



**Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas Área Biología Celular y
Molecular**

**ROL DE LA UBICACIÓN TRASLACIONAL DE ELEMENTOS
REGULATORIOS DE LA TRANSCRIPCIÓN SOBRE LA
ACCIÓN DE COMPLEJOS REMODELADORES DE
CROMATINA DEPENDIENTES DE ATP**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad
de Concepción para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

POR: CRISTIÁN ALFREDO GIDI FAÚNDEZ
Profesor Guía: José Leonardo Gutiérrez Contreras
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Marzo 2024
Concepción – Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o
procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento

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

Profesor tutor:

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

Comisión Evaluadora:

Dr. Sylvain Marcellini L.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. Amparo Uribe
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. Alejandra Loyola
Fundación Ciencia y Vida

Director de Programa:

Dr. Ariel Castro Alma
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS.....	III
GLOSARIO.....	IV
1. MARCO TEÓRICO	1
Estructura y Dinámica de Cromatina	1
Estructura y función de complejos remodeladores de cromatina ATP-dependientes	6
Tipos de remodelación de cromatina y sus consecuencias.....	15
Estructura cromatínica de promotores y regiones libres de nucleosomas (NDRs)	18
Dinámica de Cromatina y Regulación Transcripcional.....	21
2. Hipótesis y objetivos:	27
Hipótesis:.....	27
Objetivo general:	27
Objetivos específicos:	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1) Diseño y producción de plásmidos con sitios de unión para factores de transcripción en diferentes posiciones respecto de secuencia 601	28
3.2) Generación de sondas mononucleosomales:	31
3.2.1) Marcaje radioactivo de los partidores 5':	32
3.2.2) PCR de generación de fragmentos de ADN marcados:	32
3.2.3) Reconstitución de sondas a mononucleosomas:	35
3.3) Producción de proteínas recombinantes capaces de reclutar complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP:	37
3.3.1) Generación de vectores codificantes para factores de transcripción recombinantes	37
3.3.2) Expresión y purificación de factores de transcripción recombinantes	39
3.3.3) Análisis de la purificación de factores de transcripción recombinantes	41
3.4) Purificación y análisis preliminares de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	42
3.4.1) Purificación de complejos remodeladores.	42
3.4.2) Análisis de la purificación de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.....	47
3.5) Ensayos de unión de factores de transcripción, reclutamiento de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP y remodelación de cromatina sobre sondas mononucleosomales	48
3.5.1) Ensayos de unión de factores de transcripción a las sondas mononucleosomales.	49
3.5.2) Ensayos de reclutamiento (<i>targeting</i>) de complejos remodeladores de cromatina por factores de transcripción a las sondas nucleosomales.....	50
3.5.3) Ensayos de remodelación de cromatina por complejos remodeladores de cromatina sobre las sondas mononucleosomales	51
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53

4.1) Efecto de variaciones en la extensión de ADN entre core nucleosomal y sitio de unión de un factor de transcripción sobre la actividad de complejos de la subfamilia SWI/SNF (Objetivo Específico 1).	53
4.1.1) Diseño de sondas y producción de plásmidos para los diseños.	53
4.1.2) Marcaje y reconstitución de las sondas a la forma de mononucleosomas.....	59
4.1.3) Producción de proteínas recombinantes con la propiedad de reclutar complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.	62
4.1.4) Purificación de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP nativos desde <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64
4.1.5) Ensayos de unión de factores de transcripción a sondas nucleosomales.....	70
4.1.6) Ensayos de reclutamiento de complejos remodeladores de cromatina por factores de transcripción a sondas nucleosomales.....	79
4.1.7) Análisis de la acción conjunta de factores de transcripción y complejos remodeladores de cromatina sobre sondas nucleosomales.	80
4.2) Efecto de la presencia y posición relativa del sitio de unión de un factor de transcripción, respecto de la ubicación de un core nucleosomal, sobre la actividad del complejo ISW1a (Objetivo Específico 2).	92
4.2.1) Diseño de sondas, plásmidos, marcaje y reconstitución.....	93
4.2.2) Factor recombinante Rap1 y complejo ISW1a.	94
4.2.3) Ensayos de unión de Rap1 a sondas nucleosomales.....	95
4.2.4) Análisis del efecto de Rap1 sobre la actividad de ISW1a.	98
5. CONCLUSIONES	104
6. REFERENCIAS:	107

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1:	2
FIGURA 2:	3
FIGURA 3:	5
FIGURA 4:	7
FIGURA 5:	9
FIGURA 6:	12
FIGURA 7:	14
FIGURA 8:	17
FIGURA 9:	18
FIGURA 10:	21
FIGURA 11:	29
FIGURA 12:	34
FIGURA 13:	36
FIGURA 14:	55
FIGURA 15:	57
FIGURA 16:	58
FIGURA 17:	61
FIGURA 18:	63
FIGURA 19:	66
FIGURA 20:	67
FIGURA 21:	69
FIGURA 22:	71
FIGURA 23:	73
FIGURA 24:	75
FIGURA 25:	78
FIGURA 26:	79
FIGURA 27:	83
FIGURA 28:	85
FIGURA 29:	87
FIGURA 30:	90
FIGURA 31:	94
FIGURA 32:	96
FIGURA 33:	99
FIGURA 34:	101
FIGURA 35:	103

GLOSARIO

[γ -³²P]-ATP: ATP marcado con fósforo 32

μ Ci: Microcurie

μ g: Microgramo

μ L: Microlitro

μ M: Micromolar

6xHis: *Tag* de 6 Histidinas

Abf1: *ARS-Binding Factor 1*

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ATP: Adenosina trifosfato

BSA: Albúmina de Suero Bovino

CaCl₂: Cloruro de calcio

Cbf1: *Centromere Binding Factor 1*

DBD: DNA-Binding Domain

DIM: *DNA-Interaction Module*

dNTP: Desoxirribonucleótidos trifosfato

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGTA: Ácido egtázico

fmol: Femtomol

FT o TF: Factor de transcripción

g: Gramos

Gal4: *GALactose metabolism 4*

GRF: *General Regulatory Factor*

HCl: Ácido clorhídrico

HeLa: Células derivadas de carcinoma cervical humano

HEPES: Ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfónico

IgG: Inmunoglobulina G

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

ISW1a: Imitation SWitch protein 1a

ISWI: *Imitation SWitch*

KCl: Cloruro de potasio

KDa: Kilodaltons

KH₂PO₄: Fosfato de potasio monobásico

L: Litros

LB: Medio Luria Bertani

LON: Oligonucleosomas largos

M: Molar

mg: Miligramos

MgCl₂: Cloruro de magnesio

min: Minutos

mL: Mililitro

mM: Milimolar

MW: Peso molecular

Na₂HPO₄: Fosfato disódico

NaCl: Cloruro de sodio

NaH₂PO₄: Bifosfato de sodio

NaOH: Hidróxido de sodio

ng: Nanogramo

nm: Nanometro

NP-40: Nonidet P-40

O.D.₆₀₀: Densidad óptica medida a 600nm

°C: Grado Celsius

pb o bp: Par de bases

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en Cadena de Polimerasa

pmol: Picomol

PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoruro

PSA: Persulfato de Amonio

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

Rap1: *Repressor/Activator site binding Protein 1*

Reb1: *RNA polymerase I Enhancer Binding protein 1*

rpm: Revoluciones por minuto

RSC: *Remodels the Structure of Chromatin*

SDS: Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SON: Oligonucleosomas cortos

ssDNA: ADN de esperma de salmón

SWI/SNF: *Switching Defective/Sucrose Nonfermenting*

TBE: Tampón Tris, borato, EDTA

TE: Tris-Cl 10mM, EDTA 1mM

TEMED: Tetrametiletildiamina

TPCK: N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona

Tris-HCl: Tris-(hidroximetil)-aminometano llevado a pH con HCl

U: Unidades enzimáticas

V: Volts

Vol: Volúmenes

VP16: *Transcriptional activation domain from the herpes simplex Virus Protein*

xg: *Times gravity*

YPD: *Yeast extract Peptone Dextrose*

RESUMEN

La dinámica de la cromatina juega un rol fundamental en la regulación de genes eucariontes. Entre los principales actores que participan en esta dinámica, se encuentran los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP. Se han descrito varios elementos que influyen la actividad de estos complejos, como factores de transcripción y determinadas secuencias de ADN con propiedades posicionadoras o excluyentes de nucleosomas. En este estudio proponemos que un factor de importancia en la dinámica de cromatina es el ordenamiento de elementos regulatorios en la cromatina, específicamente la ubicación de sitios de unión para factores de transcripción respecto de *cores* nucleosomales.

Para estudiar este aspecto utilizamos un sistema experimental *in vitro* consistente en la medición de la actividad de complejos remodeladores de cromatina de *S. cerevisiae* (γ SWI/SNF y ISW1a) sobre sondas mononucleosomales, en presencia o ausencia de factores de transcripción, cuyos sitios de unión están presentes bajo diferentes ordenamientos en las sondas mononucleosomales.

En estos análisis encontramos que la extensión de ADN entre un *core* nucleosomal y un sitio de unión para un factor de transcripción que reclute a un complejo remodelador de cromatina afecta la actividad catalítica del complejo. Para el caso específico de γ SWI/SNF, extensiones de ADN superiores a 40 pb entre un nucleosoma posicionado y el sitio de unión del factor de transcripción capaz de reclutar al complejo implican una caída significativa en la actividad del mismo. Por otro lado, en el caso del complejo ISW1a se encontró que un factor de transcripción puede impedir la actividad del complejo si su unión se da en el ADN *linker* hacia el cual el complejo esté movilizándolo al octámero de histonas.

Nuestros resultados apuntan a la ubicación precisa de sitios para factores de transcripción, relativo a los *cores* nucleosomales vecinos, como un elemento determinante para la acción de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP. Así, este ordenamiento y factores dependientes del microambiente celular, como la presencia y abundancia relativa de factores de transcripción y complejos remodeladores de cromatina, se presentan como agentes fundamentales en la dinámica de los paisajes nucleosomales vinculados a la regulación de la expresión de genes en organismos eucariontes.

ABSTRACT

Chromatin dynamics play an essential role in the regulation of eukaryotic genes. Among the main actors involved in this dynamics are the ATP-dependent chromatin remodeling complexes. Several elements influencing the activity of these complexes have been described, such as transcription factors and specific DNA sequences with nucleosome positioning or exclusion properties. In this study, we propose that an important factor in chromatin dynamics is the arrangement of regulatory elements in chromatin, specifically the positioning of transcription factor binding sites relative to nucleosomal cores.

To investigate this aspect, we employed an *in vitro* experimental system consisting of measuring the activity of chromatin remodeling complexes from *S. cerevisiae* (γ SWI/SNF and ISW1a) on mononucleosomal probes, in the presence or absence of transcription factors, whose binding sites are present in different arrangements on the mononucleosomal probes.

In these analyses, we found that the length of DNA between a nucleosomal core and a binding site for a transcription factor able to recruit a chromatin remodeling complex affects the catalytic activity of the complex. For the specific case of γ SWI/SNF, DNA extensions greater than 40 bp from a positioned nucleosome core results in a significant decrease in the remodeling activity of the complex. On the other hand, for the ISW1a complex, it was found that a transcription factor can hinder the activity of the complex if its binding occurs in the linker DNA towards which the complex is mobilizing the histone octamer.

Our results point to the precise positioning of transcription factor sites relative to neighboring nucleosomal cores as a determinant element for the action of ATP-dependent chromatin remodeling complexes. Thus, this arrangement and factors dependent on the cellular microenvironment, such as the presence and relative abundance of transcription factors and chromatin remodeling complexes, emerge as fundamental agents in the dynamics of nucleosomal landscapes linked to gene expression regulation in eukaryotic organisms.

1. MARCO TEÓRICO

Estructura y Dinámica de Cromatina

Los genomas eucariontes se encuentran altamente condensados en el núcleo celular en la forma de cromatina, una asociación nucleoproteica entre ADN y varias proteínas de unión a ADN. Su unidad básica es el nucleosoma, una estructura que se compone de aproximadamente 200 pares de bases de ADN y un octámero de proteínas básicas llamadas histonas (Kornberg 1974, Oudet y cols 1975, Hewish y Burgoyne 1973). Cada nucleosoma contiene un centro nucleosomal (*core*) consistente en 147pb de ADN enrollados alrededor de un octámero de histonas (Luger y cols 1997, Richmond y Davey 2003) los que están unidos entre sí por tramos de ADN conector (internucleosomal o linker) y son compactados aún más al interaccionar con la histona H1 (Thoma y Koller 1977), formando así la estructura conocida como fibra de 30nm (Németh y Längst 2004). Así, esta disposición permite la formación de niveles de compactación de orden superior hasta llegar al nivel más alto, el cromosoma metafásico (Figura 1).

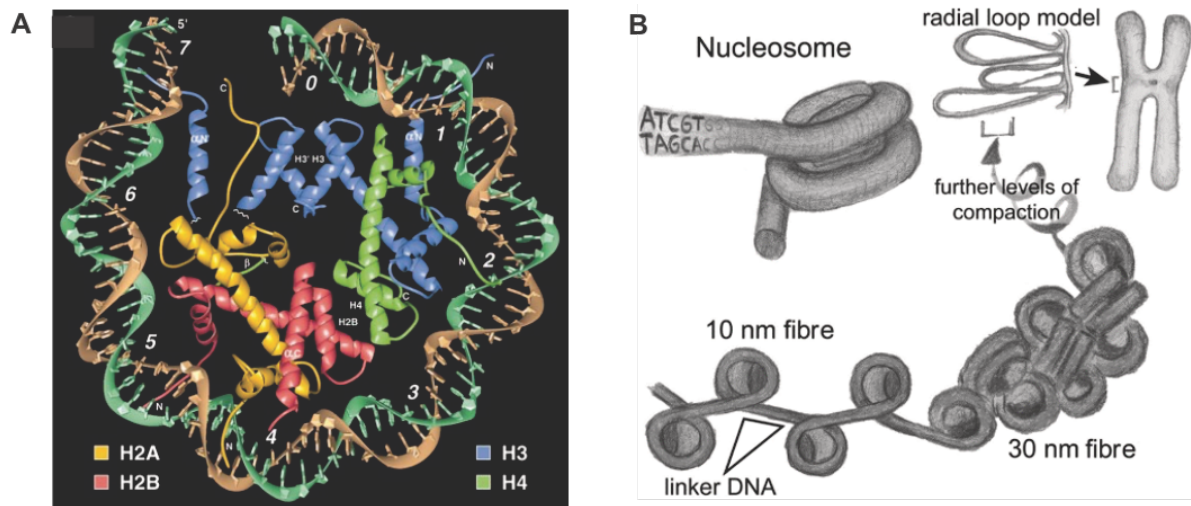


Figura 1: Estructura de la partícula core nucleosomal y esquema de niveles superiores de compactación de la cromatina (Adaptado de Luger y cols 1997 y Németh y Längst 2004). **A:** Estructura de la partícula core nucleosomal. **B:** Esquema general de niveles de compactación superiores de la cromatina.

Típicamente, entre un 65 a 90% de un genoma existe en forma de ADN de centros nucleosomales (ADN nucleosomal) en cualquier momento dado (Segal y Widom 2009, Lee et al 2007, Kaplan et al 2009), separados entre sí por entre 20 y 50pb de ADN conector. Esta amplia cobertura nucleosomal de los genomas eucariontes hace necesarios eventos de remodelación de la cromatina que permitan desplazar o remover los nucleosomas de determinadas regiones del genoma con el objeto de facilitar la unión de proteínas a sus regiones diana en el ADN para gatillar eventos como la replicación del ADN, su reparación y la transcripción.

Con el paso del tiempo y los avances tecnológicos recientes en biología celular y molecular hemos pasado de una visión de la cromatina y los nucleosomas como estructuras estáticas de empaquetamiento nuclear a reconocer a la cromatina y su organización como un componente clave y altamente dinámico en la regulación de la expresión de genes.

Previamente ha sido demostrado que, a pesar de que las interacciones entre las histonas y el ADN son de naturaleza inespecífica, hay preferencias de secuencia para la formación de nucleosomas, sólo que estas no están determinadas por interacciones con las bases nitrogenadas sino por propiedades físicas intrínsecas de la hebra de ADN (Lowary y Widom 1998). De esta forma se derivaron una serie de reglas para el posicionamiento de nucleosomas intrínseco a las propiedades de ciertas secuencias de ADN, encontrando que una periodicidad de secuencias AA, TT o AT cada 10pb y la misma de dinucleótidos de GC, pero espaciada 5pb respecto de la primera, facilitan significativamente la conformación de nucleosomas (Figura 2; Segal y cols 2006) y que trectos de poli(dA:dT) desfavorecen la conformación de nucleosomas (Iyer y Struhl 1995). También se ha observado que secuencias ricas en GC poseen propiedades de exclusión comparables en algunos organismos (Fenouil y cols 2012).

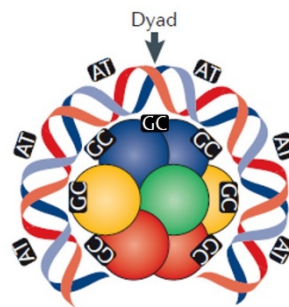


Figura 2: Esquema general de patrones de preferencia nucleotídica y periodicidad de secuencia reportados para partículas core nucleosomales (modificado de Lai y Pugh 2017 y de Struhl y Segal 2013).

A pesar de reconocerse la existencia de propiedades de posicionamiento y exclusión de nucleosomas derivadas de propiedades intrínsecas a la secuencia de ADN, estudios posteriores en los que se reconstituye *in vitro* un genoma completo a la forma de nucleosomas y se le compara con mapas de nucleosomas *in vivo* muestran una discrepancia importante en los patrones de posicionamiento nucleosomal entre ambos mapas (Korber 2012), sugiriendo que otros elementos, además de las propiedades de la secuencia de ADN están involucrados en el posicionamiento y dinámica de los nucleosomas *in vivo*. Consecuentemente, estudios de reconstitución *in vitro* de nucleosomas a genoma completo en presencia de extractos nucleares de levadura, factores de transcripción, complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP purificados (como ISWI, SWI/SNF y RSC, entre otros) y ATP (Zhang y cols 2011, Krietenstein y cols 2016), han logrado reproducir en gran medida los patrones de posicionamiento observados en los mapas de nucleosomas *in vivo*. De esta forma se demostró que existe un aporte esencial de elementos intrínsecos a la secuencia de ADN, como tramos de poli(dA:dT), y factores extrínsecos, como la remodelación de cromatina dependiente de ATP y factores de transcripción, para el establecimiento del paisaje nucleosomal en regiones regulatorias de genes.

Estas propiedades intrínsecas del ADN, o elementos “pasivos”, y su interacción con los elementos extrínsecos, o “activos”, descritos generan patrones de posicionamiento nucleosomal entre los que se han observado regularidades que permitieron reconocer categorías de promotores de genes en base a su conformación nucleosomal (Tirosh y Barkai 2008, Cairns 2009, Clapier 2021). Entre estas regularidades se han identificado promotores que contienen regiones con nucleosomas fuertemente posicionados (llamados por convención +1 y -1, respecto de su posición con respecto al TSS) separados por un tramo de ADN *linker*

particularmente extenso denominado NDR o NFR (del inglés *nucleosome-depleted region* o *nucleosome-free region*, respectivamente), dependiendo del grupo de investigación si se distingue entre ellos o si son términos intercambiables (e.g., Clapier 2021, ver Figura 3). El establecimiento y mantención de estas regiones se ha visto asociado a la acción concertada de elementos intrínsecos de la secuencia de ADN, como su propensión termodinámica a formar nucleosomas o excluirlos (Figura 2), y de los elementos “activos” anteriormente mencionados, entre los que se encuentran los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP como elementos de acción en *trans* especialmente importantes para estos fenómenos.

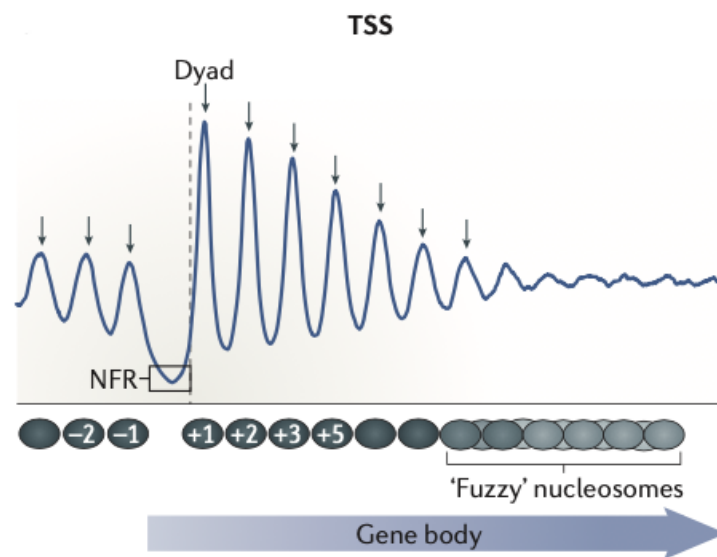


Figura 3: Organización típica de los nucleosomas en un gen eucarionte de promotor tipo-abierto. Los números en los octámeros representan posición respecto del TSS, el centro de cada peak representa la posición del dyad o eje de simetría nucleosomal. El eje vertical representa aproximadamente la fuerza del posicionamiento de cada nucleosoma. (Modificado de Lai y Pugh 2017)

Estructura y función de complejos remodeladores de cromatina ATP-dependientes

La remodelación de la cromatina comprende, en general, dos tipos de modificación: la modificación covalente de histonas (Munshi y cols 2009) y la remodelación de cromatina dependiente de ATP (Clapier y Cairns 2009). La remodelación de cromatina dependiente de ATP es realizada por proteínas o complejos de proteínas que acoplan la hidrólisis del ATP con una variedad de actividades orientadas a alterar la estructura local de la cromatina con exposición de regiones que estén a la forma de ADN nucleosomal o paso de ADN no nucleosomal a nucleosomal (Becker y Horz 2002). Estos complejos poseen una característica común, todos poseen una subunidad catalítica ATPasa y se han clasificado de acuerdo a las características estructurales de dichas subunidades (esto es, la presencia y distribución de diferentes dominios estructurales y funcionales dentro de ellas). De acuerdo a esto, se les ha clasificado en cuatro subfamilias de complejos: SWI/SNF (Switching defective/Sucrose Non-Fermentative) (Cairns y cols 1994), INO80 (Inositol-requiring 80), ISWI (Imitation switch) y CHD (Chromodomain, Helicase, DNA binding) (Clapier y Cairns 2009) (Figura 4). El complejo SWI/SNF está altamente conservado en eucariontes y ha sido relacionado con activación y represión transcripcional en levaduras, humanos y otros organismos (Fry y Peterson 2001). En levaduras, SWI/SNF se compone de 11 subunidades (Smith y cols 2003) y su subunidad catalítica presenta un alto grado de similitud estructural y de secuencia en eucariontes. Los complejos de la subfamilia SWI/SNF se caracterizan por poseer en su subunidad catalítica un dominio HSA (Helicase-SANT) hacia el extremo N-terminal de su dominio ATPasa y un bromodominio en su extremo C-terminal. Así mismo, el dominio ATPasa está compuesto de dos regiones separadas por una inserción pequeña: DExx y HELICc.

(Clapier y Cairns 2009). Otro miembro relevante de esta subfamilia es RSC (*Remodels the Structure of Chromatin*), el cual es alrededor de 10 veces más abundante en la célula que SWI/SNF (Cairns y cols 1996) y se le ha implicado en procesos como la organización de los nucleosomas en los promotores de genes y la apertura de NDRs (Hartley y Madhani 2009, Clapier 2021). Por otra parte, los complejos de la subfamilia ISWI se han visto relacionados con el espaciamiento regular de los nucleosomas y presenta un rol antagonista a los complejos de la familia SWI/SNF (Parnell y Cairns 2015, Grune y cols 2003, Whitehouse y Tsukiyama 2006), que desplazan octámeros de histonas en *cis* o en *trans* para despejar tramos de ADN y están asociados generalmente a activación transcripcional (Hartley y Madhani 2009).

