

Universidad de Concepción



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

Por

Valentina A. Alarcón Contreras.

Tutor: Dr. José Leonardo Gutiérrez Contreras.

Concepción-CHILE  
2013.

## RESUMEN

En eucariontes el ADN nuclear se encuentra a la forma de un complejo multiproteico denominado cromatina, cuya unidad básica es el nucleosoma. La unión de factores de transcripción y la ARN polimerasa a promotores de genes determina la actividad transcripcional. Estos elementos se distribuyen de manera modular en las regiones promotoras de genes y esta distribución es de gran importancia para su correcta acción. En este contexto, la accesibilidad de las proteínas regulatorias puede ser modulado por la distribución de nucleosomas en las regiones regulatorias de un gen. El estado de compactación de la cromatina puede ser alterado por complejos remodeladores de cromatina ATP-dependientes (Ej SWI/SNF, RSC), y varios factores de transcripción pueden reclutar estos complejos hacia regiones regulatorias, llevando la acción remodeladora a puntos específicos del genoma.

Si bien en el presente existe evidencia, que apunta a la influencia que secuencias de ADN pueden tener sobre la actividad remodeladora dependiente de ATP, los mecanismos involucrados no se conocen con profundidad. Actualmente, se desconoce si la variación de distancia y la presencia de ADN-Z (una de las conformaciones que puede adoptar el ADN) entre el sitio de unión de uno de estos factores de transcripción y un nucleosoma podría influenciar la actividad remodeladora de la maquinaria ATP-dependiente. Con el objeto de abordar esta problemática se realizaron ensayos de remodelación *in vitro* usando diferentes probadores mononucleosomales, variando la distancia entre el sitio de unión del factor de transcripción Gal4 y un nucleosoma. Para el caso del ADN-Z utilizamos secuencias con tendencia a adoptar la conformación Z entre el nucleosoma y el sitio de unión para el factor de transcripción Gal4. El efecto de estos dos factores fue evaluado en presencia del complejo SWI/SNF de levadura y el factor de transcripción quimérico Gal4-VP16.

Bajo nuestras condiciones de ensayo, SWI/SNF tuvo un requerimiento absoluto de Gal4-VP16 para poder asociarse al probador mononucleosomal. Nuestros resultados muestran que el desensamblaje nucleosomal fue mayor cuando la distancia entre el nucleosoma y el sitio de unión de Gal4 fue menor. También observamos que la extensión del ADN extranucleosomal influye en la fuerza de unión de SWI/SNF a los nucleosomas. Respecto al ADN-Z, nuestros resultados muestran que el desensamblaje de nucleosomas es mayor en presencia de secuencias con tendencia a adoptar la conformación Z, comparado

con secuencias normales. Nuestros resultados apuntan a nuevos aspectos que podrían tener un impacto sobre la expresión génica en el nivel de regulación transcripcional.



## ABSTRACT

In eukaryotes nuclear DNA is found like a multiproteic complex named chromatin, and its basic unit is the nucleosome. Binding of transcription factors and RNA polymerase to gene promoters determines transcriptional activity. These elements are distributed in a modular way in the promoters regions of genes and this distribution has a big importance for its correct action. In this context, the accessibility of regulatory proteins can be modulated by the distribution of nucleosomes at gene regulatory regions. The chromatin structure state can be altered by ATP-dependent chromatin remodeling complexes (e.g. SWI/SNF, RSC) and several transcription factors can target these complexes to regulatory regions, leading the remodeling action to specific points of genome.

Although in the present there is evidence that points to an influence that DNA sequences can have on the ATP-dependent remodeling activity, the mechanisms involved are not known in depth. It is unknown whether if a variation in the distance and the presence of Z-DNA (one of the conformations that the DNA can adopt) between a binding site of one transcription factor and a nucleosome would influence the targeted nucleosome remodeling activity of these ATP-dependent machines. In order to ascertain this question we performed *in vitro* nucleosome remodeling assays using different mononucleosome probes, varying the distance between a transcription factor-binding site (Gal4) and a positioned nucleosome. In the case of Z-DNA we used sequences tending to structure as Z between the mononucleosome and a transcription factor binding-site (Gal4). The effects of both factors were evaluated in presence of the yeast SWI/SNF complex and the chimeric transcription factor Gal4-VP16.

Under our assay conditions SWI/SNF had an absolute requirement of Gal4-VP16 for reaching the mononucleosome probe. Our results showed that nucleosome disassembly was higher when shorter distances between the Gal4 binding site and the positioned nucleosome were present. We also found that the extension of extranucleosomal DNA influences the strength of SWI/SNF binding to the nucleosomes. Respect to Z-DNA, our results showed that eviction mechanism was higher in presence of sequences tending to structures as Z than a normal sequence. Our results point to new aspects that could have an impact on gene expression at the level of transcriptional regulation.

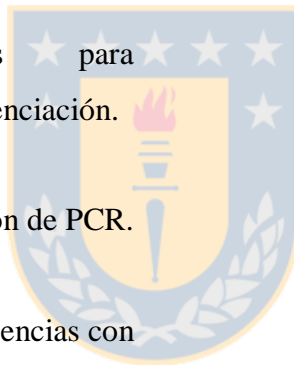
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>Páginas</b>
<b>1.- INTRODUCCIÓN.</b>	1
1.1.- Remodelación de cromatina y regulación de la expresión génica.	1
1.2.- Posicionamiento nucleosomal y su rol en regiones regulatorias de genes.	3
1.3.- ADN-Z.	8
1.4.- ADN-Z y remodelación de cromatina	8
<b>2.- METODOLOGÍA.</b>	13
2.1.- Construcción de vectores plasmidiales.	13
2.2.- Purificación de clones positivos y secuenciación.	14
2.3. - Marcaje radiactivo.	14
2.3.1.- Marca extremo 5' de partidor.	14
2.3.2.- PCR radiactiva.	17
2.4. - Reconstitución de mononucleosomas.	19
2.5. - Purificación Gal4-VP16 y Gal4-DBD.	19



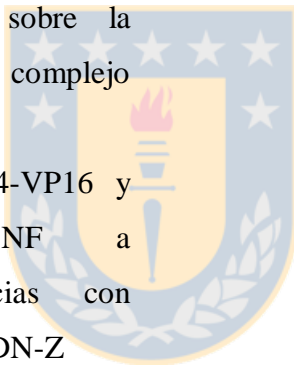
	<b>Páginas</b>
2.5.1.- Crecimiento de Bacterias.	19
2.5.2.- Lisis bacteriana y purificación por afinidad	21
2.5.3.- Análisis de purificación.	21
2.5.4.- Inmuno-detección de Gal4- VP16 mediante Western-Blot.	22
2.6.- Ensayos de unión de proteína- ADN, proteína-nucleosoma de formación de complejos ternarios.	22
2.6.1.- Ensayos de unión de Gal4- VP16 a nucleosoma o ADN y ensayos de unión Gal4-DBD al nucleosoma.	22
2.6.2.- Reclutamiento de ySWI/SNF por Gal4-VP16.	23
2.7.- Ensayo de Remodelación.	23
<b>3.- RESULTADOS.</b>	24
3.1.- Purificaciones de proteínas (Gal4- VP16 y Gal4-DBD) y unión al nucleosoma.	24
3.1.1.- Purificación, western-blot y unión de Gal4-VP16.	24
3.1.2.- Purificación y unión de Gal4-DBD.	26



	<b>Páginas</b>
3.2.- Obtención de probadores nucleosomales.	26
3.2.1.- Obtención probadores efecto de la distancia entre la secuencia posicionadora de nucleosoma y el sitio de unión a Gal4.	26
3.2.2.- Obtención de sustratos nucleosomales que contengan secuencias con tendencia a estructurarse como ADN-Z.	26
-Subclonamientos para construcciones de ADN-Z y secuenciación.	29
-Estandarización de PCR.	29
-Análisis de PCR para secuencias con tendencia a formar ADN-Z.	29
3.3.- Efecto de la extensión del ADN entre el sitio de unión de Gal4 y el nucleosoma sobre la acción remodeladora del complejo SWI/SNF.	32
3.3.1.- Efecto de la distancia entre el sitio de unión de Gal4 y un nucleosoma en el reclutamiento de SWI/SNF al nucleosoma por Gal4-VP16	32



	<b>Páginas</b>
3.3.2.- Efecto de la distancia entre un nucleosoma y el sitio de unión de Gal4 en la remodelación de cromatina ATP-dependiente	36
3.3.3.- Evaluación de la actividad catalítica de SWI/SNF en presencia de Gal4-DBD.	38
3.4.- Efecto de la presencia de secuencias con tendencia a adoptar la conformación ADN-Z sobre la acción remodeladora del complejo SWI/SNF.	38
3.4.1.- Unión de Gal4-VP16 y reclutamiento de SWI/SNF a monucleosomas con secuencias con tendencia a estructurarse como ADN-Z	38
3.4.2.- Efecto de las secuencias con tendencia a estructurarse como ADN-Z entre un nucleosoma y el sitio de unión de Gal4 en la remodelación de cromatina ATP-dependiente.	38
<b>4.-DISCUSIÓN.</b>	44
<b>5.- REFERENCIAS.</b>	51





## ÍNDICE DE FIGURAS

## Páginas

**Figura 1.** Niveles de compactación de la cromatina. 4

**Figura 2.** Motivos estructurales presentes en la sub-unidad catalítica del complejo remodelador ATP-dependiente SWI/SNF. 6

**Figura 3.** Distribución consenso de los nucleosomas alrededor de todos los genes de levadura. 7

**Figura 4.** Modelos espaciales y estructura química del ADN. 9

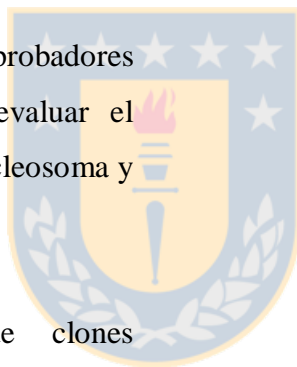
**Figura 5.** La remodelación de cromatina es facilitada por NFI y ADN-Z en el promotor de CSF1. 11

**Figura 6.** Vector utilizado para subclonamientos y modelo de probadores con tendencia a estructurarse como ADN-Z. 15

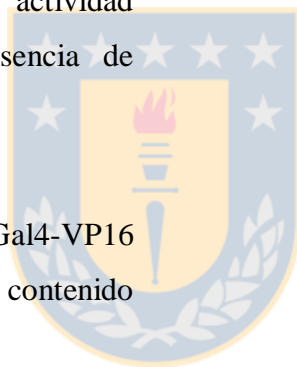
**Figura 7.** Diseño esquemático de los probadores nucleosomales utilizado para evaluar el efecto de la distancia entre un nucleosoma y el sitio de unión de Gal4. 16



	<b>Páginas</b>
<b>Figura 8.</b> Reconstitución nucleosomal por transferencia del octámero.	20
<b>Figura 9.</b> Análisis de la purificación de Gal4-VP16, verificación por western-blot y unión a su secuencia diana.	25
<b>Figura 10.</b> Gel SDS-PAGE de las etapas de purificación de Gal4-DBD y unión a su secuencia diana.	27
<b>Figura 11.</b> Migración de probadores nucleosomales utilizados para evaluar el efecto de la distancia entre un nucleosoma y el sitio de unión de Gal4.	28
<b>Figura 12.</b> Confirmación de clones positivos por ensayos de restricción.	30
<b>Figura 13.</b> Secuenciación y PCR para clones con inserto 601_22Z_Gal4 (CGX6) y 601_42Z_Gal4 (CGX16).	31
<b>Figura 14.</b> Análisis de los segmentos de ADN que contienen repeticiones CG.	33
<b>Figura 15.</b> Propiedades de segmentos de ADN conteniendo regiones de repeticiones CG.	34



	<b>Páginas</b>
<b>Figura 16.</b> Efecto de la distancia entre el sitio de unión de Gal4 y un nucleosoma en el reclutamiento de SWI/SNF al nucleosoma dado por Gal4-VP16.	35
<b>Figura 17.</b> Efecto de la distancia entre un nucleosoma y el sitio de unión de Gal4 en la remodelación de cromatina ATP-dependiente.	37
<b>Figura 18.</b> Evaluación de la actividad catalítica de SWI/SNF en presencia de Gal4-DBD.	40
<b>Figura 19.</b> Análisis de unión de Gal4-VP16 a probadores nucleosomales con contenido de repeticiones CG.	41
<b>Figura 20.</b> Reclutamiento de SWI/SNF por Gal4-VP16 a mononucleosomas con secuencias con tendencia a estructurarse como ADN-Z.	42
<b>Figura 21.</b> Efecto de las secuencias con tendencia a estructurarse como ADN-Z entre un nucleosoma y el sitio de unión de Gal4 en la remodelación de cromatina ATP-dependiente.	43



	<b>Páginas</b>
<b>Figura 22.</b> Modelo propuesto para efecto de la distancia entre el nucleosoma y el sitio de unión de Gal4 en la remodelación ATP dependiente catalizada por SWI/SNF.	48
<b>Figura.23.</b> Mecanismos de remodelación de cromatina y modelo propuesto para el efecto de secuencias con tendencia a estructurarse como ADN.	50

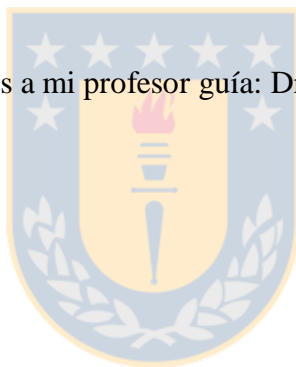
#### **ÍNDICE DE TABLAS.**

<b>Tabla I:</b> Secuencias de oligonucleótidos utilizados.	13
<b>Tabla II:</b> Partidores utilizados en las reacciones de PCR.	18



## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

- A la Universidad de Concepción, Chile, en especial al programa de Magister en Bioquímica y Bioinformática.
- A la Dra. Marta Bunster, directora del programa de Magister en Bioquímica y Bioinformática.
- A la Facultad de Farmacia y Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción, por la ayuda económica.
- Al financiamiento del proyecto Fondecyt 1085092 y DIUC-211.037.014-1.0.
- Al Laboratorio de Regulación Transcripcional, Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.
- A la Dra. Carola Bruna y el Dr. Fernando Cruzat, por la ponencia y corrección de este documento.
- Especiales agradecimientos a mi profesor guía: Dr. José Leonardo Gutiérrez Contreras.



## ABREVIACIONES

**ADN:** Acido desoxiribonucleico.

**ADN-B:** Acido desoxiribonucleico con conformación B.

**ADN-Z:** Acido desoxiribonucleico con conformación Z.

**ARN:** Acido ribonucleico.

**ATP:** Adenosintrifosfato.

**BAF:** *Brg1/Brm associated factors.*

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

**B.I:** Banda inferior.

**B.S:** Banda superior.

**BSA:** *Bovine serum albumin* (sero albúmina de bovino)

**BRG1:** *Brahma related gene 1.*

**Brm:** *Brahma.*

**CFTR:** *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.*

**CG:** Citosina-Guanina.

**CGX6:** Repetición de citosina-guanina 6 veces.

**CGX16:** Repetición de citosina.guanina 16 veces.

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

**CSF1:** Factor estimulante de colonias 1.

**dNTP:** Desoxirubonucleotido trifosfato.

**DTT:** Ditioneitol.

**D.O:** Densidad óptica.

**FMR1:** *Fragile X linked Mental Retardation type .1*

**Gal4 DBD:** *Gal4 DNA binding domain* (Dominio de union al AND de Gal4).

**Gal4 VP16:** *Gal4- virus protein 16.*

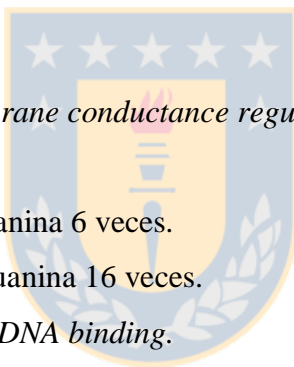
**GST:** Glutación S- transferasa

**HSA:** Helicasa SANT.

**H1:** Histona 1.

**H2A:** Histona 2 A.

**H2B:** Histona 2 B.



**H3:** Histona 3.

**H4:** Histona 4.

**INDEL:** Contracción de inserción-delección.

**INO80:** Inositol requiring 80.

**ISWI:** Imitation Switch.

**LB:** Luria Bertani (medio).

**LON:** Oligo nucleosoma largo.

**NEB:** New England Biolabs.

**NFI:** Factor nuclear –I

**NP40:** Nonil fenoxipolietoxietanol.

**Nuc:** Nucleosoma.

**Pb:** Pares de bases.

**PBS:** Buffer fosfato salino.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**PMSF:** fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

**SANT:** Acrónimo de Swi3, Ada2, N-Cor, y TF IIIB

**SON:** Oligonucleosomas cortos.

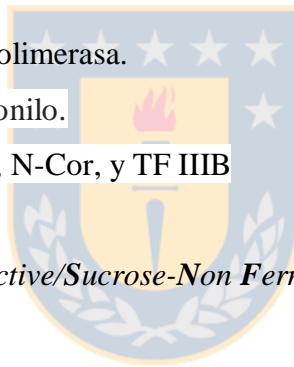
**ySWI/SNF:** *yeast Switching defective/Sucrose-Non Fermenting* .

**TBE:** Tris/ Borato/EDTA 0.3X.

**TE:** Tris – EDTA pH 8.0

**TPCK:** Tosil fenilalanil clorometil cetona.

**ZDR:** Regiones con alta tendencia a estructurarse como ADN-Z.



## 1.- INTRODUCCIÓN

### 1.1 Remodelación de cromatina y regulación de la expresión génica.

El ADN (ácido desoxirribonucleico) es un ácido nucleico que contiene la información genética usada para el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos. El rol principal de las moléculas de ADN es el almacenamiento de información, conteniendo las instrucciones necesarias para construir otros componentes de la célula, como proteínas y moléculas de ARN. Los segmentos de ADN que tienen la información genética son llamados genes, pero otras secuencias de ADN tienen propósitos estructurales o están involucradas en la regulación del uso de esta información genética.

El ADN se encuentra en la célula estructurado como cromatina, la cual tiene como unidad básica al nucleosoma (Fig.1). El nucleosoma se encuentra formado por un octámero proteico que está compuesto por las histonas H2A, H2B, H3 y H4 más el ADN que se encuentra enrollado a su alrededor con una extensión de 147pb. El ADN entre nucleosomas es conocido como ADN conector o *linker* al que se asocia la denominada histona H1 (Lodish H., y col., 2008).

Sobre la cromatina actúan de forma conjunta una serie de complejos multi proteicos que alteran su estructura y regulan la acción de la maquinaria transcripcional basal en eucariotas (Clapier C.y col., 2002). Para que la transcripción se pueda realizar, el ADN debe encontrarse accesible para la unión de proteínas como factores de transcripción y la ARN polimerasa, lo cual es bloqueado por la compactación en cromatina. (Clapier C., y col., 2002).

Los complejos multiproteicos que alteran la estructura de la cromatina, denominados complejos remodeladores, se clasifican en: a) los que utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para modificar la estructura de la cromatina de una manera no covalente, y b) los complejos que modifican covalentemente las histonas (Fan H.Y. y col., 2004). Dentro de los complejos remodeladores de cromatina ATP dependientes se encuentran cuatro familias que se clasifican de acuerdo a su sub unidad ATP-ásica. Estas familias son SWI/SNF (*Switching defective/Sucrose-Non Fermenting*), ISWI (*Imitation Switch*), CHD (*CHromodomain, Helicase, DNA binding*) e INO80 (*INOsitol requiring 80*).

La acción remodeladora da como resultado varios resultados que pueden ser clasificados en 2 categorías:



- La secuencia diana para una proteína de unión al ADN, inicialmente ocluida por el octámero de histonas, se vuelve accesible por un reposicionamiento nucleosomal (*sliding*), por salida del nucleosoma (*eviction*) o un desempaquetamiento localizado.
- La composición proteica del nucleosoma se altera. El contenido nucleosomal es modificado por el reemplazo de un dímero H2A-H2B o por eyección de éste (Clapier R. C. y Cairns B. R. 2009).

