4-VP16 y el ADN. Electroforesis en gel de poliacrilamida no-denaturante al 5%(AA:bis, 40:1).



**Figura 14: Reclutamiento de ySWI/SNF por Gal4-VP16 a los probadores mononucleosomales con distintas distancias entre el nucleosoma posicionado y el sitio Gal4.** El set de probadores en el análisis de la figura corresponde a una selección de probadores que muestran diferencias significativas en el grado de evicción (resultado contenido en figura siguiente). **ADN:** Patrón de migración del ADN; **Nuc:** Patrón de migración del nucleosoma; **Nuc/Gal4:** Patrón de migración del complejo de nucleosoma con Gal4-VP16; **Nuc/Gal4/SWI:** Patrón de migración del complejo ternario del nucleosoma con Gal4-VP16 y ySWI/SNF. Ensayo realizado a alta estrictez (200ng SON) y resuelto en gel de poliacrilamida 3,5% (AA:bis, 60:1) no-denaturante.

#### **4.4.2 Ensayos de remodelación de cromatina (desplazamiento en *trans* del octámero o *eviction*) por el complejo SWI/SNF sobre los 15 probadores mononucleosomales**

Con el objetivo de verificar si la distancia entre un nucleosoma posicionado y el sitio de unión de Gal4 afecta la actividad del complejo ySWI/SNF se realizaron una serie de ensayos de remodelación de cromatina en presencia de Gal4-VP16 como factor de transcripción reclutando al complejo hacia el nucleosoma y se evaluó si existían diferencias en su actividad catalítica, medido por el grado de desensamble del nucleosoma (*eviction*). Esta medición se realizó cuantificando la cantidad de ADN libre en el carril con el nucleosoma remodelado, restándole la cantidad (si la hubiere) de ADN libre en el carril del nucleosoma sin ser sometido a remodelación y dividiéndolo por la señal del nucleosoma de este mismo carril. Para determinar si existen diferencias en el grado de *eviction* entre las sondas en análisis se realizó un ANOVA de una vía y posteriormente la prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak utilizando el paquete estadístico R con el uso de un intervalo de confianza del 95%.

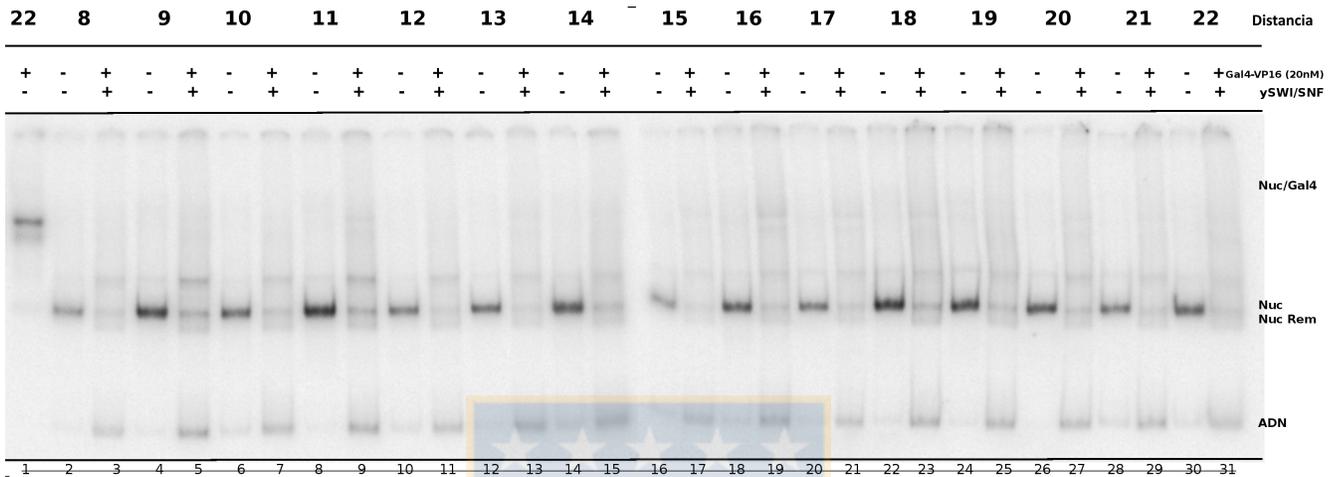
Los resultados de los ensayos aquí presentados corresponden a seis réplicas del ensayo con el total de los 15 probadores simultáneamente (Figura 15, representativa de la serie de ensayos). El análisis cuantitativo mostró diferencias significativas en el grado de *eviction* entre algunos de los distintos probadores, como queda evidenciado en la Figura 16, gráfico resumen de la serie de ensayos realizados.