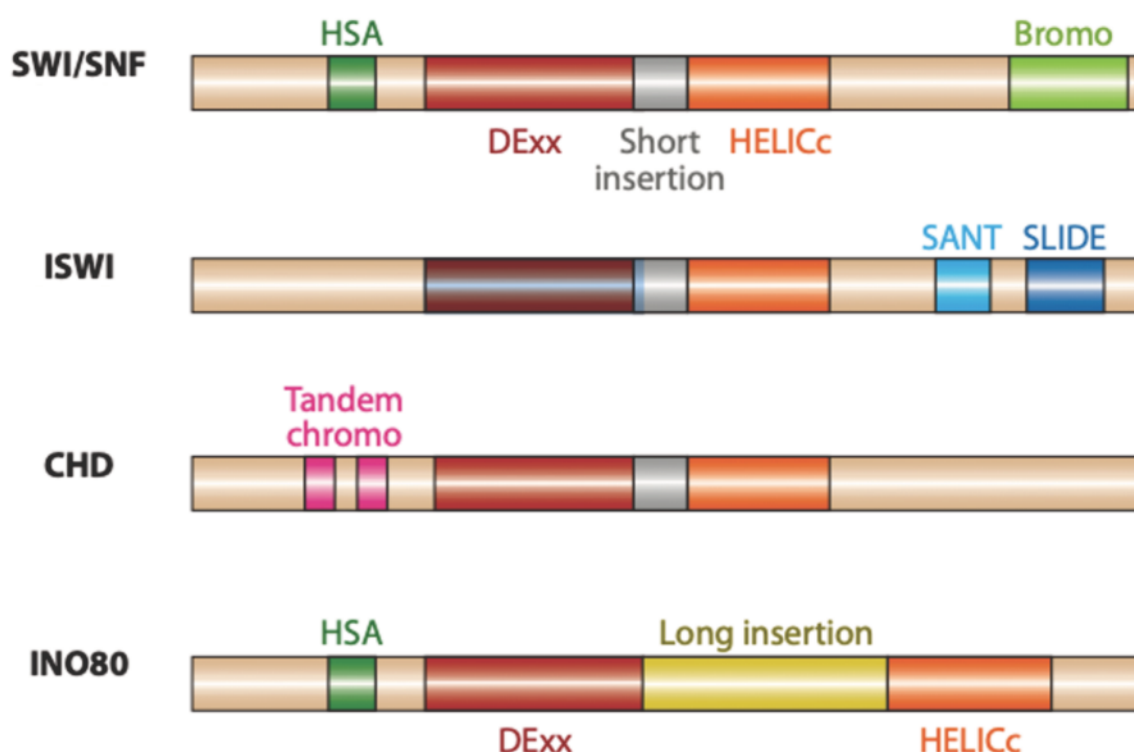


Figura 4: Subfamilias de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP definidas por la organización de los dominios de su subunidad catalítica (Adaptado de Clapier y Cairns 2009)

De manera más reciente, se ha logrado determinar la estructura tridimensional de los principales complejos remodeladores de cromatina unidos al nucleosoma, por medio de la técnica de Cryo-EM (Microscopía de electrones a temperaturas ultra-bajas), como RSC (Wagner y cols 2020) y SWI/SNF (Han y cols 2020), entre otros. Estos avances han permitido comprender las relaciones estructurales íntimas entre las diferentes subunidades de los complejos remodeladores estudiados y el nucleosoma (Figura 5), además de similitudes y diferencias en la organización de las subunidades que reproducen la relación estructural entre los complejos, su mecanismo de acción y sus funciones en la célula.

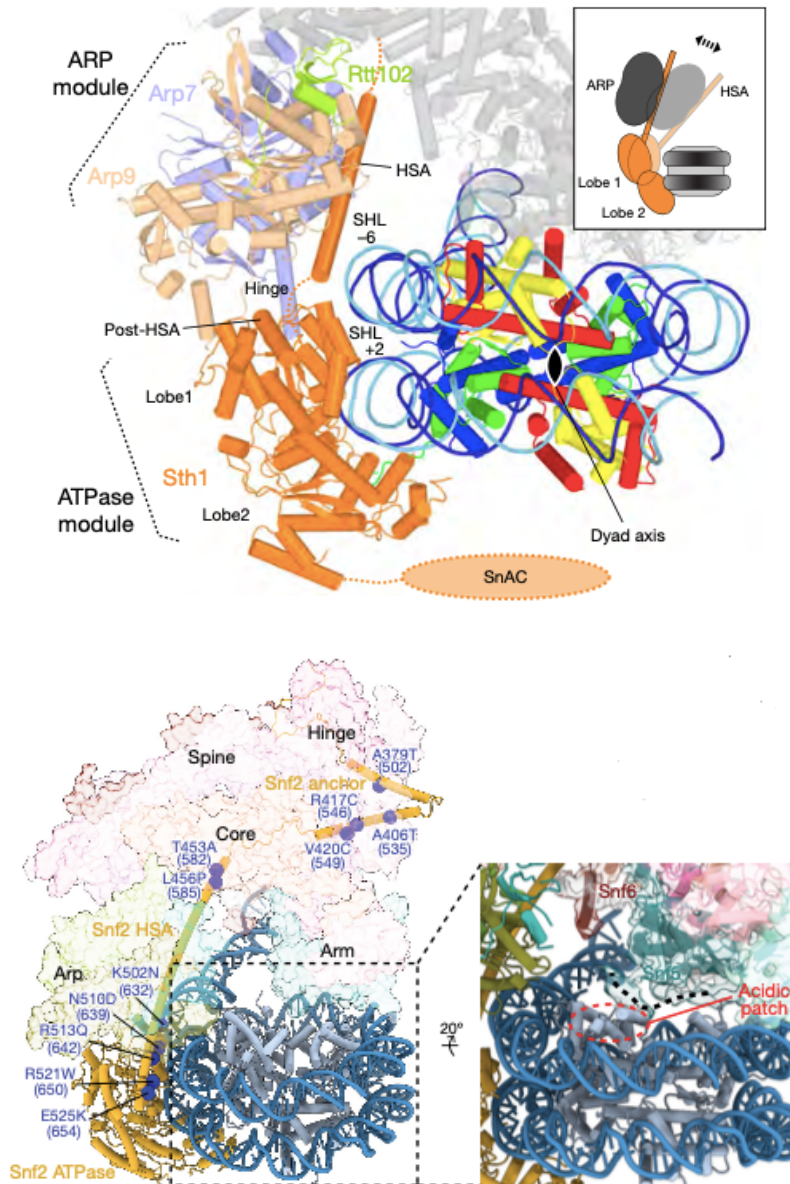


Figura 5: Similitudes estructurales y de interacción con el nucleosoma resueltas por Cryo-EM para los complejos remodeladores de cromatina RSC (arriba) y SWI/SNF (abajo). (Adaptado de Wagner y cols 2020 y Han y cols 2020, respectivamente).

Estas soluciones estructurales para los complejos RSC y SWI/SNF arrojan luces sobre el modo de interacción de ambos complejos con el nucleosoma (Figura 5), revelando similitudes marcadas en la manera en que estos complejos se unen al ADN

nucleosomal, extranucleosomal y el octámero de histonas. La disposición de la subunidad ATPasa en ambos complejos (Snf2 en el caso de SWI/SNF y Sth1 en el caso de RSC) parece interactuar con el nucleosoma en la misma posición del octámero (SHL+2¹ o SHL-2, dependiendo de la orientación del complejo respecto al nucleosoma, ver Wagner y cols 2020 y Han y cols 2020), lo que nos sugiere que la actividad ATPasa de ambos complejos opera de forma similar y reconoce el mismo sustrato.

Al mismo tiempo, ambos complejos parecen tener una estructura cuaternaria muy similar, dividida en 5 módulos funcionales para el caso de RSC (Wagner y cols 2020) y 4 para el caso de SWI/SNF (Han y cols 2020). Sin embargo, esta distinción queda sugerida por los autores y no refleja necesariamente la ausencia en SWI/SNF de un módulo funcional presente en RSC, sino que diversas clasificaciones de las subunidades de cada complejo.

En el caso de RSC, los módulos funcionales definidos por los autores son el módulo ATPasa, ARP (*actin related protein*), arm (“brazo” del complejo), DIM (*DNA Interacting Module*) y un “cuerpo” que funciona como andamiaje para el ensamble de los 4 módulos mencionados anteriormente. Como fue mencionado anteriormente, la subunidad ATPasa del complejo RSC puede unirse a SHL+2 o SHL-2, dependiendo de la orientación en la que se une al nucleosoma. Al respecto, los autores hacen una distinción importante sobre la orientación del complejo. La orientación del complejo RSC sobre el nucleosoma (esto es, si la unión al nucleosoma ocurre sobre la posición SHL+2 o -2) parece depender de la orientación del módulo DIM. Los autores muestran que la ATPasa se une al SHL2 más lejano del ADN extranucleosomal al que se une

¹ SHL viene del inglés *Superhelical Location* y refiere a las posiciones de interacción del ADN y las histonas con respecto al *dyad* o eje de simetría del nucleosoma.

el DIM. Entonces, si por ejemplo el DIM se une al ADN extranucleosomal más cercano a SHL-7 (último punto de interacción ADN-octámero por ese lado del *dyad*), entonces la subunidad ATPasa queda unida a SHL+2. Este aspecto sería clave para la ya mencionada función de apertura de NDRs que posee RSC, ya que la actividad remodeladora de RSC aleja al octámero de histonas del linker al que se une su DIM, por lo que a este linker se le denomina ADN “de salida” (Wagner y cols. 2020; más detalles sobre este y otros tipos actividad remodeladora se encuentran en la siguiente sección). Así, esta acción de apertura funcionaría si en el caso del nucleosoma +1 la ATPasa de RSC se une a este en el SHL2 más alejado del linker adyacente que pasará a formar el NDR, con lo que su DIM quedará unido a este linker, corriente arriba del nucleosoma +1. En el caso del nucleosoma -1, funcionaría si la ATPasa de RSC se une al SHL2 de este nucleosoma más alejado de su linker adyacente que pasará a conformar el NDR, con lo que su DIM quedará unido a este linker. Sin embargo, tanto para el nucleosoma +1 como -1, RSC podría unirse en la orientación opuesta a la recién indicada. Al respecto, estudios recientes han mostrado que la presencia de determinados motivos de secuencia en el ADN guían la orientación con la que RSC se une al nucleosoma. Estas secuencias precisamente se encuentran enriquecidas en las regiones que corresponden a NDRs y servirían como sitios de interacción para el DIM de RSC, por lo que se postula que - al encauzar una correcta orientación de unión de RSC - contribuirían a que RSC pueda ejercer su acción de apertura de NDRs. Estas secuencias de ADN enriquecidas en los NDRs incluyen secuencias de unión para Rsc3, Rsc30 (subunidades del complejo RSC) y Reb1² y tramos de poli dA:dT (Figura 6; Parnell y cols 2015, Amigo y cols 2023, Chen y cols 2023).

² Factor de transcripción que podría tener la propiedad de reclutar a RSC (e.g., Costanzo y cols 2016).

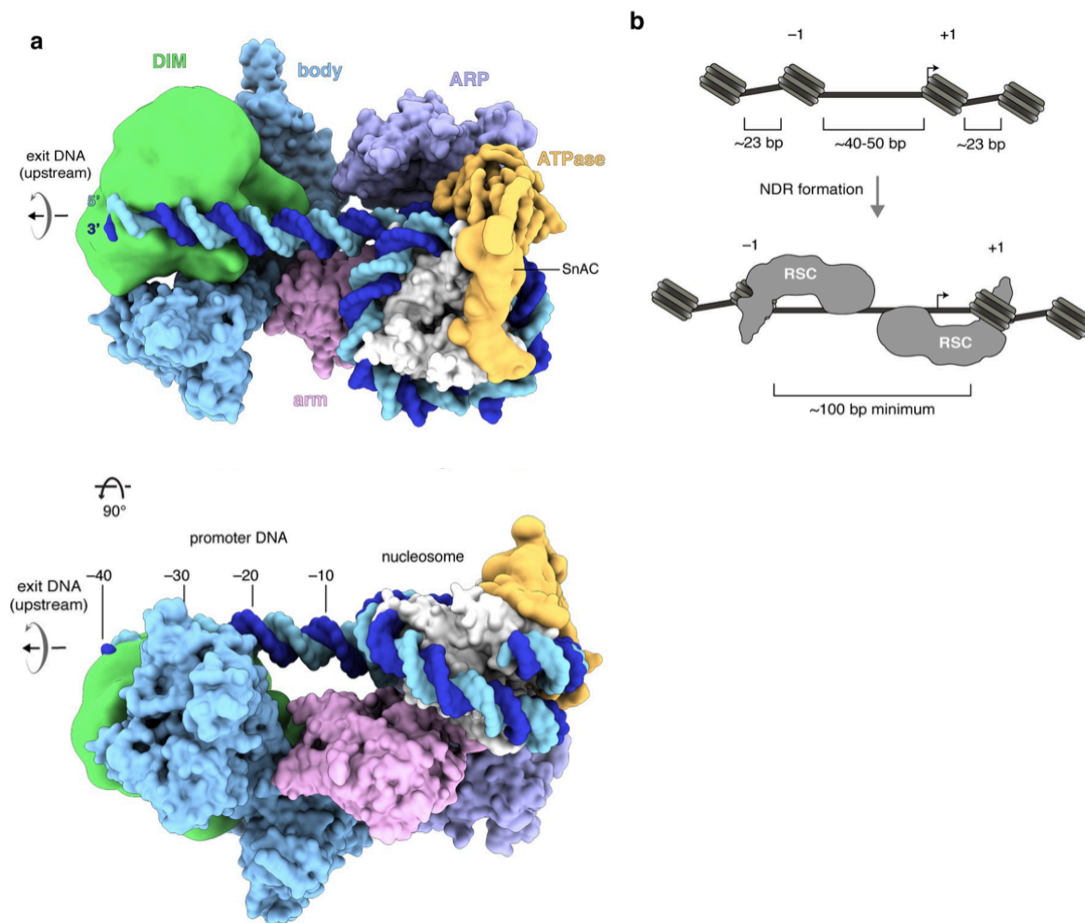


Figura 6: Caracterización estructural del complejo RSC (Modificado de Wagner y cols 2020). La figura A muestra un modelo del complejo RSC unido al nucleosoma, con indicaciones esquemáticas aproximadas de los diferentes módulos y su relación con el ADN nucleosomal y extranucleosomal. La figura B muestra el modelo propuesto por Wagner y cols. para la ampliación de NDRs por parte de RSC en base a la información estructural obtenida.

Para SWI/SNF, Han y cols. (2020) describen 4 módulos funcionales aproximadamente análogos a los descritos para RSC, el módulo ATPasa, un módulo ARP (*Actin Related Proteins*) y un módulo arm, conectados por un “cuerpo”, que los autores subdividen en 3 submódulos (*spine, hinge and core*) (Figura 7a). A pesar de

que los autores no reconocen explícitamente la existencia de un DIM o equivalente en el trabajo, sí interacciona la ATPasa del complejo. Esto supone un escenario similar al recién descrito para RSC, en términos de acción remodeladora de nucleosomas con apertura de NDRs en regiones regulatorias de genes (Figura 7b). A su vez los autores reportan (datos no mostrados en el artículo) que realizaron un experimento para verificar la formación de un complejo estable entre SWI/SNF y el nucleosoma, viendo que el ADN extranucleosomal es requerido para la formación de este complejo binario. Esto sugiere que existe un análogo al DIM reportado para RSC en el complejo SWI/SNF, quizá sin la especificidad de secuencia que presenta RSC en su DIM (e.g., Rsc3 se une a una secuencia nucleotídica específica que se encuentra enriquecida en promotores de genes). Adicionalmente, Dechassa y cols (2008) observaron interacción entre la subunidad Snf6 del complejo con ADN extranucleosomal al ser el complejo reclutado por Gal4-VP16. Finalmente, experimentos previos en nuestro laboratorio también sugieren el requerimiento de ADN extranucleosomal para la unión estable de SWI/SNF al nucleosoma (datos no mostrados).

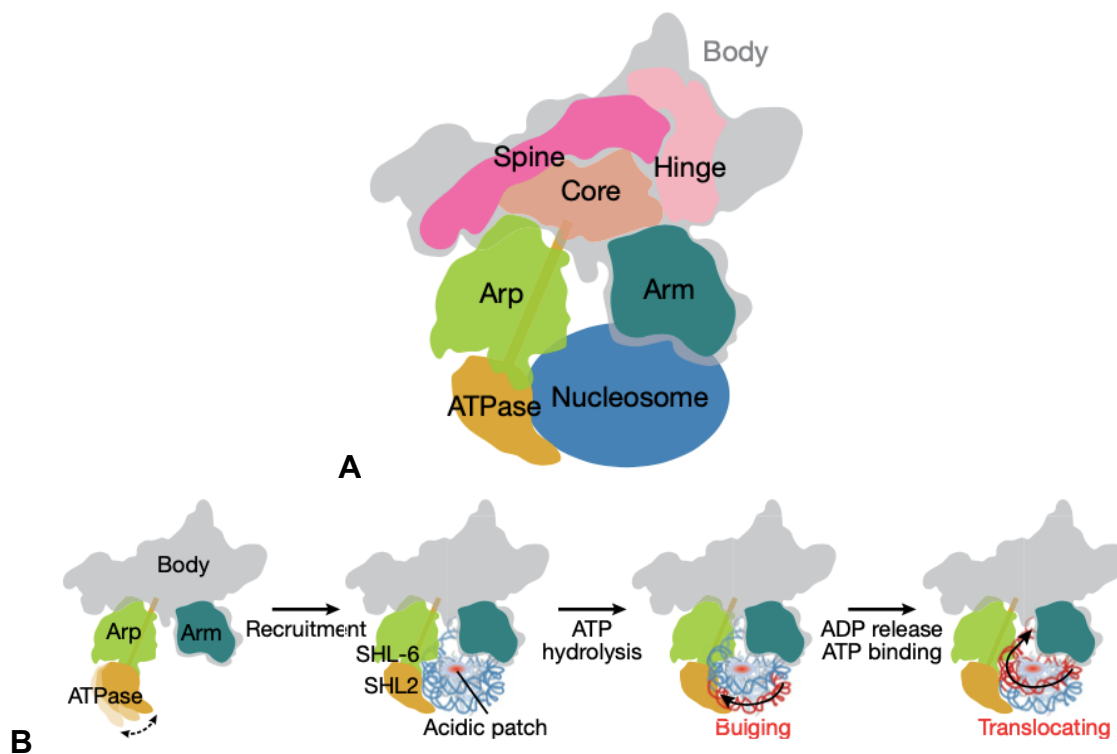


Figura 7: Caracterización estructural del complejo SWI/SNF (Modificado de Han y cols 2020). La Figura A muestra una representación esquemática del complejo SWI/SNF unido a un nucleosoma derivada de la información estructural obtenida por los autores. La Figura B muestra el modelo propuesto por los autores para la unión del complejo al nucleosoma y la dirección que seguiría el ADN durante la reacción de hidrólisis de ATP.

En conjunto, estos datos estructurales arrojan luces sobre el mecanismo de acción de los complejos remodeladores de cromatina de la familia SWI/SNF y fortalecen la evidencia para su participación como actores cruciales en la dinámica de cromatina. Al mismo tiempo, revelan una interacción significativa entre elementos de secuencia en el ADN y estos complejos.

Dentro de este contexto, también se ha determinado interacción con ADN extranucleosomal para complejos de la subfamilia ISWI (Clapier y cols 2017), incluyendo al complejo ISW1a (Gangaraju y Bartholomew 2007) que es estudiado en este trabajo. A su vez, se reportan roles antagónicos para los complejos de la

subfamilia SWI/SNF y los complejos de la subfamilia ISWI, donde los complejos de la familia SWI/SNF (como y SWI/SNF y RSC) tienden a despejar regiones del genoma de octámeros de histonas, exponiendo tramos de este ADN para subsecuentes interacciones con otros elementos de la maquinaria nuclear, en tanto los complejos de la subfamilia ISWI funcionan como “espaciadores moleculares” regulares, dejando equidistantes los octámeros de histonas afectados por su actividad, cerrando de esta manera regiones que podrían estar despejadas de octámeros de histonas.

Complejo remodelador	Cantidad de subunidades	Subunidad catalítica (ATPasa)	Actividad canónica
ySWI/SNF	12-18	SNF2	Desplazamiento en <i>cis</i> y <i>trans</i> del octámero de histonas. Generación/mantención de NDRs.
ISW1a	2	ISW1	Desplazamiento en <i>cis</i> del octámero de histonas. Espaciamiento regular de <i>cores</i> nucleosomales.

Tabla 1: Complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP utilizados en este estudio

Tipos de remodelación de cromatina y sus consecuencias

Los complejos remodeladores pueden catalizar reacciones bioquímicas con una serie de consecuencias sobre la estructura de la cromatina (Becker y Längst 2004): a) *Sliding* o desplazamiento en *cis* de nucleosomas previamente localizados en un locus, b) *Eviction* o eyección de nucleosomas, donde un octámero de histonas es transferido a otra hebra de ADN o a proteínas chaperonas de histonas y c) *Looping* o desenrollamiento de la hebra de ADN sobre la superficie del octámero de histonas. Dentro de la acción de los complejos remodeladores también se encuentran mecanismos de la alteración de la composición del octámero de histonas como: a)

Intercambio de dímeros H2A-H2B por otros del mismo tipo o variantes (e.g., H2A.Z) y b) Eyección de dímeros H2A-H2B de un nucleosoma (Clapier y Cairns 2009, Clapier y cols 2017, Clapier 2021) (Figura 8). Complejos de la subfamilia SWI/SNF presentan actividad de *sliding* (desplazamiento en *cis*) en nucleosomas (Whitehouse y cols 1999), así como actividad de *eviction* o transferencia de octámero en ciertas condiciones (Gutiérrez y cols 2007) y se puede unir de forma inespecífica al ADN o ser reclutado por factores de transcripción (*targeting*) (Yudkovsky y cols 1999, Owen-Hughes y Workman 1996).

En general se ha observado que los diferentes complejos remodeladores de las diferentes subfamilias comparten un mecanismo de acción, que es el de translocación de ADN por medio de una subunidad catalítica ATPasa. Este mecanismo compartido de acción sugiere un mismo modelo para la acción de todos los complejos remodeladores, en el cual, luego de la unión de la ATPasa al substrato nucleosomal en un punto específico a dos vueltas de hélice del *dyad* (es decir, en un SHL2), los dos lóbulos que conforman la ATPasa hidrolizan ATP para romper los contactos entre las histonas y el ADN de la superficie del octámero (Clapier y cols 2017). Al respecto, la energía de disociación de las 14 zonas de contactos entre el ADN nucleosomal y las histonas del octámero es, en total, de aproximadamente 14kcal/mol, 1kcal/mol por zona, en tanto la energía obtenida de la hidrólisis de 1 molécula de ATP es de aproximadamente 7kcal/mol. Considerando que la formación y posterior avance de un loop de ADN sobre la superficie del nucleosoma requerirá hidrólisis de ATP para el rompimiento de solo una fracción de estos contactos y que, con el avance del loop, habrá contactos que se romperán y otros que se irán reformando, se observa el requerimiento de que el proceso de remodelación sea gradual. Clapier y colaboradores (2017) proponen un modelo en el que, por cada evento de hidrólisis de

ATP se rompen sólo unos pocos contactos sobre la superficie del nucleosoma, generando una especie de “onda” de ADN no-unido que se desplazará por efecto de la acción combinada de ambos lóbulos de la ATPasa hacia el borde del core más alejado del punto de unión de estos módulos, denominado “ADN de salida” (Figura 9). Un aspecto de gran relevancia dentro de este ámbito es que el módulo de unión a ADN linker de los complejos de la subfamilia SWI/SNF interacciona con el ADN extranucleosomal de salida (Dechassa y cols 2010; Wagner 2020), mientras que la interacción con ADN linker de los complejos de las subfamilias ISWI y CHD es con el ADN extranucleosomal de entrada que corresponde a ADN por el borde del core más cercano al punto de unión de los lóbulos de la ATPasa (Ganjaraju y Bartholomew 2007; Clapier 2017).