El primer complejo remodelador de cromatina dependiente de ATP descrito es el complejo SWI/SNF. Este complejo presenta propiedades como (i) tener alta afinidad por el nucleosoma, (ii) poseer sub-unidades que reconocen ciertas modificaciones covalentes de las histonas, (iii) poseer una sub-unidad ATP-asa ADN dependiente que sirve como un motor translocador de ADN, alterando el contacto ADN-histona, (iv) tener dominios y/o proteínas que regulan el dominio ATP-asa y (v) tener dominios y/o proteínas para la interacción con factores de transcripción y otras proteínas (Clapier R.C. y Cairns B.R. 2009). La subunidad catalítica de BAF (SWI/SNF en mamíferos) tiene los dominios ATP-asa, helicasa SANT (HSA), un dominio post-HSA y un bromodominio C-terminal (Fig.2). El dominio SANT se ha descrito como un dominio de unión al ADN basado en su homología con c-myb (un regulador transcripcional) (Boyer L. A. y col., 2002). Por su parte bromodominio tiene como función reconocer las lisinas acetiladas del N-terminal de las histonas, y el dominio helicasa es necesario para separar la doble hebra del ADN en monohebra. (Lodish H., y col 2008).

Se ha demostrado que el complejo remodelador SWI/SNF tiene actividad de *sliding* y *eviction*, además del desempaquetamiento localizado del ADN en el nucleosoma. Estudios *in vitro* que analizan la actividad de SWI/SNF han tenido como principal resultado actividad de *sliding*, también se ha demostrado que este complejo tiene actividad *eviction*.

El hecho de que SWI/SNF facilita el acceso de factores de transcripción al nucleosoma, lleva al concepto inicial que la actividad *in vivo* de SWI/SNF regularmente es anterior a la unión del factor de transcripción. Sin embargo, SWI/SNF interacciona con el ADN y nucleosomas sin especificidad de secuencia. Este hecho, y la baja abundancia de ySWI/SNF en el núcleo de la célula comparado con el número de nucleosomas, implican que este complejo necesita ser llevado a regiones del genoma donde se requiere de su actividad. El reclutamiento de SWI/SNF depende principalmente de la interacción con factores de transcripción. Existe poca información de la influencia que podrían tener los factores de transcripción sobre la actividad catalítica de

estos complejos. La mayoría de los estudios *in vitro* no han considerado la posible influencia de factores de transcripción. (Gutiérrez J.L. y col., 2007)

Se sabe que SWI/SNF requiere de la presencia de factores de transcripción que tengan un dominio de activación que lo reclute en arreglos nucleosomales como es el caso de la proteína quimérica Gal4-VP16 (proteína viral 16) (Gutiérrez J.L. y col., 2007), la cual se utilizará en esta tesis junto con ySWI/SNF y un mononucleosoma como modelo de estudio.

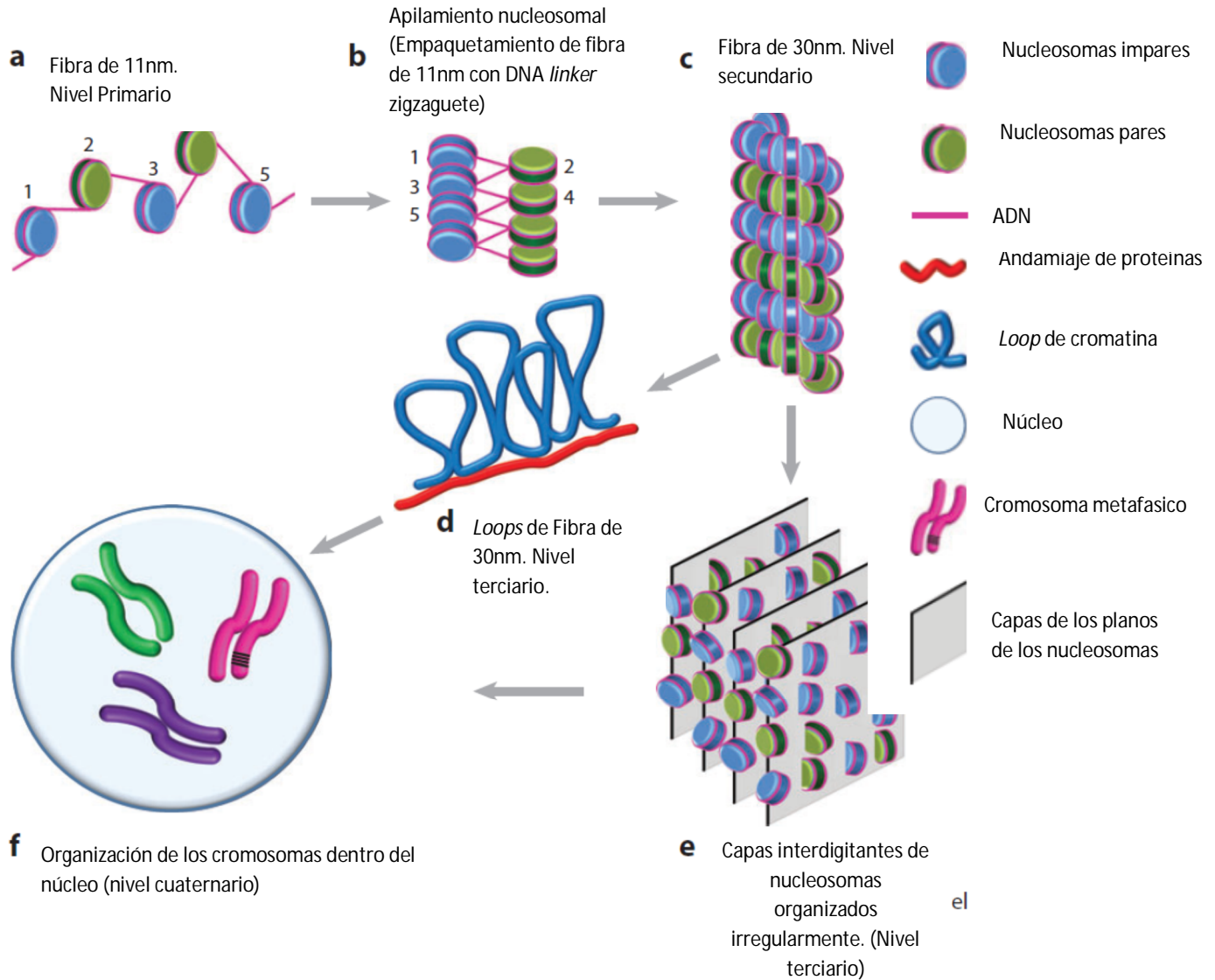
## **1.2 Posicionamiento nucleosomal y su rol en regiones regulatorias de genes.**

Hasta hace poco se tenía poca información de la organización genómica de los nucleosomas. Por un lado se pensaba que el posicionamiento de las histonas podría ser al azar durante la replicación del ADN, lo que implica que las histonas son proteínas que son removidas y reposicionadas a medida que la ARN y ADN polimerasa pasa a través de ellas.

Gracias al avance de las técnicas desarrolladas con el tiempo, principalmente microarreglos, se pudo tener una visión de como se ubican los nucleosomas a lo largo del genoma en *Saccharomyces cerevisiae*. En estos estudios se observó que en las regiones intergénicas donde se ubican promotores no se encontraban nucleosomas generalmente (Jiang C. y Pugh B. F. 2007). Primero no se sabía como la presencia o ausencia de nucleosomas estaba relacionada con la transcripción, porque se observaba que tanto en zonas de promotores de genes activos e inactivos había baja cantidad de nucleosomas. Luego gracias a mapas de nucleosomas de alta resolución se observó que en genes activos los promotores tenían menos nucleosomas que los genes que se mantienen inactivos (Lee C. y col. 2004)

En el año 2005 se desarrollaron microarreglos con alta resolución, los cuales mostraron que los nucleosomas en la mayoría de los genes están organizados de la misma forma. Esto consiste en dos regiones libres de nucleosomas (*Nucleosome free región* o NFR) que flanquean el empaquetamiento nucleosomal del gen. La NFR del promotor del gen está delimitada por dos nucleosomas bien posicionados (nucleosomas -1 y +1) (Yuang G.C. y col., 2005) (Fig.3).

Debido a la posición de estos nucleosomas justo antes (-1) y después del sitio de inicio de la transcripción (+1) pensamos que un cambio en el posicionamiento puede tener un efecto importante en la activación transcripcional. Este cambio en el posicionamiento de nucleosomas



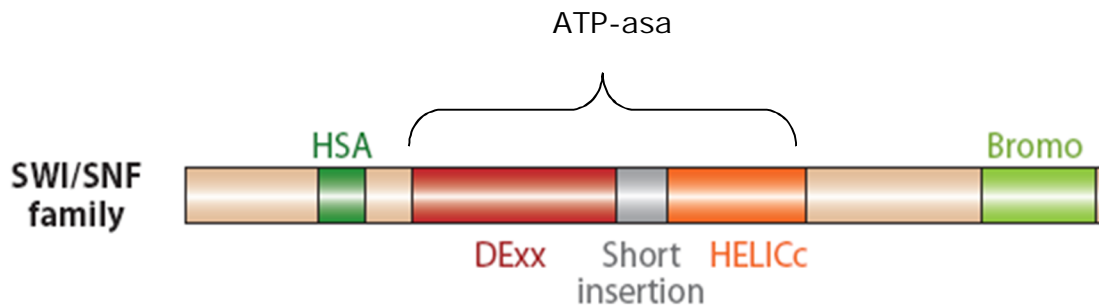
**Fig.1. Niveles de compactación de la cromatina.** (a) Primer nivel de compactación. Fibra de 11nm; (b) Apilamiento de nucleosomas; (c) Segundo nivel de compactación. Fibra de 30nm; (d) Tercer nivel de compactación. *Loops* de la fibra de 30 nm; (e) Tercer nivel de compactación. Capas interdigitantes de nucleosomas organizados irregularmente; (f) Cuarto nivel de compactación. Organización de todos los cromosomas dentro del núcleo. Modificado de. Sajan S. A. y Hawkins. R. D. Annual Reviews. 2012.

puede darse por inserciones o deleciones en la región promotora, también llamadas INDELS. Esta variación es la segunda variación más abundante en el genoma, teniendo tamaños que van desde 1 a 10.000 pb. También pueden encontrarse en la región codificante del gen, pudiendo tener como resultado la eliminación de un aminoácido como es el caso del gen de la proteína CFTR, conocido como fibrosis quística.

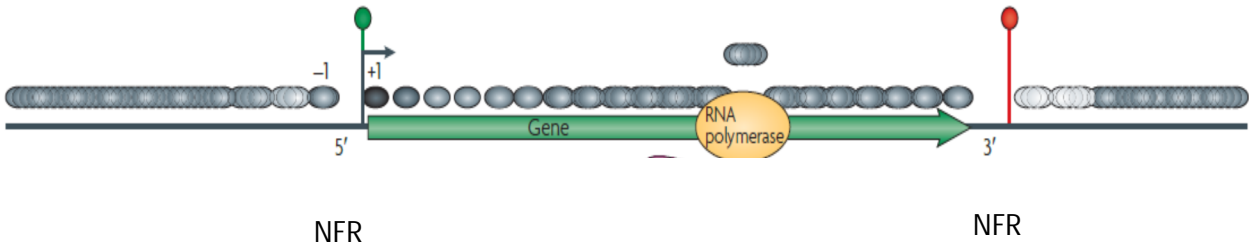
Los INDELS en regiones promotoras pueden alterar la fase de las secuencias de ADN en los promotores (Mills y col., 2006). Por ejemplo, un INDEL de 5 pb puede rotar un sitio de unión de un factor de transcripción a la cara opuesta de la hélice de ADN, ocultándolo o exponiéndolo. También un INDEL puede hacer desaparecer un sitio de unión para un factor de transcripción o por otro lado podría aumentar el espaciamiento entre dos sitios de unión en 100 pb, siendo interrumpidas sus interacciones. Un ejemplo de inserción en la región promotora es el Síndrome X frágil, ocurre en el gen *FMRI* (*Fragile X linked Mental Retardation type 1*) en el cromosoma X debido a la expansión de trinucleótidos CGG, una vez que se alcanza un umbral crítico los patrones de metilación del promotor se alteran, lo que lleva a cambios en la expresión del gen (Mullaney J.M y col., 2010). También se ha descrito una deleción de 3pb en la región promotora del gen *GSTM3* (Glutación S-transferasa M3) observándose una disminución en la transcripción del gen y disminución en la expresión de la proteína (Liu X. y col., 2005).

Por lo tanto, los INDELS en el promotor de un gen podrían explicar las diferencias en la expresión que son observados en diversos seres humanos. Hasta el momento se han dilucidado los mecanismos de cómo estas variantes estarían afectando la expresión de genes, para un pequeño grupo de genes, como los ejemplos mencionados previamente (Mullaney J.M y col., 2010; Liu X. y col., 2005), la mayoría se mantiene sin explicación (Cheung V.G. y col., 2009).

Sabiendo lo anterior, en nuestro laboratorio se quiso analizar si la distancia entre un nucleosoma y el sitio de unión del factor de transcripción Gal4 tendría algún efecto sobre la remodelación de cromatina. Así se puede tener una aproximación de lo que sucedería en un promotor.

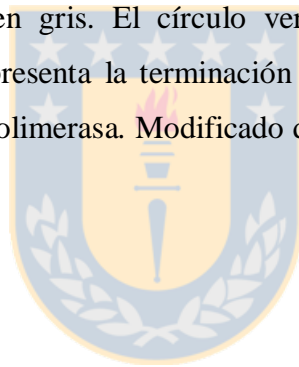


**Fig.2. Motivos estructurales presentes en la sub-unidad catalítica del complejo remodelador ATP-dependiente SWI/SNF.** ATP-asa: dominio ATP-asa; HSA: dominio Helicasa SANT; Bromo: Bromodominio; DExx y HELICc: Motivos relacionados con la secuencia de helicasas. Modificado de Clapier C. y Cairns B. Annual Reviews. 2009.



**Fig.3. Distribución consenso de los nucleosomas alrededor de todos los genes de levadura.**

Los nucleosomas se muestran en gris. El círculo verde representa el sitio de inicio de la transcripción. El círculo rojo representa la terminación transcripcional. NFR: *Nucleosome free region*; *RNA polymerase*: ARN polimerasa. Modificado de Jiang C. y Pugh B.F. 2009.



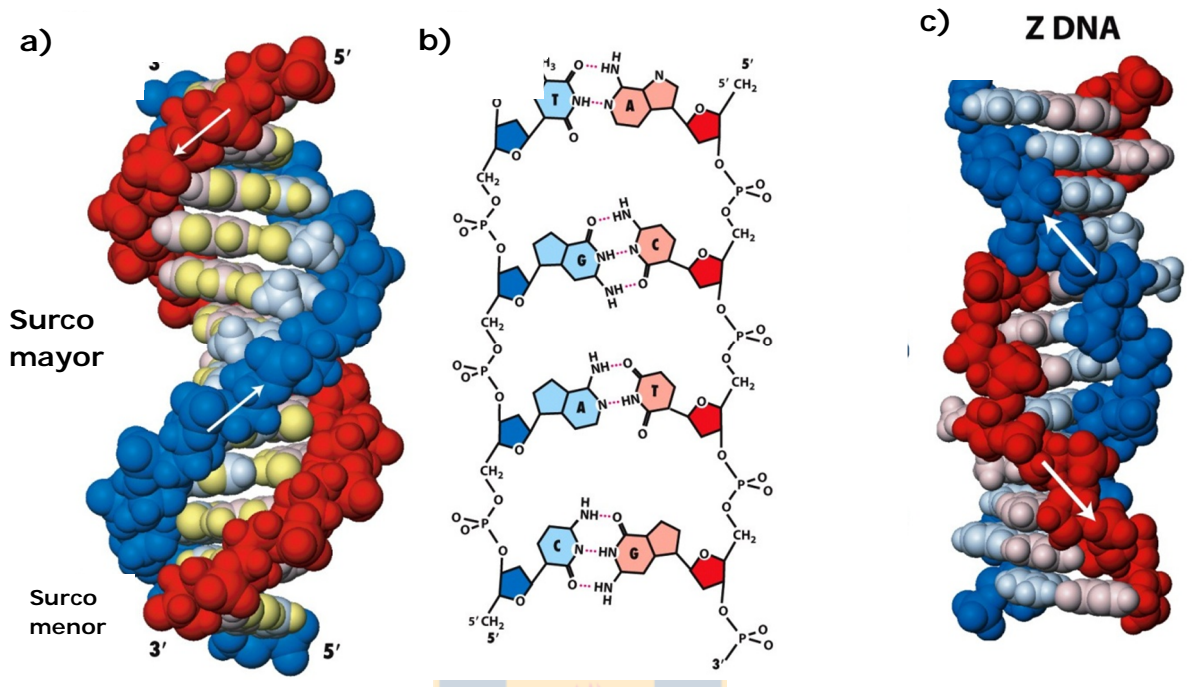
### 1.3 ADN-Z

Químicamente, el ADN consiste en dos hebras conformadas como polímeros compuestas por unidades simples llamadas nucleótidos, con columnas de azúcares y grupos fosfatos unidos por enlaces ésteres. Estas dos hebras son anti paralelas. Unidas a cada azúcar están una de las cuatro bases nitrogenadas que son Adenina, Timina, Guanina y Citosina (Lodish H. y col., 2004). La estructura canónica del ADN, dada por Watson y Crick, es una doble hélice dextrógira con 10 nucleótidos por vuelta, separados por 3.4 Å por nucleótido (Fig.4). Inicialmente se pensaba que las moléculas de ADN se interconvertían en dos estructuras doble hélice dextrógiras bien definidas, denominadas A y B. Ahora es claro que la molécula de ADN exhibe la propiedad de elasticidad en su microambiente retorciéndose, girando y encogiéndose, obteniéndose diferentes estructuras (Ghosh A. y Bansal M., 1999).

En la década de los setenta se hizo posible la difracción de rayos X en moléculas específicas de ADN para definir su estructura, obteniéndose un fragmento de doble hélice auto-complementario, hexamérico, con una repetición de secuencias en CG y levógiro (giro hacia la izquierda) al cual se nombró como ADN-Z (Rich A. y Zhang S., 2003). El ADN-Z tiene 6 dinucleótidos por vuelta y exhibe una columna vertebral zig-zagueante (Fig.4.c). Esto es consecuencia de su geometría diferente por los dos residuos en la repetición dinucleotídica que está dada por la alternación de los azúcares y de las conformaciones syn/anti alrededor de los enlaces glucosídicos (Arnott S. y col., 1980). Por un período de tiempo se ignoró el estudio del ADN-Z porque no tenía un rol biológico aparente, pero en 1987, Liu L. y Wang J. postularon que en la transcripción se generaba una torsión positiva delante de la maquinaria transcripcional y una torsión negativa detrás de éste, permitiendo la formación de ADN-Z. También se ha descrito que el ADN-Z es una forma de alta energía de la doble hélice estabilizada por un super-enrollamiento negativo debido a la transcripción o el desempaquetamiento nucleosomal (Ha S.C. y col., 2005).