A partir de estos resultados se seleccionaron cuatro probadores, los cuales presentaron las dos actividades de remodelación más altas (15 y 21) y las dos más bajas (probadores 14 y 22) y se realizaron ensayos de *eviction* en las mismas condiciones que las series con los 15 probadores simultáneos para verificar las diferencias en la actividad. Estos ensayos se realizaron por triplicado y la síntesis de los resultados de los primeros ensayos se combinaron con las 3 réplicas de los

probadores seleccionados. (Figura 17).

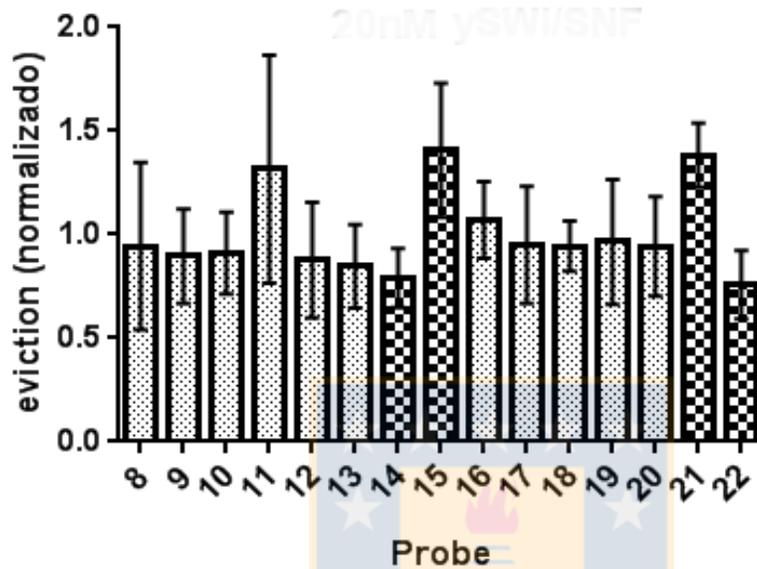
El análisis muestra que el probador de distancia de 21pb presenta la mayor actividad entre todas las sondas consideradas y el probador de distancia 22pb la menor. Aparecen como estadísticamente significativas las diferencias entre el probador 21 y el 22 y entre el 21 y el 14, no así entre el probador 15 y las demás sondas analizadas.



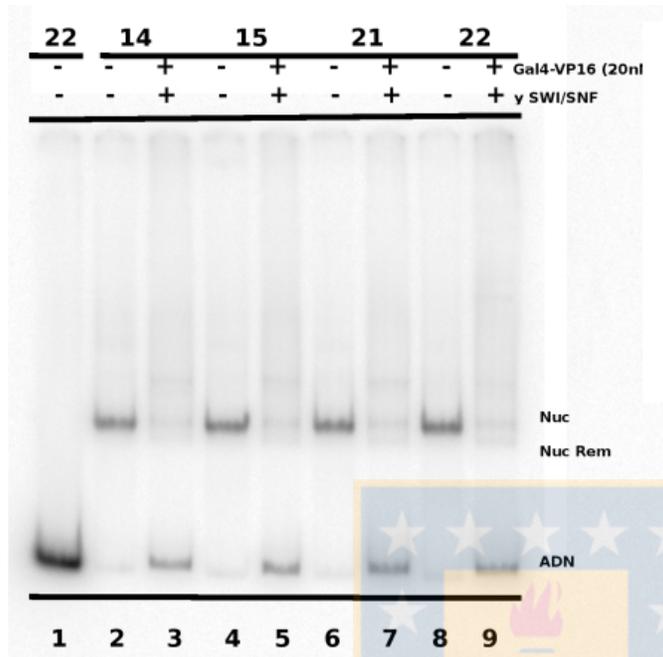
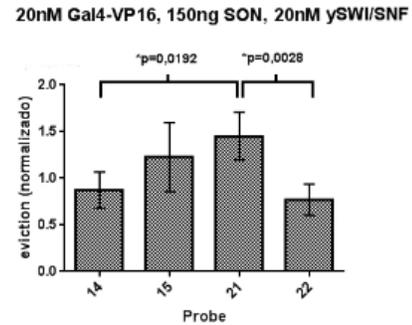


**Figura 15: Ensayo de remodelación de cromatina (desplazamiento en trans del octámero o eviction) por el complejo SWI/SNF sobre los probadores mononucleosomales. ADN:** Patrón de migración del ADN; **Nuc/Rem:** Patrón de migración del nucleosoma remodelado; **Nuc:** Patrón de migración del nucleosoma sin remodelar. Ensayo realizado a alta estrictez (150ng SON) y resuelto en gel de poliacrilamida 5% (AA:bis, 40:1) no-denaturante. Ensayo representativo de una serie de seis experimentos. En la figura se muestra una imagen compuesta de dos geles, el primero en carriles 1 a 14, el segundo de 15 a 31, ambos cargados y corridos simultáneamente. La reacción del carril 1 no contiene mezcla de remoción.