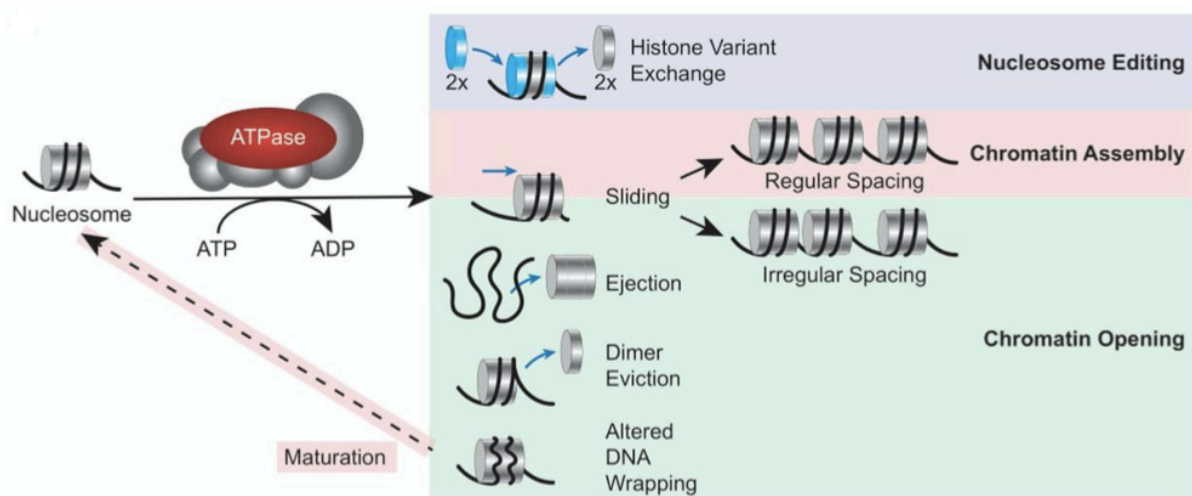


Figura 8: Consecuencias posibles de la acción de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP sobre la estructura cromatínica (Adaptado de Clapier 2021).

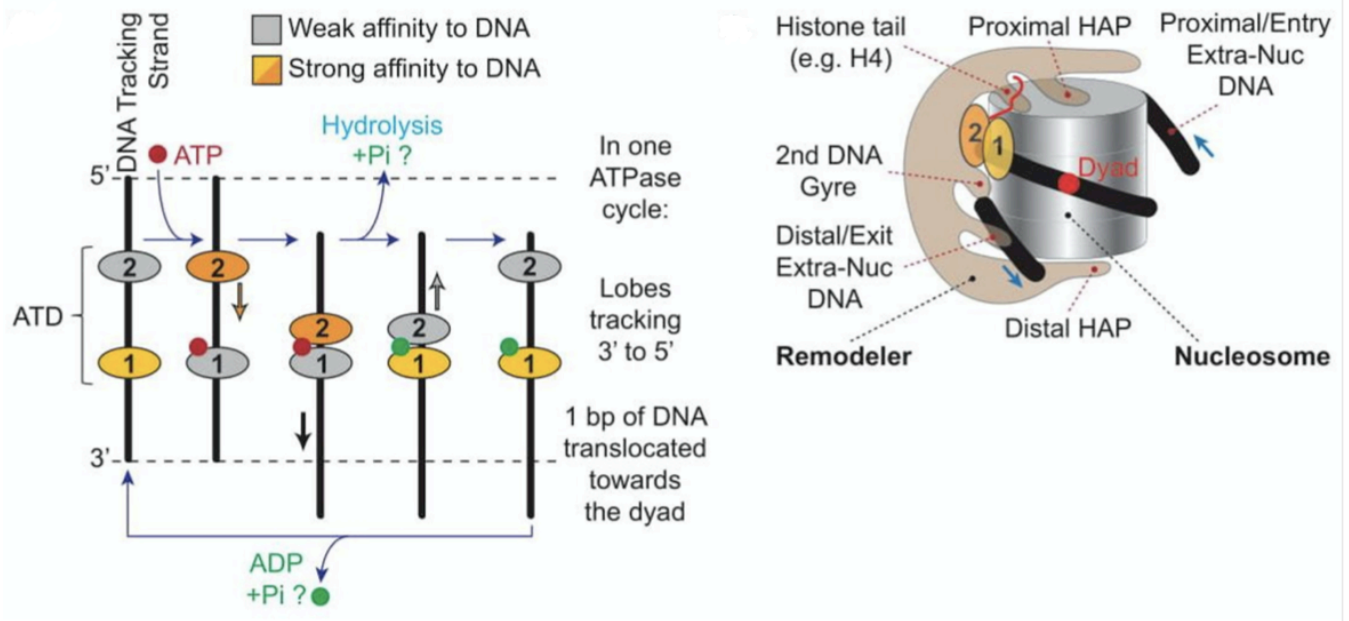


Figura 9: Mecanismo de acción sugerido para complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP (Adaptado de Clapier 2021). 1 y 2 representan ambos lóbulos de la subunidad ATPasa del complejo. A la derecha aparece mostrada la orientación relativa de los remodeladores de la subfamilia SWI/SNF con respecto a su sustrato y la orientación que adquieren los puntos de interacción remodelador-nucleosoma. HAP: Histone acidic patches. Parches ácidos de las histonas del octámero.

Estructura cromatínica de promotores y regiones libres de nucleosomas (NDRs)

Luego de la deposición inicial de las histonas durante la replicación del ADN una proporción importante de los nucleosomas adquieren posiciones específicas en el genoma, estableciéndose de esta manera regiones densamente ocupadas por nucleosomas y regiones pobremente ocupadas (Yuan y cols 2005, Lee y cols 2007, Kaplan y cols 2009). Una serie de estudios, posibilitados por la aparición de tecnologías como microarreglos de ADN y secuenciación masiva (ambos acoplados a digestión con nucleasa micrococcal), han producido mapas de posicionamiento de nucleosomas a genoma completo (Yuan y cols 2005, Lee y cols 2007, Kaplan y cols

2009), evidenciando de esta manera los patrones de organización de los nucleosomas en organismos eucariontes. Uno de los aspectos más notables que emergen de estos ensayos es la presencia de regiones de baja ocupancia de nucleosomas (NFRs o NDRs, de *nucleosome-free regions* y *nucleosome-depleted regions*, respectivamente, aspecto previamente discutido) inmediatamente corriente arriba de los sitios de inicio de transcripción de muchos genes (Yuan y cols 2005, Lee y cols 2007, Kaplan y cols 2009). Estas regiones de baja ocupancia nucleosomal típicamente abarcan de 100 a 200pb (aproximadamente la extensión cubierta por un nucleosoma) y su existencia ha sido reportada en todos los organismos eucariontes mapeados a la fecha, entre los que se incluyen levaduras, plantas y animales (Yuan y cols 2005, Lee et al 2007, Valouev et al 2008, Schones et al 2008). Estas regiones además presentan dos nucleosomas fuertemente posicionados, denominados nucleosoma +1 (sobre o corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción) y el -1 (primer nucleosoma corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción).

Sin embargo, no todos los genes presentan NDRs en sus regiones regulatorias. Al respecto, se ha sugerido que diferentes tipos de promotores utilizan estrategias distintas para la regulación transcripcional en términos del paisaje nucleosomal que presenten. Un estudio realizado por Tirosh y Barkai identifica dos clases de promotores, aquellos que presentan un NDR marcado y aquellos que aparecen cubiertos de nucleosomas. Los promotores que poseen NDRs presentan nucleosomas altamente posicionados flanqueando el NDR, presencia de variantes de histonas en estos nucleosomas (como H2A.Z), un NDR con sitios de unión para factores de transcripción altamente localizados en el NDR, mayores niveles de expresión de los genes en los que se localizan y menor plasticidad de expresión. Por el contrario, los promotores cubiertos presentan más sitios de unión para factores de

transcripción, sin embargo estos están distribuidos de manera uniforme a lo largo del promotor, presentan menores niveles de expresión relativos a los promotores con NDRs, pero poseen una alta plasticidad transcripcional (Tirosch y Barkai 2008) (Figura 10). Otros estudios que han clasificado promotores de genes en función del paisaje nucleosomal que presentan, han mostrado que en general los promotores con NDRs definidos están asociados a genes involucrados en biogénesis y ensamble de ribosomas y organización y biogénesis de organelos, i.e., genes esenciales para la fisiología celular básica. En contraste, los promotores que no presentan NDRs definidos aparecen principalmente asociados a genes involucrados a la respuesta a estrés (Lee y cols 2007), sugiriendo que **a nivel de promotores, patrones específicos de organización nucleosomal cumplen un rol fundamental en el control de la expresión génica, vale decir, que la propiedad de plasticidad transcripcional de los genes parece estar definida en posicionamiento nucleosomal.**

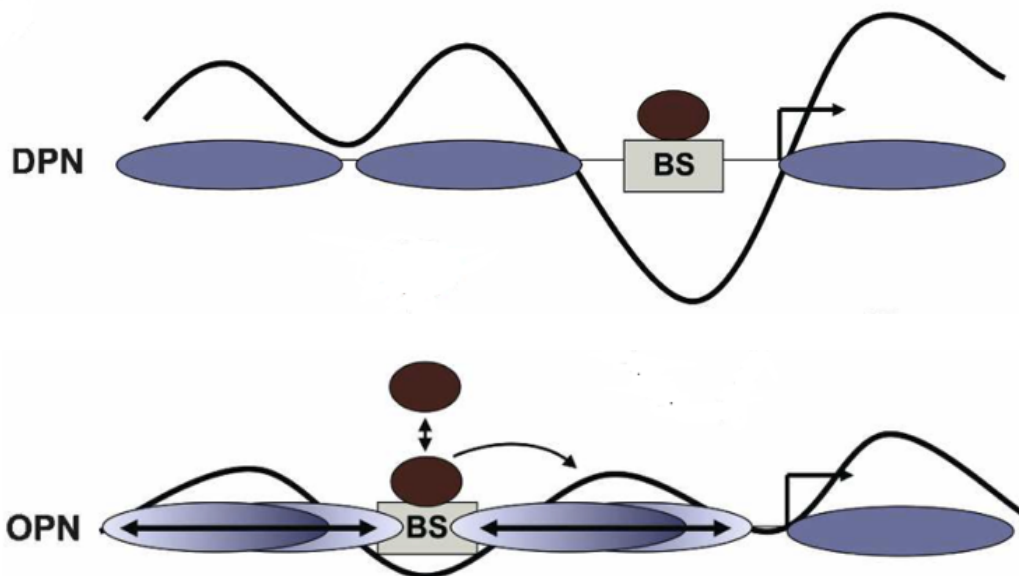


Figura 10: Tipos de promotores propuestos inicialmente por Tirosh y Barkai (2008) (Adaptado del mismo). **DPN** Depleted proximal nucleosome, o “promotor abierto”, **OPN**: Occupied proximal nucleosome o “promotor cerrado”, **BS**: Sitio de unión para un factor que pueda modificar la cromatina, como factores de transcripción.

Dinámica de Cromatina y Regulación Transcripcional

La regulación de la transcripción es un proceso íntimamente ligado a la dinámica de la cromatina y en conjunto los estudios discutidos indican que la estructura de la cromatina en los promotores de genes es un fenómeno que está en la frontera entre la genética, comprendida como las propiedades intrínsecas de la hebra de ADN, y la epigenética, considerada como los elementos extrínsecos a la secuencia de ADN, donde factores de transcripción y complejos remodeladores dependientes de ATP toman un rol fundamental en la regulación de la expresión de genes. En este contexto

surge la siguiente pregunta ¿Podrá la secuencia de ADN jugar un rol en los procesos llevados a cabo por estos elementos extrínsecos?.

Al respecto, trabajos previos de nuestro laboratorio demuestran que la actividad de *eviction* de SWI/SNF, uno de los principales complejos remodeladores implicados en este fenómeno, se ve incrementada al ser reclutado por factores de transcripción (Gutiérrez y cols 2007). Tanto el reclutamiento de complejos remodeladores a determinados *loci* dado por ciertos factores de transcripción como el efecto de éstos sobre la actividad de los complejos, ya ponen de relieve la naturaleza indisociable de las componentes genética y epigenética, dado que el factor de transcripción requiere de una secuencia en el ADN a la cual unirse para ejercer estas acciones. Esto adquiere especial relevancia para proponer estudios orientados a definir si hay influencia de las secuencias de ADN sobre la actividad de estos factores extrínsecos en el establecimiento de paisajes nucleosomales descritos en promotores *in vivo*, lo que es crucial para la comprensión detallada de los mecanismos de regulación de la transcripción que involucran la estructura de la cromatina.

Un aspecto particular dentro de este tema es la influencia que puede tener la disposición traslacional (comprendida como la posición que adquiere un elemento con respecto a los otros elementos del sistema) de diferentes elementos regulatorios en el ADN, como nucleosomas posicionados sitios de unión para factores de transcripción capaces de reclutar complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP, sobre la actividad remodeladora de estos complejos. Estudios previos en nuestro laboratorio sugieren la existencia de este fenómeno (Alarcón 2013, Gidi 2016). Un posible correlato biológico de la alteración de estas distancias podría verse reflejado *in vivo* en la posibilidad de aparición de INDELS (polimorfismos de inserción/delección) en regiones regulatorias proximales al sitio de inicio de transcripción de genes. Se

han reportado ~2 millones de polimorfismos de inserción/delección en el genoma humano, tanto por laboratorios independientes como por parte de iniciativas de mayor envergadura como el proyecto 1000 genomas (Mills y cols 2011). Según un reporte del laboratorio de Devine, la mayor parte de estos polimorfismos son de menos de 100pb en extensión, se presentan en promedio a razón de 1 INDEL por cada 1589pb y abarcan combinadamente 11.9Mb del genoma (comparado con ~15Mb abarcados por SNPs), lo que nos indica que la cantidad de variación genética generada por INDELS es significativa y comparable a la generada por SNPs (Mills y cols 2011). Así mismo, la abundancia de estos polimorfismos no se presenta de forma homogénea en el genoma. Se ha reportado una disminución significativa en la densidad de INDELS en los exones del genoma humano, así como un incremento de los mismos en las regiones intergénicas, que comprenden a su vez los promotores de genes (Montgomery y cols 2013). Los INDELS en regiones regulatorias de genes pueden afectar la transcripción en una serie de formas. Por ejemplo, y tal vez de forma más evidente, un INDEL puede generar o eliminar una secuencia específica en un promotor, alterando la secuencia de unión de un factor de transcripción específico o general, (e.g., Sander y cols 2005) o de formas más sutiles, como por ejemplo INDELS generados entre dos sitios de unión de factores de transcripción cooperativos de tal manera que se interrumpa su interacción. Además, INDELS de extensión cercana a 5pb afectarían la fase rotacional de la hebra de ADN, dejando un sitio de unión de un factor de transcripción en la cara opuesta de dicha hebra, o alterando la distancia entre los sitios de unión de factores de transcripción y las regiones genómicas diana de las proteínas que reclutan (Mullaney y cols 2010). Consideramos que otro efecto que pueden acarrear determinados INDELS es el cambio en el grado o tipo de remodelación de un nucleosoma particular al variar el INDEL la extensión de ADN

entre el *core* de este nucleosoma y un sitio de unión para un factor que reclute a un complejo remodelador.

Otro aspecto en el que factores de transcripción y, por ende, sus secuencias de unión específicas, pueden cumplir un rol modulador de la actividad de remodelación de nucleosomas dependiente de ATP, corresponde a la acción que pueden ejercer algunos de estos factores como barrera para la actividad de sliding de determinados complejos remodeladores, como los de las subfamilias ISWI. Al respecto, se ha observado que los NDRs están enriquecidos en sitios de unión para factores de transcripción denominados Factors Regulatorios Generales (GRFs) en levaduras y Factores Pioneros en eucariontes superiores (Clapier 2021; Chen y cols 2022). En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, los factores Reb1, Abf1, Cbf1 y Rap1 han sido caracterizados como los principales GRFs involucrados en regulación transcripcional (Yan y cols 2018). En base a estudios realizados con estos factores, se ha postulado que tanto la afinidad por la secuencia blanco como la baja tasa de disociación serían elementos determinantes en la propiedad de actuar como barrera de la actividad de sliding (Rossi y cols 2018; Kondalaji y Bowman 2022). Otro aspecto de relevancia dentro de este ámbito, corresponde a lo anteriormente mencionado respecto del ADN extranucleosomal con el que interaccionan complejos que tienden a cerrar los NDRs. Dado que, entre otros, los complejos de las subfamilias ISWI tienden a reducir la extensión de los NDRs (Parnell y cols. 2015; Clapier 2021), entonces su interacción con ADN extranucleosomal de entrada debe corresponder a interacción con el ADN linker que forma parte del NDR. Esto indica que, para que un GRF ejerza su acción de barrera, su sitio de unión debe estar localizado en el linker que pasará a ser ADN de entrada en la acción de sliding del complejo, pasando ese linker a conformar un NDR. Esto pone de relieve la relevancia de la ubicación relativa a un *core* nucleosomal

que tenga un sitio de unión para alguno de estos factores, en términos de ubicarse río arriba o río abajo de este *core*.

Es en virtud de los aspectos anteriormente descritos que **nuestra propuesta es que las secuencias de ADN, tanto en términos de contenido de secuencia como de posición relativa entre elementos regulatorios, participan activamente en el establecimiento del paisaje nucleosomal de las regiones regulatorias de genes, específicamente influenciando la actividad catalítica de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.** Así, el propósito principal de este proyecto fue evaluar el efecto de la extensión de ADN (en pares de bases) entre elementos *cis*-regulatorios y nucleosomas posicionados sobre la actividad catalítica de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP como SWI/SNF y RSC. Adicionalmente, nos propusimos analizar el efecto de la presencia y ubicación de sitios de unión para factores de transcripción relativo a un *core* nucleosomal (corriente arriba versus corriente abajo) sobre la actividad de *sliding* del complejo ISW1a. Estas investigaciones propuestas tuvieron como objeto el explorar nuevos elementos involucrados en el posicionamiento de nucleosomas y la regulación transcripcional a nivel de la estructura de la cromatina en regiones regulatorias de genes. El establecer la existencia de estos fenómenos involucra una importante contribución al entendimiento del diseño de regiones reguladoras de la expresión génica a nivel de la transcripción y también podría permitir entender la raíz de los efectos de ciertos INDELS susceptibles de aparecer en estas regiones.

Finalmente, la aparición de remodeladores de cromatina y elementos regulatorios asociados en la historia de la vida eucariota sigue siendo un área de investigación activa y actualmente no hay un consenso claro sobre el momento de su surgimiento. Sin embargo, los estudios mostrados sugieren que las funciones de remodelación de

cromatina tuvieron su aparición tempranamente en la evolución eucariota, probablemente antes de la divergencia de las principales líneas eucariotas. La evidencia de esto proviene de la identificación de ATPasas homólogas de complejos de remodelación de cromatina en diversas líneas eucariotas, lo que indica que ya estaban presentes en el ancestro común de los eucariotas, así como la relativa conservación de elementos de secuencia de ADN que interactúan con estos complejos.

La evolución de promotores entonces habría encontrado novedad evolutiva en la aparición de mutaciones pequeñas en regiones de importancia para la remodelación de cromatina dependiente de ATP, afectando de esta forma la actividad transcripcional de genes en diferentes etapas del desarrollo y líneas celulares y pudiendo tener consecuencias importantes sobre el fenotipo y la interacción del organismo y su ambiente.

2. Hipótesis y objetivos:

Hipótesis:

En el caso de factores de transcripción que poseen la propiedad de modular la actividad de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP, la ubicación de su sitio de unión relativo al *core* nucleosomal afecta esta modulación.

Objetivo general:

Determinar la influencia de la ubicación, relativo a un *core* nucleosomal, del sitio de unión de factores capaces de influir sobre la actividad de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.

Objetivos específicos:

- 1) Determinar el efecto que tienen las variaciones en la extensión de ADN entre *core* nucleosomal y sitio de unión de un factor de transcripción sobre la actividad de complejos de la subfamilia SWI/SNF.
- 2) Determinar el efecto de presencia y posición relativa del sitio de unión de un factor de transcripción, respecto de la ubicación de un *core* nucleosomal, sobre la actividad del complejo ISW1a.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1) Diseño y producción de plásmidos con sitios de unión para factores de transcripción en diferentes posiciones respecto de secuencia 601:

Para el diseño de plásmidos que permitan generar sondas con distintas extensiones de ADN entre la secuencia un sitio de unión para un factor de transcripción y el borde de un core nucleosomal, se utilizaron vectores que contienen una secuencia con alta capacidad de posicionar un nucleosoma, denominada 601. Tras la reconstitución de un fragmento de ADN de más de 147 pb que contenga la secuencia 601 (147 pb), el octámero de histonas quedará posicionado en la secuencia 601 (601 (Lowary y Widom 1998). Se partió de tres plásmidos diferentes ya producidos en nuestro laboratorio; pGEM-3Z/601_8n_Gal4, pGEM-3Z/601_22_Gal4 o pGEM-3Z/601_42_Gal4, según compatibilidad de sitios de restricción para los insertos a ligar. Los insertos fueron producidos a partir de oligonucleótidos monohebra diseñados en el laboratorio y sintetizados comercialmente (Integrated DNA Technologies, Inc.) (Ver Anexo 1). Los oligonucleótidos doble-hebra a utilizarse como insertos se generaron mediante la hibridación de los oligonucleótidos monohebra en las siguientes condiciones: 100pMol de cada oligonucleótido y 12µL de Tris-Cl 1M pH 7.4 en un volumen de 200 µL final se incubaron por 5 minutos a 95°C en una termoplaca y se dejaron enfriar en el bloque con la termoplaca apagada hasta alcanzar temperatura ambiente. Luego, se incubó la mezcla a 4°C por 1 minuto y se preservó a -20°C hasta su uso. El plásmido receptor (4µg, por lo general) fue digerido con las enzimas de restricción adecuadas para realizar la apertura del sitio de inserción del oligonucleótido (15-20U de cada enzima, por 120 minutos a 37°C).

Posteriormente, el producto fue resuelto en una electroforesis preparativa en gel de agarosa (0.8%, TBE 0.5X) y cortado para su posterior purificación. La purificación del fragmento de interés se realizó mediante kit comercial (Omega BioTeK³) y resuspendido en Tris 10mM, pH 8.0 (Figura 11).

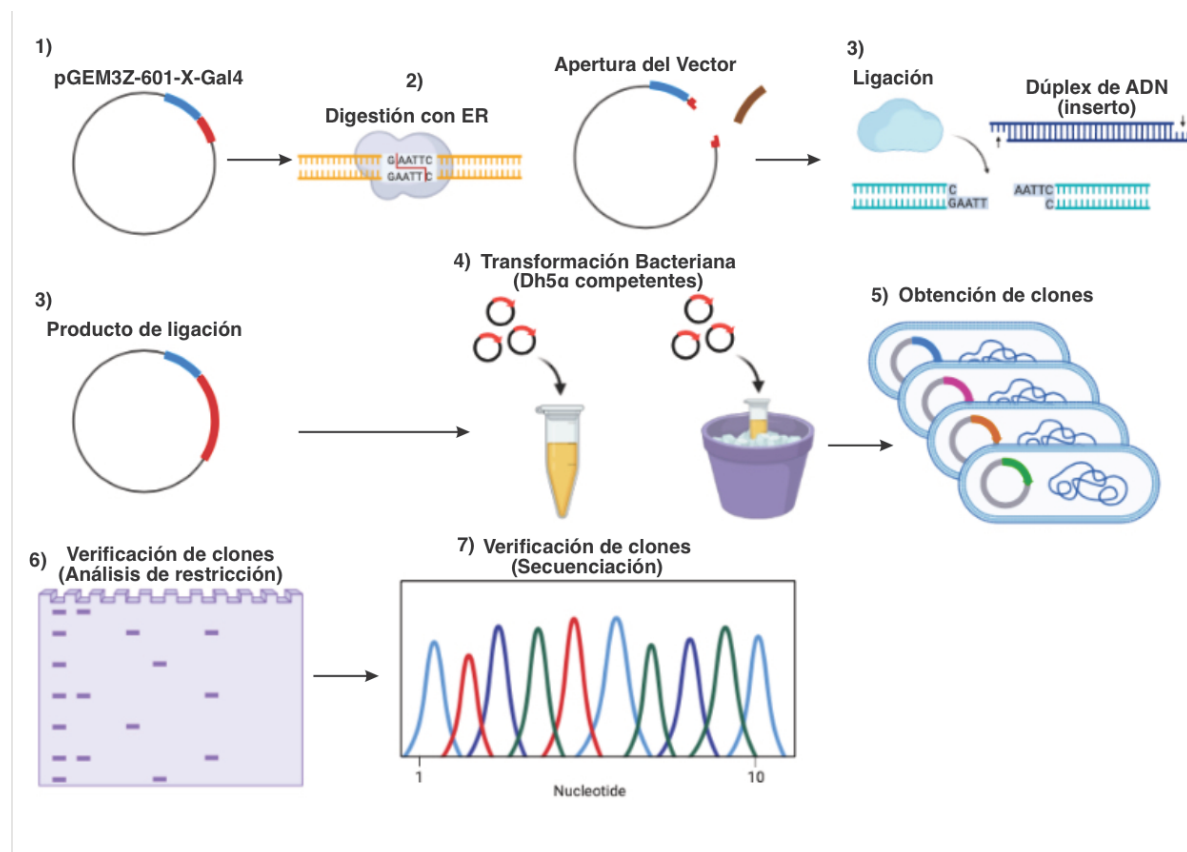


Figura 11: Esquema general de la estrategia para la producción de vectores plasmidiales utilizada en este trabajo. ER: Enzima de restricción. Para la producción de vectores de expresión bacterianos se utilizó la cepa BL21 DE3 Codon Plus en vez de DH5α, la cual se utilizó para la producción de vectores templado para la generación de sondas mononucleosomales.