### 1.4 ADN-Z y remodelación de cromatina.

Existen evidencias de que el ADN-Z jugaría un rol importante en la transcripción. Champ P. y col. (2004) realizaron un análisis de la secuencia del cromosoma 22 en donde se observó que la presencia de regiones con alta tendencia a estructurarse como ADN-Z (ZDRs) y de sitios de unión para el factor nuclear-I (NFI) estaría correlacionada con la localización de genes conocidos



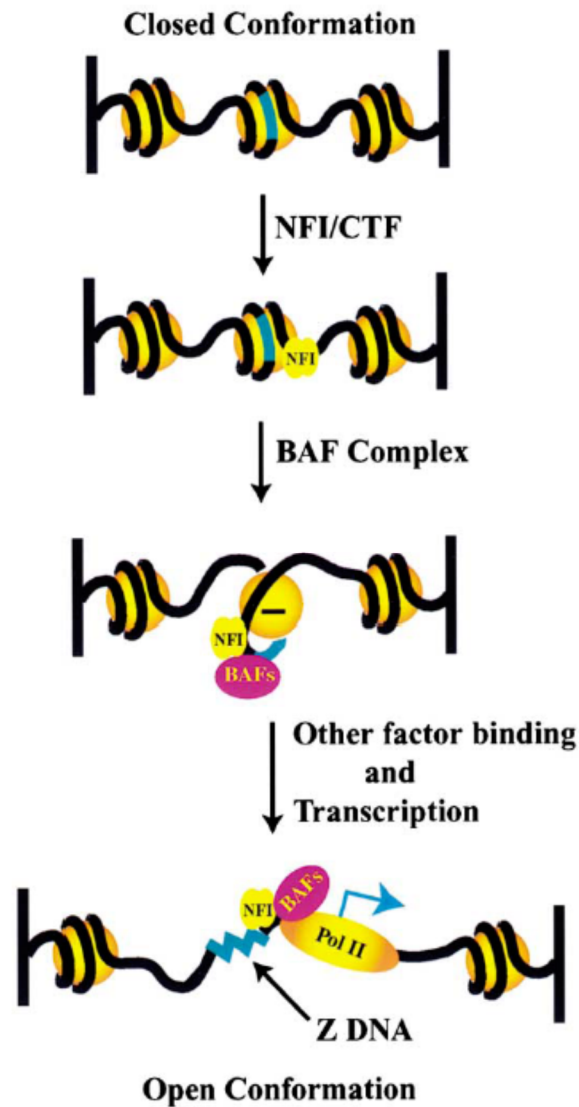
**Fig.4. Modelos espaciales y estructura química del ADN.** (a) Modelo espacial del ADN-B; (b) Estructura química de la doble hélice de ADN. Este esquema muestra los dos esqueletos de azúcar-fosfato que se unen entre los pares de bases A-T Y G-C; (c) ADN-Z con giro hacia la izquierda. Modificado de Lodish H., Molecular and Cell Biology, quinta edición.



y predichos a lo largo del cromosoma, acumulándose alrededor de los sitios de inicio de la transcripción. En un estudio *in-silico* realizado por Schroth G. y col. (1991), se describió que las secuencias formadoras de ADN-Z son comunes de encontrar cerca de los extremos 5' de genes humanos. Un estudio que apuntó a dilucidar cómo estaría actuando el ADN-Z en el proceso de la transcripción fue el realizado por Liu y col., el año 2001 (Fig.5). En esta investigación ellos proponen que el complejo remodelador de cromatina BAF o hSWI /SNF promovería la formación de ADN-Z, el cual estabilizaría la estructura abierta de la cromatina en el promotor del gen del factor estimulante de colonias 1 (CSF1), facilitándose la transcripción. Estos estudios también describieron el requerimiento de NFI para que se desencadenaran los eventos recién mencionados.

Es por lo anteriormente expuesto que nos preguntamos cómo se ve afectada la remodelación nucleosomal catalizada por SWI/SNF en secuencias con tendencia a formar ADN-Z.





**Fig.5. La remodelación de cromatina es facilitada por NFI y ADN-Z en el promotor de CSF1.** Al estar en presencia del factor de transcripción NFI y el complejo BAF (hSWI/SNF) se favorece la remodelación de cromatina por la formación de ADN.Z. Obtenido de Liu R. y col. Cell. 2001.

### **HIPOTESIS DE TRABAJO:**

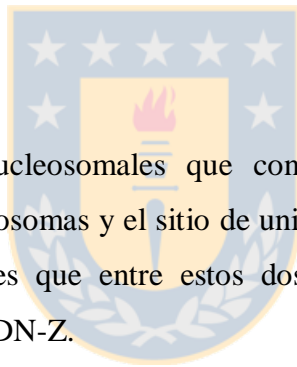
La remodelación nucleosomal catalizada por el complejo SWI/SNF, al ser reclutado por un factor de transcripción, se ve influenciada por elementos vinculados al ADN del nucleosoma, como la secuencia de este ADN y la distancia entre el nucleosoma y el sitio de unión del factor de transcripción.

### **Objetivo general:**

Determinar el efecto sobre la acción remodeladora del complejo SWI/SNF de secuencias con tendencia a formar ADN-Z y de la distancia entre el nucleosoma y el sitio de unión del factor de transcripción.

### **Objetivos específicos:**

- 1.- Obtener probadores mononucleosomales que contengan distancias variables entre una secuencia posicionadora de nucleosomas y el sitio de unión a Gal4, generando para estas mismas distancias otro set de probadores que entre estos dos elementos contengan secuencias con tendencia a estructurarse como ADN-Z.
- 2.- Determinar el efecto de la extensión del ADN entre el sitio de unión de Gal4 y el nucleosoma sobre la acción remodeladora del complejo SWI/SNF en probadores mononucleosomales.
- 3.- Determinar el efecto de la presencia de secuencias con tendencia a adoptar la conformación ADN-Z tiene sobre la acción remodeladora del complejo SWI/SNF en probadores mononucleosomales.



## 2.-METODOLOGÍA

### 2.1- Construcción de vectores plasmidiales:

Se diseñaron oligonucleótidos conteniendo repeticiones de la secuencia CG o TG 6 y 16 veces (realmente 8 y 18 repeticiones para oligonucleótidos CG) para realizar subclonamientos, las que poseen tendencia a estructurarse como ADN-Z (Champ P. C.y col., 2004), que además incluyen la secuencia de unión del factor de transcripción Gal4. Los extremos cohesivos de los oligonucleótidos son complementarios al plásmido original luego de ser digerido por NotI y PstI. La secuencia de los oligos se indica en la Tabla I.

**Tabla I:** Secuencias de oligos utilizados.

Oligonucleótidos	Secuencia
<b>CGX6 sentido</b>	5'-GGCCGCGCGCGCGCGCGCGC <u>CGGAGGACAGTCCTCCG</u> CGGACCTGCA-3'
<b>CGX6 Antisentido</b>	5'-GGTCCG <u>CGGAGGACTGTCCTCCG</u> CGCGCGCGCGCGCGC-3'
<b>CGX16 Sentido</b>	5'- GGCCGC <u>CGGAGGACAGTCCTCCG</u> CGGACCTGCA -3'
<b>CGX16 Antisentido</b>	5'-GGTCCG <u>CGGAGGACTGTCCTCCG</u> CGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGC-3'
<b>TGX6 Sentido</b>	5'-GGCCGCGTGTGTGTGTGTGTG <u>CGGAGGACAGTCCTCCGCGG</u> ACCTGCA-3'
<b>TGX6 Antisentido</b>	5'- GGTCCG <u>CGGAGGACTGTCCTCCG</u> CACACACACACACGC-3'
<b>TGX16 Sentido</b>	5'-GGCCGCGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG TG <u>CGGAGGACAGTCCTCCG</u> CGGACCTGCA-3'
<b>TGX16 Antisentido</b>	5'-GGTCCG <u>CGGAGGACTGTCCTCCG</u> CACA CACACACACACACACACACACACACACGC-3'

- Subrayada la secuencia de unión de Gal4.

Los oligonucleótidos fueron resuspendidos en solución Tris-EDTA (TE) pH 8.0 a una concentración final de 100 µM. Luego se realizó la hibridización de oligos con aproximadamente 1.0 µg de cada oligonucleótido (sentido y antisentido).

Los oligonucleótidos doble hebra, fueron clonados en los plásmidos pGEM3Z/601-42-Gal4 (para X16) y pGEM3z/601-22-Gal4 (para X6), los cuales poseen el sitio 601 o secuencia posicionadora de nucleosoma 601 (Lowary P.T y Widom J., 1998). Se digirieron ambos plásmidos con las enzimas de restricción Not I (NEB) y PstI (NEB). Luego de la digestión se

realizó una electroforesis para purificación desde el gel del plásmido digerido, utilizando QIAEX II Gel *extraction* kit (QIAGEN), según instrucciones del fabricante.

Luego, se realizó la ligación de los insertos en el plásmido digerido (ver insertos en Tabla N°1) utilizando una relación oligonucleótido plásmido de 2:1 y enzima ligasa (T4 DNA ligasa, NEB) (Fig.6). Con las reacciones de ligación se transformaron bacterias *E.coli* DH5alfa por el método de *shock* térmico (Sambrook and Russell).

Colonias resistentes a ampicilina fueron sometidas a lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979) para el análisis de plásmidos recombinantes por enzimas de restricción.

## **2.2. -Purificación de clones positivos y secuenciación:**

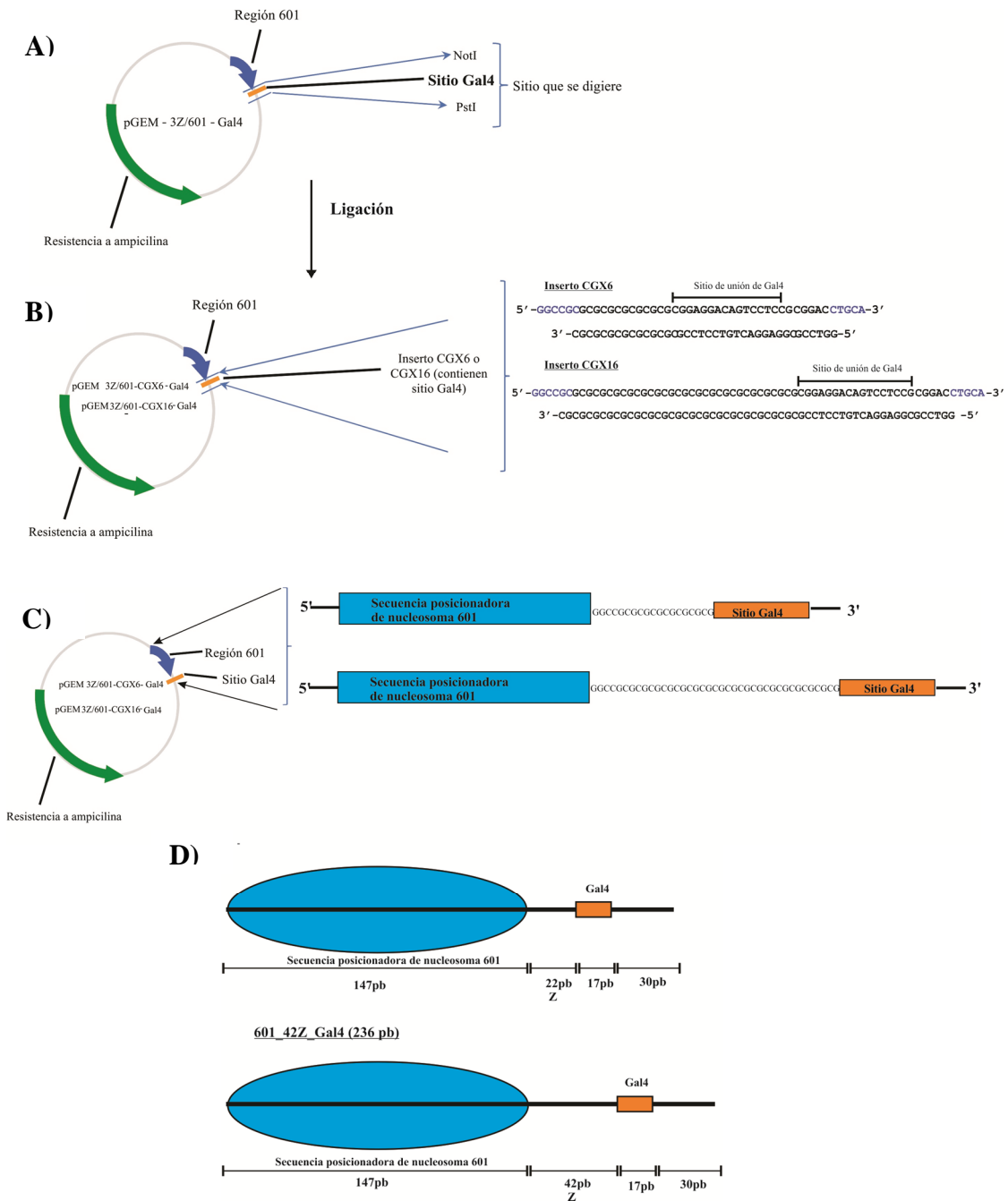
Los clones positivos obtenidos según el ensayo de restricción (Ver Fig.12 sección 3.2.2), fueron purificados usando PLASMID Mini Kit II (EZNA). Finalmente los clones positivos fueron confirmados mediante secuenciación automática (Genytec, Santiago de Chile).

Para el caso de los estudios enfocados en la distancia entre nucleosoma y el sitio de unión del factor de transcripción, nuestro laboratorio contaba previamente con los clones pGEM\_601\_8\_Gal4, pGEM\_601\_22\_Gal4 y pGEM\_601\_42\_Gal4. Estos plásmidos contienen la secuencia posicionadora del octámero de histonas denominada 601 y también se encuentra presente la secuencia de unión para el factor de transcripción Gal4. Entre ellos se diferencian en el número de pares de bases entre la secuencia 601 y el sitio de unión para Gal4, que son 42, 22 y 8 pb (ver Fig.7).

## **2.3. - Marcaje radiactivo:**

### **2.3.1 Marca extremo 5' de partidor:**

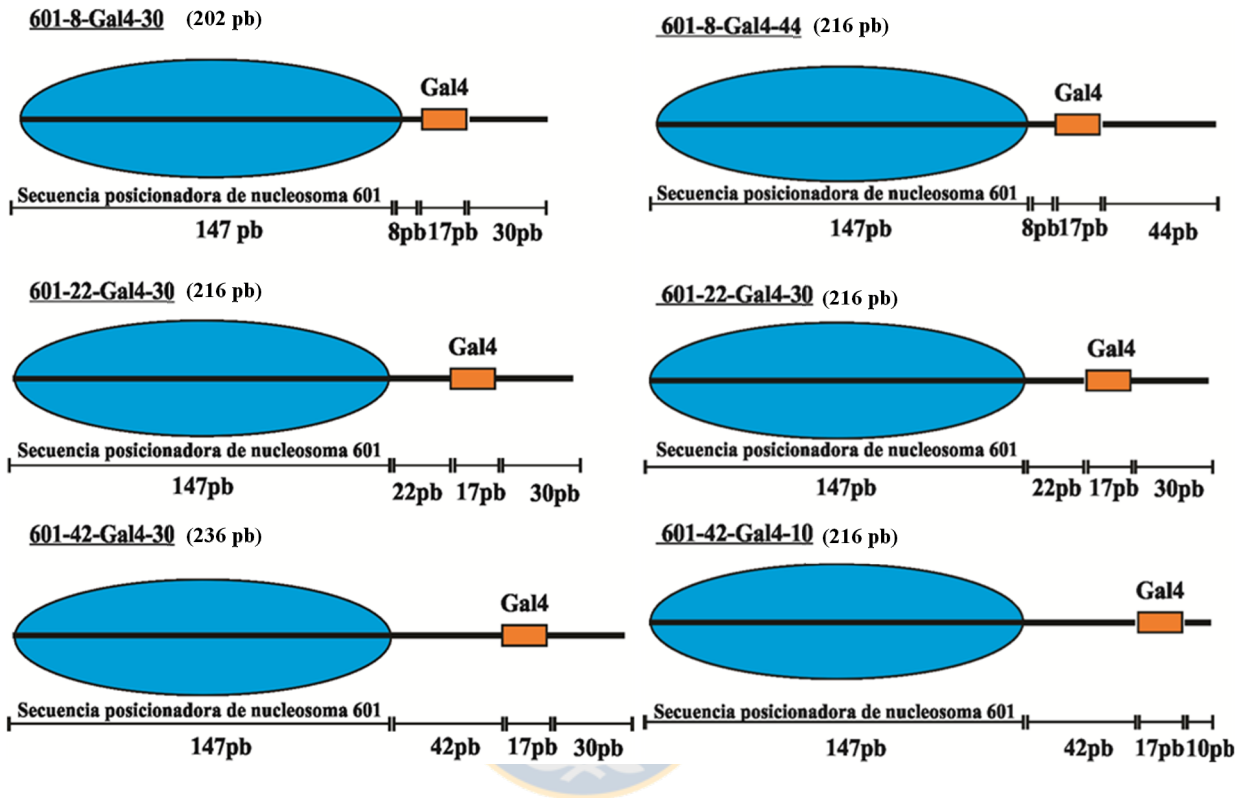
Cada partidor de ADN a utilizar fue marcado con  $^{32}\text{P}$  por medio de PCR. Primero se realizó el marcaje del extremo 5' de cada partidor sentido a utilizar en las PCR con 12.5 U de T4 Polinucleótido Kinasa (NEB), 7.7 uL de [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP 10 uCi/uL, solución T4 PNK 1X y 25 pmoles de oligonucleótido en un volumen de 25 uL. En todos los casos se utilizó el partidor 5p\_601Lat\_pGEM (Tabla II). La reacción se detuvo con 0.02M (concentración final) de EDTA luego de haber incubado 30 minutos a 30°C. El oligonucleótido marcado se purificó con columna



**Fig.6. Vector utilizado para subclonamientos y modelo de probadores con tendencia a estructurarse como ADN-Z. (A)** Plásmido pGEM-3z/601-Gal4 utilizado para sub-clonamientos. Se digirió con la enzima NotI y PstI en todos los casos. **(B)** Ligación con los oligonucleótidos previamente diseñados con sitios complementarios al plásmido original digerido con NotI y PstI (en azul). **(C)** Resultado de la ligación de los insertos. **(D)** Probadores luego de PCR y reconstitución hacia mononucleosomas.

Probadores nucleosomales de distinto tamaño

Probadores nucleosomales del mismo tamaño.



**Fig.7. Diseño esquemático de los probadores nucleosomales utilizado para evaluar el efecto de la distancia entre un nucleosoma y el sitio de unión de Gal4.** El probador 601-22-Gal4- 30 es exactamente el mismo en ambas columnas y sólo se incluye dos veces con fines de permitir la comparación con los demás probadores de cada columna.

Sephadex G-25 (Roche). Luego, la muestra se sometió a precipitación regular con etanol (adición de 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2 a -20°C por 2 horas, luego de la incubación la muestra fue centrifugada a 16.000 g por 10 minutos a 4°C, se elimina el sobrenadante, luego se lavó el *pellet* con 400 uL de etanol 70% frío; centrifugación igual a la anterior; eliminación sobrenadante y secado de etanol residual con el tubo destapado). Finalmente el oligonucleótido se resuspendió en agua.

### 2.3.2 PCR radiactiva (Tabla II):

Para los ensayos del efecto de la distancia entre el nucleosoma y el sitio de unión, los productos de PCR fueron obtenidos a partir de los plásmidos pGEM\_601\_42\_Gal4, pGEM\_601\_22\_Gal4 y pGEM\_601\_8\_Gal4. Para el caso del ADN-Z, los productos de PCR fueron obtenidos a partir de los clones CGX6 y CGX16.

Las reacciones de PCR se realizaron con 2.5 ng de ADN, 1.25 U de enzima Paq 5000 (Stratagene), solución Paq 5000 1X, 25 pmoles de ambos partidores, 0.2 mM de cada dNTP en un volumen de 50 uL.

El programa utilizado fue el siguiente: 95°C por 4 minutos; 30 ciclos de amplificación, consistentes cada uno en denaturación a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 55°C de por 30 segundos y 72°C por 30 segundos de elongación con una elongación final a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron purificados por columnas Sephadex G-50. Los eluatos fueron sometidos a una precipitación estándar con etanol (sección 2.3.1). Las muestras fueron resuspendidas en 10uL de Tris EDTA (TE) pH 8.0 filtrado.

Luego se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó con Kit QIAEX II (QIAGEN). Se obtuvieron dos eluciones con 50 uL cada una de solución TE pH 8.0. Luego se les agregó 0.1 volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2 y se realizó la precipitación con etanol descrita previamente. Luego de haber secado los precipitados, se resuspendieron en 10-20 uL solución TE pH 8.0 filtrado.

Para cuantificar cada segmento generado se sometió una alícuota a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se comparó la intensidad de la muestra con la intensidad del marcador de Gel tamaño NEB 100pb *ladder*, utilizando la banda de 200 pb de este marcador como referente y utilizando el software UN-SCAN IT versión 6.1.



Luego una alícuota de los fragmentos se analizó por electroforesis en gel de acrilamida/bis (40:1) al 5 % para verificar la integridad del ADN. Se corrió a 200 Volts por 3 horas a 4°C con solución TBE 0.3X. El gel se secó por 2 horas, se expuso a placas *Phosphorscreen* y la imagen fue obtenida utilizando el equipo *Molecular Imager FX* (BIORAD).