**20nM Gal4-VP16, 150ng SON, 20nM ySWI/SNF**



**Figura 16: Cuantificación del grado de evicción para los 15 probadores mononucleosomales.** Grado de evicción normalizado contra la media de cada ensayo. Se seleccionaron los dos probadores con máximo evicción (15 y 21) y los dos probadores con mínimo evicción (14 y 22) para análisis posterior. Barras oscuras: Probes seleccionados para análisis posterior.

**A****B**

**Figura 17: Ensayo de remodelación de cromatina (desplazamiento en trans del octámero o eviction) por el complejo SWI/SNF sobre para los 4 probadores seleccionados. A: ADN: Patrón de migración del ADN; Nuc Rem: Patrón de migración del nucleosoma remodelado; : Nuc :Patrón de migración del nucleosoma sin remodelar. Ensayo realizado a alta estrictez (150ng SON) y resuelto en gel de poliacrilamida 5% (AA:bis, 40:1) no-denaturante. Ensayo representativo de una serie de tres experimentos. B: Cuantificación del grado de eviction. Valores obtenidos de la serie de 6 ensayos previamente mostrados más 3 ensayos sólo con los probadores seleccionados. CI: 95%.**

## 5. DISCUSIÓN

Desde la década de los 90, la estructura de la cromatina se ha perfilado como un actor crítico en la regulación de la expresión génica. De esta manera, los procesos involucrados en su dinámica, topología y relación con elementos genéticos son capaces de modular la transcripción de genes.

En el presente trabajo demostramos que la distancia y/o disposición rotacional entre un nucleosoma posicionado y un factor de transcripción capaz de reclutar a un complejo remodelador de cromatina son elementos capaces de afectar la eficiencia de la actividad catalítica de este complejo y proponemos que este es un factor que podría potencialmente alterar la expresión de genes eucariontes.

El trabajo central presentado se realizó en dos fases. La primera estuvo orientada a determinar el efecto de la extensión de ADN corriente abajo del sitio de unión del factor de transcripción sobre la actividad de remodelación del complejo ySWI/SNF con el objetivo principal de establecer la extensión óptima de los probadores mononucleosomales a construir para llevar a cabo la segunda fase de la investigación (ver Sección 2.2). Se observa que, en un rango amplio, la extensión de ADN corriente abajo del sitio Gal4 no afecta la unión de Gal4-VP16 ni la actividad catalítica del complejo de forma significativa. Sin embargo tramos cortos (<20nt) de este ADN sí parecen tener un efecto sobre la eficiencia de reclutamiento del complejo por este factor de transcripción, lo que llevó a construir sondas con entre 30 y 45nt de extensión para la segunda fase de la investigación.

De manera interesante, reportes previos indican que SWI/SNF no requeriría de ADN extranucleosomal para acceder o remodelar un nucleosoma (Gangaraju y Bartholomew 2007<sup>20</sup>), a diferencia de lo reportado para otros complejos remodeladores de la subfamilia ISWI, los cuales establecen puntos de contacto en el