Las ligaciones de los oligonucleótidos de interés con los vectores digeridos se realizaron en razón molar inserto:plásmido 2:1 o 3:1 a partir de 100ng de vector

³ E.Z.N.A. Gel Extraction Kit D2500-01. Lote D250020877-32

digerido y la masa de inserto correspondiente en presencia de 5U de T4 DNA Ligasa⁴ (New England Biolabs, Inc.), 1µL de buffer de reacción de la enzima (10X) y en un volumen final de 10µL. La reacción de ligación se realizó a 16°C por 8-16 horas, luego 10 minutos a 65°C y se preservó a 4°C hasta la transformación bacteriana con el vector ligado.

Posteriormente, *Escherichia coli* DH5α químicamente competentes fueron transformadas mediante *shock* térmico. Para esto, se agregó la totalidad de la reacción de ligación descrita previamente a un stock de 100µL de bacterias e incubadas en hielo por 30 minutos. Posteriormente el tubo fue sometido a estrés térmico poniéndolas a 42°C por 90 segundos y luego a 4°C por 30 segundos. A la mezcla se agregaron 400µL de medio LB estéril y se incubó en agitación por 45 minutos a 37°C. Finalmente se centrifugaron a 10000g por 1 minuto y se eliminó el sobrenadante, dejando aproximadamente 100µL. El *pellet* fue resuspendido y sembrado en placas de medio sólido LB/Agar/Ampicilina (100mg/mL) e incubado en estufa a 37°C por 12-16 horas. Colonias transformantes fueron cultivadas en 5mL de medio LB/Ampicilina a 37°C por 12 horas y posteriormente se purificaron los plásmidos de cada candidato utilizando 1mL de cultivo. Para esto, se centrifugó a 10000g, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 300µL de *buffer* de lisis TENS (Tris 10mM pH 10.5, EDTA 1mM, NaCl 150mM y SDS 0.5%). La mezcla fue homogenizada en vortex e incubada en hielo por 10 minutos. Se agregaron 150µL de NaCH₃COO 3M pH 5.2 y se homogenizó en vortex. Se procedió a centrifugar por 6 minutos a 10000g y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio con 900µL de EtOH 100% enfriado a -20°C, el cual se incubó 15 minutos sobre hielo. Se centrifugó la

⁴ T4 DNA Ligase, M0202S

muestra a 10000g por 5 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante, para posteriormente realizar dos lavados con 1mL de EtOH 70% y se eliminó el sobrenadante. El *pellet* de ADN se dejó secar con el tubo destapado y se resuspendió en 50µL de *buffer* TE (Tris-Cl 10mM, EDTA 1mM). Finalmente se agregó 1µL de RNAsa A 10mg/mL al *pellet* resuspendido y se incubó la muestra a 37°C por 45 minutos.

Los clones candidatos fueron verificados por medio de análisis por digestión con enzimas de restricción y aquellos que resultaran positivos fueron purificados mediante un kit comercial de purificación de plásmidos⁵ y posteriormente enviados a secuenciar con partidores dirigidos contra el inicio de la secuencia posicionadora de nucleosomas 601 (Lowary y Widom 1998) (Anexo 2).

3.2) Generación de sondas mononucleosomales:

Para la generación de las sondas mononucleosomales requeridas se utilizaron los plásmidos generados en la sección anterior, además de otros vectores ya disponibles en el laboratorio. Estas sondas fueron generadas mediante marcaje radioactivo de un partidor *forward* en su extremo 5' y posterior PCR sobre el plásmido con un partidor *reverse* sin marcar, para dar origen a un producto de PCR doble hebra cuyo fosfato en uno de sus extremos 5' queda con un fosfato que contiene el isótopo ³²P. La Tabla II entrega información de cada una de las sondas generadas, incluyendo vector usado, región del vector amplificada y partidores usados en PCR de generación del fragmento de ADN.

⁵ E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II, Omega Biotek, D6945-01

3.2.1) Marcaje radioactivo de los partidores 5´:

El marcaje radioactivo de los partidores se realizó utilizando 25 pmoles de partidor, en presencia de 25 pmoles de [γ - 32 P]-ATP (NEG035C, 6000 Ci/mmol, 150 mCi/mL, en solución 10mM Tricine pH 7.6, Perkin Elmer) y 12.5U de T4 Polinucleótido Kinasa (New England Biolabs, Inc.) en un volumen final de 25 μ L. La reacción fue incubada a 37°C por 30 minutos y posteriormente el ADN fue precipitado usando 2,5 volúmenes de EtOH 100% frío, 0,1 volúmenes de NaCH₃COO 3M pH 5,2, incubados a -20°C por 60 minutos al menos. Luego, la mezcla fue centrifugada a 10000g por 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El *pellet* resultante fue lavado dos veces con 400 μ L de EtOH 70% frío y se eliminó el sobrenadante mediante centrifugación como fue descrito previamente. Finalmente el *pellet* de ADN fue resuspendido en 10 μ L de Tris-Cl 10 mM pH 8.0 y utilizado inmediatamente para realizar una PCR (Figura 12-A).

3.2.2) PCR de generación de fragmentos de ADN marcados:

Las reacciones de PCR para la generación de las sondas a reconstituir como mononucleosomas se realizaron en presencia de la totalidad del partidor marcado recuperado (sección 3.2.1), 25 pmoles de partidor *reverse* sin marcar, 0.2 mM de cada uno de los 4 dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1.5U de ExTaq DNA Polymerase (TaKaRa Bio Inc.) y su correspondiente *buffer* de reacción y 1ng de ADN plasmidial en la que se subclonó la sonda en un volumen final de 50 μ L. El programa de amplificación para todas las sondas fue: 95°C por 5 minutos para denaturación inicial, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos para alineación y 72°C por 30 segundos para elongación, con un ciclo de elongación final de 72°C por 10 minutos.

Cada sonda fue resuelta mediante una electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida (40:1 AA:bis, 5%, TBE 0.5X) a 200V por 100 minutos y posteriormente purificada desde el gel mediante corte de la banda y elución del producto de PCR en *buffer* Tris-Cl 10mM pH 8.0, EDTA 1 mM por 12 horas en agitación a 4°C. Finalmente, el producto de PCR eluido fue separado de los residuos de gel mediante centrifugación y pasado a un tubo limpio, donde fue sometido a precipitación estándar con etanol y resuspendido en 10µL de Tris-Cl 10mM pH 8.0, EDTA 1 mM para su posterior cuantificación mediante sistema QUBIT 4 de fluorometría (Thermo Fisher Scientific Inc.) y almacenado a -20°C hasta su reconstitución a la forma de mononucleosoma. (Figura 12-B)

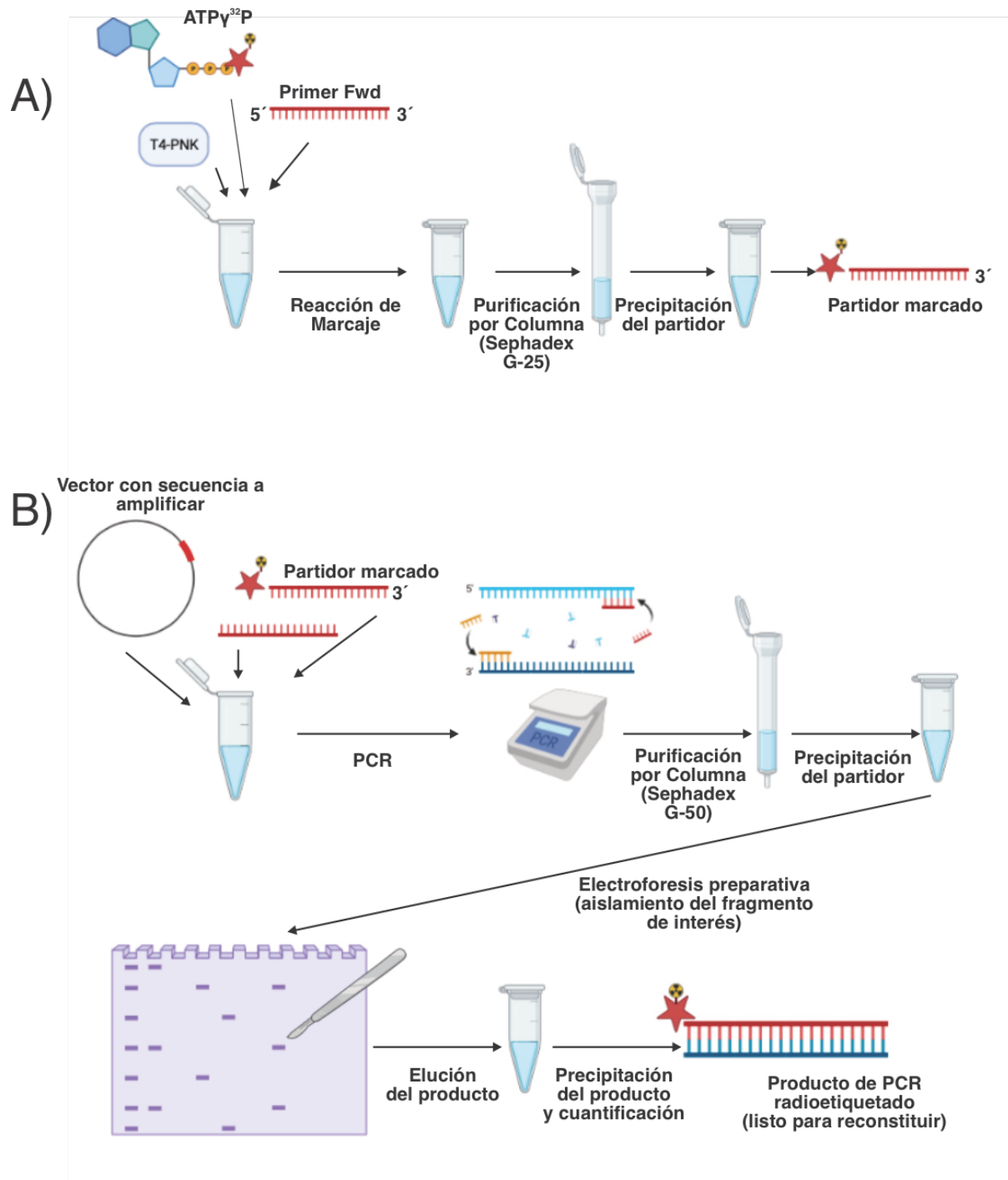


Figura 12: Esquema general de la estrategia para la producción de sondas marcadas utilizados en este trabajo. A) Marcaje radioactivo del partidor forward para la reacción de PCR radioactiva. B) Preparación del partidor, reacción de PCR y purificación del producto para su posterior reconstitución como sonda mononucleosomal.

3.2.3) Reconstitución de sondas a mononucleosomas:

La reconstitución de las sondas a mononucleosomas se realizó a partir de una modificación del método de transferencia de octámeros descrito previamente por Workman y colaboradores (Utley et al, 1996). Para cada sonda a reconstituir se mezclaron 0.5 pmoles de sonda, entre 1.5 y 2µg de SON (*Short OligoNucleosomes*, oligonucleosomas cortos), purificados previamente desde células HeLa⁶, NaCl 1M en la mezcla y *buffer* de dilución (10mM Tris-Cl pH 7.4, 1mM EDTA, 0.5mM PMSF, 5mM DTT) para completar a un volumen inicial de 12.5µL. La mezcla se incubó a 37°C por 20 minutos para favorecer la disociación de los octámeros de histonas provenientes de los oligonucleosomas “donantes” del ADN asociado a ellos. Posteriormente se realizaron cuatro pasos de diluciones seriadas de 20 minutos a 30°C utilizando el mismo *buffer* de dilución para llegar a concentraciones de NaCl de 0.8, 0.6, 0.4 y 0.2M en cada paso sucesivo, con el objetivo de reducir progresivamente la fuerza iónica de la solución y permitir la reasociación de los octámeros de histonas libres con las moléculas de ADN presentes en la solución, dentro de las cuales también estarán presentes las sondas de ADN marcadas. Finalmente se realizó una dilución con un *buffer* de dilución final (10 mM Tris-Cl pH 7.4; 1 mM EDTA; 0.5 mM PMSF; 5 mM DTT; 0.1% NP-40; 20% Glicerol; 200 ug/mL BSA) para llegar a una concentración de NaCl de 100mM y se incubó por última vez por 20 minutos a 30°C. Las sondas mononucleosomales fueron almacenados indefinidamente a 4°C en un volumen final de 125µL.

⁶ La cantidad de SON para la reacción es determinada empíricamente según la fracción cromatográfica de oligonucleosomas a utilizar durante la reconstitución para lograr un grado de reconstitución superior a 90%, por lo que diferentes fracciones pueden requerir cantidades variables de oligonucleosomas para lograr el grado de reconstitución deseado para la realización de los ensayos. Ensayos donde se comparan distintas sondas exigen reconstitución de estas con exactamente el mismo stock, y por ende cantidad, de oligonucleosomas.

La eficiencia de la reconstitución y la integridad de las sondas mononucleosomales resultantes fue verificada por electroforesis en gel de poliacrilamida no-denaturante 40:1 (AA:bis) al 5%, la cual fue realizada a 4°C, 200V por 150 minutos con *buffer* TBE 0,3X. El gel seco se expuso a Phosphorscreen (GE-Healthcare) y fue escaneado utilizando el instrumento Molecular Imager FX (Bio-Rad). La cuantificación del ADN nucleosomal y libre en cada sonda fue realizada utilizando el *software* Quantity One 4.6.3 (Figura 13)

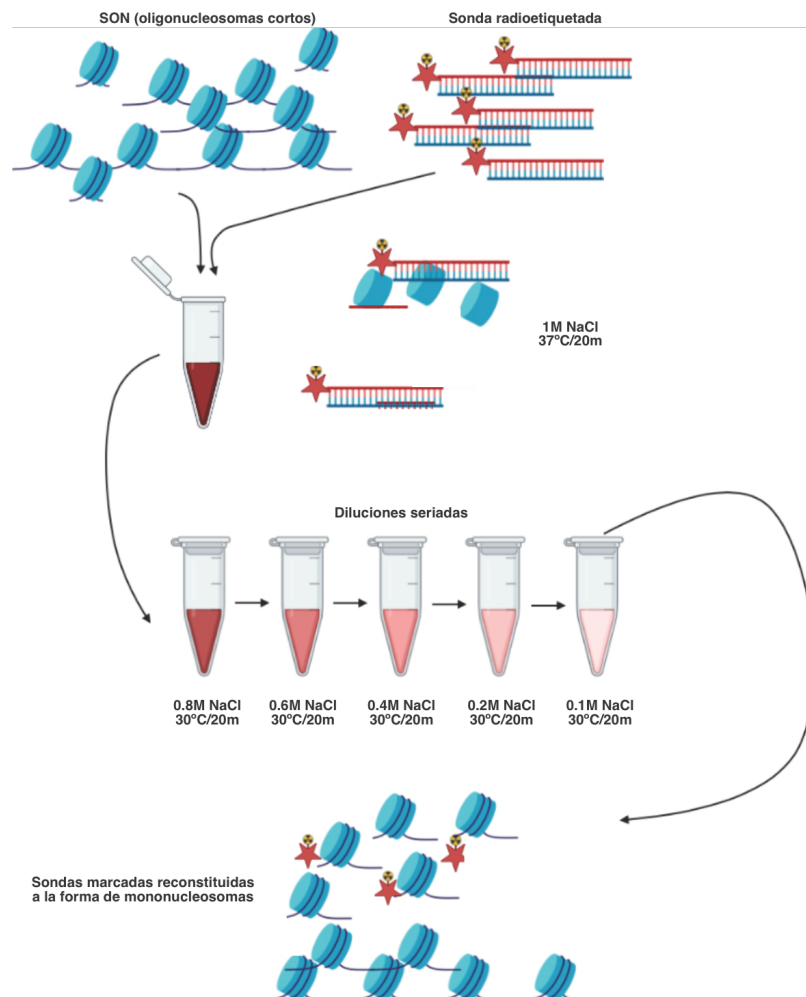


Figura 13: Esquema de la estrategia de reconstitución de probadores mononucleosomales basada en diluciones seriales utilizada en este trabajo.

3.3) Producción de proteínas recombinantes capaces de reclutar complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP:

Para determinar si existe un efecto de la extensión de ADN entre sitio de unión para un factor de transcripción y borde de un *core* nucleosomal sobre la actividad catalítica de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP, resulta experimentalmente indispensable en nuestro diseño el uso de factores de transcripción que posean interacción proteína-proteína con el complejo en estudio, de manera que este sea reclutado a la sonda mononucleosomal por el factor de transcripción, dado que complejos como SWI/SNF y RSC pueden unirse de forma inespecífica al ADN y nucleosomas en condiciones normales. Se requirió producir estos factores de transcripción a un elevado grado de pureza, para así minimizar la interacción de proteínas o péptidos co-purificados en el sistema experimental desarrollado. Los factores a producir fueron determinados mediante revisión bibliográfica donde se mostraron interacciones físicas directas entre los complejos remodeladores en estudio y los factores a utilizar.

3.3.1) Generación de vectores codificantes para factores de transcripción recombinantes

Se generaron vectores codificantes para los factores Abf1, Reb1 y Gcn4. Para la obtención de las secuencias codificantes de estos factores de transcripción de *S. cerevisiae* a clonar para su posterior producción, se diseñaron partidores que flanquearan estas secuencias y que tuvieran modificaciones en nucleótidos puntuales respecto de la secuencia blanco, para introducir sitios de restricción en los extremos del amplicón que fueran compatibles con el vector destino. Con estos partidores se

realizaron reacciones de PCR con una polimerasa de alta fidelidad⁷ sobre ADN genómico de *S. cerevisiae* purificado y los productos fueron digeridos con las enzimas de restricción dirigidas a los sitios generados y luego sometidos a electroforesis en gel de agarosa preparativo para su posterior purificación (0.8% agarosa, TBE 0.5X). Los fragmentos amplificados fueron cortados desde el gel y purificados usando el kit comercial QIAEX II® (QIAGEN) y resuspendido en Tris 10mM, pH 8.0.

En cada caso, el fragmento obtenido fue ligado en el vector destino pQE80L, el cual fue previamente abierto en su sitio de multiclonamiento mediante el uso de enzimas de restricción compatibles con las modificaciones introducidas en el inserto durante la reacción de PCR. Luego, la ligación, transformación de bacterias *E. coli* DH5 α , búsqueda de clones recombinantes y obtención de plasmidios a alta pureza desde clones positivos se realizó de la forma detallada en la sección 3.1. Los plasmidios purificados fueron enviados a secuenciar con partidores dirigidos contra las porciones del vector que flanquearan el inserto y dos partidores dirigidos contra secciones internas del inserto para asegurar cobertura total de secuenciación.

Alternativamente, cuando no funcionó la estrategia de ligación directa del inserto en pQE80L, como paso intermedio se realizó un clonamiento TOPO (Thermo Fisher Scientific) utilizando un kit comercial⁸. Para esto se realizó una reacción de PCR y su producto fue purificado como fue detallado al comienzo de la presente sección y se realizó la reacción TOPO según instrucciones del fabricante, partiendo de 150ng de producto de PCR purificado y con una incubación de 5 minutos. El vector producto de esta reacción fue usado para transformar bacterias *Escherichia coli* DH5 α

⁷ TaKaRa Ex Taq® DNA Polymerase, catálogo RR01CM.

⁸ Kit de clonación de PCR TOPO™ Zero Blunt™, sin células competentes, catálogo 450245.

químicamente competentes como fue previamente descrito en la sección 3.1 y sembrado en placas conteniendo medio LB/Agar/Kanamicina (50µg/mL). Se seleccionaron colonias para cultivo en medio líquido, se purificó plasmidio desde estos cultivos y se realizaron análisis de patrones de restricción de la forma detallada en la sección 3.1. Desde el vector TOPO recombinante obtenido, el inserto con la secuencia codificante para la proteína de interés se subclonó a un vector pQE80L y se verificó la obtención del nuevo vector recombinante según las estrategias descritas en los párrafos anteriores a esta sección.

3.3.2) Expresión y purificación de factores de transcripción recombinantes

Para la expresión y purificación de los factores de transcripción recombinantes utilizados en los ensayos de este trabajo, se utilizaron los plásmidos indicados en la sección 3.1.1. Además, se utilizaron plásmidos codificantes para Gal4-VP16, Rap1 y Cbf1 previamente disponibles en el laboratorio. Con cada plasmidio se transformaron, mediante *shock* térmico (descrito previamente en sección 3.1), bacterias *Escherichia coli* BL21 DE3 Codon Plus químicamente competentes, las que fueron sembradas en placas LB/Ampicilina (100µg/mL) y se seleccionó una colonia para crecer en medio líquido (5mL de LB/Ampicilina 100µg/mL) a 37°C por 12 horas. Posteriormente este cultivo se escaló inoculando a razón 1:100 un matraz con 200mL del mismo medio y este se dejó incubando en agitación a 28°C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de aproximadamente 0.6 y luego se indujo la expresión de la proteína recombinante adicionando 0.1mM de IPTG e incubando en agitación a 28°C por 2 horas. Para la obtención de un pellet bacteriano, se centrifugó a 5000g por 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante.

Para realizar la lisis bacteriana el *pellet* se resuspendió sobre hielo en 15mL de buffer de lisis (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM Imidazol, equilibrada a pH 8.0 con NaOH) en presencia de inhibidores de proteasas (0,5 mM PMSF, TPCK 7µg/mL, Pepstatina A 1µg/mL e inhibidor de tripsina 10µg/mL) y se procedió a fraccionar las células por sonicación (4°C, 4 ciclos de 20 segundos a 40% de amplitud con 20 segundos de descanso, 300W). Luego la mezcla se centrifugó a 8000g, 4°C por 15 minutos y el sobrenadante se sometió a una segunda centrifugación en las mismas condiciones.

Posteriormente se realizó una purificación por afinidad de la proteína, para la cual se utilizaron 200µL de resina Ni-NTA⁹ seca (400µL de suspensión), los cuales fueron previamente puestos en una columna y tratados con 200µL de buffer de lavado sin inhibidores de proteasas (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM Imidazol) y luego con el mismo buffer en presencia de inhibidores de proteasas (0,5 mM PMSF, TPCK 7µg/mL, Pepstatina A 1µg/mL e inhibidor de tripsina 10µg/mL). La resina tratada fue pasada a un tubo de 15mL estéril e incubada en conjunto con el sobrenadante obtenido de la lisis bacteriana en rotación suave por 60 minutos a 4°C y posteriormente fue escurrida en la columna. El pasado de largo fue aplicado nuevamente a la resina en la columna para una segunda pasada.

Posteriormente se resuspendió la resina de la columna en 1mL de buffer de lavado con inhibidores de proteasas (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM Imidazol, 0,5 mM PMSF, TPCK 7µg/mL, Pepstatina A 1µg/mL e inhibidor de tripsina 10µg/mL) y se dejó escurrir por gravedad en cámara fría (4°C) eliminándose el sobrenadante.

Para lavar la resina se realizaron 5 lavados en columna con 400µL de buffer de lavado con 20mM de Imidazol a 4°C, un lavado con buffer de lavado 50mM Imidazol a 4°C y

⁹ QIAGEN

finalmente 5 eluciones con 100mM Imidazol, también en columna. A los eluatos se agregó glicerol 15% concentración final y fueron almacenados a -80°C. Todos los lavados y eluciones se realizaron en presencia de inhibidores de proteasas (0,5 mM PMSF, TPCK 7µg/mL, Pepstatina A 1µg/mL e inhibidor de tripsina 10µg/mL).