**Tabla II: Partidores utilizados en las reacciones de PCR.**

<b>Producto de PCR</b>	<b>Partidores</b>	<b>Tamaño producto de PCR (pb)</b>
Para todos los fragmentos (partidor 5p_601Lat_pGEM)	<b>Sentido:</b> 5'-ACAGGATGTATATATCTGACACGTGCCTGG-3'	-
601_8_Gal4_44	<b>Antisentido:</b> 5'-GACTCATAAGATATCACAGTGG-3'	216
601_22_Gal4_30	<b>Antisentido:</b> 5'-GGACGTCCGTACGTTCGAACTCATAA-3'	216
601_42_Gal4_10	<b>Antisentido:</b> 5'-GTCAGGAGGCGCCTGGACGT-3'	216
601_8_Gal4_30	<b>Antisentido:</b> 5'-GGACGTCCGTACGTTCGAACTCATAA-3'	202
601_42_Gal4_30	<b>Antisentido:</b> 5'-GGACGTCCGTACGTTCGAACTCATAA-3'	236
601_22Z_Gal4	<b>Antisentido:</b> 5'-GGACGTCCGTACGTTCGAACTCATAA-3'	216
601_42Z_Gal4	<b>Antisentido:</b> 5'-GGACGTCCGTACGTTCGAACTCATAA-3'	236

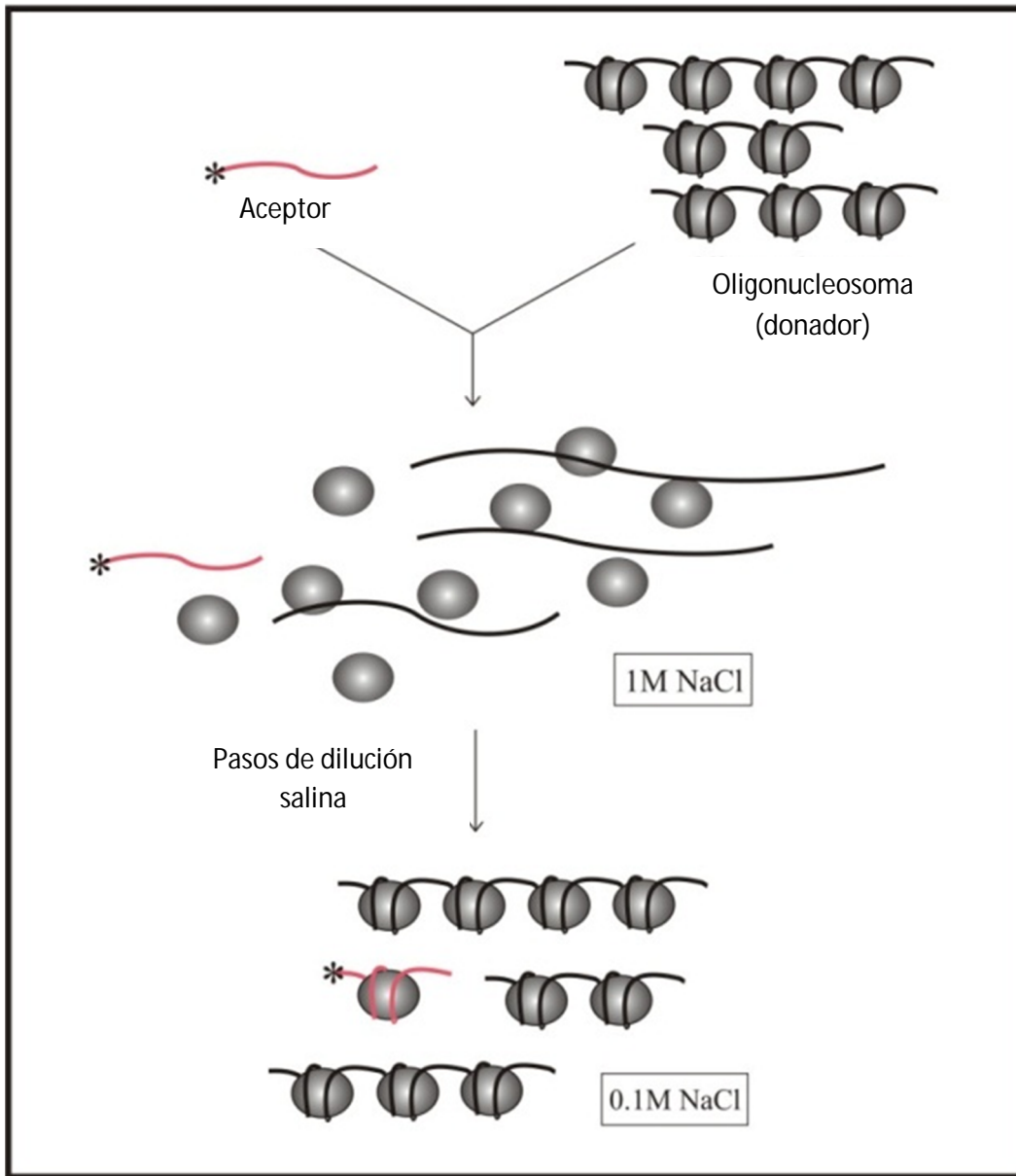
## 2.4. - Reconstitución de mononucleosomas:

Se realizó una mezcla inicial con 0.5 pmoles de ADN marcado, 1.5 ug de oligonucleosomas cortos (SON, por el inglés *Short oligonucleosomes*), 1M de NaCl y tampón de dilución (10 mM Tris-Cl pH 7.4; 1 mM EDTA; 0.5mM PMSF; 5mM DTT) en un volumen de 12.5 uL. Bajo estas condiciones las histonas de los oligonucleosomas se disocian. Luego se incubaron las muestras a 37°C por 20 minutos. A continuación se realizaron diluciones sucesivas de la mezcla con el tampón de dilución hasta alcanzar concentraciones finales de NaCl de 0.8, 0.6, 0.4 y 0.2M. Entre diluciones se incubó la mezcla a 30°C por 20min. Después se agregó solución 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 quedando una concentración salina de 0.1M en un volumen de 125 uL (Fig.8). En paralelo se realizaron reconstituciones nucleosomales negativas como controles. En éstas se agregó oligonucleosomas cortos sólo después de la última dilución. Luego se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (40:1) al 5% para verificar la reconstitución. La electroforesis se realizó a 200 volts por 3 horas a 4°C con Buffer TBE 0.3X. Se expuso el gel seco a *Phosphorscreen* y se visualizó en el equipo Molecular Imager FX.

## 2.5. – Purificación Gal4-VP16 y Gal4-DBD:

### 2.5.1 Crecimiento de Bacterias:

Se utilizaron bacterias BL21 (DE3) pLys previamente transformadas con el plásmido pET28a que dirige la expresión de las proteínas Gal4-VP16 y Gal4-DBD fusionadas con cola de histidinas. Se crecieron las bacterias entre 12 y 16 horas en placas con medio Luria Bertani (LB) y 10ug/mL de kanamicina y cloranfenicol a 37°C. Se seleccionó una colonia y se dejó creciendo en un tubo con 5 mL de medio LB con 10 ug/mL de kanamicina durante 12 a 16 horas a 37°C. Luego se inoculó 200 mL de medio LB en una razón de 1:100, incubando a 28°C hasta llegar a una absorbancia de 0.6-0.8. Después se adicionó IPTG 0.1 mM y se continuó durante 2 horas. Finalmente se centrifugó a 5000 g por 10 minutos (4°C) para obtener el pellet.



**Fig.8.**Reconstitución nucleosomal por transferencia del octámero. (Tesis Doctoral Gutiérrez J.L.)

### 2.5.2 Lisis bacteriana y purificación por afinidad.

El *pellet* bacteriano se resuspendió en 10 mL de solución de lisis (50mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; pH 8.0). Luego se realizaron 4 ciclos de sonicación de 20 segundos, con 40% de amplitud y con 20 segundos de descanso en hielo cada uno. Después se centrifugó a 8000 g dos veces a 4°C por 15 minutos.

Para las purificaciones de las proteínas Gal4-VP16 y Gal4-DBD, se utilizaron 200 uL de resina Ni-NTA (QIAGEN) que primero fue tratada con 200 uL de solución de lisis sin inhibidores de proteasa y luego con 200 uL de buffer de lisis con inhibidores de proteasa al 1x (PMSF 0.5 mM, Inhibidor de tripsina 10 ug/mL, TPCK 7 ug/mL, Pepstatin A 1ug/mL, Leupeptin 5 ug/mL). Luego se incubó el sobrenadante obtenido de la centrifugación por 40 minutos con la resina a 4°C en columna. Luego se dejó pasar y se volvió a poner en contacto con la resina. La resina fue traspasada a un tubo y se realizaron 5 lavados con 400 uL de solución de lisis conteniendo 10mM de imidazol, 2 lavados de 400 uL de solución conteniendo 50 mM de imidazol y 5 eluciones de 200 uL con 100 mM de imidazol. En todos los casos se realizó una incubación previa con la solución y resina de 5 minutos a 4°C en rotación. Luego se realizó una centrifugación a 3400 g por 10 segundos. Se obtuvo el sobrenadante el cual fue guardado en presencia de inhibidores de proteasa al 1x y glicerol al 15%.

### 2.5.3 Análisis de purificación:

La purificación se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida 12% (30:1) en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS). Las condiciones de corrida fueron entre 100-150 Volts (solución de corrida 25mM Tris-HCl pH 8.3; 250 mM glicina y 0.2% SDS). Las muestras fueron desnaturalizadas previamente con solución Laemmli 2X (125mM Tris-HCl pH 6.8; 200mM DTT; 6% SDS; 0.05% bromofenol azul y 20% glicerol), calentando a 95°C y luego fueron sembradas.

Para visualizar las bandas en el gel se realizó una tinción con azul de Coomassie.

#### 2.5.4 Inmuno-detección de Gal4-VP16 mediante western-blot:

Se realizó un gel de poliacrilamida (30:1) al 12% en presencia de SDS para separar las proteínas y luego fijarlas en una membrana de nitrocelulosa (Hybond C, Promega) mediante transferencia húmeda a 300 mA por dos horas (solución de transferencia 48 mM Tris-HCl pH 9.2; 39 mM glicina; 20% metanol).

La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS1X- Tween 20% (1X) durante 1 hora y luego se hicieron 3 lavados con PBS-Tween 1X de 3 minutos cada uno. Luego se incubó durante 1 hora en agitación suave con el anticuerpo primario de clase IgG anti- His de conejo (Santa Cruz, N° de catálogo sc-804) en PBS-Tween 1X, en una dilución 1:2000. Posterior a realizar 3 lavados con PBS-Tween 1X de 3 minutos cada uno, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario Anti- Inmunoglobulina de conejo proveniente de cabra (Santa Cruz, N° de catálogo sc-2004) con una dilución 1:10000 en PBS-Tween 1X por una hora con agitación suave. Se realizaron los lavados nuevamente y se procedió a revelar con kit de quimioluminiscencia (Pierce ECL, Thermo Scientific) y se expuso la membrana a film (Kodak) durante 1 minuto.

#### **2.6.- Ensayos de unión de proteína-ADN, proteína-nucleosoma de formación de complejos ternarios:**

##### 2.6.1 Ensayos de unión de Gal4-VP16 a mononucleosoma o ADN y ensayos de unión Gal4-DBD al nucleosoma:

Estos ensayos consistieron en mezclar 10 fmoles de mononucleosoma marcado o 10 fmoles de mononucleosoma no reconstituido marcado (ver sección 2.4), con 8.4 uL buffer de remodelación (HEPES 20 mM pH 7.9; KCl 70 mM; PMSF 0.5 mM; DTT 2mM; NP-40 0.05%; Glicerol 10%; BSA 100 ug/mL; MgCl<sub>2</sub> 9.5 mM; agua), Buffer SWI/SNF (10 mM Tris-Cl pH 8.0; EGTA 2 mM pH 8.0; PMSF 0.5 mM; DTT 1 mM; Imidazol 1 mM; NP-40 0.1%; Mg(CHCOO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 1mM; Glicerol 10%; NaCl 150 mM y agua), y Gal4-VP16. Como control se utilizaron las muestras sin Gal4-VP16. Las muestras se incubaron por 30 minutos a 30°C. Se analizaron por electroforesis en un gel no denaturante de poliacrilamida al 5% (40:1) y se expuso en Phosphorscreen y se visualizó en equipo Molecular Imager FX.

### 2.6.2 Reclutamiento de $\gamma$ SWI/SNF por Gal4-VP16:

Se realizó con 10 fmoles de nucleosoma marcado, 20 nM de Gal4-VP16, 8.4 uL de solución de remodelación (Hepes 20mM pH 7.9; KCl 90 mM, PMSF 0.5mM; DTT 2 mM; NP-40 0.05%; Glicerol 10%; BSA 100 ug/mL; MgCl<sub>2</sub> 9.5 mM y agua), 200ng de oligonucleosomas cortos (SON). Esta mezcla se incubó por 20 minutos a 30°C (paso de preunión). Luego se agregó 1nM de complejo remodelador SWI/SNF (o solución SWI/SNF como control del reclutamiento) y se incubó por 30 minutos a 30°C. Los resultados se analizaron por electroforesis en gel no denaturante de poliacrilamida al 4% (60:1). Los geles fueron secados al vacío y expuestos a Phosphorscreen o filmes radiográficos Kodak.

### **2.7.- Ensayo de Remodelación:**

Este ensayo se realizó como lo descrito en la sección 2.6.2 con las siguientes modificaciones: se utilizaron 7.9 uL de solución de remodelación, 2mM de ATP y 200ng de SON. Luego de la incubación con el complejo SWI/SNF viene la etapa de remoción del complejo y del factor de transcripción Gal4-VP16 o Gal4-DBD utilizando una mezcla con los siguientes componentes: 0.5 ug de oligonucleosomas largos (LON) provenientes de células HeLa y 0.75 ug de ADN de esperma de salmón y 41.7 uM de oligonucleótido al cual se une Gal4. Se incubó por 20 minutos a 30°C. Las remodelaciones se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% (40:1) no denaturantes con buffer TBE 0.3X a 200 Volts a 4°C. Los geles fueron secados al vacío y expuestos a Phosphorscreen o filmes radiográficos Kodak.

### 3.- RESULTADOS.

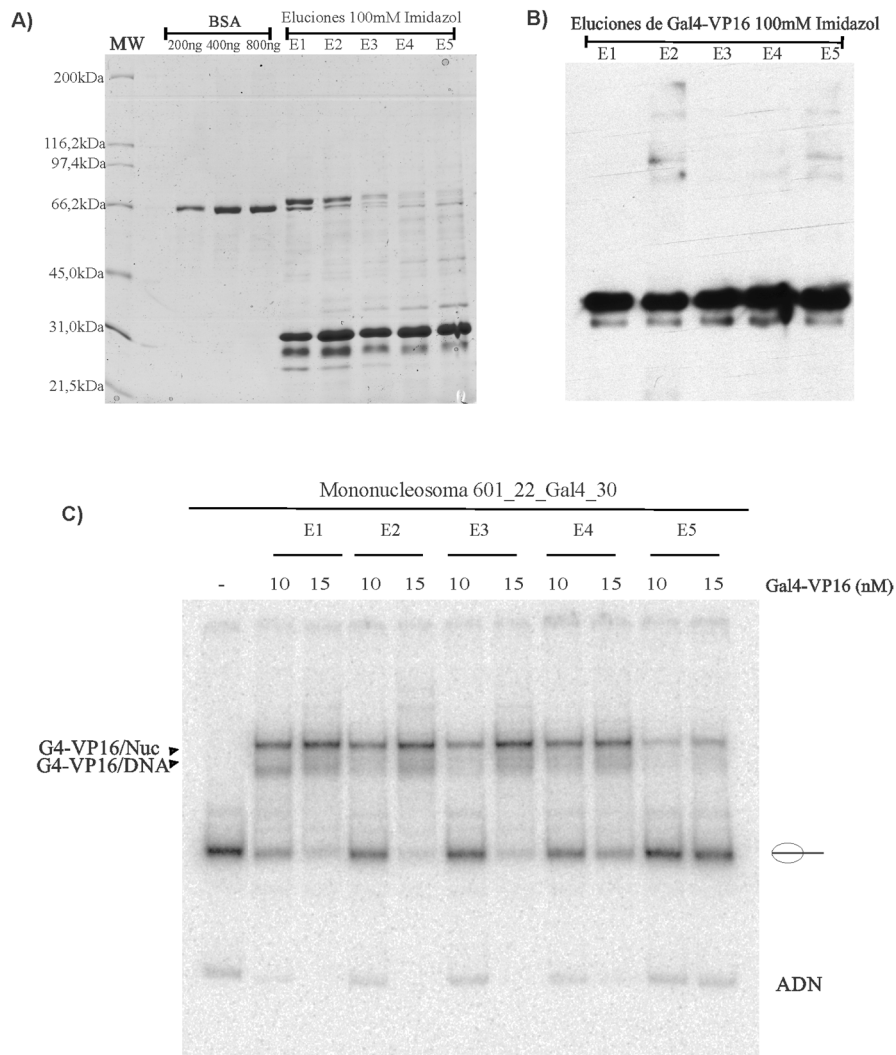
#### 3.1 Purificaciones de proteínas (Gal4-VP16 y Gal4-DBD) y análisis de unión al nucleosoma.

Para poder realizar los ensayos de remodelación de cromatina, se necesitó purificar el factor de transcripción quimérico Gal4-VP16 que puede reclutar el complejo ATP-dependiente SWI/SNF. Por otro lado también se necesita su control Gal4-DBD, el cual consta sólo del dominio de unión al ADN de la proteína Gal4, por lo que no recluta a SWI/SNF (Gutiérrez J.L., y col., 2007).

3.1.1 Purificación, western-blot y unión de Gal4-VP16: Este factor de transcripción quimérico se obtuvo a partir de bacterias y fue purificado a través de una resina de níquel. Luego se analizaron los eluatos correspondientes mediante SDS-PAGE. Mediante tinción con azul de coomasie, el factor de transcripción se observa con una pureza (superior al 40%) y un tamaño aparente de 30kDa (Fig.9A). En la Fig.9B se confirma la identidad de Gal4-VP16 mediante western-blot, utilizando un anticuerpo dirigido al epítipo His de la proteína recombinante.

En la Fig.9C se observa que todas las eluciones del factor de transcripción Gal4-VP16 previamente purificado se unen al probador nucleosomal 601-22-Gal4-30 y que esta unión aumenta con la concentración de la proteína. Se seleccionó la elución 4 para realizar los ensayos posteriores a una concentración de 20nM de la proteína.

A lo largo de esta tesis en los distintos ensayos de unión a probadores nucleosomales y de remodelación se utilizaron dos condiciones diferentes estrictez, denominados baja y alta estrictez. Baja estrictez se refiere a una concentración de oligonucleosomas fríos (SON) de 2ng/uL (30 ng totales de SON). La presencia de estos SON se debe a su presencia en el probador nucleosomal. Alta estrictez se refiere a la presencia de 200ng de SON, adicionales a los 30 ng provenientes de la reconstitución del mononucleosoma, lo que entrega 230 ng totales en cada reacción (15 ng/uL, por realizarse las reacciones en un volumen de 15 uL). La utilización de alta estrictez tiene como objeto evitar la unión directa de SWI/SNF al probador nucleosomal que, en estos casos deberá ser reclutado al probador por parte de Gal4-VP16 para lograr interacción con el nucleosoma.



**Fig.9. Análisis de la purificación de Gal4-VP16, verificación por western-blot y unión a su secuencia diana.** (A) Análisis electroforético de eluciones obtenidas de purificación de Gal4-VP16 por columna Ni-NTA desde sistema de expresión procarionte (SDS-PAGE 12%). E1 a E5 corresponden a los eluatos de la purificación. Se observa que Gal4-VP16 migra aproximadamente a los 30 kDa. Se utilizaron concentraciones crecientes de BSA para cuantificación. (B) Western-blot con anticuerpo primario de conejo anti-His (Santa Cruz). Se sembraron las distintas eluciones obtenidas de la purificación y se verificó la presencia de Gal4-VP16 en las eluciones obtenidas. (C) Unión de las distintas eluciones de Gal4-VP16 al mononucleosoma reconstituido 601\_22\_Gal4\_30. Se verificó la unión de las distintas eluciones previamente cuantificadas. Se probaron las concentraciones 10 y 15 nM.