---

20 Aunque posteriormente los autores cambian de opinión, según se ve en Dechassa y cols 2010

ADN adyacente al *core* nucleosomal (Zofall y cols 2004, Dang y cols 2006). En contraste con estos estudios, nuestros ensayos de reclutamiento de SWI/SNF por Gal4-VP16 mostraron que la extensión de ADN corriente abajo del sitio de unión del factor de transcripción afecta el reclutamiento del complejo por el factor, con extensiones de 10 nucleótidos corriente abajo del sitio mostrando un reclutamiento significativamente menor que el resto de las sondas (Figura 9). En este contexto, experimentos previos realizados en nuestro laboratorio muestran que, si bien SWI/SNF es capaz de unirse a un *core* nucleosomal con exactamente 147 pares de bases de ADN, éste lo hace con una eficiencia significativamente mayor en presencia de ADN extranucleosomal, esta vez en una interacción no mediada por un factor de transcripción (Anexo 1). En conjunto estas observaciones nos llevan a sugerir que el complejo SWI/SNF se vería afectado por la extensión de ADN extranucleosomal, tanto al unirse de forma inespecífica al nucleosoma como al ser reclutado a una región específica del genoma por un factor de transcripción, posiblemente formando puntos de interacción entre este ADN y una o más de sus subunidades. Una manera de indagar de forma más profunda en esta evidencia podría involucrar ensayos de *footprinting* de ADN (Galas y Schmitz 1978) utilizando un complejo SWI/SNF purificado y sondas de ADN reconstituido a la forma de mononucleosomas con diferentes extensiones de ADN extranucleosomal (e.g., 0, 10, 20, 30nt, para probar lo observado con nuestras sondas), con y sin presencia de un factor de transcripción capaz de reclutar al complejo, con el objetivo de analizar la existencia de zonas de la sonda protegidas por la unión del complejo y determinar así una posible región de interacción del complejo con ADN extranucleosomal.

La segunda fase de este trabajo involucró probar el efecto de alteraciones de la extensión de ADN entre un nucleosoma posicionado y un sitio de unión para un factor de transcripción con la capacidad de reclutar al complejo SWI/SNF sobre la actividad del complejo al acceder éste al nucleosoma sólo a través de reclutamiento por el factor de transcripción. Esto surge de observaciones previas en nuestro

laboratorio en las que la distancia entre el sitio de reclutamiento del complejo afecta la actividad de *eviction*, con distancias de 42 pb mostrando una menor actividad del complejo que dos distancias más cortas probadas (Alarcón 2013, trabajo de tesis). No obstante este trabajo no consideró el posible efecto de la fase rotacional que adquiere el complejo sobre la hebra de ADN en relación al nucleosoma, puesto que entre 22 y 42 pb tal vez el aspecto rotacional esté diluido por la flexibilidad natural de torsión sobre su eje de la doble hebra, que a mayor número de pb permitirá más opciones de posiciones rotacionales respecto del nucleosoma adyacente. Es entonces este elemento el que decidimos observar de forma simultánea a la distancia generando 15 probadores con diferencias de distancia de un nucleótido en un rango de entre 8 y 22nt entre el nucleosoma posicionado y el sitio de reclutamiento de SWI/SNF. En términos técnicos, además de la alta resolución que implica realizar ensayos cada un nucleótido en el tramo considerado de distancias, esta aproximación permite verificar simultáneamente el efecto de la fase rotacional anteriormente mencionado sobre la actividad catalítica y los perfiles de unión del complejo SWI/SNF. Se observa que, dadas las propiedades estructurales de la doble hebra de ADN, se da una periodicidad de aproximadamente 10 nucleótidos en la colocación de algún elemento estructural de la hebra (como uno de los surcos de ADN) hacia una orientación particular. Este es un factor importante a considerar dado que en nuestro set de 15 probadores el factor de transcripción Gal4-VP16 al interactuar con su secuencia diana toma una orientación en cada caso distinta respecto de un nucleosoma que tiene siempre la misma disposición en la secuencia posicionadora 601 lo que implica que, al ser reclutado por el factor, la posición relativa del complejo SWI/SNF con respecto al nucleosoma posicionado dentro del probador variará no sólo en términos de distancia, sino también con respecto a la orientación o *fase rotacional* que adquirirá en cada uno de los 15 probadores considerados.

Es requisito para abordar los efectos de la distancia y rotación sobre la actividad del

complejo que no se vean afectadas ni la unión de Gal4-VP16 ni el reclutamiento del complejo por este factor, con el objetivo de que los efectos observados sobre la actividad de *eviction* no se puedan atribuir, por ejemplo, a que algunos probadores reclutan de forma más eficiente el complejo, con el consecuente incremento sobre el *eviction*. Los resultados de los ensayos de unión de Gal4-VP16 y de reclutamiento del complejo sobre los 15 probadores satisfacen esta condición, indicando que las variaciones en la actividad observadas en los subsecuentes ensayos de *eviction* realizados se deben en forma exclusiva a cambios en la eficiencia de la actividad catalítica del complejo SWI/SNF gatillados por las características intrínsecas de cada probador mononucleosomal.