3.3.3) Análisis de la purificación de factores de transcripción recombinantes

Alícuotas de las eluciones resultantes fueron denaturadas por adición de 1 volumen de solución Laemmli 2X (125 mM Tris-Cl pH 6.8, 6% SDS, 200 mM DTT, 20% Glicerol, 0,05% Azul de Bromofenol) e incubando a 95°C por 5 minutos. Luego de centrifugar a 13.000g durante 1 minuto, las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida denaturante (SDS-PAGE) al porcentaje correspondiente al ensayo. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 100V, por 30 minutos y luego a 150V hasta finalizar la corrida, utilizando buffer de corrida (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina, 0.1% SDS). El gel se fijó y tiñó durante toda la noche en solución colorante azul de coomassie (50% v/v Metanol, 10% v/v Ácido acético, 0.05% p/v Azul de coomassie), luego se decoloró por 45 minutos con solución fijadora (50% v/v Metanol, 10% v/v Ácido acético) y acto seguido se decoloró por 90 minutos con solución decolorante (5% v/v Metanol, 7% v/v Ácido acético). Finalmente se realizaron varios lavados con agua desionizada. La imagen del gel se digitalizó mediante escáner¹⁰ y las bandas fueron cuantificadas por medio de análisis densitométrico utilizando el software UN-SCAN-IT gel, versión 6.1.

De manera complementaria, para efectos de cuantificación, se hicieron electroforesis incluyendo cantidades definidas de BSA (Sigma A2153-10G). Adicionalmente se

¹⁰ UMAX PowerLook 2100XL-USB

realizó SDS-PAGE seguido de inmunodetección de la proteína por medio de Western Blot (Towbin et al 1979) utilizando un anticuerpo primario dirigido contra la cola de histidinas de la proteína recombinante¹¹.

3.4) Purificación y análisis preliminares de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.4.1) Purificación de complejos remodeladores.

Para la realización de los ensayos de unión, reclutamiento de complejos y remodelación de cromatina detallados en este trabajo se requirieron complejos remodeladores de cromatina purificados desde *S. cerevisiae*. Los complejos a estudiar fueron RSC y SWI/SNF, complejos con múltiples subunidades proteicas, lo que dificulta su obtención como complejos recombinantes. Debido a esto se optó por obtenerlos nativos desde cepas de levadura existentes en nuestro laboratorio (derivadas de BY4741, generadas en el laboratorio del Dr. Jerry Workman), donde una de las subunidades de cada complejo (RSC2 en el caso de RSC y SNF6 en el caso de SWI/SNF) está expresada en fusión a un epítipo apropiado para una purificación por doble afinidad en tándem (TAP-Tag). El complejo ISW1a se encontraba disponible en el laboratorio al momento de ejecutar ensayos con este complejo; su purificación procedió de la misma forma que RSC y SWI/SNF.

Para iniciar el cultivo la cepa de interés se inoculó en una placa con medio sólido YPD/Ampicilina (50µg/mL) y se dejó crecer en incubadora a 30°C por 48 horas. De la placa se picó una colonia única con la cual se inocularon 5mL de medio YPD/Ampicilina (50µg/mL) líquido en un tubo de 15mL estéril y se dejó crecer en

¹¹ Anti-His Monoclonal (Mouse) Clontech. Cat #631212, Lote #1311198A

agitación por 12-16 horas a 30°C. Luego se midió la OD₆₀₀ del cultivo líquido (dilución 1:5) para escalar a un cultivo de 25mL en el mismo medio líquido, el cual debe quedar con una OD₆₀₀ de aproximadamente 0.1¹². Este cultivo se incubó en agitación por 8 horas a 30°C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de aproximadamente 1. Seguidamente se realizó el escalamiento final del cultivo a 12L de medio líquido en el caso de SWI/SNF o 6L en el caso de RSC (la diferencia de escala es debido a la abundancia relativa de cada complejo en la célula, donde RSC es aproximadamente 10 veces más abundante que SWI/SNF) aplicando la misma fórmula descrita previamente para alcanzar una OD₆₀₀ final de 2.5. Este cultivo final se realizó a 30°C en agitación permanente a 250rpm hasta alcanzar la OD deseada.

Posteriormente se obtuvo el *pellet* de levaduras centrifugando el cultivo a 5000g por 10 minutos a 4°C en un rotor de ángulo fijo y el sobrenadante fue descartado. Luego el *pellet* fue resuspendido sobre hielo desde las botellas de centrifugación utilizando 30mL de *buffer* de extracción frío (40 mM HEPES-KOH, pH 7.5; 10% glicerol; 350 mM NaCl; 0.1% Tween-20) y traspasado a un tubo estéril de 50mL. Éste fue centrifugado a 5000g por 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante.

El *pellet* fue resuspendido sobre hielo con 25mL de *buffer* de extracción frío¹³ en presencia de inhibidores de proteasa (40 mM HEPES-KOH, pH 7.5; 10% glicerol; 350 mM NaCl; 0.1% Tween-20; 1 µg/ml pepstatina A; 5 µg/ml leupeptin; 0.2 mM DTT; 0.5 mM PMSF) y fue depositado en una cámara de agitación de 100mL recubierta de hielo (Bead Beater) con 30mL de perlas de vidrio de 0.5mm previamente lavadas con agua *nanopure* una vez y luego con *buffer* de extracción con inhibidores de proteasa

¹² Para calcular esto se utiliza la siguiente fórmula:
 $\text{Vol. inóculo} \times \text{OD inóculo} \times 2^{t/\text{div}} = \text{Vol. cultivo} \times \text{OD}_{\text{final}} \text{ cultivo}$. T_{div} para *S. cerevisiae* será 1.5 y T=n° de horas de incubación para llegar a la OD deseada.

¹³ 30mL en caso de haber partido de un cultivo de 12L.

y enfriadas y se tomó una muestra de levaduras previa a la lisis para comparación posterior. Posteriormente se realizaron 30 ciclos de pulsos de 30 segundos seguidos por 1 minuto de descanso sobre hielo. El hielo de la cámara se reemplazó cada 5 ciclos o antes de notarse derretimiento excesivo. A su vez, se volvió a adicionar PMSF a la misma concentración anteriormente descrita pasados 30 minutos debido a su vida media en solución. Pasados los 30 ciclos se realizó un análisis de la lisis de las levaduras mediante tinción con azul de tripán y observación al microscopio, comparando el resultado con la muestra tomada antes de la lisis. De observarse suficiente lisis se procedió al siguiente paso, de lo contrario se continuó agregando pulsos de 10 en 10 con un máximo de 50 pulsos finales hasta lograr la lisis deseada, con los cuidados correspondientes a mantener el hielo y PMSF anteriormente descritos. Luego de la lisis se transfirió el sobrenadante a tubos para centrifuga de polipropileno y las perlas fueron lavadas con 10mL de *buffer* de extracción con inhibidores de proteasa frío, el cual fue posteriormente incorporado al lisado total de levaduras. El lisado fue sometido a centrifugación a 16000g por 30 minutos a 4°C y el sobrenadante se traspasó mediante el uso de micropipeta a tubos de ultracentrifuga poniendo atención de no tomar los residuos celulares al fondo del tubo. El lisado fue sometido a ultracentrifugación a 160000g por 2 horas a 4°C en un rotor de ángulo fijo con la velocidad de frenado mínima determinada por el equipo y el lisado aclarado fue recuperado utilizando micropipeta y traspasado a un tubo con resina Sepharose-CL-6B (General Electric Healthcare, 17016001) previamente lavada con 10 volúmenes de *buffer* de extracción con inhibidores de proteasa 3 veces mediante centrifugaciones a 2000g por 2 minutos a 4°C (250µL de resina seca por cada 100mg

de proteína total¹⁴). La resina se incubó con el extracto aclarado por 2 horas en rotación suave a 4°C y posteriormente se centrifugó a 2000g por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y pasado a un tubo con 4mL (2mL en caso de SWI/SNF, volumen seco) de resina IgG-Sepharose 6-Fast Flow (GE Healthcare, 17096901) previamente tratada¹⁵. La resina fue incubada con el sobrenadante por 12 horas en agitación suave a 4°C para unir el complejo con la subunidad en fusión al epítipo y luego fue transferida en partes iguales a 4 minicolumnas (BioRad, 731-1550), donde se le dejó escurrir por gravedad a 4°C. Posteriormente se dejaron pasar 10 volúmenes de *buffer* de extracción sin inhibidores de proteasa frío (40 mM HEPES-KOH, pH 7.5; 10% glicerol; 350 mM NaCl; 0.1% Tween-20) por la columna y se dejó escurrir por gravedad. Este paso se repitió una vez más. Finalmente se dejaron pasar 10 volúmenes de *buffer* de digestión para TEV proteasa (10mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 0.5 mM EDTA, 10% glicerol, 0.2 mM DTT) y se dejó escurrir por gravedad. Luego la resina fue resuspendida con 1.5 volúmenes de *buffer* de digestión para TEV proteasa y transferida a un tubo de 15mL estéril. Restos de resina en la columna fueron resuspendidos con 0.3 volúmenes del mismo *buffer* y esta suspensión fue incorporada al tubo anteriormente mencionado. A la resina en suspensión se agregaron 800U de TEV proteasa (New England Biolabs, P8112S) y se dejó incubar

¹⁴ El total de proteína del extracto total de proteínas de levaduras fue determinado por el método de Bradford previamente a la incubación con la resina.

¹⁵ El tratamiento es el siguiente (lavado implica invertir suavemente el tubo en presencia de la solución con la que se está lavando y posterior centrifugación a 2000g por 3 minutos y eliminación de sobrenadante con micropipeta, cuidando de no perder resina en cada paso):

- 1) Lavar con 10 volúmenes de *buffer* de extracción
- 2) Lavar con 2 volúmenes de ácido acético 0,5M pH 3,4 (al preparar esta solución, el pH se ajusta a 3,4 con acetato de amonio)
- 3) Lavar con 5 volúmenes de *buffer* de extracción
- 4) Lavar con 2 volúmenes de ácido acético 0,5M pH 3,4
- 5) Lavar con 5 volúmenes de *buffer* de extracción (2 veces)
- 6) Lavar con 5 volúmenes de *buffer* de extracción+ 0,2 mM DTT + inhibidores de proteasas. Dejar la resina en este buffer hasta su uso.

El tratamiento se realizó durante la incubación con resina Sepharose CL-6B, nunca antes para evitar denaturación de la IgG.

en agitación por 8 horas a 4°C para realizar el corte del primer epítipo y exposición del segundo.

Seguidamente se traspasó la suspensión a 4 minicolumnas y se dejó escurrir por gravedad a 4°C, guardando el eluato, y al conjunto de columnas se aplicó 0.5 volúmenes de *buffer* de unión a Calmodulina con inhibidores de proteasa (10 mM Tris pH8; 1mM MgAc; 1mM imidazol; 2mM CaCl₂; 0.1% NP-40; 10% glycerol; 0.5mM PMSF; 5 µg/ml leupeptin; 1 µg/ml pepstatin A; 0.5mM DTT) y 150mM NaCl añadido. Ambos eluatos se combinaron, se suplementó con CaCl₂ para obtener concentración 2.5 mM y se aplicó a 1mL (volumen seco) de resina Calmodulin Sepharose 4B (GE Healthcare, 17052901) previamente lavada 3 veces con 10 volúmenes de *buffer* de unión a Calmodulina en presencia de inhibidores de proteasa y con 150mM de NaCl añadido. Se dejó incubar en rotación suave por un mínimo de 8 horas a 4°C. Posteriormente se lavó una vez la resina con 10 volúmenes de *buffer* de unión a Calmodulina-NaCl 150 mM con inhibidores de proteasa. Luego se lavó dos veces con el mismo *buffer* pero conteniendo 300mM de NaCl y finalmente dos veces con el mismo *buffer* conteniendo 150mM de NaCl. Todos los lavados se realizaron incubando la resina en rotación suave a 4°C con el *buffer* correspondiente por 3 minutos y posterior centrifugación a 2000g a 4°C por 5 minutos para eliminar el sobrenadante con micropipeta teniendo cuidado de no perder resina en cada lavado. Para la elución de los complejos se resuspendió la resina en 500µL de *buffer* de elución de Calmodulina (10 mM Tris pH8; 150mM NaCl; 1mM MgAc; 1mM imidazol; 2mM EGTA; 0.1% NP-40; 10% glicerol; 0.5mM PMSF¹⁶, 5 µg/ml leupeptin; 1 µg/ml pepstatin A; 0.5mM DTT) y se pasó a un tubo estéril de 1.5mL. Se incubó por 5

¹⁶ PMSF e inhibidores de proteasa se agregaron siempre justo previo a utilizar el *buffer*, considerando su vida corta en soluciones acuosas. Esto es válido para todas las secciones de este trabajo donde se utilizan inhibidores de proteasas y PMSF.

minutos en rotación suave a temperatura ambiente y se centrifugó a 2000g por 1 minuto. El sobrenadante conteniendo el complejo se traspasó a un tubo de 1.5mL estéril del cual se tomó una alícuota para análisis y se le agregó BSA (Sigma A7030) a una concentración final de 500ng/μL para su almacenamiento a -80°C hasta su uso. Este proceso se repitió hasta obtener 10 fracciones de elución de complejo de 500μL cada una. Posteriormente se realizó el mismo proceso, pero utilizando *buffer* de elución de Calmodulina con 300mM de NaCl, obteniendo así 10 fracciones más de complejo eluidas a una concentración de sal mayor para un total de 20 fracciones. En algunos casos se concentraron las fracciones con mayor actividad utilizando columnas concentradoras Amicon Ultra-4 de 100 MWCO (Millipore UFC810024) para obtener pools de complejos con una actividad más apropiada para realizar ensayos.

3.4.2) Análisis de la purificación de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.

Cada fracción de complejo purificado fue analizada mediante tinción con plata y Western blot para verificar la integridad y presencia de las subunidades de cada complejo y la identidad del mismo, así como el rendimiento en cada paso de la purificación, respectivamente. De forma accesoria se realizaron ensayos de actividad de las fracciones mediante ensayos de remodelación de cromatina dependientes de ATP como se detallan en la sección 3.5 para evaluar la actividad catalítica de los complejos obtenidos.

Para determinar la integridad de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP obtenidos se realizó SDS-PAGE seguido de tinción con plata, ya que la cantidad de proteína de complejo es baja como para detectar las distintas subunidades usando la tinción menos sensible de azul de Coomassie. La

electroforesis se realizó como se detalla en la sección 3.3.3. Al finalizar la electroforesis, el gel fue incubado en agitación sumergido en solución fijadora (50% Metanol, 10% Ácido acético) por 45 minutos y luego incubado en metanol 50% por 60 minutos en agitación. Subsecuentemente se realizaron 4 lavados con H₂O nanopura fría de 10 minutos cada uno en agitación y se trató con una solución de nitrato de plata 8mg/mL¹⁷ por 15 minutos en agitación orbital de intensidad media. Posteriormente el gel fue lavado 6 veces con H₂O nanopura fría como fue descrito anteriormente y se agregó la solución reveladora (formaldehído 0.02%; ácido cítrico 0.001%). El gel se dejó en agitación hasta observar claramente las bandas correspondientes a las proteínas y finalmente la reacción se bloqueó eliminando la solución reveladora y lavando el gel con 200mL H₂O nanopura fría.

La imagen del gel se digitalizó mediante escáner¹⁸ y la identificación de las subunidades presentes se realizó mediante comparación con patrones de tinción con plata de los complejos purificados disponibles en la literatura.

3.5) Ensayos de unión de factores de transcripción, reclutamiento de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP y remodelación de cromatina sobre sondas mononucleosomales

La realización de los ensayos detallados en esta sección se pensó para servir varios propósitos. El principal de ellos es la obtención de información conducente a resolver la hipótesis de este trabajo, pero como se mencionó brevemente en la sección 3.4, muchas veces se realizaron ensayos del tipo detallado a continuación para, por

¹⁷ Para la preparación de la solución se agregan 21mL de NaOH 0.36% p/v y 1.4mL de NH₄OH 14N en un vaso precipitado. Posteriormente se disuelven 0.8g de AgNO₃ en 4mL de H₂O nanopura y mediante el uso de pipeta se integra lentamente la disolución de plata sobre la solución de NaOH/NH₄OH en agitación permanente para evitar la formación de un precipitado. Finalmente, la solución se lleva a un volumen final de 100mL con H₂O nanopura.

¹⁸ UMAX PowerLook 2100XL-USB

ejemplo, realizar una evaluación de actividad de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP tras su purificación. A su vez, los ensayos de unión de factores de transcripción sirvieron propósitos múltiples, tales como evaluación de la concentración de proteína requerida para lograr un determinado grado de unión a las sondas mononucleosomales (precondición para los ensayos de remodelación). Los ensayos de reclutamiento fueron realizados además para verificar si determinados factores eran capaces de interactuar con los complejos remodeladores en nuestras condiciones experimentales y finalmente todos los ensayos descritos en esta sección fueron realizados en diferentes condiciones químicas base para poder estandarizar los protocolos experimentales a ser usados para los ensayos que abordaron directamente el problema científico planteado en la hipótesis de este trabajo. Por esta razón, en la presente sección se describen los procedimientos experimentales generales de estos tipos de ensayo, aunque muchos de ellos fueron realizados con modificaciones al protocolo presentado aquí por las razones previamente descritas. En esos casos, sus particularidades se detallan en las figuras correspondientes en la sección de Resultados del trabajo y los resultados fueron interpretados con esos parámetros en consideración.

3.5.1 Ensayos de unión de factores de transcripción a las sondas mononucleosomales.

Estos ensayos se realizaron utilizando 10 fmoles (2,5 μ L) de sonda mononucleosomal marcada (Sección 3.2.3) en presencia de una concentración apropiada del factor de transcripción en uso, la cual frecuentemente orientamos a que mostrara una unión superior a 90% en un ensayo de EMSA¹⁹ (e.g., 15nM final de Gal4-VP16) y siempre

¹⁹ Electrophoretic Mobility Shift Assay.

a un volumen de 0,5 μ L de stock diluido²⁰ (en caso de Gal4-VP16 se prepara un stock 450nM²¹), 8,4 μ L de *buffer* de remodelación (HEPES-KOH 20mM pH 7.9; KCl 13,9mM; PMSF 0.5mM; DTT 2mM; NP-40 0.05%; Glicerol 10%; BSA 100 μ g/mL; MgCl₂ 11mM), 0,6 μ L de H₂O nanopura filtrada y 3 μ L de *buffer* de complejo (10mM Tris-Cl pH 8.0; EGTA 2mM; PMSF 0,5mM; DTT 1 mM; Imidazol 1 mM; NP-40 0,1%; Mg(CHCOO₃)₂ 1mM; Glicerol 10%; NaCl 300mM) en un volumen final de 15 μ L y una concentración final de Na/KCl de 100mM²². Las reacciones fueron incubadas a 30°C por 30 minutos y posteriormente a 4°C por 5 minutos. Finalmente las muestras se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida no-denaturante (AA:bis 40:1, 5%, TBE 0,3X), la cual fue realizada a 4°C, 200V por 150 minutos. El gel seco se expuso a Phosphorscreen²³ y fue escaneado utilizando el instrumento Molecular Imager FX. La cuantificación del grado de unión en cada sonda fue realizada utilizando el *software* Quantity One 4.6.3 (Bio-Rad). Estos ensayos se realizaron de igual forma para todas las sondas en este trabajo.

3.5.2 Ensayos de reclutamiento (*targeting*) de complejos remodeladores de cromatina por factores de transcripción a las sondas nucleosomales

Estos ensayos se realizaron utilizando 10 fmoles (2,5 μ L) de sonda mononucleosomal marcada (Sección 3.2.3) en presencia de una concentración apropiada del factor de

²⁰ *Buffer* de factor de transcripción: 10mM HEPES-KOH pH 7.4, 100mM KCl, 30mM NaCl, 10 μ M ZnCl₂, 10mM Imidazol, 100 μ g/mL BSA, 5mM NaH₂PO₄, 1mM DTT, 0.2mM PMSF, 20% glicerol.

²¹ El stock 450nM se prepara de una fracción concentrada del factor de transcripción recombinante inmediatamente antes de realizar el ensayo para evitar posible degradación de la proteína. La dilución se realiza en un *buffer* de dilución con los componentes requeridos para preservar las concentraciones finales de todos los componentes en el ensayo

²² Detalle a considerar ya que hemos observado en nuestro laboratorio que incrementar la fuerza iónica de la reacción puede aumentar la facilidad de desensamble del octámero de histonas.

²³ GE Healthcare.

transcripción en uso como se describió en la sección 3.5.1, 7,9µL de *buffer* de remodelación, 0,6µL de H₂O nanopura filtrada y entre 0 y 200ng de SON (0,5 µL) para estrictez del ensayo, dando un volumen final de 12µL. Las reacciones fueron incubadas a 30°C por 20 minutos (etapa de unión del factor de transcripción a las sondas) y posteriormente se añadió el complejo remodelador purificado o *buffer* del complejo según el caso (por ejemplo para controles), llegando a un volumen final de 15µL y una concentración final de Na/KCl de 100mM. Cabe mencionar que el complejo remodelador utilizado en los ensayos y su correspondiente *buffer mock* se pueden encontrar a 150 o 300mM de Na/KCl dependiendo del complejo y fracción cromatográfica utilizada, por lo que en cada caso el *buffer* de remodelación se preparó para que en cada ensayo la concentración global de Na/KCl fuese de 100mM. Las reacciones se incubaron por 45 minutos a 30°C, luego a 4°C por 5 minutos y fueron resueltas por electroforesis en gel de poliacrilamida no-denaturante al 3.5% (60:1), a 4°C y 200V por 210 minutos con *buffer* TBE 0,3X. El gel seco se expuso a Phosphorscreen y fue escaneado utilizando el instrumento Molecular Imager FX o expuesto a films autoradiográficos. La cuantificación del grado de unión y reclutamiento en cada sonda fue realizada utilizando el *software* Quantity One 4.6.3. Estos ensayos se realizaron de igual forma para todas las sondas en este trabajo.

3.5.3 Ensayos de remodelación de cromatina por complejos remodeladores de cromatina sobre las sondas mononucleosomales

Estos ensayos se realizaron utilizando 10 fmoles (2,5µL) de sonda mononucleosomal marcado (Sección 3.2.3) en presencia de una concentración apropiada del factor de transcripción en uso como se describió en la sección 3.5.1, 7,9µL de *buffer* de

remodelación, 2mM de ATP²⁴ (0,6 µL de stock 50 mM) y de 0 a 200ng de SON (0,5 µL) para estrictez del ensayo, dando un volumen final de 12µL. Las reacciones fueron incubadas a 30°C por 20 minutos (etapa de unión del factor de transcripción a las sondas) y posteriormente se añadió el complejo remodelador de cromatina purificado o *buffer* del complejo según el caso, llegando a un volumen final de 15µL y una concentración final de Na/KCl de 100mM. Las reacciones se incubaron por 45 minutos a 30°C para permitir que el complejo catalizara la reacción y posteriormente se agregó una solución removedora (500ng de ADN plasmidial digerido y purificado y un oligonucleótido doble hebra que contiene la secuencia de unión para el factor de transcripción usado a una concentración tal que en la reacción quedaba 100x respecto del factor de transcripción usado) y se incubó por 30 minutos a 30°C con el objeto de disociar los complejos formados entre el nucleosoma, el factor de transcripción y el complejo remodelador de cromatina (4 horas a 37°C en el caso de ensayos con Rap1; ver comentarios al respecto de la sección de Resultados). Finalmente las muestras se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida no-denaturante 40:1 al 5%, la cual fue realizada a 4°C, 200V por 150 minutos con *buffer* TBE 0,3X. El gel seco se expuso a Phosphorscreen y fue escaneado utilizando el instrumento Molecular Imager FX . La cuantificación de las poblaciones de ADN y nucleosomas en cada sonda fue realizada utilizando el *software* Quantity One 4.6.3. Estos ensayos se realizaron de igual forma para todas las sondas en este trabajo.

²⁴ Sigma-Roche, 11140965001

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1) Efecto de variaciones en la extensión de ADN entre core nucleosomal y sitio de unión de un factor de transcripción sobre la actividad de complejos de la subfamilia SWI/SNF (Objetivo Específico 1).

4.1.1) Diseño de sondas y producción de plásmidos para los diseños.

El hecho de que el ADN doble hebra presente una periodicidad de “fase” (se entenderá como “fase” el que la unión de una proteína a la molécula de ADN quede en la misma orientación rotacional respecto de uniones en otras posiciones en la misma molécula de ADN) cada aproximadamente 10 pares de base llevó a diseñar series de sondas para evaluar el posible efecto de la fase rotacional además de la extensión de ADN en sí.