### 3.1.2 Purificación y unión de Gal4-DBD:

Se analizaron los eluatos obtenidos con 100mM de imidazol. El tamaño de Gal4-DBD es de aproximadamente 18 kDa y migra cercano a los 21,5 kDa (Fig.10A). En la Fig.10B se observa la unión de la proteína a distintos mononucleosomas de igual extensión total (601\_8\_Gal4\_44, 601\_22\_Gal4\_30, 601\_42\_Gal4\_10). Se observa que la elución 1 es la única que une cerca de todo el probador nucleosomal. Se seleccionó la elución 1 para los ensayos posteriores a 10nM de proteína.

## **3.2.-Obtención de probadores mononucleosomales.**

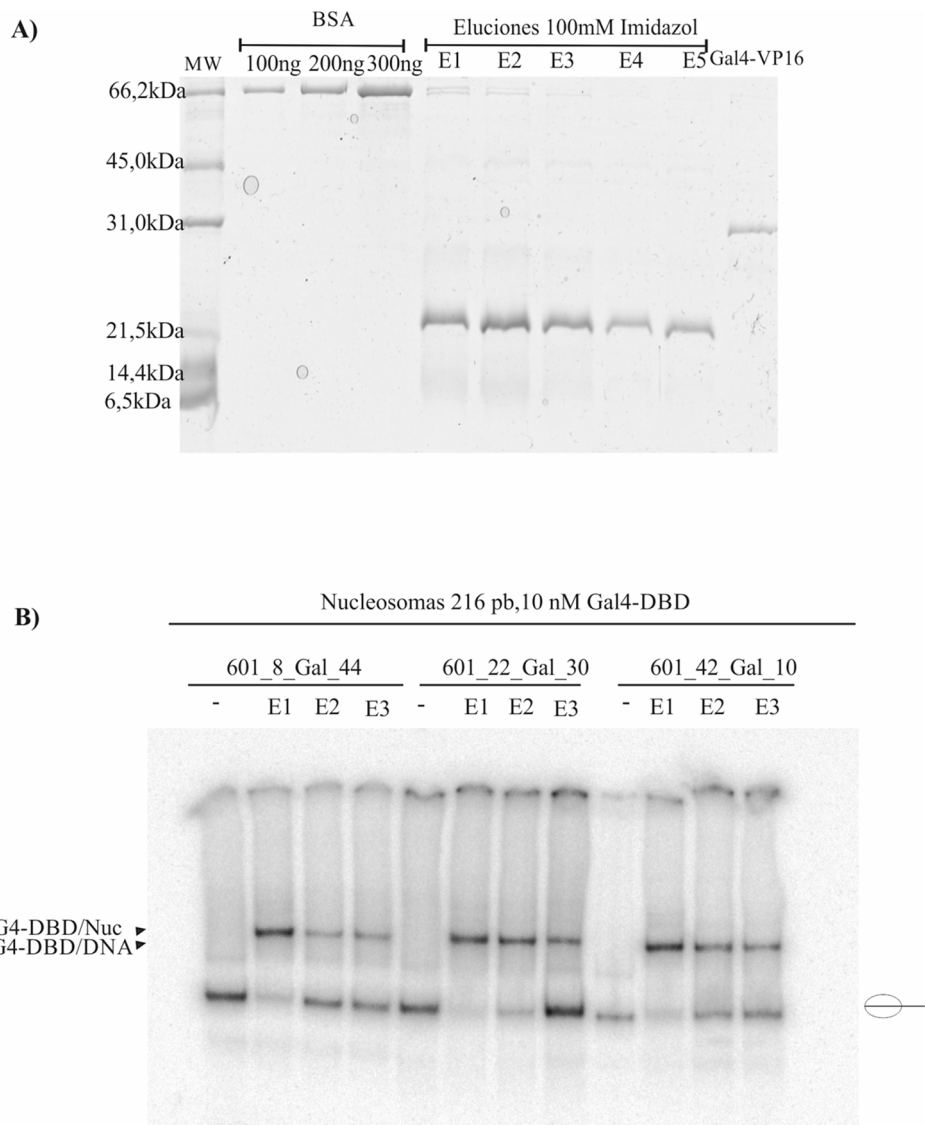
### 3.2.1 Obtención de probadores para el estudio del efecto de la distancia un nucleosoma posicionado y el sitio de unión a Gal4.

Los segmentos de ADN generados para estudiar este efecto fueron reconstituídos mediante transferencia de octámero (ver metodología 2.4). Como se observa en la Fig.11, se obtuvo un alto porcentaje de reconstitución con estos segmentos de ADN. La sección 3.3.2 aborda los fundamentos que llevaron a definir estos distintos probadores.

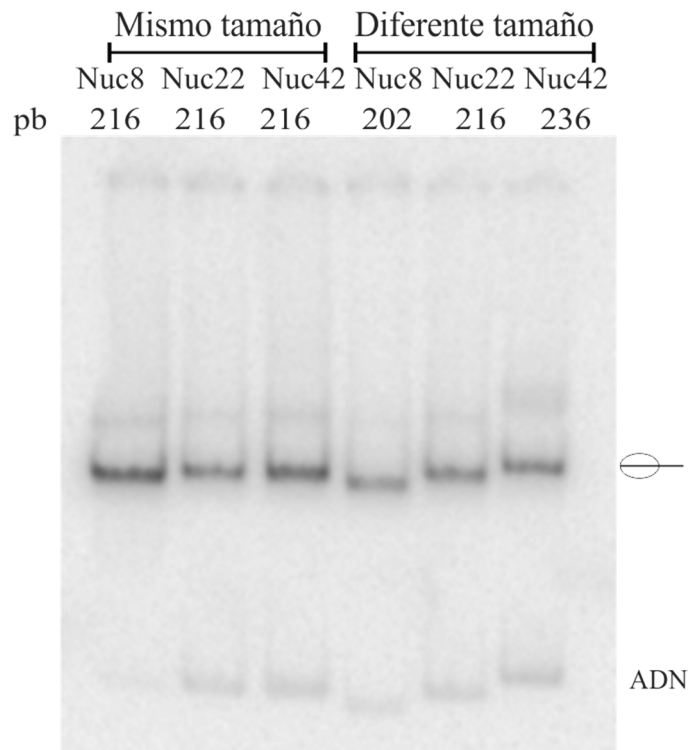
Se describe previamente en metodología como se obtuvieron estos mononucleosomas (Fig.11).

### 3.2.2 Obtención de sustratos nucleosomales que contengan secuencias con tendencia a estructurarse como ADN-Z.

Para poder realizar los ensayos de remodelación y ver el efecto de secuencias con tendencia a estructurarse como ADN-Z se realizaron dos sub-clonamientos, uno con la secuencia CG repetido 6 veces (más tres repeticiones CG que son del plásmido original, siendo CG repetido 9 veces) entre el sitio de posicionamiento de nucleosomas y el sitio de unión de Gal4 (601\_22Z\_Gal4) y otro con la secuencia CG repetido 16 veces (más dos repeticiones de CG que son del plásmido original, siendo CG repetido 18 veces) entre el sitio de posicionamiento de nucleosomas y el sitio de unión de Gal4 (601\_42Z\_Gal4). Con ellos, luego de reconstituir, se obtuvieron los sustratos nucleosomales para realizar los ensayos de actividad catalítica de *eviction* (Ver Fig.6 sección 2.1)



**Fig.10. Gel SDS-PAGE de las etapas de purificación de Gal4-DBD y unión a su secuencia diana.** (A) Análisis electroforético de eluciones obtenidas de purificación de Gal4-DBD por columna Ni –NTA desde sistema de expresión procarionte (SDS-PAGE, 12%). Se sembraron alícuotas de los eluatos obtenidos. Se observa que Gal4–DBD migra aproximadamente a los 21,5 kDa. Se utilizaron concentraciones crecientes de BSA para cuantificación. E1: Elución 1; E2: Elución2; E3: Elución 3; E4: Elución 4; E5; Elución 5. MW: Marcador de peso broad range de BIO-RAD. Se utilizó Gal4-VP16 como control de migración. (B) Unión de las distintas eluciones de Gal4-DBD a distintos mononucleosomas reconstituídos. Se verificó la unión de las eluciones 1, 2 y 3 previamente cuantificadas. Se probó la concentración 10nM. E1: Elución 1; E2: Elución2; E3: Elución 3; -: Sin Gal4-DBD.



**Fig.11. Migración de probadores nucleosomales utilizados para evaluar el efecto de la distancia entre un nucleosoma y el sitio de unión de Gal4 en gel de poliacrilamida denaturante.** Se sembraron mononucleosomas del mismo tamaño (Nuc8: 601\_8\_Gal4\_44; Nuc22:601\_22\_Gal4\_30; Nuc42: 601\_42\_Gal4\_10) y de diferentes tamaños (Nuc8: 601\_8\_Gal4\_30; Nuc22: 601\_22\_Gal4\_30; Nuc42: 601\_42\_Gal4\_30). ⊖—: Patrón de migración del nucleosoma no remodelado; ADN: Patrón de migración del ADN.

- Subclonamientos para construcciones de ADN-Z y secuenciación:

Primero se realizaron ensayos de restricción para confirmación de clones positivos. En la Fig.12 se observan los dos clones obtenidos tras la ligación de oligonucleótidos CGX6 o CGX16. En ningún clon digerido (D) se observa una banda entre 200pb-300pb, lo cual es lo correcto en el caso de clones recombinantes, ya que sólo en los plásmidos originales están presentes los dos sitios de corte de las enzimas indicadas en la Fig.12. En los controles sin digerir (SD) tampoco se observa banda entre estos pesos moleculares, lo cual es correcto. En el control positivo digerido (C+D) sí se observa banda entre 200 y 300pb, que es lo que se observaría si un clon es negativo. Estos clones fueron secuenciados y los resultados se presentan en la Fig.13B.

- Estandarización de PCR:

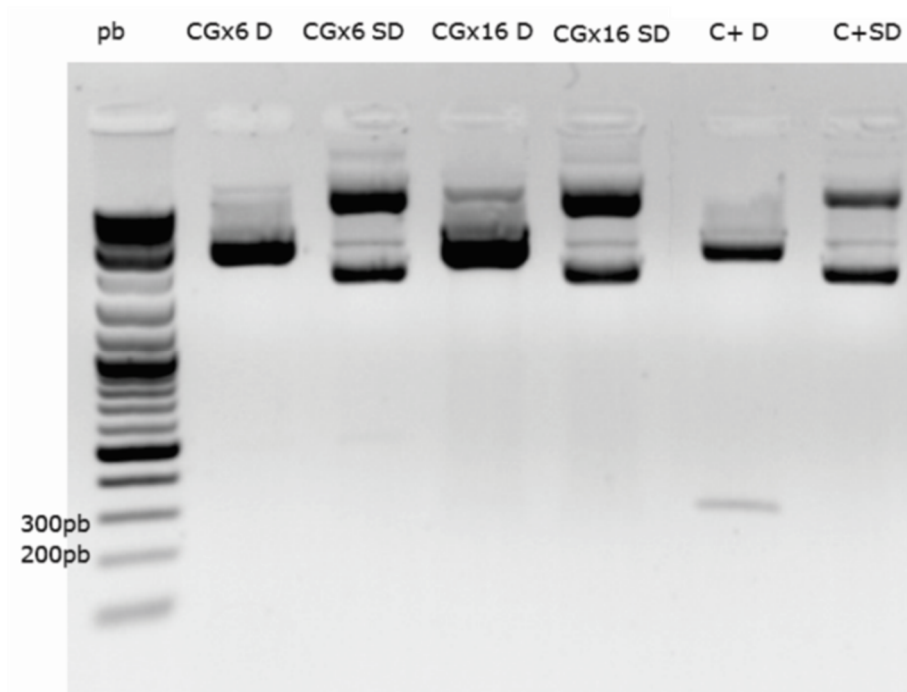
En la Fig.13B se observan los productos de PCR para cada uno de los clones que contienen la secuencia 601, el inserto con repetición CG y la secuencia de unión del Gal4. El producto esperado para 601\_22Z\_Gal4 (216pb) es de menor tamaño que para 601\_42Z\_Gal4 (236pb), pero las bandas se ven del mismo tamaño.

Hacia el extremo 3' del sitio Gal4 existen 30 pb para ambas construcciones. De esta manera al existir distintas distancias entre el sitio 601 y Gal4, implica que estos dos segmentos serán de distinta extensión. Cada uno de estos segmentos tendrá un control de igual extensión sin secuencia CG.

- Análisis de los segmentos de ADN que contienen repeticiones CG:

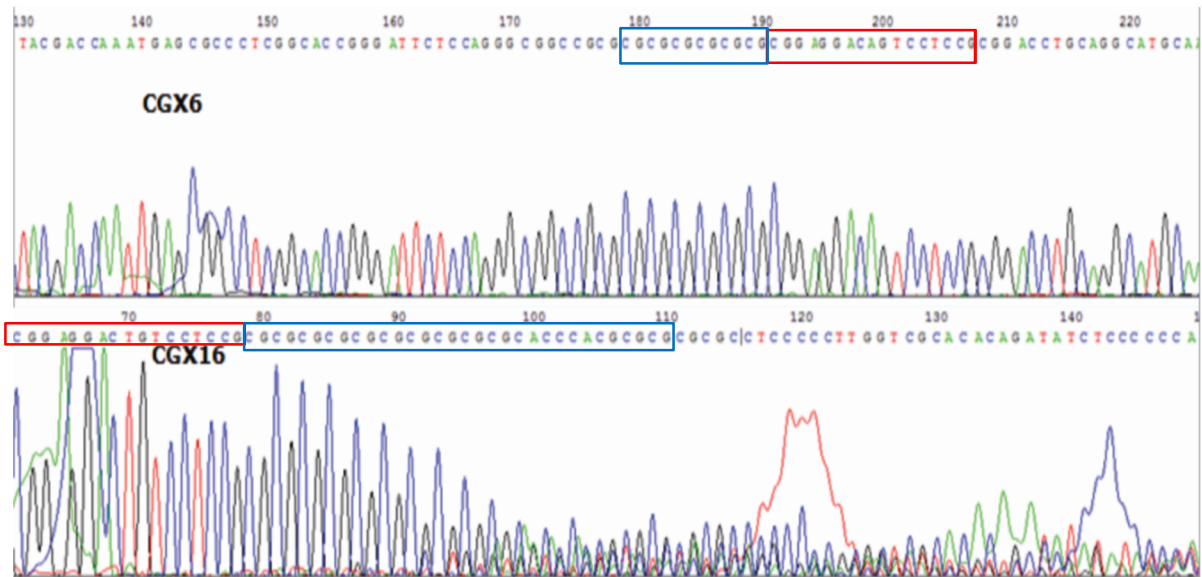
En la Fig.14A se muestra el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante de las PCR radiactivas para las secuencias con tendencia a formar ADN-Z luego de realizar las respectivas purificaciones (ver metodología sección 2.3.2). Se observan varias bandas a diferencia de lo observado en gel de agarosa en que se obtiene una sola banda.

Luego de lo sucedido con la PCR radiactiva se procedió a analizar si el buffer de condiciones finales de reconstitución (BCFR) tendría algún efecto sobre las secuencias con tendencia a estructurarse como ADN-Z en una PCR no radiactiva. También se sembraron las muestras en agua con solución de carga pero no se observó ninguna diferencia (Fig.14B). Estos resultados sugieren la posibilidad de tener productos de PCR inespecíficos con pequeñas diferencias de



**Fig 12. Confirmación de clones positivos por ensayos de restricción.** Confirmación de clones positivos por ensayos de restricción con enzimas con EcoRI-EcoRV (CGX6) y EcoRI-XhoI (CGX16) en electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se sembraron 400ng de ADN plasmidial purificado. Los 4 clones D se sembraron en el siguiente orden: CGX6, CGX16, cada uno con su control SD. pb: pares de bases; D: digerido; SD: Sin Digerir; C+: Control positivo pGEM3Z/601-Gal4; C+SD: plásmido original sin digerir.

A)



B)



**Fig.13. Secuenciación y PCR para clones con inserto 601\_22Z\_Gal4 (CGX6) y 601\_42Z\_Gal4 (CGX16).** (A) Electroferograma de de secuencias de clones positivos. Clon CGX6 (con segmento 601\_22Z\_Gal4) se secuenció su hebra sentido, para el clon CGX16 (con segmento 601\_42Z\_Gal4) se secuenció su hebra anti sentido. La región correspondiente a la repetición CG se destaca en rectángulo azul y la región del sitio de unión de Gal4 se destaca en rectángulo rojo (B) Producto de PCR correspondiente a los segmentos CGX6, CGX16 que contienen secuencia 601, insertos y secuencia de unión de Gal4 analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se cargó 1uL del producto de PCR de cada uno de los clones. Pb: Pares de bases (Marcador de peso 2log, NEB).

tamaño respecto del producto deseado, o bien que la repetición CG estuviese afectando la migración del producto de PCR. Por lo anterior se decidió purificar desde gel de poliacrilamida las bandas de mayor migración. Luego de ser purificados, estos segmentos de ADN fueron incubados a 95°C por 5 minutos para ser denaturados, enfriados lentamente y luego se volvió a analizar las muestras por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% y El tinción con bromuro de etidio. En el mismo gel fueron sembrados los productos de PCR sin purificar y aquellos que fueron denaturados a 95°C. Se observó que al calentar las muestras aparecen bandas de migración menor en todos los casos, lo que daba indicios de los fragmentos anteriormente observados correspondían a otras conformaciones del ADN.

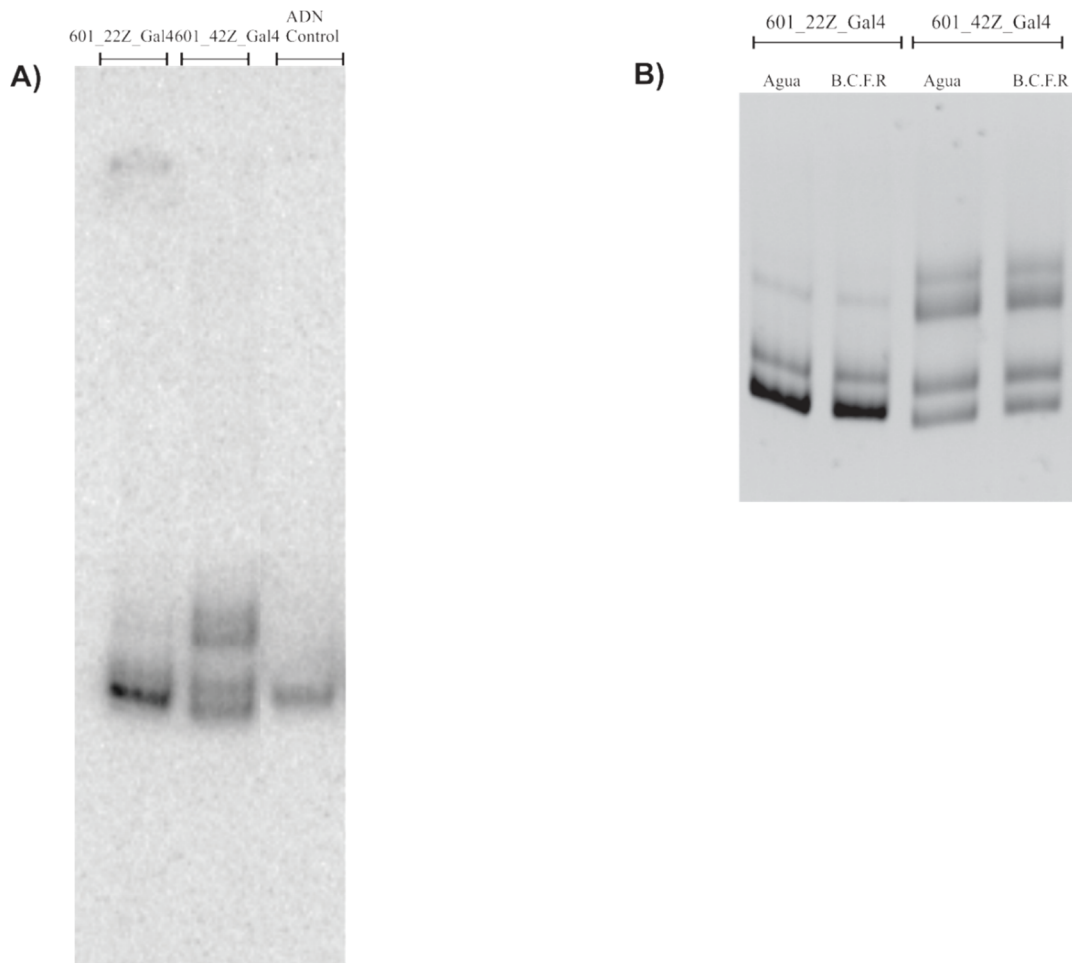
Luego de saber que las distintas bandas finalmente se pueden generar por el mismo fragmento de ADN, se procedió a realizar el marcaje radiactivo de los fragmentos con tendencia a estructurarse como ADN-Z y se purificaron las bandas previamente seleccionadas para poder reconstituir a mononucleosoma.