Como se observó en los resultados se pudo identificar diferencias estadísticamente significativas en la actividad de *eviction* del complejo en al menos 3 de los probadores en estudio, incluyendo máximos y mínimos de actividad, lo que sugiere fuertemente que existe un efecto de la topología local de los elementos involucrados en la remodelación de cromatina ATP-dependiente sobre la actividad catalítica del complejo SWI/SNF. De forma contraria a nuestras expectativas iniciales el efecto de la disposición rotacional no resulta obvio. En condiciones donde sólo la rotación afectara la actividad del complejo esperaríamos que los mínimos de *eviction* se localizaran a aproximadamente 5 nucleótidos de distancia de los máximos, fenómeno que no observamos en los ensayos realizados. De la misma forma, el que los probadores con menor actividad se ubiquen exactamente a un nucleótido de distancia de los que presentan las actividades más altas no es consistente con un modelo que considere sólo rotación o sólo distancia. En concreto, el probador 21 presenta la máxima actividad de todas las sondas estudiadas, lo que bajo un modelo combinado de efectos de distancia y disposición rotacional, podríamos considerar que es una posición óptima en la que el complejo podría lograr una asociación de sus regiones de interacción física con el octámero de histonas, el ADN en la superficie del nucleosoma y el ADN extranucleosomal (Figura 17). A la inversa, el

nucleosoma 22 presenta consistentemente la mínima actividad entre todos los probadores estudiados, lo que nos sugiere que una alteración de unos pocos angstrom de distancia y una rotación aproximada de  $33^\circ$  bastarían para que la disposición del complejo relativa al nucleosoma y ADN extranucleosomal se torne particularmente desfavorable, afectando de esta manera la actividad catalítica del complejo, caso similar al probador 14 con respecto al probador 15. Los probadores 15 y 11 son casos interesantes, en tanto aparecen como máximos relativos a la media si ignoramos la desviación estándar asociada. En particular el probador 11 tiene una diferencia en la posición del sitio de unión para Gal4 de exactamente 10 nucleótidos con el probador 21, lo que de haberse observado menos variación entre los ensayos donde se le evaluó sería una evidencia importante para considerar el efecto de la disposición rotacional sobre la actividad catalítica del complejo, al localizar 11 y 21 a Gal4-VP16 y SWI/SNF en la misma orientación con respecto al nucleosoma posicionado. Resulta importante entonces continuar evaluando el efecto de estos elementos sobre la actividad catalítica del complejo SWI/SNF y otros complejos remodeladores de cromatina con el fin de poder determinar la contribución específica de los factores que determinan la topología local de promotores eucariontes sobre la dinámica de cromatina y diseñar experimentos que permitan estimar la contribución relativa de la distancia y la disposición rotacional con el objetivo final de derivar un modelo general del fenómeno.

La influencia de la topología local sobre la dinámica de cromatina no es un fenómeno biológicamente trivial y algunos trabajos previos han mostrado efectos importantes de alteraciones en la extensión de ADN en promotores de genes eucariontes sobre la transcripción. Por ejemplo, se reportó la influencia de la introducción de trectos de poli dA:dT de longitud variable en promotores sobre la expresión de genes en *Saccharomyces cerevisiae*, los cuales además de constituir secuencias excluyentes de nucleosomas, especialmente prevalentes en promotores eucariontes, alteraban la distancia entre sitios de unión para factores de transcripción, observándose

alteraciones significativas en la actividad transcripcional de los genes *in vivo* (Raveh-Sadka y cols 2012). Otro trabajo se realizó identificando promotores de genes que presentaran repeticiones en tándem (VNTRs) en diversas cepas de *Saccharomices cerevisiae* y alterando la cantidad de las mismas para medir el efecto que tienen sobre la expresión de los genes que controlan (Vinces y cols 2009), observándose un incremento en la actividad transcripcional a medida que aumenta la cantidad de repeticiones en estos promotores hasta un límite, luego del cual la actividad comienza a disminuir. Notablemente, los genes que presentaron repeticiones mostraron una mayor divergencia en los niveles de expresión con respecto a los genes que no las presentaron y una correlación inversa entre repeticiones en tándem y la ocupancia de nucleosomas en la región promotora, vinculando de esta forma la aparición de mutaciones en promotores, la arquitectura local de cromatina, cambios en la actividad transcripcional de genes y la aparición de novedad evolutiva en eucariontes.

Esto presenta un panorama donde mutaciones que aparezcan en promotores de genes y que no necesariamente alteren elementos como la aparición o eliminación de sitios de unión para factores de transcripción puedan modular la expresión de genes *in vivo*. Se ha reportado que polimorfismos de inserción/delección (INDELS) ocurren con relativa frecuencia en regiones regulatorias del genoma, en contraposición a regiones codificantes (Montgomery y cols 2013) y su aparición podría, de la misma forma que en los trabajos discutidos anteriormente en *Saccharomices cerevisiae*, estar relacionada con alteraciones en los perfiles de expresión de genes entre individuos de la misma especie de forma patológica o como parte de la variabilidad biológica natural, con consecuencias fenotípicas observables.