La primera serie de sondas se diseñó para probar si el complejo RSC de levaduras purificado en nuestro laboratorio posee la propiedad de hacer *eviction* (desensamble completo del nucleosoma) cuando es reclutado por un factor de transcripción en las condiciones experimentales definidas previamente para otros complejos de la misma forma que lo hace SWI/SNF de levadura (Gutiérrez et al 2007). Para esto se diseñaron sondas con secuencias de unión a Reb1, Cbf1 (control negativo) y Gcn4, factores para los que se han reportado interacciones físicas (con excepción de Cbf1) con alguna de las subunidades no-catalíticas del complejo RSC en levaduras (Gavin y cols 2002, Gavin y cols 2006, Swanson y cols 2006) en especial Reb1, para el cual también se ha postulado que su rol en la apertura de la cromatina en promotores de genes *in vivo* en *S. cerevisiae* se podría acompañarse de una acción conjunta con RSC (Hartley y Madhani 2009) para el establecimiento y/o mantención de regiones libres de nucleosomas. Para cada factor se diseñaron y produjeron sondas para 3

extensiones de ADN entre un borde del core nucleosomal (cuyo posicionamiento se da por la presencia de la secuencia de 147 pb denominada 601), las que son 0, 5 y 10 pares de base. Estas extensiones abordan el aspecto de extensión de ADN en sí y también el de fase rotacional en el perfil de unión del factor y el posterior reclutamiento del complejo a cada sonda.

Otra serie de sondas, utilizadas en análisis que conformaron el cuerpo principal de este trabajo de tesis, se diseñó para analizar la interrelación entre γ SWI/SNF y factores de transcripción que recluten a este complejo (factor Gal4-VP16 en los análisis de esta tesis). Para esto se diseñaron tres sets de sondas con distintas extensiones de ADN entre el sitio de unión Gal4 y la secuencia posicionadora de nucleosomas 601. En el primer set, las sondas (Figura 14) tienen una extensión de 216 pares de bases total y comienzan en un extremo con 147 pb correspondientes a la secuencia 601, quedando ésta arbitrariamente definida como el elemento corriente arriba en las sondas, que se encontrará a la izquierda en los esquemas de éstas y otras sondas. Corriente abajo de la secuencia 601 se encuentra la secuencia de unión de Gal4 (17 pb). Las sondas se diferencian en las extensiones de ADN entre ambos elementos, que son 0, 5, 10, 22 y 27 pares de bases. Al tener todas estas sondas la misma extensión total (216 pb), corriente abajo del sitio Gal4 quedan extensiones variables de ADN, que son de 52, 47, 42, 30 y 25 pb, respectivamente.

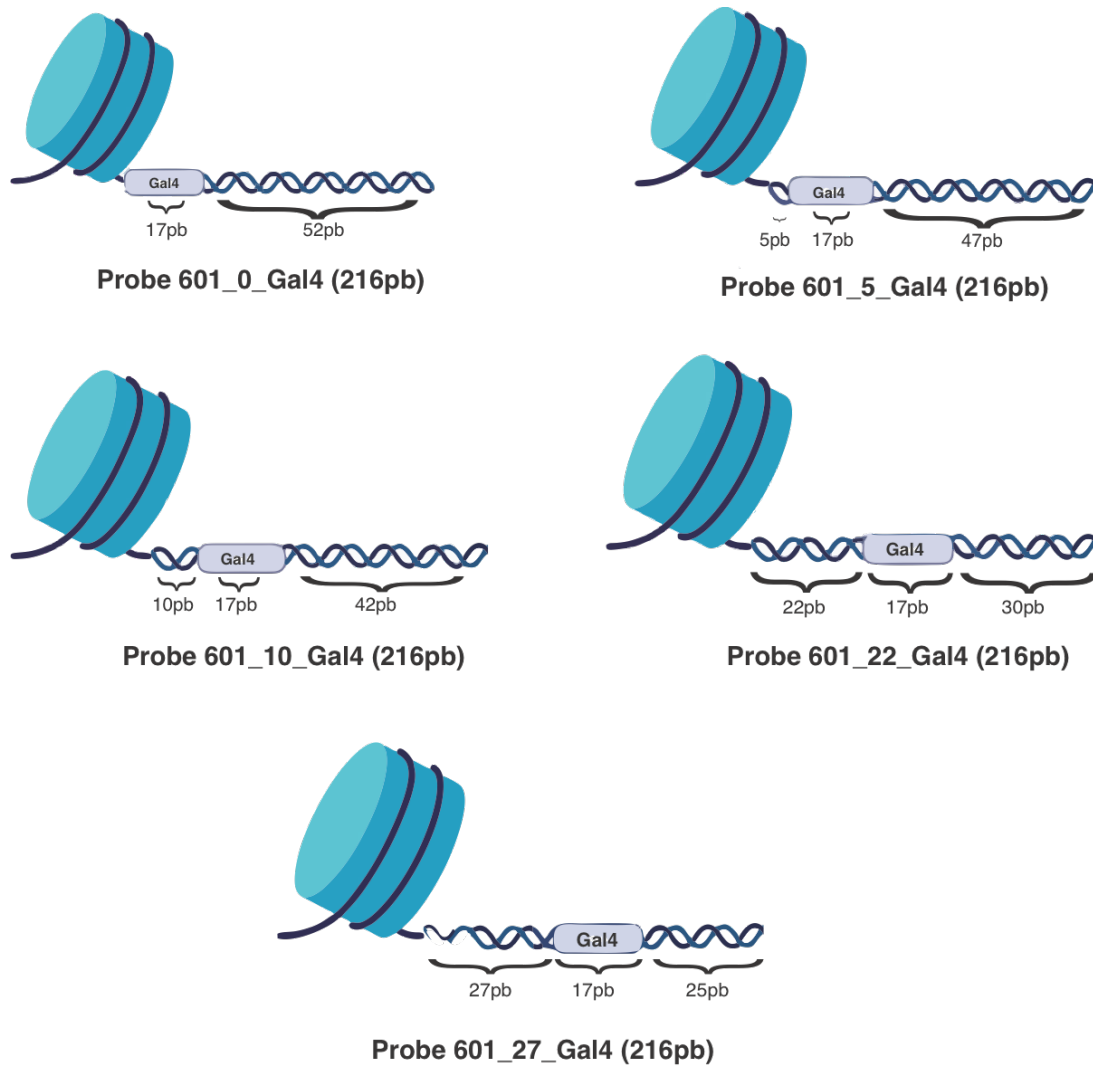


Figura 14: Sondas mononucleosomales de extensión total 216 pb y con extensiones de ADN de 0, 5, 10, 22 y 27pb entre la secuencia 601 (en donde se alojará el core nucleosomal) y la secuencia blanco de Gal4. Sondas mostradas esquemáticamente en su forma reconstituida y con dimensiones en escala sólo aproximada.

El segundo set de sondas (Figura 15) fue diseñado con el sitio Gal4 superpuesto sobre una porción de la secuencia posicionadora 601, con el objetivo de determinar si la unión de Gal4-VP16 en una porción interna del *core* nucleosomal comporta variaciones en su efecto sobre la actividad remodeladora del complejo ySWI/SNF. El sitio Gal4 está superpuesto 4, 8 y 13pb hacia el final de la secuencia posicionadora 601 y el tamaño total de cada sonda es de 216pb. Junto con estas sondas también

se generaron y analizaron sondas con extensiones de 22 y 42 pb entre la secuencia 601 y sitio Gal4, para ser usadas como elemento de comparación.

Finalmente, para determinar si el efecto de Gal4-VP16 sobre ySWI/SNF podría verse afectado por un aumento considerable en la extensión de ADN entre un *core* nucleosomal y el sitio de unión del factor, se diseñaron sondas de extensión total de 244pb (Figura 16). Estas parten con la secuencia posicionadora 601 y tienen 22, 27 y 60pb de extensión entre esta secuencia y el sitio de unión de Gal4. Esta última extensión fue pensada como una que haría menos viable una interacción estable entre Gal4-VP16 y ySWI/SNF sobre el ADN *linker*, en base a la zona del *linker* con la que interacciona el complejo RSC, de la misma subfamilia, que está a 20-40 pb del *core* (Wagner y cols 2020). El mayor largo de estas sondas (244 pb) responde a acomodar el sitio Gal4 para el caso de la mayor extensión de 60 pb, manteniendo la misma extensión global de *linker* en las distintas sondas a comparar.

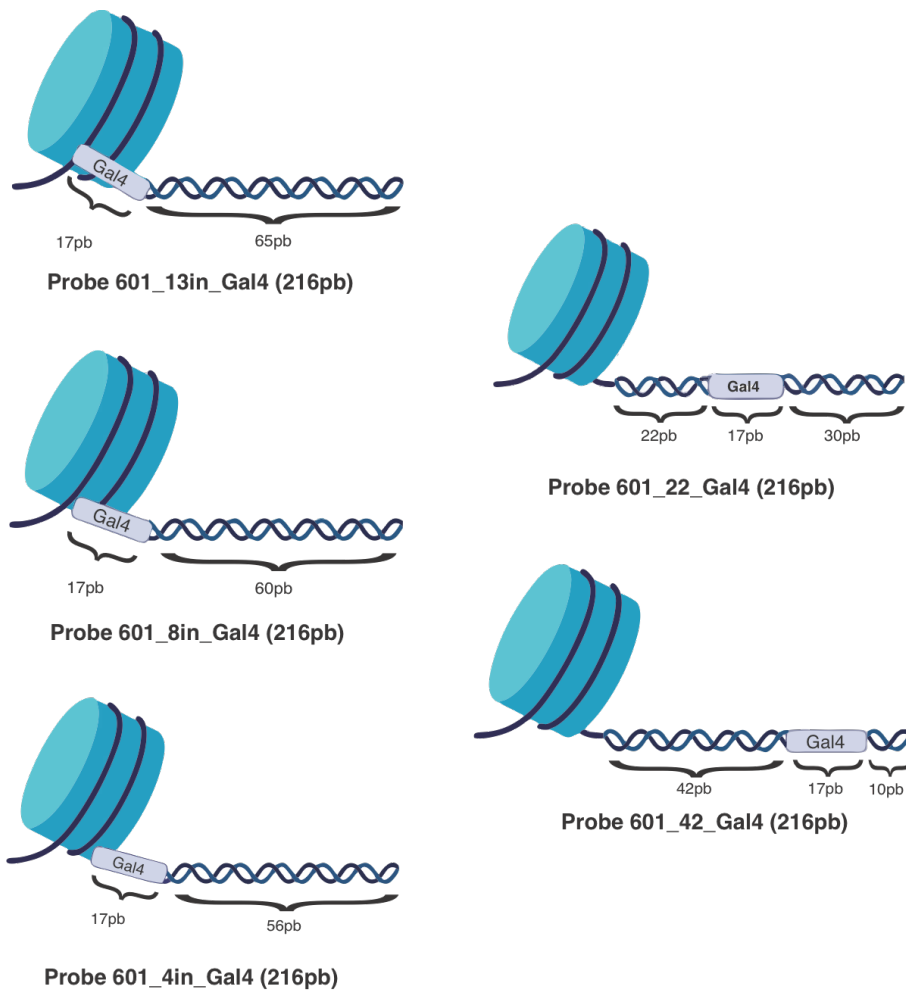


Figura 15: Sondas mononucleosomales diseñadas para extensiones de -13, -8, -4, 22 y 42pb respecto al core nucleosomal. Sondas mostradas esquemáticamente en su forma reconstituida y con dimensiones en escala sólo aproximada.

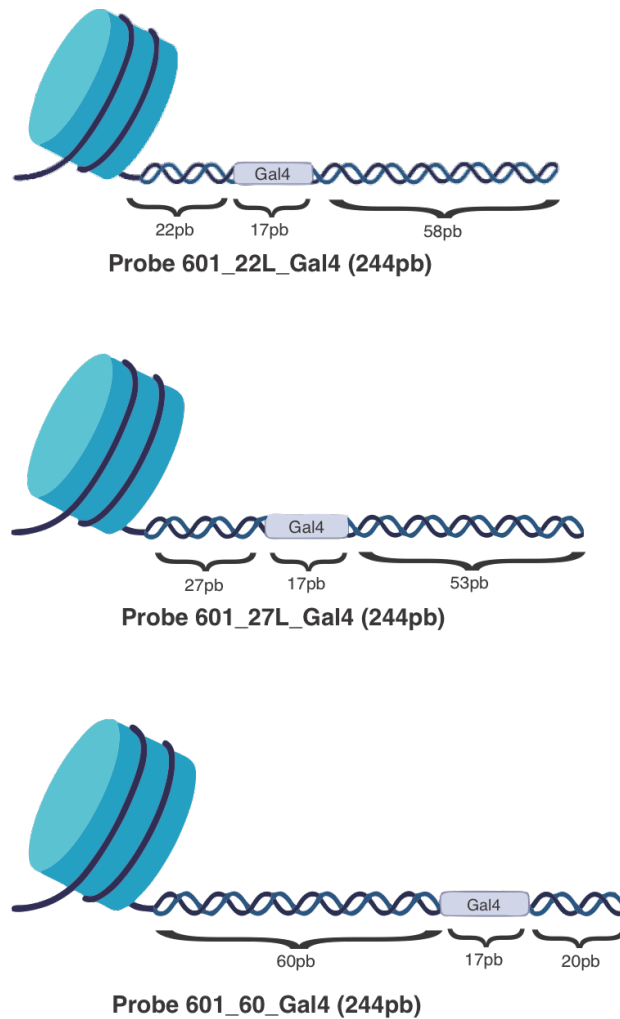


Figura 16: Sondas mononucleosomales de extensión total 244 pb y con extensiones de ADN de 22, 27 y 60pb entre la secuencia 601 (en donde se alojará el core nucleosomal) y la secuencia blanco de Gal4. Sondas mostradas esquemáticamente en su forma reconstituida y con dimensiones en escala sólo aproximada.

Todos los vectores plasmidiales que sirvieron como templado de ADN para la producción de las sondas marcadas fueron, en general, diseñados y generados como está indicado en la sección 3.1 (Figura 11). Los plásmidos generados fueron depositados en el archivo de plásmidos del Laboratorio de Regulación Transcripcional de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

4.1.2) Marcaje y reconstitución de las sondas a la forma de mononucleosomas.

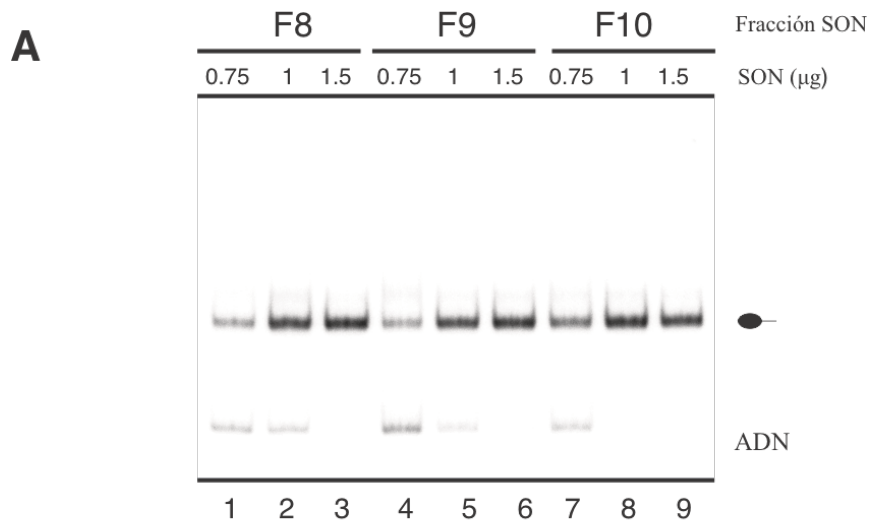
Todas las sondas utilizadas en este trabajo fueron generadas de la forma descrita en la sección 3.2 (Figura 12). A su vez, todas las reconstituciones realizadas durante este trabajo fueron hechas de la forma descrita en la sección 3.2.3 (Figura 13), con una cantidad de SON (*Short Oligonucleosomes*) que varió entre 1 y 1.5 μ g o equivalente²⁵ por reconstitución, dependiendo de la fracción de SON donantes de histonas usada.

Como criterio para determinar el éxito de cada reconstitución se consideró que una reconstitución sobre 90% de los probadores que contienen la secuencia posicionadora 601 es aceptable para realizar los ensayos, criterio que fue medido por análisis electroforético y densitométrico de las reconstituciones realizadas. A su vez durante este trabajo se debieron obtener oligonucleosomas cortos como donantes de histonas más de una vez, por lo que al obtener una nueva purificación se realizaron pruebas de estandarización de la cantidad de donantes de histonas necesarios para cada purificación realizada, de tal manera de mantener los niveles de reconstitución y la estrictez²⁶ base del ensayo en niveles conocidos y controlados (e.g., Figura 17A). Conocer y manejar la estrictez de los ensayos a realizar con los probadores mononucleosomales reconstituidos de esta forma resulta de importancia vital para

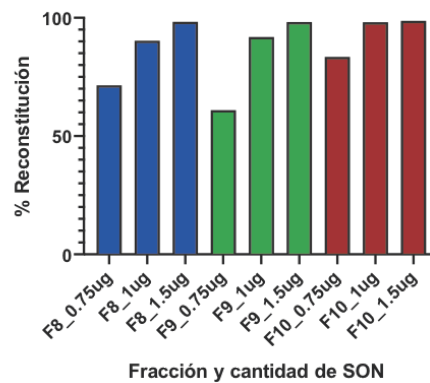
²⁵ “Equivalente” se refiere a reconstituciones realizadas usando volúmenes distintos (por ejemplo, 6,25 μ L inicial hacia 62,5 μ L final), donde la cantidad de todos los componentes se escaló acordeamente.

²⁶ La estrictez base del ensayo proviene de los oligonucleosomas dadores de histonas usados en cada reconstitución. Los dadores (que no tienen marca radioactiva) retoman su estructura nucleosomal terminada la reconstitución. Ya que no son separados de la sonda tras la reconstitución, pasan a “competir” con la sonda por la unión al complejo, lo que define la estrictez. Una mayor estrictez se puede obtener agregando más oligonucleosomas en los ensayos de remodelación (después de haber reconstituido la sonda). Como norma general, se asume que los ensayos de este trabajo que no indiquen que se agregó estrictez adicional tendrán un aproximado de 30ng de oligonucleosomas fríos (en masa de ADN) como estrictez base, que corresponde a una concentración de nucleosomas cercana a 15.4nM [ensayos en 15 μ L finales, con 2.5 μ L (10 fmoles) de sonda mononucleosomal marcada].

gran parte de los ensayos presentados en este trabajo, ya que para poder asegurar que la remodelación de cromatina producida por un complejo en, por ejemplo, un ensayo de *eviction* sobre el probador mononucleosomal, está siendo mediada por una interacción proteína-proteína directa entre el factor de transcripción unido a la sonda y el complejo remodelador de cromatina, el complejo no debe ser capaz de unirse ni remodelar al octámero en ausencia de reclutamiento por el factor. Esto se logra utilizando una cantidad determinada de ADN u oligonucleosomas fríos en la reacción que hayan demostrado experimentalmente ser suficientes para que el complejo no muestre unión ni actividad catalítica apreciables en ausencia de reclutamiento por un factor de transcripción. En el presente trabajo la estrictez base proveniente de la reconstitución mostró ser suficiente para este propósito.



B Grado de reconstitución para diferentes fracciones y cantidades de SON típicamente usadas en nuestros ensayos



C Grado de reconstitución para cada cantidad de SON utilizada independientemente de la fracción

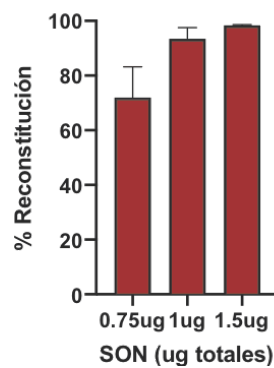


Figura 17: Reconstitución de sondas mononucleosomales con secuencia posicionadora de nucleosomas 601. **A)** Reconstitución analítica de una sonda mononucleosomal, realizada con 3 cantidades distintas de SON de 3 diferentes fracciones de una purificación de SON. **B)** Cuantificación de grado de reconstitución para las tres fracciones de SON agrupadas por cantidad de donantes de histonas utilizados en la reacción (N=3 por cada cantidad de SON). **C)** Cuantificación de grado de reconstitución para las tres fracciones de SON segregados por concentración de donantes de histonas utilizados en la reacción.

4.1.3) Producción de proteínas recombinantes con la propiedad de reclutar complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.

Para la realización de los experimentos conducentes a probar la hipótesis de este trabajo se produjo una serie de proteínas recombinantes que poseen la propiedad de reclutar a los complejos RSC y γ SWI/SNF, según literatura y bases de datos disponibles en línea (e.g., *Saccharomyces* Genome Database²⁷, entre otras). Las proteínas recombinantes producidas para probar el reclutamiento de los complejos RSC y γ SWI/SNF en nuestro modelo experimental fueron Reb1 (Gavin y cols 2002; Gavin y cols 2006), Gcn4 (Swanson y cols 2003; Neely y cols 2002), Cbf1 (control negativo) y Gal4-VP16 (Neely y cols 2002; Gutiérrez et al 2007). Éstas fueron clonadas como está descrito en la sección 3.3.1, posteriormente producidas como está descrito en la sección 3.3.2 y finalmente analizadas como se indica en la sección 3.3.3. Las proteínas fueron obtenidas con un buen nivel de pureza (Figura 18) y subsecuentemente utilizadas para realizar los ensayos de este trabajo.

²⁷ <https://www.yeastgenome.org>

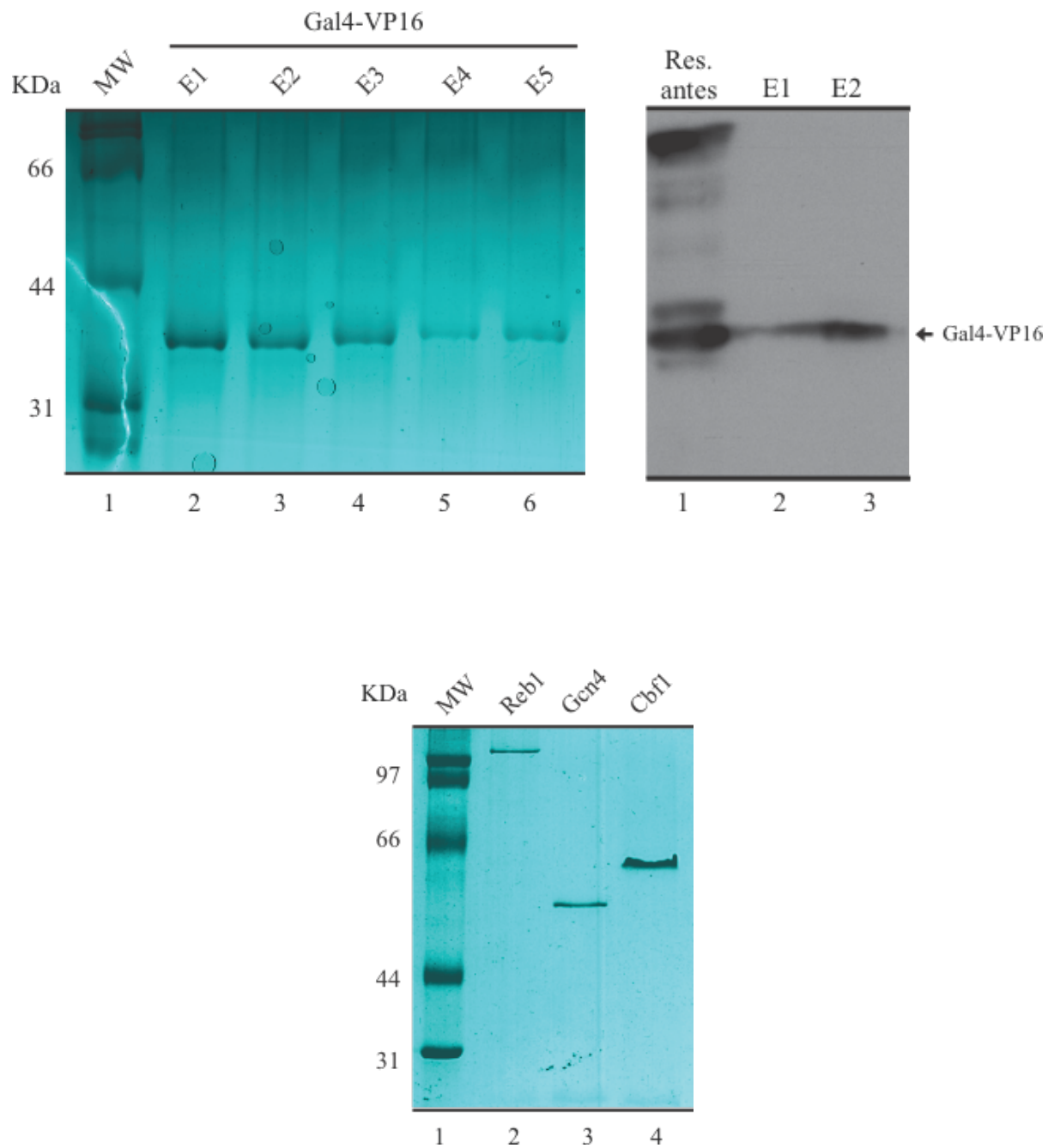


Figura 18: Análisis de la purificación de factores de transcripción recombinantes utilizados en este trabajo. A) Análisis de una purificación de Gal4-VP16 por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. MW: Marcador de peso molecular, E1-E5: Fracciones cromatográficas obtenidas en la purificación. **B)** Detección de Gal4-VP16 por Western Blot. Res. Antes: Resina Ni-NTA antes de eluir las fracciones con Imidazol. **C)** Análisis de purificaciones de Reb1, Gcn4 y Cbf1 por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. MW: Marcador de peso molecular.