Se analizó el efecto salino sobre las secuencias con tendencia a estructurarse como ADN-Z ya marcadas radiactivamente (Herbert A y Rich A., 1999). Se sembraron muestras en BCFR sin NaCl y con 0.1M de NaCl. En la Fig.15B se observan bandas más difusas en las condiciones sin NaCl 0.1M que en las condiciones con NaCl.

### **3.3.- Determinación del efecto de la extensión del ADN entre el sitio de unión de Gal4 y el nucleosoma sobre la acción remodeladora del complejo SWI/SNF.**

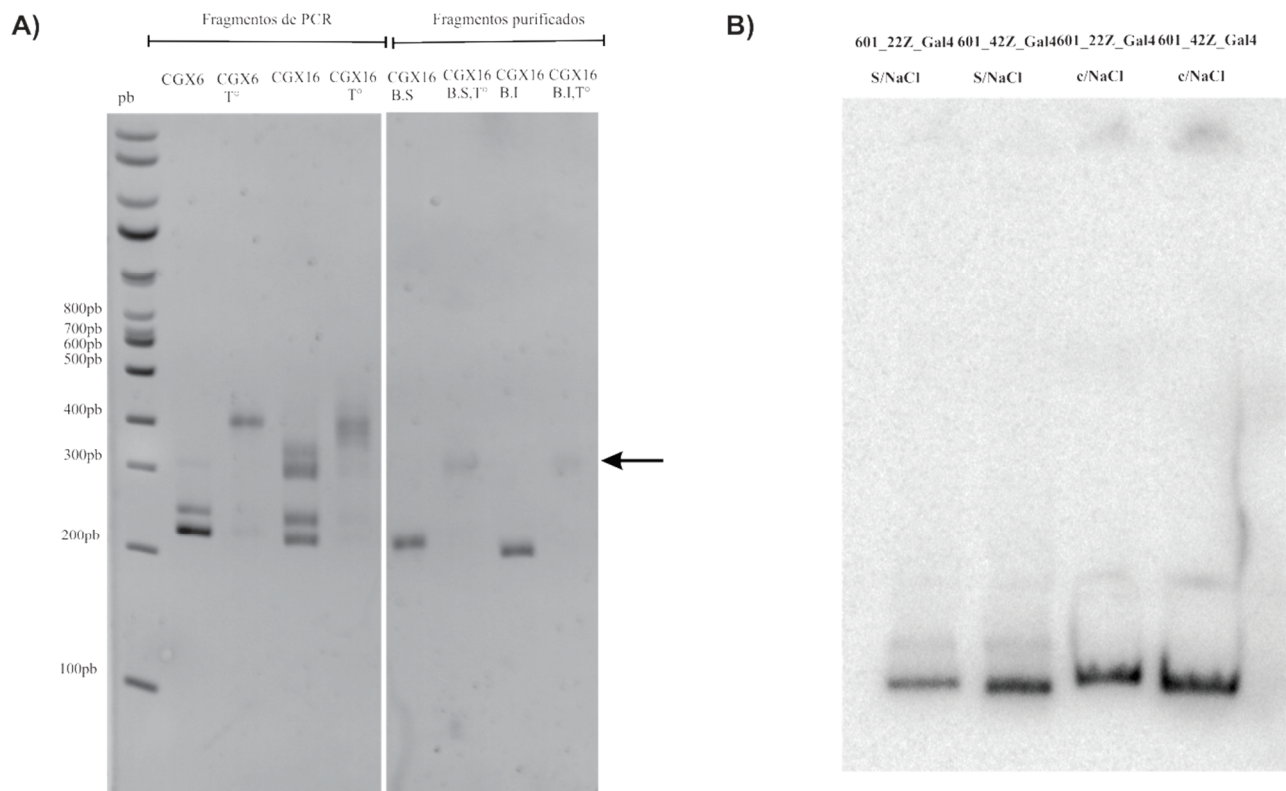
#### **3.3.1 Efecto de la distancia entre el sitio de unión de Gal4 y un nucleosoma en el reclutamiento de SWI/SNF dado por Gal4-VP16.**

Primero se quiso analizar el reclutamiento de SWI/SNF al nucleosoma por Gal4-VP16. En la Fig.16 se observa la unión de Gal4-VP16 al nucleosoma y el reclutamiento de SWI/SNF. En todos los probadores nucleosomales Gal4-VP16 se une en el mismo grado. Se observa que el reclutamiento de SWI/SNF por Gal4-VP16 va en aumento a medida que aumenta la distancia entre el nucleosoma y el sitio de unión para Gal4.

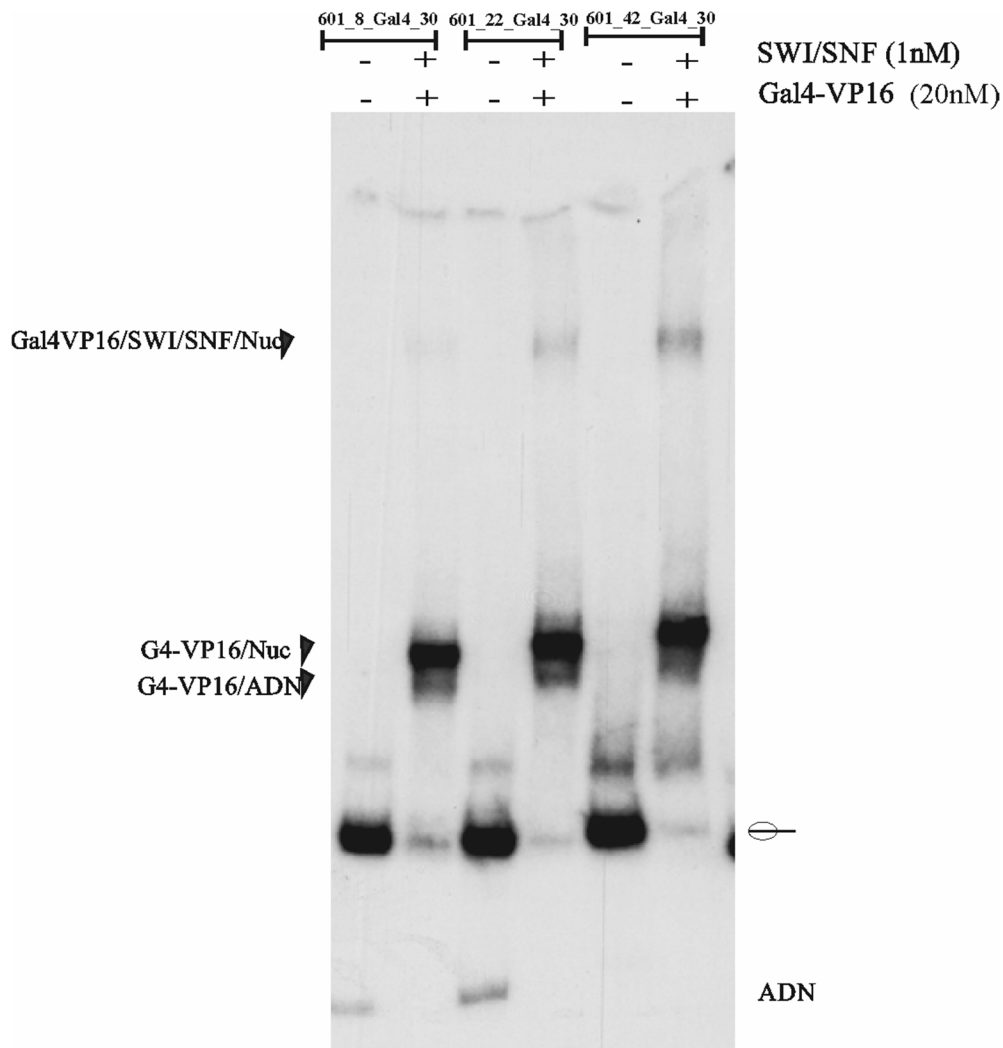


**Fig.14. Análisis de los segmentos de ADN que contienen repeticiones CG en geles no denaturantes de acrilamida (5%, 40:1).** (A) Luego de purificar las PCR radiactivas, fueron analizadas en gel no denaturante. Las muestras fueron cargadas con buffer de condiciones finales de reconstitución (10 mM Tris-Cl pH 7.4; 1 mM EDTA; 0.5 mM PMSF; 5 mM DTT; 0.05% NP40; 10% Glicerol; 100 ug/mL BSA; 0.1 M NaCl). Los segmentos de ADN sembrados son 601\_22Z\_Gal4, 601\_42Z\_Gal4 y ADN control que corresponde a la secuencia de ADN 601\_22\_Gal4. (B) Se analizaron los productos de PCR no marcados radiactivamente en gel de poliacrilamida no denaturante y teñido con bromuro de etidio. Se analizaron las muestras de ADN 601\_22Z\_Gal4 y 601\_42Z\_Gal4 con agua en presencia de buffer de carga para ADN y con buffer de condiciones finales de reconstitución (B.C.F.R.).





**Fig.15. Propiedades de segmentos de ADN conteniendo regiones de repeticiones CG geles no denaturantes de acrilamida (5%, 40:1).** (A) Efecto la temperatura. El panel de la izquierda corresponde a productos de PCR sin purificar y el de la derecha a ADN purificado desde gel de poliacrilamida. En donde se indica, se hizo tratamiento con temperatura como se detalla en el texto. CGX6: PCR 601\_22Z\_Gal4; CGX6 T°: PCR 601\_22Z\_Gal4 sometido a 95°C; CGX16: PCR 601\_42Z\_Gal4; CGX16 T°: PCR 601\_42Z\_Gal4 sometido a 95°C; B.S CGX16: Banda superior 601\_42Z\_Gal4 purificada; CGX16 B.S T°: Banda superior 601\_42Z\_Gal4 purificada sometida a 95°C; CGX16 B.I: Banda inferior 601\_42Z\_Gal4 purificada; CGX16 B.I T°: Banda inferior 601\_42Z\_Gal4 purificada sometida a 95°C; pb: Marcador de peso 100 pb NEB. (B) Análisis del efecto salino sobre los fragmentos marcados radiactivamente con tendencia a estructurarse como ADN-Z marcados radiactivamente. Se sembraron estos fragmentos en buffer de condiciones finales de reconstitución sin NaCl (S/NaCl) y en buffer de condiciones finales de reconstitución con NaCl 0.1M (C/NaCl).



**Fig.16. Efecto de la distancia entre el sitio de unión de Gal4 y un nucleosoma en el reclutamiento de SWI/SNF dado por Gal4-VP16.** Se utilizaron los arreglos nucleosomales de distinto tamaño. Los mononucleosomas utilizados son 601\_8\_Gal4\_30, 601\_22\_Gal4\_30, 601\_42\_Gal4\_30. Los ensayos fueron realizados en condiciones de alta estrictez. El análisis electroforético se realizó en gel de poliacrilamida 4% (60:1). ⊖—: Patrón de migración del nucleosoma no remodelado; ADN: Patrón de migración del ADN.

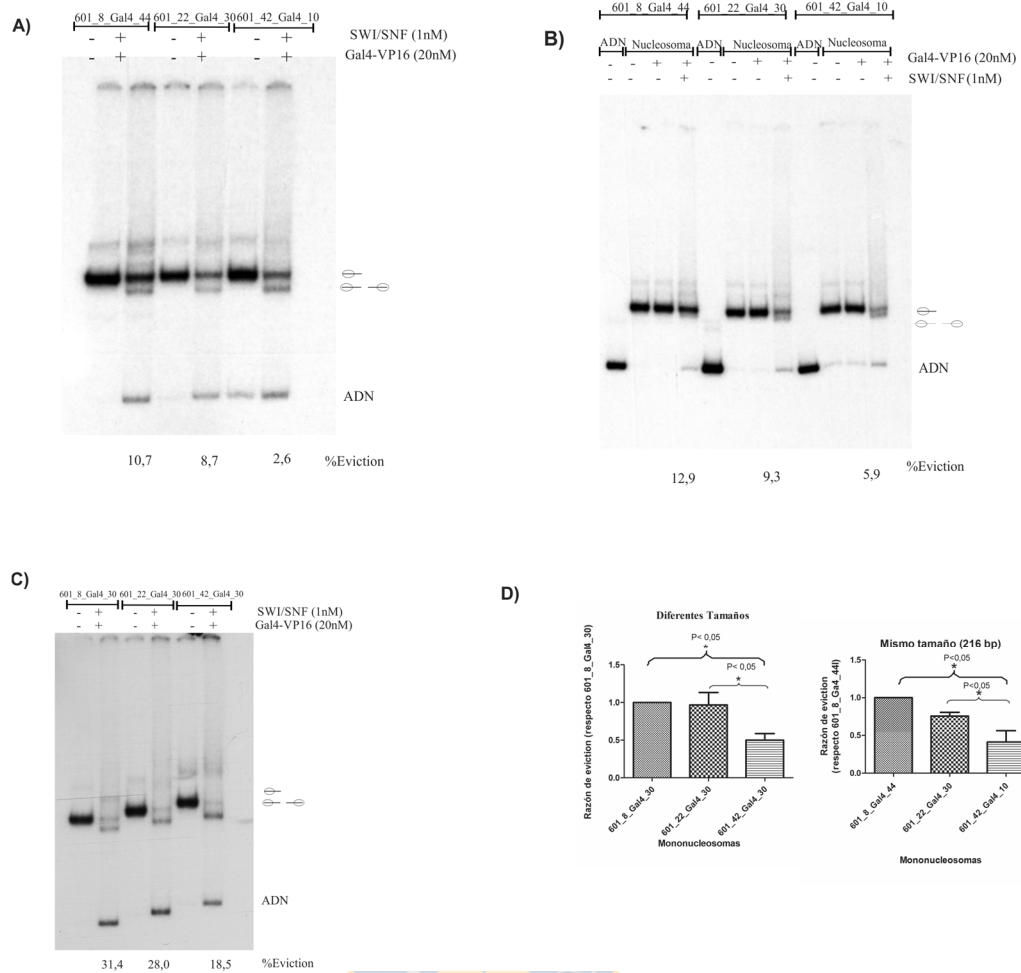
### 3.3.2 Efecto de la distancia entre un nucleosoma y el sitio de unión de Gal4 en la remodelación de cromatina ATP-dependiente:

En las figuras 17A y 17B se utilizaron los arreglos nucleosomales del mismo tamaño (216pb) para analizar el efecto de la distancia en la remodelación. A medida que aumenta la distancia entre el nucleosoma y el sitio de unión de Gal4, disminuye la actividad catalítica de *eviction* (% *eviction* ). En la Fig.17B se observa que sólo en presencia simultánea de Gal4-VP16 y SWI/SNF hay actividad catalítica de *eviction*. El porcentaje de *eviction* (ADN desnudo del monucleosoma remodelado) se cuantificó con respecto a la intensidad de banda del nucleosoma sin remodelar considerándolo como el 100%. Si el probador sin ser sometido a remodelación posee una cierta cantidad de ADN desnudo, esta cantidad se resta a la cantidad de ADN desnudo obtenida en la incubación de remodelación

Existe la posibilidad de que el mayor grado de remodelación observado en el probador 601-8-Gal4-44 respecto de 601-42-Gal4-10 se deba a la menor extensión de ADN extranucleosomal presente corriente abajo del sitio Gal4 (44pb v/s 10 pb). No existen estudios analizando posibles contactos que puede tener el complejo SWI/SNF con esta región de ADN, de manera que esa posibilidad está abierta. Por esta razón, se generaron probadores nucleosomales que, manteniendo la distancia entre la secuencia de unión a Gal4 y el nucleosoma, tuvieran igual extensión de ADN extranucleosomal corriente abajo de este sitio, lo que hemos definido como probadores de distinta extensión de tamaño (601-8-Gal4-30, 601-22-Gal4-30, 601-42-Gal4-30)

En la Fig.17C se analizó la actividad remodeladora sobre los probadores nucleosomales de diferentes tamaños. Se puede observar que la tendencia es la misma que en 17A: menor grado de *eviction* a mayor distancia entre el nucleosoma y el sitio Gal4.

Todos estos ensayos se realizaron por triplicado repitiéndose la tendencia (Fig.17.D). La diferencia del porcentaje de *eviction* entre el nucleosoma 601\_22\_Gal4 y 601\_42\_Gal4 es significativa ( $P < 0.05$ ).



**Fig.17. Efecto de la distancia entre un nucleosoma y el sitio de unión de Gal4 en la remodelación de cromatina ATP-dependiente. (A) y (B):** Ensayos de actividad *eviction* de SWI/SNF para mononucleosomas del mismo tamaño. **(C):** Ensayos de actividad *eviction* de SWI/SNF para mononucleosomas de diferentes tamaños. **(D)** Análisis del grado de *eviction* derivado de tres experimentos independientes realizados con cada set de mononucleosomas. ADN: Patrón de migración del ADN. % Eviction: Porcentaje de *eviction* para cada uno de los nucleosomas. El cálculo del nivel de desensamble del nucleosoma (*eviction*) cuantifica el porcentaje de ADN nucleosomal que es convertido a ADN desnudo. Si el probador sin ser sometido a remodelación posee una cierta cantidad de ADN desnudo, esta cantidad se resta a la cantidad de ADN desnudo obtenida en la incubación de remodelación.  $\ominus$  — : Migración nucleosoma no remodelado;  $\ominus$  —  $\ominus$ : Migración nucleosoma remodelado; ADN: migración del ADN.

### 3.3.3 Evaluación de la actividad catalítica de SWI/SNF en presencia de Gal4-DBD.

También se realizaron ensayos con Gal4DBD, el cual no tiene el dominio de activación (VP16). En este caso se observa sólo *sliding* en condiciones estándar de estrictez, como ya se ha descrito en otros trabajos, debiéndose a que la presencia de Gal4-VP16 facilita la interacción con el nucleosoma favoreciendo el *eviction* (Gutiérrez J.L. y col., 2007). Cabe mencionar que el *sliding* es el principal efecto de SWI/SNF cuando se incuba el nucleosoma solo con este complejo. En la Fig.18 se observa que la actividad catalítica de *sliding* es similar entre las condiciones donde hay SWI/SNF y Gal4-DBD más SWI/SNF.

## **3.4 Determinación del efecto que la presencia de secuencias con tendencia a adoptar la conformación ADN-Z tiene sobre la acción remodeladora del complejo SWI/SNF.**

### 3.4.1 Unión de Gal4-VP16 y reclutamiento de SWI/SNF a monucleosomas con secuencias con tendencia a estructurarse como ADN-Z.

Al igual que en el caso de las distancias, en el caso de la presencia de repeticiones CG nos preocupaba que la observación de un eventual nivel de *eviction* aumentado por estas secuencias no estuviese dado por un mayor grado de unión de Gal4-VP16 a los probadores que contienen las repeticiones y/o un mayor nivel de reclutamiento de SWI/SNF a estos probadores. Por esta razón luego de reconstituídos los probadores nucleosomales, se procedió a revisar el nivel de unión de Gal4-VP16 y el grado de reclutamiento del complejo remodelador. En la Fig.19 se observa que la unión de Gal4-VP16 es igual para todos los arreglos nucleosomales y que la presencia de secuencias con tendencia a estructurarse como ADN-Z no afectan la unión de Gal4-VP16.

La Fig.20 muestra el análisis de reclutamiento de SWI/SNF. El resultado muestra que, como se esperaba, SWI/SNF es capaz de posicionarse en el nucleosoma sólo en presencia de Gal4-VP16. También se observa que en los mononucleosomas con secuencias de repetición CG el reclutamiento de SWI/SNF es menor que sus controles, aunque de todas formas detectable.