En conclusión, con este trabajo presentamos un conjunto de resultados que apuntan a un nuevo mecanismo de regulación de la expresión de genes en eucariontes ligado a cambios en la dinámica de cromatina generados por alteraciones en la topología

local de los elementos involucrados en la misma, que podría dar cuenta de la variabilidad fenotípica inter-individual inherente a estos organismos y por el cual pequeñas mutaciones en regiones regulatorias podrían ser importantes generadores de novedad evolutiva.



## 6. REFERENCIAS

Alarcón V. 2013. Influencia de factores de transcripción y de secuencias de ADN sobre la remodelación de cromatina dependiente de ATP. Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile.

Bartolomé S, Bermúdez A, Dabán J. 1994. Internal Structure of the 30 nm Chromatin Fiber. *Journal of Cell Science* 107, 2983-2992

Becker P, Hörz W. 2002. ATP-Dependent Nucleosome Remodeling" *Annual Review of Biochemistry*. 71, 247–73

Becker P, Längst G. 2004. Nucleosome remodeling: one mechanism, many phenomena?. *Biochimica et Biophysica Acta* 1677, 58–63

Clapier C, Cairns B. 2009. The Biology of Chromatin Remodeling Complexes. *Annual Review of Biochemistry*. 78, 18.1–18.32

Dang W, Kagalwala MN, Bartholomew B. 2006. Regulation of ISW2 by concerted action of histone H4 tail and extranucleosomal DNA. *Molecular and Cellular Biology*;26(20):7388-96.

Dechassa ML, Sabri A, Pondugula S, Kassabov SR, Chatterjee N, Kladde MP, Bartholomew B. 2010. SWI/SNF has intrinsic nucleosome disassembly activity that is

dependent on adjacent nucleosomes. *Molecular Cell*. 28;38(4):590-602.

Felsenfeld G, Groudine M. 2003. Controlling the Double Helix. *Nature* 421(6921):448-453.

Finch J, Klug A. 1976. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 73, 1897-1901

Fry C, Peterson C. 2001. Chromatin remodeling enzymes: who's on first?. *Current Biology* 11, R185-R197

Fussner E, Ching R, Bazett-Jones D. 2010. Living without 30 nm chromatin fibers. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol 36, No 1

Galas DJ, Schmitz A. 1978. DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Research*;5(9):3157-70.

Gangaraju VK, Bartholomew B. 2007. Mechanisms of ATP dependent chromatin remodeling. *Mutation Research*. 1;618(1-2):3-17.

Gutiérrez J, Chandy M, Carozza M, Workman J. 2007. Activation domains drive nucleosome eviction by SWI/SNF. *The EMBO Journal* 26, 730–740

Hewish D, Burgoyne L. 1973. Chromatin substructure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear desoxyribonuclease. *Biochemical and Biophysical Communications* Vol 52, No 2.

Iyer V, Struhl K. 1995. Poly(dA:dT), a ubiquitous promoter element that stimulates

transcription via its intrinsic structure. *The EMBO Journal* 14, 2570–2579

Jiang C, Pugh F. 2009. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nature Reviews Genetics* Vol 10, 161-172

Kornberg R. 1974. Chromatin Structure: A repeating unit of Histones and DNA. *Science* 184, 868-871

Lee C, Shibata Y, Rao B, Strahl B, Lieb J. 2004. Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nature Genetics* 36, 900–905

Lowary P, Widom J. 1998. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. *Journal of Molecular Biology* 276(1): 19-42

Maeshima K, Hihara S, Eltsov M. 2010. Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo?. *Current Opinion in Cell Biology* 22, 291–297

Mills R, Pittard S, Mullaney J, Farooq U, Creasy T, Mahurkar A, Kemeza D, Strassler D, Ponting C, Webber C, Devine S. 2011. Natural genetic variation caused by small insertions and deletions in the human genome. *Genome Research* 21, 830-839

Montgomery S, Goode D, Kvikstad E, Albers C, Zhengdong Z, Xinmeng J, Guruprasad A, Howie B, Karczewski K, Smith K, Anaya V, Richardson R, Davis J, The 1000 Genomes Project Consortium, MacArthur D, Sidow A, Duret L, Gerstein M, Makova K, Marchini J, McVean G, Lunter G. 2013. The origin, evolution, and functional impact of short insertion–deletion variants identified in 179 human genomes. *Genome Research* 23, 749-761