4.1.4) Purificación de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP nativos desde *Saccharomyces cerevisiae*.

Los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP de la subfamilia SWI/SNF, como fue mencionado anteriormente, son complejos compuestos de múltiples subunidades (Cairns et al 1994, Treich y Carlson 1997). Esto dificulta considerablemente utilizar una estrategia experimental de purificación utilizando sistemas de expresión recombinantes, ya que esto involucraría la expresión de al menos un grupo de las proteínas del complejo de forma recombinante y una posterior reconstitución del complejo (Phelan et al 1999) y, en ausencia de buena parte del ambiente nativo de maduración de cada una de las subunidades puede haber diferencias en el plegamiento y ensamble del complejo, así como ausencia o cambio en modificaciones post-traduccionales potencialmente relevantes para la actividad del complejo. Por estas razones y otras, se decidió optar por una estrategia de purificación por cromatografía de doble afinidad de los complejos nativos utilizando una cepa de *S. cerevisiae* con una de las subunidades no-catalíticas²⁸ en fusión a un doble epítotope de Proteína A (PA) y Proteína de Unión a Calmodulina (CBP) separados por un sitio de corte para TEV proteasa modificado del método reportado por el equipo de Séraphin (Puig y cols 2001) como está descrito en la sección 3.4.

Las purificaciones de complejos RSC y γ SWI/SNF fueron estandarizadas y ejecutadas varias veces durante el transcurso de esta tesis.

Inicialmente para este trabajo las purificaciones de complejos remodeladores, si bien se basaron en el mismo principio técnico de purificación por cromatografía de doble afinidad y un protocolo ya establecido en el laboratorio, tuvieron dificultades en rendimiento debidas a la dificultad técnica del proceso de purificación, por lo que se

²⁸ Snf6 para el complejo γ SWI/SNF, Rsc2 para RSC e Ioc3 para ISW1a, en variantes de BY4741 modificadas especialmente para este propósito.

realizaron análisis de las etapas de purificación para identificar, por medio de inmunodetección, los pasos donde la mayor parte del complejo quedaba retenido sin pasar eficientemente al siguiente paso (Figura 19, para complejo RSC). La principal dificultad detectada fue la baja eficiencia de corte de la TEV proteasa, que permite tanto la elución en la primera cromatografía de afinidad, como la exposición del segundo epítipo (CBP liberado de Proteína A).

Una vez identificados los pasos que presentaron dificultades se realizaron modificaciones al protocolo de purificación en las distintas etapas que presentaron problemas, por ejemplo, probando varias marcas y lotes de TEV proteasa en paralelo sobre una única purificación, entre otras, lo que llevó al protocolo final descrito previamente en este trabajo. La Figura 20 muestra tinción con plata de fracciones de una purificación estandarizada de complejo γ SWI/SNF, realizada por miembros del laboratorio, y utilizada en estudios del presente trabajo.

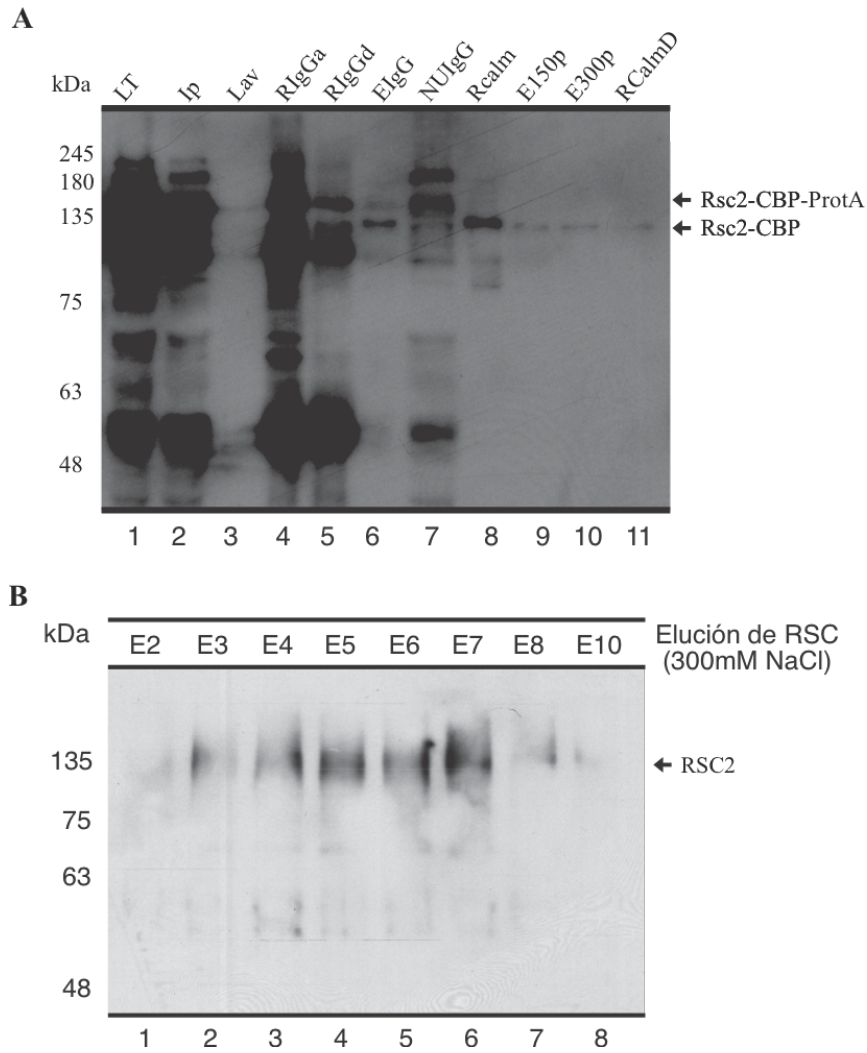


Figura 19: Ejemplo de purificación de complejo RSC nativo desde *S. cerevisiae* según el método descrito en la sección 3.4. Análisis de etapas de purificación y su rendimiento. A) Análisis por Western Blot de las etapas de la purificación del complejo. La altura de migración de la subunidad Rsc2 con los epítopes Proteína A y CBP (Calmodulin Binding Protein) o solo con el epítipo CBP está indicada a la derecha. Carriles 10 y 11 corresponden a eluciones de las fracciones 150mM y 300mM Na/KCl, respectivamente. Demás carriles corresponden a etapas de la purificación. **LT: Lisado total, **Ip**: Input, **Lav**: Pasado de largo de los lavados, **RIgGa**: Resina IgG antes de corte con TEV y elución **RIgGd**: Resina IgG después de corte con TEV y elución, **ElgG**: Eluato después de corte con TEV, **NUlgG**: No-unido a IgG, **Rcalm**: Resina de Calmodulina, **E150p**: Pool de fracciones de elución a 150mM Na/KCl, **E300p**: Pool de fracciones de elución a 300mM Na/KCl, **RCalmd**: Resina de Calmodulina después de eluir. **B**) Análisis por Western Blot de la identidad del complejo y abundancia en las fracciones de elución a 300mM de NaCl obtenidas durante la purificación. La altura de migración de la subunidad Rsc2 con el epítipo CBP está indicada a la derecha.**

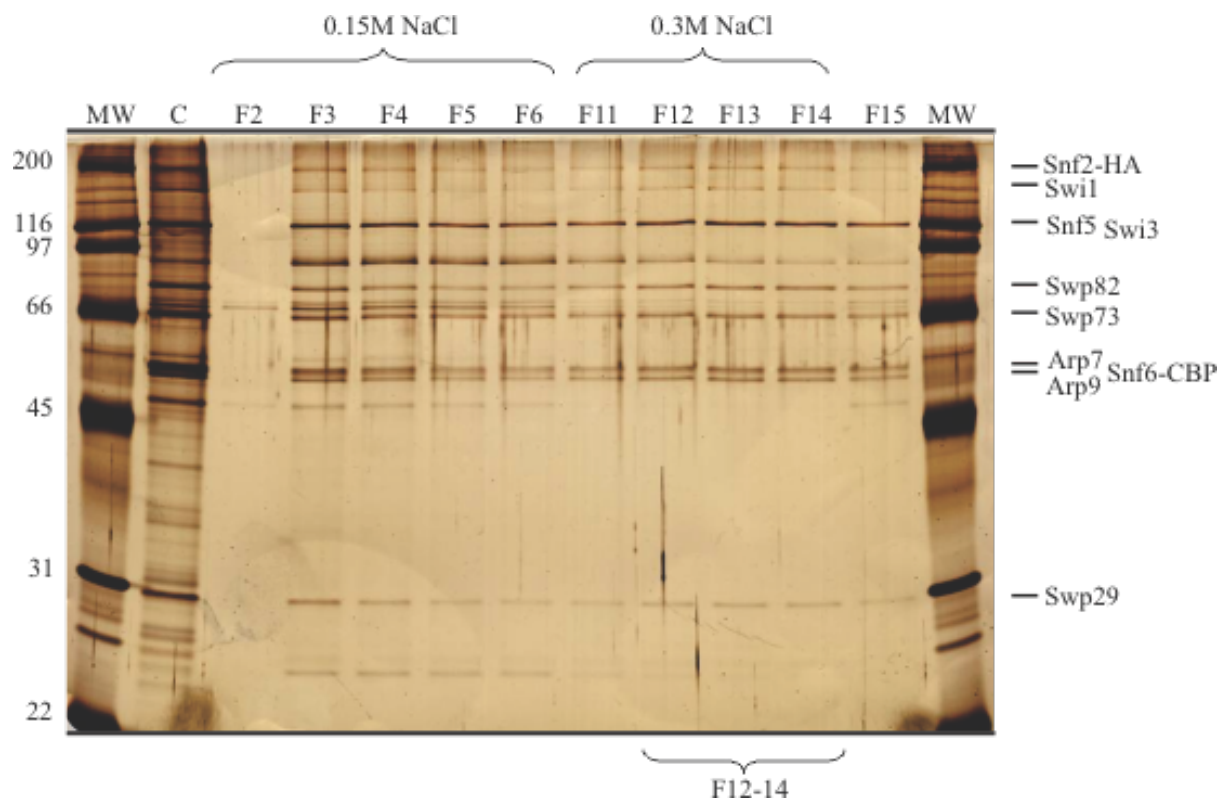


Figura 20: Tinción con plata de fracciones de una purificación de complejo γ SWI/SNF desde *S. cerevisiae*. MW: Marcador de peso molecular²⁹. F2-F15: Distintas fracciones del complejo analizadas. C: Fracción concentrada a partir de conjuntos de fracciones cromatográficas del complejo. El grado de concentración fue de una reducción de volumen de aproximadamente 10 veces.³⁰

En la figura 21 se observa un ensayo de unión de γ SWI/SNF a una sonda a la forma de ADN libre que no contiene oligonucleosomas (que aportan con estrictez) y a una sonda mononucleosomal reconstituida a partir del mismo fragmento de ADN. Todos los ensayos fueron realizados en las mismas condiciones experimentales (sección 3.5.1). Podemos observar en esta figura que, si bien la actividad de unión inespecífica al ADN de distintas fracciones cromatográficas y concentrados del complejo varía, es posible observarla sólo en ausencia de estrictez, debido a que esta se vuelve casi

²⁹ BioRad Unstained Protein Marker Broad Range, cat: 1610317.

³⁰ Para esto se utilizaron columnas Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Unit de 100kDA.

indetectable al medir el grado de unión del complejo a las sondas mononucleosomales reconstituidas. Como se mencionó previamente (sección 4.2.1 y nota al pie adjunta), se requiere de un grado de estrictez mínima en el ensayo para asegurar que la unión del complejo remodelador de cromatina sea posible sólo por el reclutamiento del complejo a la sonda por parte de un factor de transcripción que sea capaz de reclutarlo y que no se produzca unión inespecífica del complejo a la sonda. En ausencia de estrictez o un grado muy bajo de ésta algunas copias de la sonda tendrán unión del complejo mediante reclutamiento por el factor de transcripción y otras copias tendrán unión del complejo sin mediar reclutamiento por el factor de transcripción, enmascarando de esta forma lo que serían variaciones de actividad del complejo en función de la extensión de ADN entre sitio de unión del factor y borde del *core* nucleosomal, que es lo que se busca observar en este trabajo.

Podemos ver que con los aproximadamente 30ng de oligonucleosomas, que son los provenientes de la reacción de reconstitución de la sonda mononucleosomal, es suficiente para evitar que el complejo se una de forma inespecífica y no-mediada por un agente que lo reclute a la sonda, derivándose de esto que cualquier actividad de remodelación del complejo que se observe en los ensayos de este trabajo corresponderá a la fracción de complejo que esté siendo reclutado por el factor de transcripción. De esta forma, si se observan diferencias en el grado de remodelación entre distintas sondas mononucleosomales estas diferencias sólo se deberán a la variación de extensión de ADN entre *core* nucleosomal y el sitio de unión del factor de transcripción que recluta al complejo, mientras no haya variación en la fuerza de interacción del factor de transcripción con su sitio blanco de una sonda a otra (ver abajo).

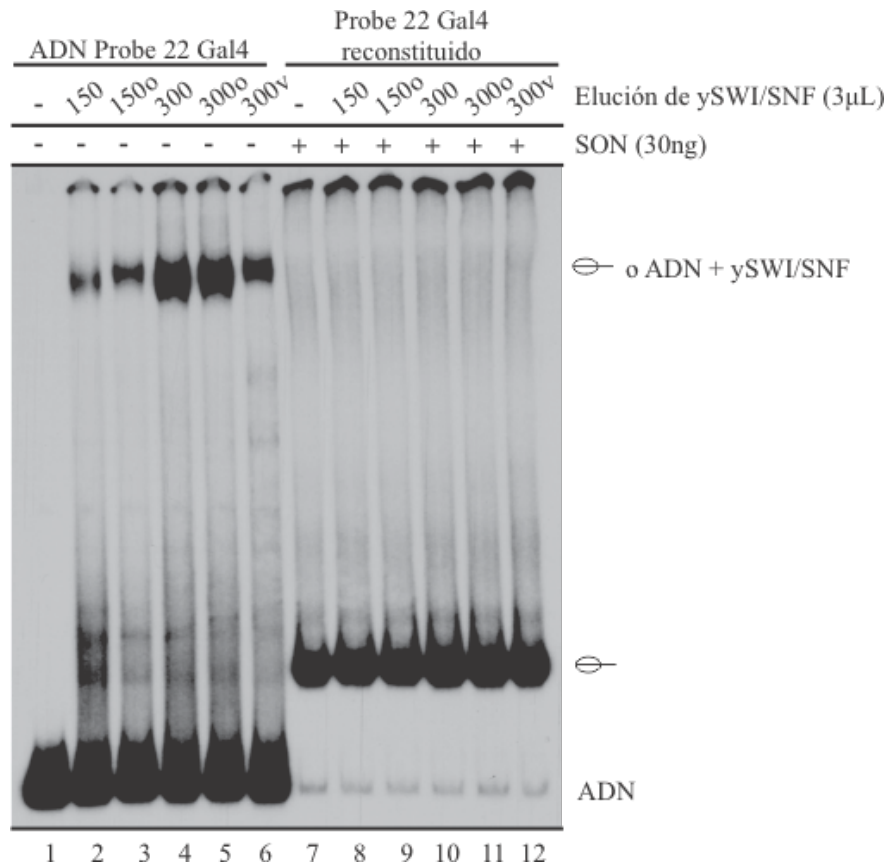


Figura 21: Análisis de la unión a ADN libre y sondas mononucleosomales por el complejo ySWI/SNF purificado desde *S. cerevisiae*. Elución de ySWI/SNF: Distintos conjuntos de fracciones concentradas del complejo ySWI/SNF purificado. **Nucleosoma o ADN + ySWI/SNF:** Migración en el ensayo del complejo binario ADN + ySWI/SNF o Nucleosoma + ySWI/SNF, según sea el caso. La migración en el ensayo del mononucleosoma reconstituido se representa de manera esquemática con un óvalo y una línea. **ADN:** Migración en el ensayo del ADN libre, sin reconstituir, de la sonda usada en el ensayo. **ADN Probe 22 Gal4:** Sonda 601-22-Gal4-30, previamente descrita en la sección 4.1, sin reconstituir. **Probe 22 Gal4 reconstituido:** Sonda mononucleosomal reconstituida a partir del fragmento de ADN previamente descrito. Todos los ensayos usaron la misma cantidad (10 fmoles) de sonda de ADN libre o reconstituido a la forma de mononucleosoma.

4.1.5) Ensayos de unión de factores de transcripción a sondas nucleosomales.

Para poder determinar la concentración óptima de cada uno de los factores de transcripción probados en este trabajo para la ejecución de los posteriores análisis de reclutamiento de los complejos RSC y ySWI/SNF, así como de los posteriores ensayos de remodelación, se realizaron ensayos de unión a las sondas mononucleosomales como está descrito en la sección 3.5.1.

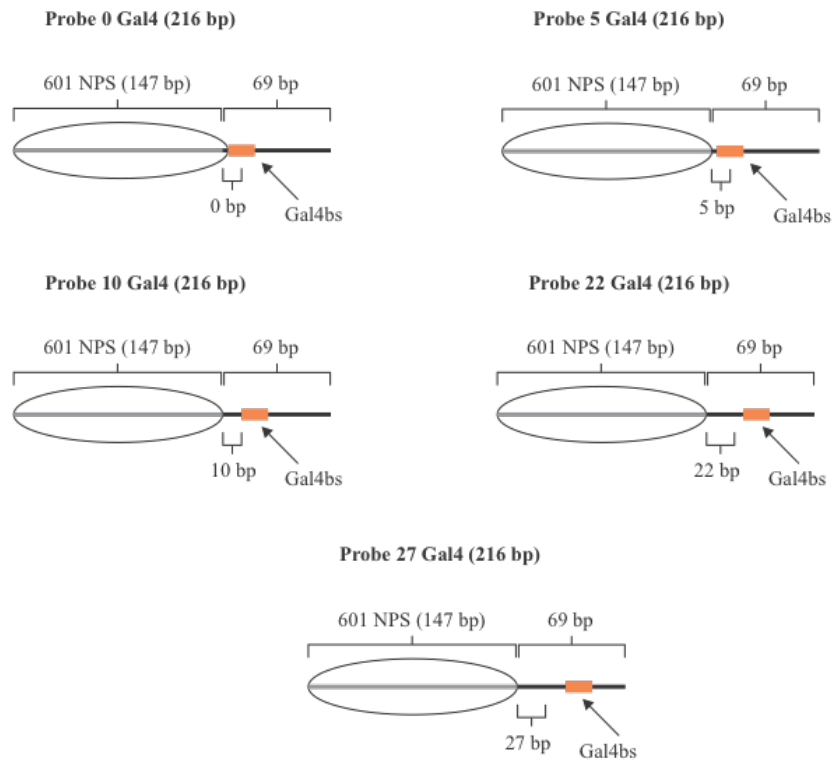
Para todos los ensayos de unión se consideró como óptima la concentración del factor de transcripción en el ensayo como aquella que uniera 90% a 95% de sonda mononucleosomal que posea una distancia de 10pb desde el sitio de unión del factor hasta el borde de la secuencia posicionadora 601, para minimizar la cantidad de sonda marcada sin unir al factor presente en la reacción.

Como se adelantó en la sección 4.1.1, este proyecto de tesis tuvo contemplado analizar el efecto de los factores regulatorios Gcn4, Cbf1, Reb1 y el factor de transcripción quimérico Gal4-VP16 en combinación con los complejos RSC y ySWI/SNF. Para los factores Gcn4 y Reb1, a pesar de tener un buen nivel de pureza e integridad y de mostrar una unión óptima a sus sondas correspondientes (Figura 22), no se observó un efecto sobre la actividad de *eviction* del complejo remodelador de cromatina correspondiente en nuestro sistema de análisis (datos no mostrados), por lo que esa línea experimental fue abandonada y los estudios siguientes dentro de este Objetivo Específico se continuaron con el factor Gal4-VP16 y ySWI/SNF, dado que con este par factor de transcripción-complejo remodelador se obtuvo resultados consistentes con lo previamente descrito en literatura y con estudios previos realizados en el laboratorio.

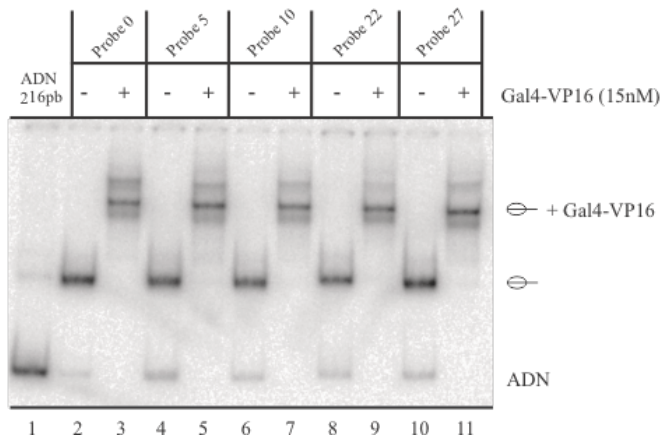
sitio de unión se encuentra íntegro. Esta posibilidad se abre dados los hallazgos hechos respecto del efecto que sobre la afinidad de factores de transcripción por sus sitios tienen secuencias de ADN que flanquean a esos sitios de unión (Rossi y cols 2018).

Por su parte, Gal4-VP16 presenta un alto grado de unión a sondas del rango de extensión desde 0 pb a 27 pb entre borde del core y sitio diana del factor, siendo el grado de unión similar al comparar las distintas sondas (Figura 23). Estos grados similares de unión constituyen un antecedente importante para los posteriores ensayos de reclutamiento y remodelación, ya que, de observarse diferencias en esos ensayos, éstas no pasarían por diferencias en los grados de unión del factor de transcripción. Para la sonda con extensión de 0 pb entre el core y el sitio Gal4, el alto grado de unión, comparado con lo observado con las sondas equivalentes para Reb1, Cbf1 y Gcn4, podría deberse a: i) Ausencia de efecto de secuencias de ADN flanqueantes al sitio Gal4 en las distintas sondas; ii) Ausencia de impedimento estérico por parte del octámero de histonas dado por diferencias de orientación de Gal4-VP16 al unirse a su diana, respecto de lo ocurrido con los otros factores; iii) Que Gal4-VP16, y no Gcn4 ni Cbf1, pueda provocar un cierto grado de desenrollamiento del ADN del core nucleosomal, permitiéndose la estabilización de su unión. Esto último no implicaría necesariamente una desestabilización del nucleosoma, ya que se sabe que los 10 pb de cada extremo del core nucleosomal corresponden a ADN con poca curvatura alrededor del octámero de histonas (Richmond y Davey 2003).