### 3.4.2 Efecto de las secuencias con tendencia a estructurarse como ADN-Z entre un nucleosoma y el sitio de unión de Gal4 sobre la remodelación de cromatina ATP-dependiente:

Una vez establecidos los patrones de unión de Gal4-VP16 y reclutamiento de SWI/SNF a los probadores nucleosomales con secuencias CG, se procedió a realizar ensayos de remodelación

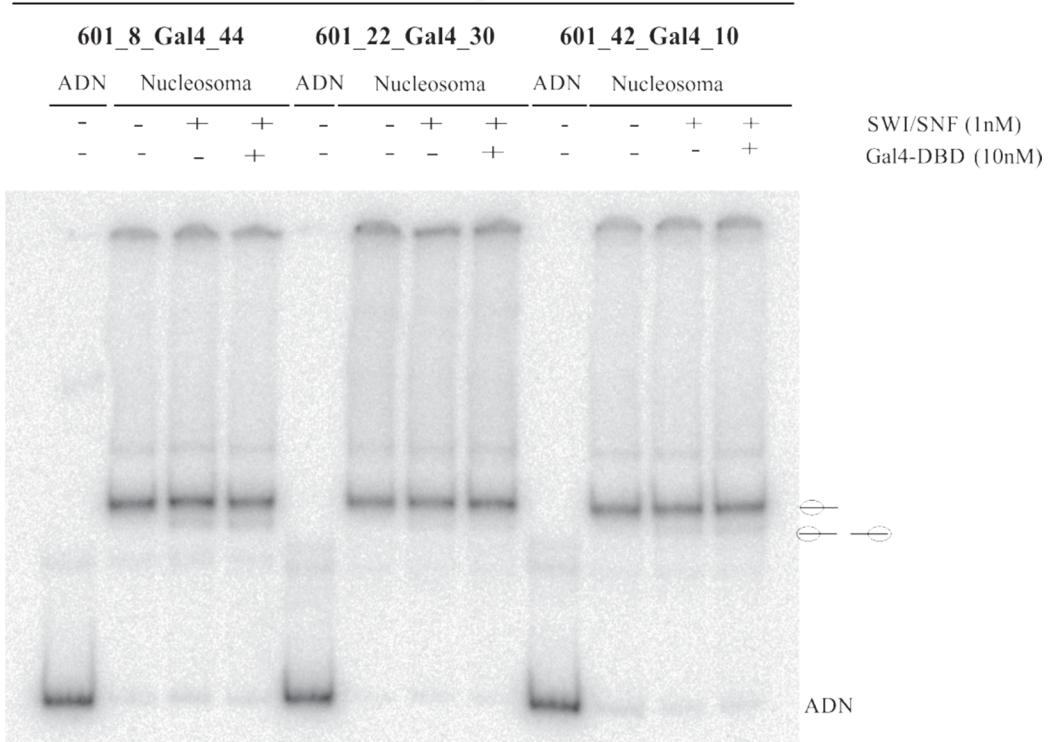
para analizar si la presencia de estas secuencias poseen una influencia sobre el resultado de la acción catalítica de SWI/SNF, respecto de controles con secuencias de ADN al azar entre el nucleosoma y el sitio Gal4.

En la Fig.21A se comprueba que SWI/SNF tiene actividad catalítica de *sliding* por sí solo. No se ve diferencia de *sliding* entre los distintos mononucleosomas. Luego se realizaron ensayos de remodelación solo en presencia de Gal4-VP16, SWI/SNF y ambos para el mononucleosoma 601\_22z\_Gal4 y su control 601\_22\_Gal4\_30. Se observa que sólo en presencia de ambos hay actividad catalítica de *eviction* observándose un aumento de *eviction* en el mononucleosoma que tiene la secuencia con tendencia a estructurarse como Z.

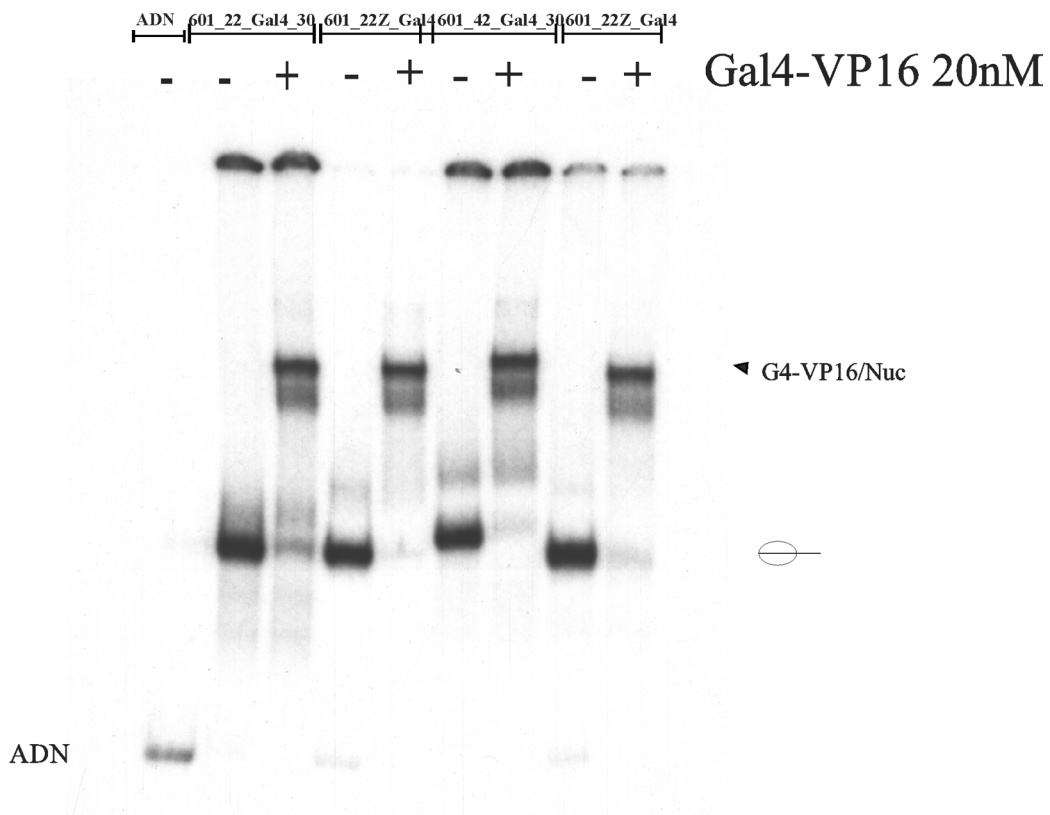
No se pudieron realizar los ensayos *eviction* para el mononucleosoma 601\_42Z\_Gal4. Este ensayo fue realizado por triplicado dando una diferencia significativa del porcentaje de *eviction* entre 601\_22\_Gal4\_30 y 601\_22Z\_Gal4 (Fig.21B).



### Nucleosomas de 216 pb, 2 mM ATP

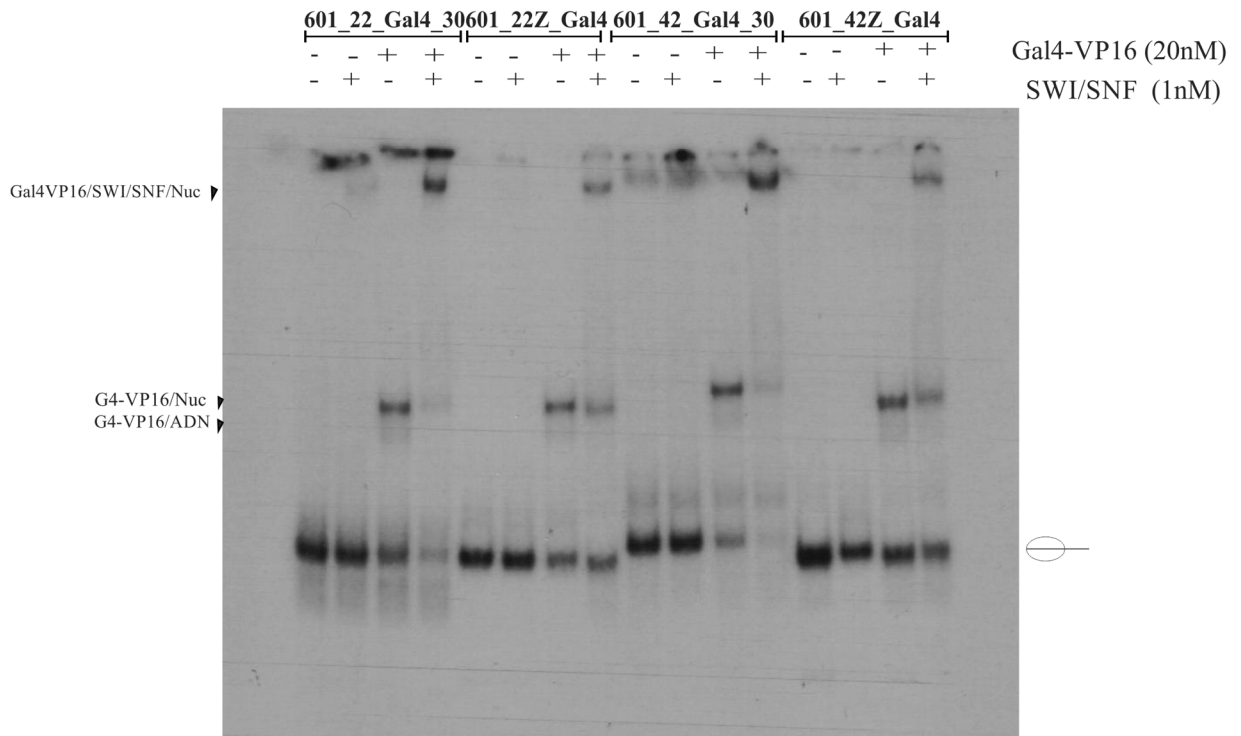


**Fig.18. Evaluación de la actividad catalítica de SWI/SNF en presencia de Gal4-DBD.** Se utilizó ADN y mononucleosoma de los fragmentos 601\_8\_Gal4\_44, 601\_22\_Gal4\_30, 601\_42\_8 en presencia (+) y ausencia (-) de Gal4-DBD y SWI/SNF; ADN: Migración del ADN. Este ensayo fue realizado a baja estrictez y analizado en electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% (40:1). ⊖: Migración nucleosoma no remodelado. ⊖: Migración nucleosoma remodelado.

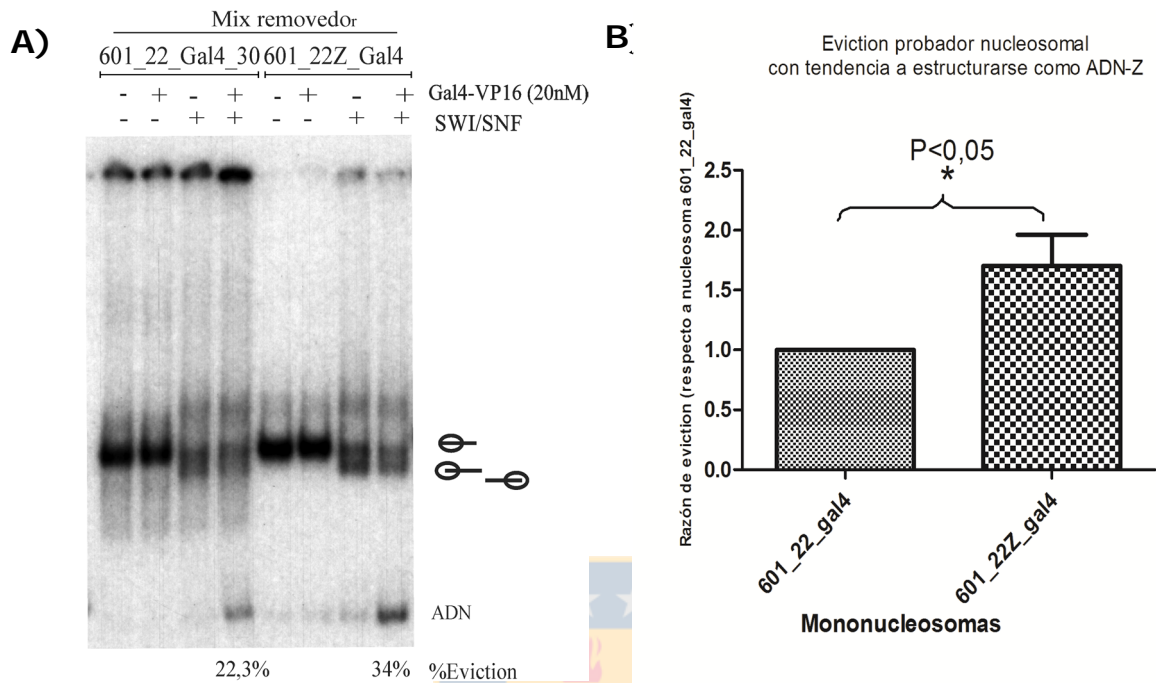


**Fig.19. Análisis de unión de Gal4-VP16 a probadores nucleosomales con contenido de repeticiones CG.** Se analizó la unión del factor de transcripción Gal4-VP16 al nucleosoma con tendencia a formar ADN-Z. El ensayo fue realizado con alta estrictez y en presencia de 2mM de ATP. ADN: Fragmento de ADN 601\_22\_Gal4\_30; Mononucleosomas control: 601\_22\_Gal4\_30 y 601\_42\_Gal4\_30. Mononucleosomas con secuencias con tendencia a estructurarse como ADN-Z: 601\_22Z\_Gal4 y 601\_42Z\_Gal4. La electroforesis se realizó en gel nativo de poliacrilamida al 5% (40:1). ○—: Migración mononucleosoma no remodelado; ADN: patrón de migración del ADN.





**Fig.20. Reclutamiento de SWI/SNF por Gal4-VP16 a mononucleosomas con tendencia a estructurarse como ADN-Z.** Se sembraron los mononucleosomas control (601\_22\_Gal4 y 601\_42\_Gal4) y los mononucleosomas con secuencias con tendencia a estructurarse como ADN-Z (601\_22Z\_Gal4 y 601\_42Z\_Gal4) en presencia o ausencia de Gal4-VP16 y SWI/SNF. Ensayo realizado a alta estrictez. Electroforésis se realizó en gel de poliacrilamida 4% (60:1). ⊖: Migración mononucleosoma.



**Fig.21. Efecto de las secuencias con tendencia a estructurarse como ADN-Z entre un nucleosoma y el sitio de unión de Gal4 en la remodelación de cromatina ATP-dependiente..**

(A) Ensayo de actividad *eviction* de SWI/SNF para mononucleosoma con secuencia con tendencia a estructurarse como ADN-Z 601\_22Z\_Gal4 y su control respectivo 601\_22\_Gal4. El ensayo fue realizado a baja estrictez en presencia de 2mM de ATP y con una incubación de removedor luego de la incubación. (B) Análisis gráfico para tres experimentos independientes con estos mononucleosomas. ADN: Patrón de migración del ADN. % Eviction: Porcentaje de eviction para cada uno de los nucleosomas.  $\ominus$ —: Migración mononucleosoma no remodelado.

$\ominus$ — $\ominus$ : Migración nucleosoma remodelado; ADN: patrón de migración del ADN.

#### 4.-DISCUSIÓN

La definición más simple de un gen es una unidad de ADN que contiene la información para especificar la síntesis de una única cadena polipeptídica o ARN funcional. Durante la síntesis de ARN se produce la polimerización de los ribonucleósidos de trifosfato (rNTP) gracias a la ARN polimerasa en sentido 5' a 3'. Al inicio de la transcripción esta enzima reconoce y se une a un sitio específico, denominado promotor. Además las ARN polimerasas requieren de factores proteicos denominados factores de transcripción generales que ayudan a localizar los promotores e iniciar la transcripción. En el sitio de inicio de la transcripción existen otros tipos de elementos control, en conjunto con los promotores se les llaman regiones de control transcripcional. (Lodish H. y col., 2004).

La estructura de la cromatina en el promotor tiene un rol clave en la regulación transcripcional, pero los mecanismos exactos de regulación todavía no son claros. Se sabe que los nucleosomas disminuyen la accesibilidad del ADN del promotor y dificultan la unión de factores de transcripción a los elementos reguladores. Consistente con esto, los promotores activos tienden a estar sin nucleosomas y la activación de un gen a menudo es asociada con salida de nucleosomas. Por lo tanto, los nucleosomas serían un obstáculo para la transcripción. De esta manera, la remodelación de cromatina es el medio para superar la represión por los nucleosomas (Kornberg R. D. y Lorch Y. 1999). Sin embargo, esto es una simplificación ya que muchos elementos regulatorios tienen nucleosomas posicionados.

El posicionamiento de los nucleosomas está regulado por numerosos mecanismos cuyas funciones exactas aún no están claras, incluyendo remodelación de cromatina dependiente de ATP, modificaciones de histonas y variantes de histonas (Tirosh I. y Barkai N. 2008).

En este trabajo de tesis se investigó el efecto que tiene la distancia entre el sitio de unión de un factor de transcripción y un nucleosoma podría influenciar la remodelación de cromatina ATP-dependiente. Este planteamiento supone que el factor de transcripción en cuestión posee interacción física con un complejo remodelador, particularmente SWI/SNF. Además, nos planteamos analizar si la secuencia del ADN entre estos dos elementos puede tener una influencia sobre la actividad remodeladora dependiente de ATP, particularmente centrado a secuencias con tendencia a adoptar la conformación Z.

En relación a la obtención de probadores mononucleosomales que contienen secuencias con tendencia a estructurarse como ADN-Z:

Se sabía que secuencias con alternancia de bases púricas y pirimidínicas adoptan esta conformación (Rich A. y Zhang S. 2003) por lo que se fabricaron oligos con estas características (Tabla I).

Luego se amplificaron mediante PCR los fragmentos de ADN con tendencia a adoptar la conformación Z a partir de los clones obtenidos. Se observó que el fragmento de ADN-Z 601\_22Z\_Gal4 migraba a un tamaño menor del que debía en un gel de agarosa al 1%. Asumimos que esto se debía a la mayor tendencia a estructurarse como ADN-Z, ya que se sabe que la repetición CG tiene mayor tendencia a estructurarse de esta manera (Herbert A. y Rich A. 1999).

También se sabe que la secuencia CG repetida 12 veces ya forma ADN-Z (Mullholand N. y col., 2012), entonces la secuencia CG repetida 16 veces (601\_42Z\_Gal4) podría tener mayor tendencia a adoptar esta conformación que la repetición de 6 veces CG (601\_22Z\_Gal4).

A través de electroforesis en gel de poliacrilamida se confirmó que los productos de PCR adoptaban distintas conformaciones, donde el producto que presentaba mayor cantidad de bandas era el 601\_42Z\_Gal4, lo que sugiere que posee mayor tendencia a adoptar conformaciones alternativas que la secuencia con menor número de repeticiones. Aunque en nuestro trabajo no llegamos a analizar si se adoptaba la conformación Z en nuestros probadores, el hecho de observar conformaciones alternativas y los estudios realizados por otros laboratorios nos sugieren que la presencia de las repeticiones CG en nuestros probadores generan este efecto.

También se probó el efecto salino sobre las secuencias con tendencia a estructurarse como ADN-Z. Se sabe que a medida que aumenta la concentración salina más se estabiliza esta conformación (Sinden R. 1994; Kim J. y col., 1996). Sin embargo no observamos un efecto mayor de la concentración de sales dentro del rango de concentraciones de nuestros ensayos.

Con respecto a la determinación en probadores mononucleosomales el efecto de la extensión del ADN entre el sitio de unión de Gal4 y el nucleosoma sobre la acción remodeladora del complejo SWI/SNF:

Al estudiar el ensayo de reclutamiento del complejo SWI/SNF por Gal4-VP16 a los probadores de distancias variables entre el nucleosoma y el sitio Gal4 se observó la misma fuerza de unión de Gal4-VP16 al mononucleosoma. Por su parte, el reclutamiento de SWI/SNF mostró un aumento a medida que aumenta la distancia entre el nucleosoma y el sitio de unión de Gal4-VP16. En los ensayos de remodelación se observó un aumento del porcentaje de *eviction* a medida que la distancia disminuye, efecto que no ha sido descrito previamente y que podría tratarse de un nuevo factor con influencia en la actividad de las regiones regulatorias de la expresión de genes.