Mullaney J, Mills R, Pittard S, Devine S. 2010. Small insertions and deletions (INDELS) in human genomes. *Human Molecular Genetics* Vol. 19, 2, R131-R136

Németh A, Längst G. 2004. Chromatin Higher Order Structure: Opening up chromatin for transcription. *Briefings In Functional Genomics and Proteomics*. Vol 2, No 4, 334–343

Oudet P, Gross-Bellard M, Chambon P. 1975. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* Vol 4, 281-300

Owen-Hughes T, Utley R, Cote J, Peterson C, Workman J. 1996. Persistent Site-Specific Remodeling of a Nucleosome Array by Transient Action of the SWI/SNF Complex. *Science* 273, 513-516

Ramakrishnan V. 1997. Histone Structure and the organization of the Nucleosome. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 26, 83–112

Raveh-Sadka T, Levo M, Shabi U, Shany B, Keren L, Lotan-Pompan L, Zeevi D, Sharon E, Weinberger A, Segal E. 2012. Manipulating nucleosome disfavoring sequences allows fine-tune regulation of gene expression in yeast. *Nature Genetics* 44, 743–750

Richmond T, Davey C. 2003. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* 423, 145-150

Sander P, Hamann H, Drögemüller C, Kashkevish K, Schiebel K, Leeb T. 2005. Bovine Prion Protein Gene (PRNP) Promoter Polymorphisms Modulate PRNP

Expression and May Be Responsible for Differences in Bovine Spongiform Encephalopathy Susceptibility. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 280, No. 45, 37408–37414

Sasaki S, Mello C, Shimada A, Nakatani Y, Hashimoto S, Ogawa M, Matsushima K, Guoping S, Kasahara M, Ahsan B, Sasaki A, Saito T, Susuki Y, Sugano S, Kohara Y, Takeda H, Fire A, Morishita S. 2009. Chromatin-Associated Periodicity in Genetic Variation Downstream of Transcriptional Start Sites" *Science* 323, 401-404

Segal E, Widom J. 2009. What controls nucleosome positions?. *Trends in Genetics* Vol 25, No 8, 335-343

Smith C, Horowitz-Scherer R, Flanagan J, Woodcock C, Peterson C. 2003. Structural analysis of the yeast SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Nature Structural Biology*, Vol 10, No 2, 141-145

Strahl B, Allis D. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45

Struhl K, Segal E. 2013. Determinants of Nucleosome Positioning. *Nature Structural and Molecular Biology* Vol 20, No 3, 267-273

Thoma F, Koller T. 1977. Influence of Histone H1 on Chromatin Structure. *Cell* Vol. 12, 101-107

Tolstorukov M, Volfovsky N, Stephens R, Park P. 2012. Impact of chromatin structure on sequence variability in the human genome. *Nature Structural and Molecular Biology* Vol 18, No 4, 510-516

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic Transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 76 (9): 4350-4354.

Trifonov E. 2011. Cracking the chromatin code: Precise rule of nucleosome positioning. *Physics of Life Reviews* 8,39-50

Utley RT, Owen-Hughes TA, Juan LJ, Cote J, Adams CC, Workman JL. 1996. In vitro analysis of transcription factor binding to nucleosomes and nucleosome disruption/displacement. *Methods Enzymol* 274: 276-291

Vinces MD, Legendre M, Caldara M, Hagihara M, Verstrepen KJ. 2009. Unstable tandem repeats in promoters confer transcriptional evolvability. *Science*;324(5931):1213-6

Whitehouse I, Flaus A, Cairns B, White M, Workman J, Owen-Hughes T. 1999. Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature* 400, 784-787

Wolffe A. 1998. *Chromatin: Structure and Function*. Academic Press, London, UK

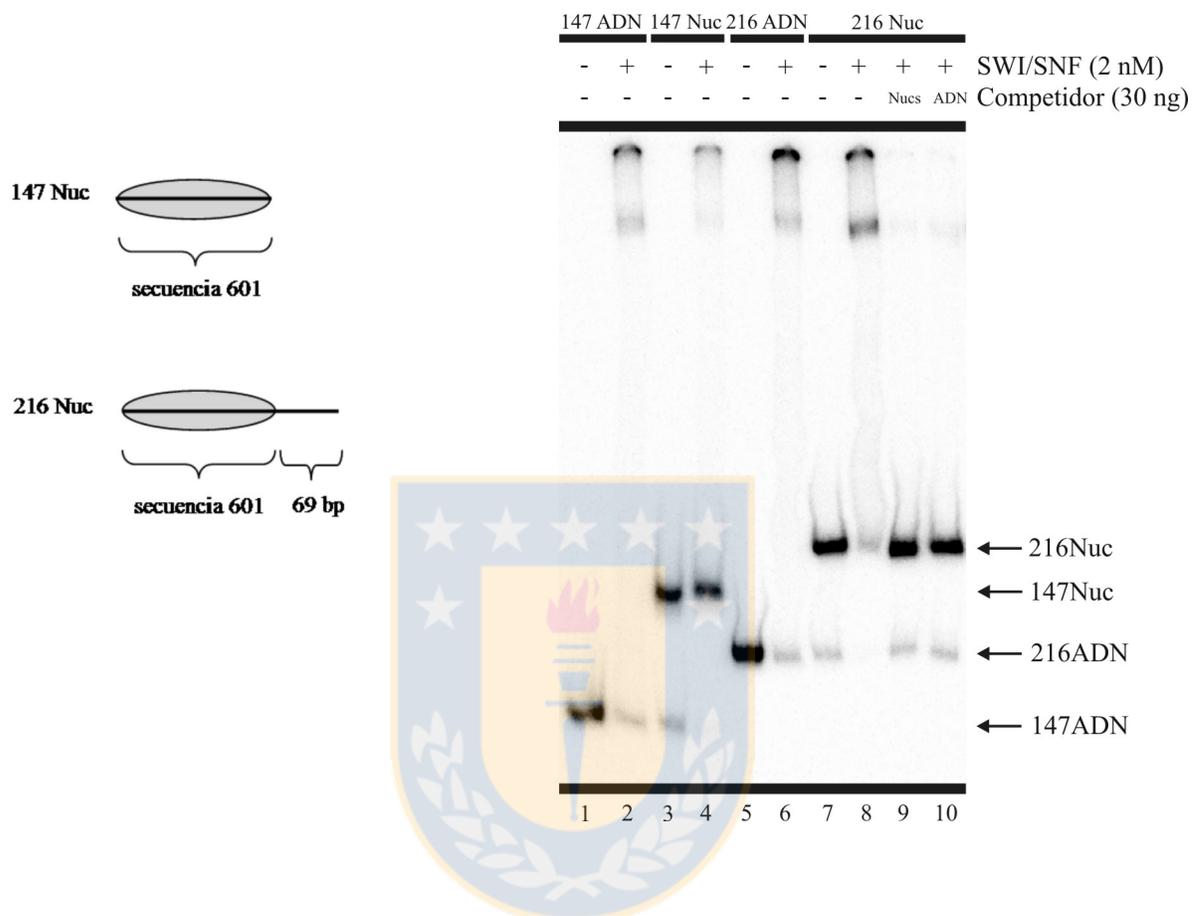
Woodcock C, Frado L, Rattner J. 1984. The higher order structure of chromatin: Evidence for a helical ribbon arrangement. *Journal of Cell Biology* 99, 42-52

Yudkovsky N, Logie C, Hahn S, Peterson CL. 1999. Recruitment of the SWI/SNF chromatin remodeling complex by transcriptional activators. *Genes and Development*;13(18):2369-74.

Zofall M, Persinger J, Bartholomew B. 2004. Functional role of extranucleosomal DNA and the entry site of the nucleosome in chromatin remodeling by ISW2. *Molecular and Cellular Biology*;24(22):10047-57.



## 7. ANEXOS.



### Anexo 1: Relación entre la presencia de ADN linker y la afinidad de SWI/SNF por el nucleosoma.

El análisis corresponde a un ensayo de retardamiento en gel, en el que se utilizaron 4 probadores distintos derivados de la secuencia posicionadora 601 y que corresponden a: segmento de ADN desnudo de 147 pb (147ADN); segmento de 147 pb reconstituido como nucleosoma (147Nuc, nucleosoma sin ADN extranucleosomal); segmento de ADN desnudo de 216 pb (216ADN); segmento de 216 pb reconstituido como nucleosoma (216Nuc, nucleosoma con una extensión de 69 pb de ADN extranucleosomal, con una distribución que se detalla en el esquema

adjunto). Los distintos probadores fueron incubados por 30 minutos a 30°C en presencia o ausencia de SWI/SNF según se indica en la figura, en donde se indica también la presencia de ADN genómico u oligonucleosomas (Nucs) no radioactivos como competidores. La electroforesis procedió en gel no denaturante de poliacrilamida 4% (60:1 poliacrilamida:bis-acrilamida).