Otro hecho que reafirma que la distancia sí afecta la transcripción es que en los ensayos de reclutamiento y de remodelación se observó que, a pesar de haber un menor reclutamiento de SWI/SNF en 601\_8\_Gal4\_30 hay un mayor porcentaje de *eviction*. Lo contrario sucede para 601\_42\_Gal4\_30. Por lo tanto podemos inferir que no por haber mayor SWI/SNF reclutado va a haber mayor porcentaje de *eviction*, que sería la correlación más lógica sino se considera este factor que hemos estudiado en el presente trabajo de tesis. Por otro lado observamos que Gal4DBD remodela de la misma manera todos los probadores sin importar la distancia, indicando que la interacción del factor de transcripción con SWI/SNF participa en el efecto diferencial observado.

Al analizar los gráficos de la cuantificación de *eviction* para probadores del mismo y distinto tamaño, se observó que entre los probadores que tienen una distancia de 8 y 22pb entre el nucleosoma y el sitio de unión de Gal4 no hay una diferencia significativa lo que puede dar indicios de un límite de distancia en la que no se ve efecto en la remodelación, en cambio, ya con una distancia de 42 pb entre el nucleosoma y el sitio de unión de Gal4 ya se ve un efecto.

El efecto de la distancia entre un sitio para un factor de transcripción y un nucleosoma puede convertirse en uno de los factores que influyen en la transcripción, y explicaría por qué la inserción o delección de unas pares de bases en regiones promotoras de genes puede influir en la transcripción más allá de otras alternaciones más evidentes que de hecho pueden ocurrir. Por

ejemplo, una inserción o deleción puede generar o hacer desaparecer un sitio de unión de un factor de transcripción. Pueden también existir casos en que una deleción o inserción afecte la interacción de dos factores o más con el promotor. Efectos más evidentes como los recién mencionados han sido descritas (Mills R.E. y col., 2006), pero existen casos en que inserciones o deleciones que afectan la expresión de un gen no tienen explicación en base a estos mecanismos más básicos.

Finalmente nosotros proponemos un modelo a partir de los resultados obtenidos de cómo estaría afectando la distancia la remodelación de cromatina ATP-dependiente (Fig.22), donde proponemos que este efecto se debe a una baja eficiencia catalítica del complejo SWI/SNF a medida que la distancia aumenta.

Con respecto a la determinación en probadores mononucleosomales el efecto que la presencia de secuencias con tendencia a adoptar la conformación ADN-Z tiene sobre la acción remodeladora del complejo SWI/SNF:

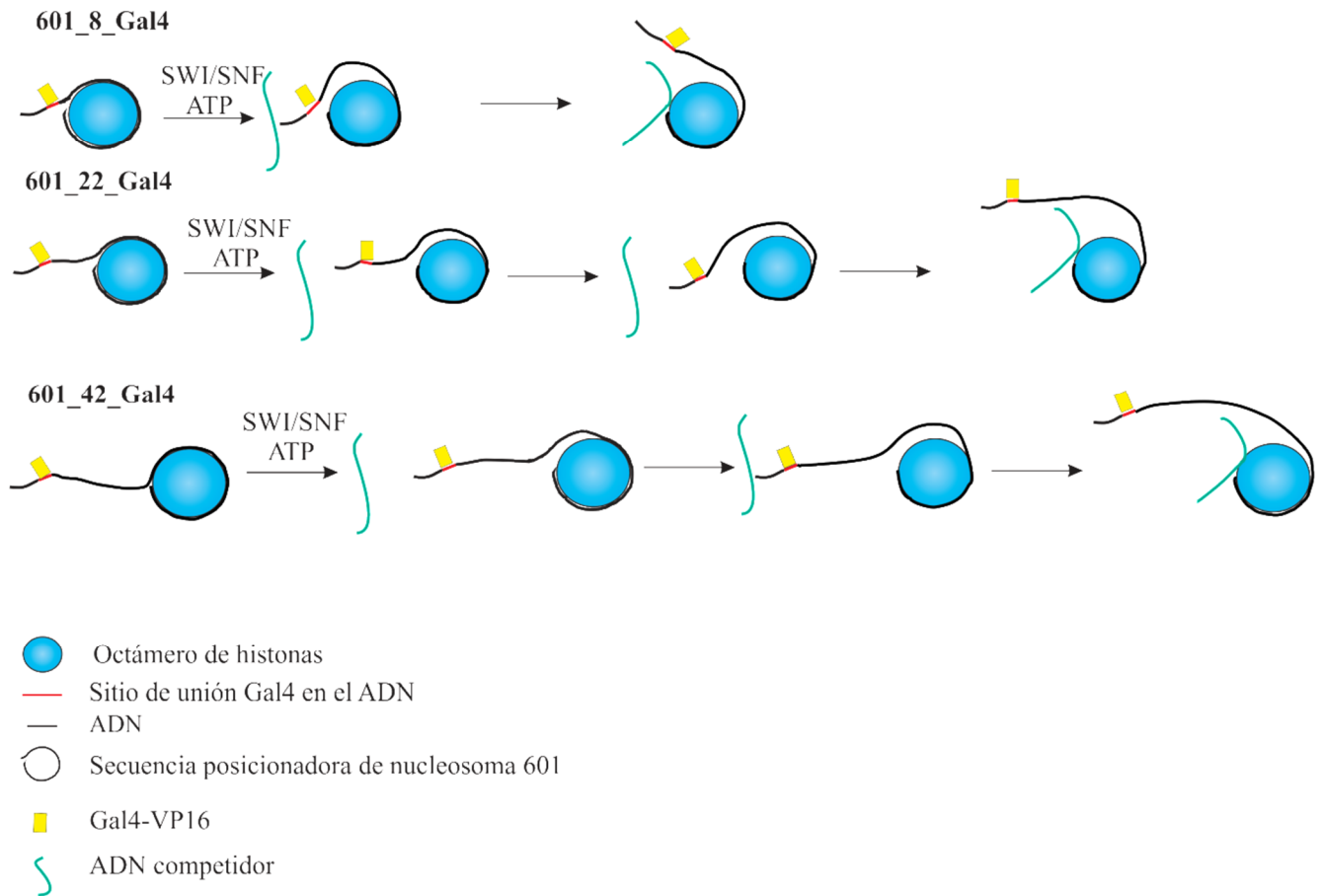
El ADN-Z es una conformación de alta energía del ADN que puede formarse *in vivo* durante la transcripción por la torsión de la hebra de ADN generado por el movimiento de una polimerasa (Herbert A. y Rich A., 1999).

Hoy en día las investigaciones sobre el ADN-Z están enfocadas en cómo se regula. Es por esto que nosotros quisimos saber si posee influencia sobre la remodelación de cromatina dependiente ATP, ya que se ha propuesto que facilita la transcripción (Liu R. y col., 2001).

Wong B. y col., 2007 han descrito en levaduras que en regiones conteniendo secuencias que pueden adoptar la conformación Z no se formarían nucleosomas, quedando este ADN en regiones *linker*. Así se demarcaría la posición de los nucleosomas corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, produciendo una locación transcripcionalmente favorable para la caja TATA cerca de la entrada del ADN y en la posición del *dyad* en el nucleosoma. Así el ADN-Z sería parte del código genómico para el posicionamiento *in vivo*.

Durante el año recién pasado Mullholand N. y col., 2012, realizaron ensayos de remodelación de cromatina con hSWI/SNF donde reconstituyen mononucleosomas que contienen una sección del ADN nucleosomal con repeticiones CG. Ellos proponen que la estructura del ADN-Z en el nucleosoma es menos estable por lo que podría pasar a ser ADN-B rápidamente o

Mecanismo propuesto para efecto de la distancia entre el nucleosoma y el sitio de unión para Gal4



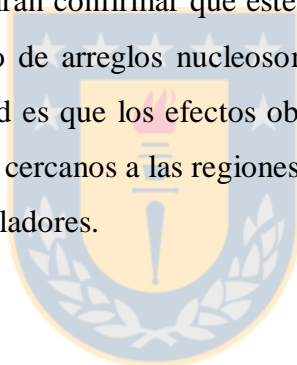
**Fig.22. Modelo propuesto para efecto de la distancia entre el nucleosoma y el sitio de unión de Gal4 en la remodelación ATP dependiente catalizada por SWI/SNF.** A medida que aumenta la distancia el desensamble del nucleosoma es menor. Esto podría deberse a una menor eficiencia catalítica del complejo remodelador SWI/SNF, ya que a medida que aumenta la distancia entre el nucleosoma y el sitio de unión de Gal4, se dificulta su unión al nucleosoma para remodelarlo.

quedar como ADN-Z sin nucleosoma por un mecanismo de desplazamiento nucleosomal (*sliding*) o pérdida de histonas.

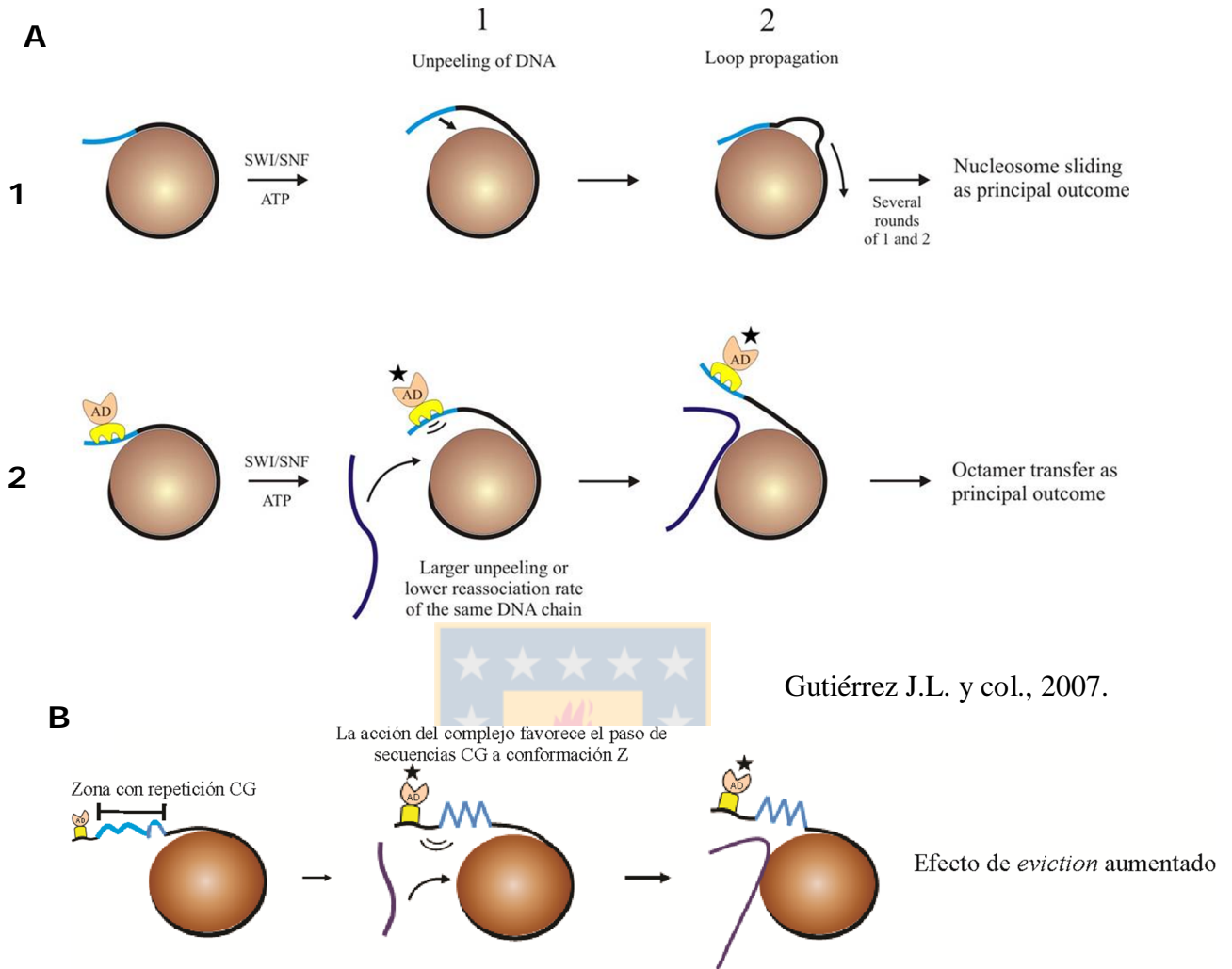
A diferencia de lo que postula Mullholand N. y col. (2012), con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio se comprueba la hipótesis de que las secuencias con tendencia a estructurarse como ADN-Z favorecen la remodelación de cromatina ATP-dependiente esencialmente mediante el gatillamiento de *eviction*. El modelo que representa estos resultados se presenta en la Fig.23B.

Las repeticiones TG así como las CG también tienen tendencia a estructurarse como ADN-Z, por lo tanto, a futuro se realizarán los ensayos de remodelación ATP-dependientes con la repetición TG y comparar si es que hay diferencias con la repetición CG. Además se deberá comprobar si realmente estas secuencias se conforman como Z con la enzima de restricción Zaa-Fok, capaz de reconocer esta conformación (Kim Y. G. y col., 1997).

Otros estudios que permitirán confirmar que este fenómeno es efecto, serán aquellos que se puedan realizar en el contexto de arreglos nucleosomales. Esto debido a que en el caso de mononucleosomas una posibilidad es que los efectos observados estén siendo influenciados por los extremos de ADN, demasiado cercanos a las regiones en donde están actuando los factores de transcripción y complejos remodeladores.





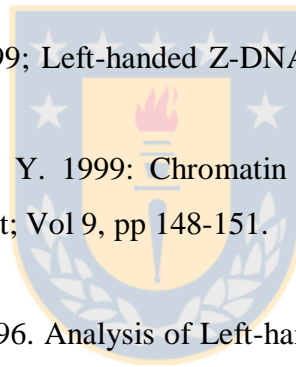


**Fig.23. Mecanismos de remodelación de cromatina y modelo propuesto para el efecto de secuencias con tendencia a estructurarse como ADN-Z presentes entre un nucleosoma y el sitio de unión para un factor de transcripción.** (A) Se representan los mecanismos de remodelación ATP-dependientes ya descritos, resaltando el mayor grado de *eviction* ocurrido en presencia de un factor de transcripción cuyo dominio de activación (AD) recluta a SWI/SNF (representado por una estrella). (B) Se representa como las secuencias con tendencia a estructurarse como ADN-Z facilitarían la salida del octámero de histonas por la conformación que adquieren aportando mayor rigidez al ADN.

## REFERENCIAS.

- Arnott S. 1980; Polymorphism of nucleic acid duplexes as revealed by X-ray diffraction analysis of oriented fibers. *Biophys J*; Vol 32, pp 249-250.
- Birnboim, H. C., y Doly, J. 1979: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA: *Nucleic acids research*; Vol 6, pp 1513- 1523.
- Boyer L.A., Langer M.R. y col. 2002; Essential Role for the SANT Domain in the Functioning of Multiple Chromatin Remodeling Enzymes residue that plays a key role in helix packing. *Molecular Cell*; Vol 10, pp 935–942.
- Clapier C. R., Nightingale K .P. y col. 2002. A critical role epitope for substrate recognition by the nucleosome remodeling ATPase ISWI. *Nucleic Acids Research*; Vol 30, pp 649- 655.
- Clapier C. R.y Bradley R. C. 2009; *The Biology of Chromatin Remodeling Complexes. Annual Review*; Vol 78, pp 273–304.
- Cheung V.G. y Spielmanvol R.S. 2009; Genetics of human gene expression: mapping DNA variants that influence gene expression. *Nature Reviews Genetics*; Vol 10, pp 595-604.
- Champ P. C., Maurice S., y col. 2004; Distributions of Z-DNA and nuclear factor I in human chromosome 22: a model for coupled transcriptional regulation. *Nucleic Acids Research*; Vol 32, pp 6501–651.
- Ghosh A. y Bansal M. 1999; Three-centre C-H-O hydrogen bonds in the DNA minor groove: analysis of oligonucleotide crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*; Vol 55, pp 2005-2012.

- Fan H.Y., Narlikar G.J. 2004; Non-covalent Modification of Chromatin: Different Remodeled Products with Different ATPase Domains. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 2004; Vol 7, pp 183-192.
- Gutiérrez, J. L., Chandy, M. y col. 2007; Activation domains drive nucleosome eviction by SWI/SNF; The EMBO journal; Vol 26, pp 730-40.
- Ha S.C., Lowenhaupt K. y col. 2005; Crystal structure of a junction between B-DNA and Z-DNA reveals two extruded bases; Nature; Vol 437, pp1183-1186.
- Herbert A. G. y Rich A. 1993; A method to identify and characterize Z-DNA binding proteins using a linear oligodeoxynucleotide; Nucleic Acids Research; Vol 21, pp 2669-2672.
- Herbert A. y Rich A. 1999; Left-handed Z-DNA: structure and function. Genetica; Vol 106, pp 37-47.
- Kornberg R. D. y Lorch Y. 1999; Chromatin modifying and remodeling complexes; Genetics and Development; Vol 9, pp 148-151.
- Kim J., Yang C. y col. 1996. Analysis of Left-handed Z-DNA Formation in short d(CG)<sub>n</sub> Sequences in *Escherichia coli* and *Halobacterium halobium* Plasmids; Vol 271, pp 9340-9346.
- Kim Y. G., Kim P. S. y col. 1997; Construction of a Z DNA specific restriction endonuclease; Biochemistry; Vol 94, pp 12875–12879.
- Lee C.K., Shibata Y. y col. 2004; Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide; Nature Genetics; Vol 36, pp 900-905.
- Liu L. y Wang J. 1987; Supercoiling of the DNA template during transcription; Proc. Nati. Acad. Sci. USA; Vol 84, pp 7024-7027.



- Liu R, Liu H. y col. 2001; Regulation of CSF1 Promoter by the SWI/SNF-like BAF Complex; Cell ; Vol 106, pp 309–318.
- Liu X., Campbell M. R. y col. 2005. Expression-Based Discovery of Variation in the Human Glutathione S-Transferase M3 Promoter and Functional Analysis in a Glioma Cell Line Using Allele-Specific Chromatin Immunoprecipitation. Bell Cancer Research: Vol 65, pp 99-104.
- Lodish H., Berk A. y col. 2008; Biología Celular y Molecular. 5ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Cap 4.
- Lowary P. T. y Widom J. 1998; New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning; Journal of Molecular Biology: Vol 276, pp 19-42.
- Mills R. E., Luttig, C. T. y col. 2006; An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome; Genome Research; Vol 16, pp 1182-1190.
- Mullaney J. M., Mills R. E. y col. 2010; Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes; Human Molecular Genetics; Vol 19, pp 131-136.
- Mulholland N., Xu Y., y col. 2012; SWI/SNF mediated chromatin remodeling induces Z-DNA formation on a nucleosome: Cell and Bioscience; Vol 2, pp 2-7.
- Utley R.T., Owen-Hughes T.A. y col. 1996; *In vitro* analysis of transcription factor binding to nucleosomes and nucleosome disruption/displacement; Methods Enzymol; Vol 274, pp 276–291.
- Rich A. y Zhang S. 2003; Z-DNA: the long road to biological function; Nature Review; Vol 4, pp 566-572.
- Sahan S. A. y Hawkins R. D. 2012; Methods for Identifying Higher-Order Chromatin Structure; Annual Review; Vol 13, pp 59-82.

- Sinden R. 1994; DNA structure and function. 1<sup>o</sup> edición, editorial Elsevier, San Diego, California, Estados Unidos. Cap 5.
- Sambrook y Russel, 2001; Molecular Cloning; 3<sup>a</sup> edición, imprenta Cold Spring Harbor, Nueva York, Estados Unidos.
- Schroth G., Chous P., y col. 1991; Mapping Z-DNA in the Human Genome: computer-aided mapping reveals a nonrandom distribution; The Journal of Biological Chemistry; Vol 267, pp 11846-11855.
- Tirosh I. y Barkai N. 2008; Two strategies for gene regulation by promoter nucleosomes. Genome Research; Vol 18, pp 1084-1091.
- Yuang G.C., Liu Y.J. y col. 2005; Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*; Vol 309, pp 626-630.
- Wong B., Chen S. y col. 2007; Characterization of Z-DNA as a nucleosome-boundary element in yeast *Saccharomyces cerevisiae*; Vol 104, pp 2229- 2234.