A



B



C

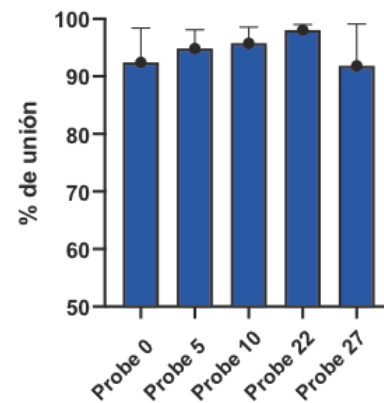
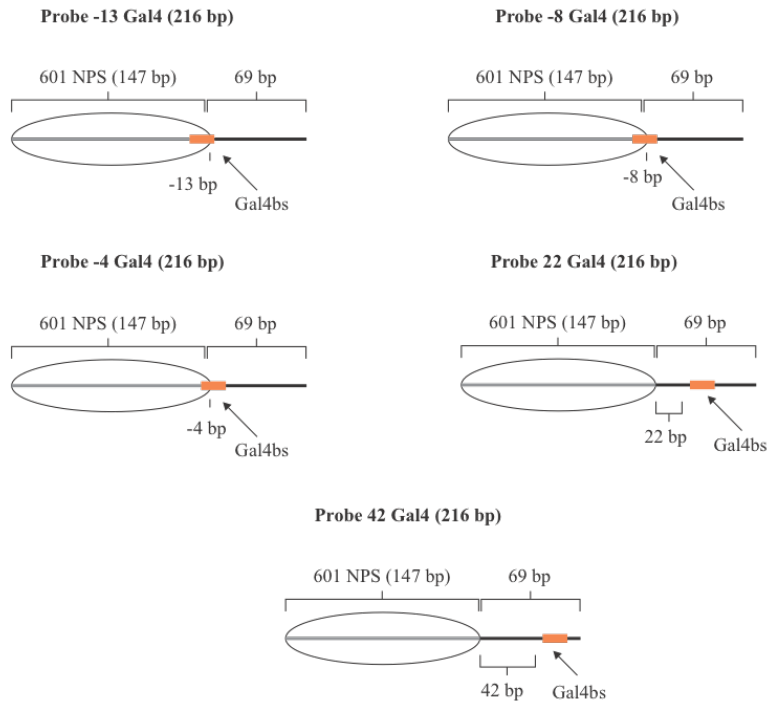


Figura 23: Análisis de unión del factor de transcripción quimérico Gal4-VP16 a sondas mononucleosomales con diferencias en extensión de ADN entre el sitio de unión del factor y el borde del nucleosoma reconstituido. A) Representación esquemática de las sondas analizadas. **B)** Ensayo de unión de Gal4-VP16 a las sondas. La imagen del gel es representativa de tres ensayos independientes realizados bajo las mismas condiciones. La identidad de las sondas y la presencia de Gal4-VP16 se indican en la parte superior de la imagen. **ADN 216pb:** sonda 601_22_Gal4 no-reconstituida como mononucleosoma. **ADN:** Migración del ADN libre. La migración del nucleosoma reconstituido se indica de manera esquemática. **Nucleosoma:** Migración de sonda mononucleosomal. **Nucleosoma + Gal4-VP16:** Migración del complejo binario de la sonda mononucleosomal y el factor unido. **C)** Gráfica de la comparación de grados de unión de Gal4-VP16 a cada sonda mononucleosomal (N=3, media aritmética, dispersión expresada en desviación estándar). Diferencias no significativas de acuerdo a ANOVA.

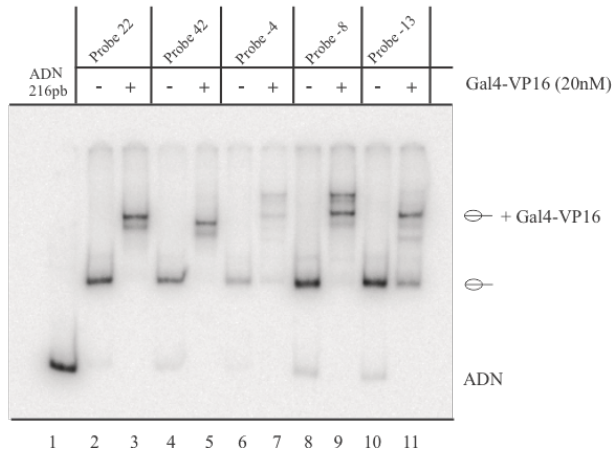
En el caso de sondas nucleosomales con el sitio de unión para Gal4 posicionado a -4, -8 y -13 pb hacia el interior de uno de los bordes del *core*³¹ se observa en general un menor grado de unión del factor a éstas respecto de sondas que no tienen en sitio Gal4 dentro del *core* (Figura 24), lo que sugiere que un mayor impedimento estérico por parte del octámero de histonas.

³¹ Es decir, con parte de la secuencia de unión de Gal4 de 17pb reemplazando los últimos 4, 8 y 13 nucleótidos de la secuencia posicionadora de nucleosomas 601.

A



B



C

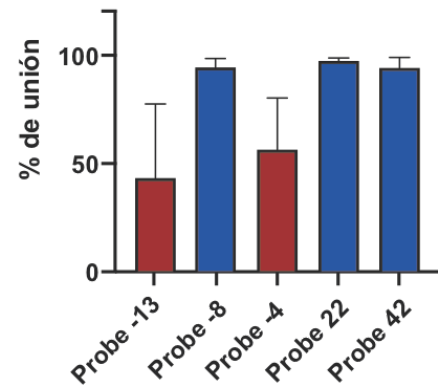


Figura 24: Análisis de unión del factor de transcripción quimérico Gal4-VP16 a sondas mononucleosomales que poseen el sitio de unión del factor en puntos internos del core. A) Representación esquemática de las sondas analizadas. **B)** Ensayo de unión de Gal4-VP16 a las sondas. La imagen del gel es representativa de tres ensayos independientes realizados bajo las mismas condiciones. La identidad de las sondas y la presencia de Gal4-VP16 se indican en la parte superior de la imagen del gel. **ADN 216pb:** sonda 601_22_Gal4 no-reconstituida como mononucleosoma. **ADN:** Migración del ADN libre. La migración del nucleosoma reconstituido se indica de manera esquemática. **Nucleosoma:** Migración de sonda mononucleosomal. **Nucleosoma + Gal4-VP16:** Migración del complejo binario de la sonda mononucleosomal y el factor unido. **C)** Gráfica de la comparación de grados de unión de Gal4-VP16 a cada sonda mononucleosomal (N=3, media aritmética, dispersión expresada en desviación estándar). No se observan diferencias significativas de acuerdo a ANOVA. (IC 95%)

De forma interesante en esta serie de ensayos también observamos que la sonda que tiene su sitio de unión a Gal4 a -8pb de distancia presenta una unión mucho mayor y más reproducible (i.e., menor dispersión) que los probadores -4 y -13, sugiriendo un efecto de la diferencia en la “fase rotacional dentro del core nucleosomal” en la que se encuentra dispuesto el sitio de unión de Gal4 en -8 respecto de -4 y -13, que presentan entre ellas prácticamente la misma fase. Así, al encontrarse el sitio de unión de Gal4 de la sonda -8 a 4 y 5pb de diferencia con respecto a las -4 y -13 respectivamente, el sitio a -8 estaría rotado aproximadamente 180° con respecto a las otras dos sondas, lo que podría relacionarse con una orientación en el espacio de Gal4-VP16 que a -8 sufra menos impedimento estérico por parte del octámero de histonas que con las otras dos posiciones del sitio. Estas diferencias encontradas en grados de unión se deben considerar para evaluar las posibles diferencias en el grado de actividad del complejo ySWI/SNF al interpretar los resultados de los ensayos de remodelación para estas sondas, aunque una comparación directa entre la sonda -8 y las que poseen sitio Gal4 en el ADN linker (casi todas con grado de unión superior a 90% en los ensayos) no requiere de esta consideración. A su vez estos resultados son consistentes con el rol que posee la orientación topológica relativa de los diferentes elementos regulatorios *cis* y *trans* que interactúan en regiones regulatorias de la transcripción³².

Para estudiar el efecto de extensión de ADN sobre la acción conjunta de Gal4-VP16 y ySWI/SNF en un rango más amplio de esta extensión, se optó por generar sondas

³² El comentario se restringe a aspectos topológicos que relacionan presencia del octámero de histonas con unión de factor de transcripción, vinculado a lo descrito para las sondas con sitio Gal4 en regiones internas del *core*. Este aspecto topológico podría también presentarse estando el sitio diana del factor en ADN *linker*, al sumarse un complejo remodelador reclutado por el factor, aspecto que se aborda más adelante.

(denominadas 22L, 27L y 60) con ADN *linker* más largo, con el fin de acomodar el sitio Gal4 en el caso de la extensión de 60 pb y mantener el parámetro de largo total de *linker* sin variación entre esta sonda y las sondas con extensión de ADN menor entre *core* y sitio Gal4 (largo total de sondas es 244pb). Al analizar el patrón de reconstitución de estas sondas, se pudo observar dos bandas nucleosomales. En base a estudios previos (Gutiérrez y col, 2007), la banda nucleosomal de migración mayor correspondería a octámero en posición lateral en el fragmento de ADN (octámero ubicado sobre la secuencia posicionadora 601), mientras que la banda nucleosomal minoritaria de migración menor correspondería a octámero ubicado en una porción más central de las sondas (Figura 25). Consistente con estas ubicaciones traslacionales del octámero de histonas, el grado de unión de Gal4-VP16 a la especie nucleosomal de mayor migración es fuerte (octámero en posición lateral, sobre secuencia 601) y no varía mayormente entre las sondas. En cambio la unión del factor a la especie nucleosomal de menor migración (octámero en posición central) se observa como más débil, lo que podría deberse a la inclusión del sitio Gal4 dentro de ADN de *core* nucleosomal en esta especie.

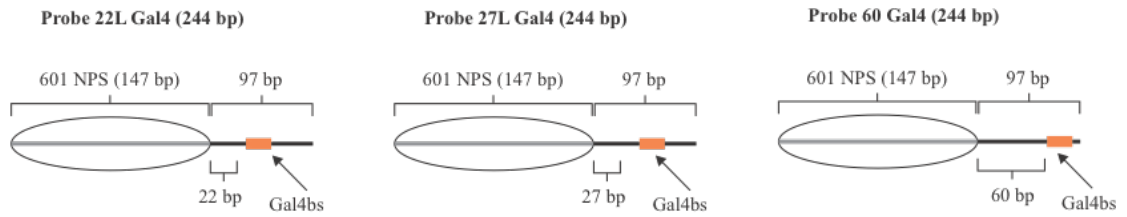
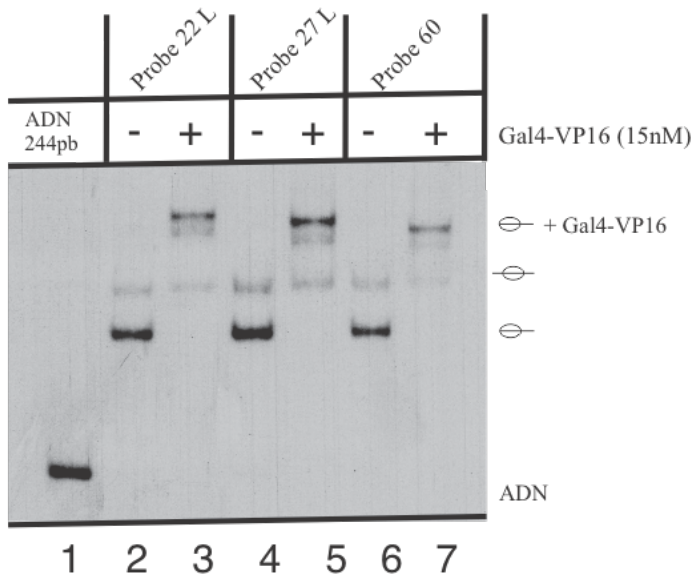
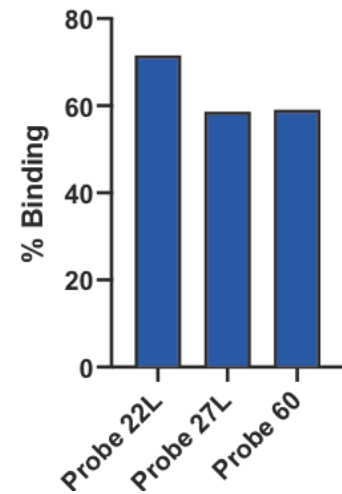
A**B****C**

Figura 25: Análisis de unión del factor de transcripción quimérico Gal4-VP16 a sondas mononucleosomales con un mayor rango de diferencia en extensión de ADN entre el sitio de unión del factor y el borde del core nucleosomal. A) Representación esquemática de las sondas analizadas. B) Ensayo de unión de Gal4-VP16 a las sondas. La identidad de las sondas y la presencia de Gal4-VP16 se indican en la parte superior de la imagen. **ADN 244pb: sonda 601_22L_Gal4 no-reconstituida como mononucleosoma. **ADN**: Migración del ADN libre. La migración de las formas nucleosomales de las sondas se indica de manera esquemática (octámero en posición lateral o central). **Nucleosoma + Gal4-VP16**: Migración del complejo binario de la sonda mononucleosomal y el factor unido. C) Gráfica de la comparación de grados de unión de Gal4-VP16 a cada sonda mononucleosomal. Población nucleosomal central fue considerada como “no-unido”.**

4.1.6 Ensayos de reclutamiento de complejos remodeladores de cromatina por factores de transcripción a sondas nucleosomales

Las diferencias en el grado de acción conjunta de un complejo remodelador y el factor que lo recluta sobre distintas sondas nucleosomales, para un mismo porcentaje de unión del factor a todas las sondas, podrían deberse a variaciones en el grado de reclutamiento del complejo. Por esto, se analizó el reclutamiento del complejo ySWI/SNF por el factor Gal4-VP16 a sondas a las que previamente Gal4-VP16 mostró igual grado de unión (Figura 26).

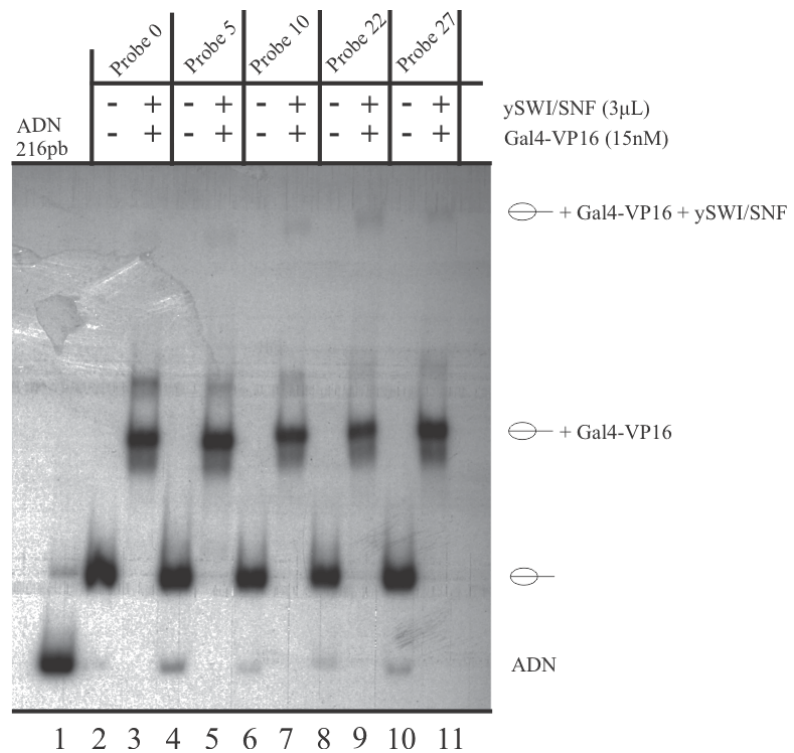


Figura 26: Análisis del reclutamiento del complejo ySWI/SNF por el factor de transcripción quimérico Gal4-VP16 a sondas mononucleosomales con distintas extensiones de ADN entre el sitio de unión del factor y el borde del core nucleosomal. Ensayo de unión de Gal4-VP16 y ySWI/SNF a las sondas. La identidad de las sondas, la presencia de Gal4-VP16 y ySWI/SNF se indican en la parte superior de la imagen. Imagen representativa de una serie de 3 ensayos en condiciones similares. **ADN 216pb:** sonda 601_22L_Gal4 no-reconstituida como mononucleosoma. **ADN:** Migración del ADN libre. La migración del nucleosoma reconstituido se indica de manera esquemática. **Nucleosoma:** migración de la sonda a la forma de mononucleosoma. **Nucleosoma + Gal4-VP16:** Migración del complejo binario de la sonda mononucleosomal y el factor unido. **Nucleosoma + Gal4-VP16 + ySWI/SNF:** Migración del complejo ternario de sonda mononucleosomal, el factor unido y el complejo siendo reclutado por el factor después de la unión del factor a la sonda. Representaciones esquemáticas de las sondas se pueden encontrar en la Figura 23.

Como podemos observar en la figura 26, las bandas tenues correspondientes a la altura de migración del complejo ternario muestran que el grado de reclutamiento en general para todas las sondas en estudio es bajo, por lo que consideramos que una cuantificación es poco informativa en comparación a un análisis cualitativo de los resultados del ensayo. Sin embargo, podemos confirmar reclutamiento del complejo para todas las sondas, aunque con una disminución apreciable para las sondas 0 y 5 en las réplicas realizadas de este ensayo (no mostradas). Ya que Gal4-VP16 muestra el mismo grado de unión a estas sondas respecto de las otras sondas analizadas, sugerimos que el bajo nivel de reclutamiento del complejo a las sondas 0 y 5 podría deberse a un establecimiento de la interacción proteína-proteína entre Gal4-VP16 y ySWI/SNF menos compatible con las interacciones que el complejo debe establecer con el *core* nucleosomal. Como se mencionó en la Introducción, tanto RSC como ySWI/SNF pueden establecer interacción con el ADN *linker* en su unión al nucleosoma (Wagner y col., 2020; Dechassa y col., 2008). Entonces, el conjunto de interacciones de ySWI/SNF con el *core* nucleosomal y, al mismo tiempo, con el *linker* a través de Gal4-VP16 podría ser menos óptimo para las extensiones 0 y 5 que para las demás extensiones analizadas, al menos previo al inicio de la actividad remodeladora del complejo, que es lo analizado en estos ensayos realizados en ausencia de ATP.

4.1.7) Análisis de la acción conjunta de factores de transcripción y complejos remodeladores de cromatina sobre sondas nucleosomales.

Ya establecidas las condiciones experimentales de los ensayos de remodelación (p.ej., concentración de Na/KCl, de cofactores enzimáticos, de factor de transcripción a utilizar, entre otras) y que tanto el factor se une a la sonda y que el complejo es reclutado por el factor, se procedió a realizar una serie de ensayos de remodelación nucleosomal por desplazamiento del octámero en *cis* (*sliding*) y en *trans* (*eviction*).

Estos ensayos se realizaron en las condiciones descritas previamente en la sección 3.5.3 y considerando la información obtenida de los resultados de los ensayos mostrados previamente en las secciones 4.1.5 y 4.1.6.

El grado de desensamble completo del nucleosoma (remodelación en *trans* o *eviction*) es determinado observando en los ensayos la cantidad de ADN desnudo en los carriles donde la sonda está en presencia de ATP, el factor de transcripción y el complejo ySWI/SNF purificado. Esta es comparada con el ADN desnudo en los carriles que contienen los ensayos donde la sonda está en ausencia de factor y complejo.

Con estas consideraciones experimentales en mente, el cálculo procede de la siguiente forma y se expresa como un porcentaje de conversión de ADN nucleosomal a ADN desnudo:

$$[(A-B) / C]*100$$

Donde A representa la señal de la sonda a la forma de ADN desnudo en el carril del ensayo con ATP, complejo y factor, B es la señal de la sonda a la forma de ADN desnudo presente en el carril de sonda sin tratamiento y C es la señal de la sonda a la forma de mononucleosoma en el carril de sonda sin tratar. Las cuantificaciones se realizaron por densitometría, según fue descrito en la sección 3.5.3.

En la figura 27 se muestran los ensayos de *eviction* gatillado por γ SWI/SNF al ser reclutado por Gal4-VP16 a las sondas mononucleosomales -13, -8 y -4, 22 y 42, todas sondas de 216pb. En este análisis llama la atención que el mayor grado de disociación del nucleosoma se hubiese obtenido con una sonda que tiene el sitio Gal4 en una posición interna del core nucleosomal (-4). Si correlacionamos el resultado de este ensayo con el ensayo de unión de Gal4-VP16 a estas sondas (Figura 24) el resultado de bajo grado de disociación del nucleosoma para la sonda -13 resulta esperable, dado el bajo grado de unión del factor a la sonda con el sitio Gal4 en esta posición interna del *core* nucleosomal. El grado de disociación del nucleosoma obtenido para la sonda -8, comparado con la -13, también resulta esperable al observar el alto grado de unión de Gal4-VP16 a la sonda -8 respecto de la -13. No obstante, no hay una correlación entre grado de unión de Gal4-VP16 y nivel de *eviction* al comparar la sonda -8 con la -4. El grado de unión de Gal4-VP16 es mucho más bajo para la sonda -4 (Figura 24) que para la -8, mientras que el nivel de *eviction* es superior para la sonda -4. La misma disparidad de grado de unión de Gal4-VP16 (Figura 24) con nivel de *eviction* se observa al comparar la sonda -4 con las sondas que tienen sitio Gal4 en el *linker* (Figura 27).

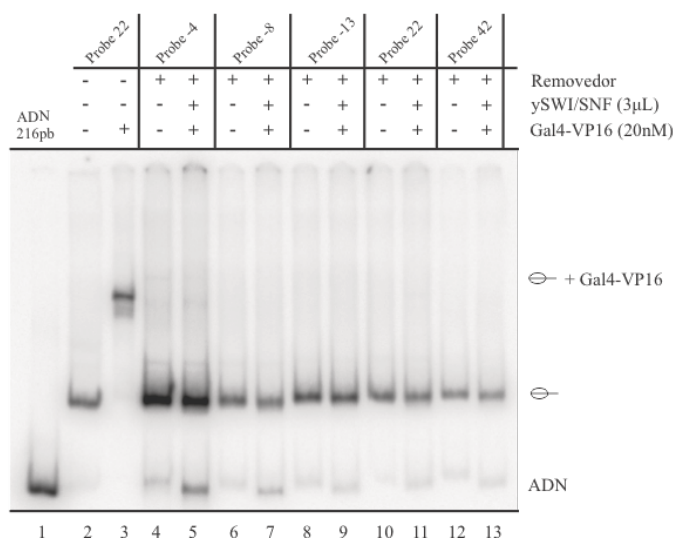
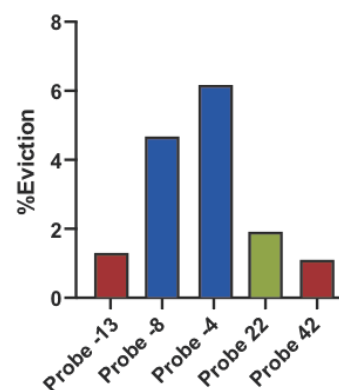
A**B**

Figura 27: Análisis de remodelación nucleosomal por el complejo ySWI/SNF reclutado por Gal4-VP16 sobre sondas mononucleosomales con sitio de unión Gal4 en distintas zonas internas del core nucleosomal y sondas con distintas extensiones de ADN entre sitio Gal4 y borde del core nucleosomal. A) Ensayo de remodelación. La identidad de las sondas, la presencia de Gal4-VP16, del complejo ySWI/SNF y de mezcla de remoción (que permite ver los patrones de remodelación en lugar de los patrones de unión, ver sección 3.5.3 de Materiales y Métodos) se indican en la parte superior de la imagen del gel. **ADN 216pb:** sonda 601_22_Gal4 no-reconstituida como mononucleosoma. **ADN:** Migración del ADN libre. La migración del nucleosoma reconstituido se indica de manera esquemática. **Nucleosoma:** Migración de sonda mononucleosomal. **Nucleosoma + Gal4-VP16:** Migración del complejo binario de la sonda mononucleosomal y el factor unido. **B)** Gráfica de la cuantificación y comparación de los porcentajes de desensamble completo del nucleosoma en las sondas mononucleosomales. Representaciones esquemáticas de estas sondas se pueden encontrar en la Figura 24.

Desafortunadamente no fue posible hacer repeticiones de este ensayo; tampoco ensayos de reclutamiento de ySWI/SNF por Gal4-VP16 a las sondas -13, -8 y -4. Asumiendo que sea reproducible, el resultado sugiere que el mayor grado de disociación del nucleosoma obtenido para la sonda -4 podría deberse a un reclutamiento más eficiente del complejo ySWI/SNF. Esta mayor eficiencia tendría que ser bastante superior que con las demás sondas, dado el relativamente bajo porcentaje de unión observado para la sonda -4 (Figura 24). Un eventual

reclutamiento más óptimo de γ SWI/SNF tiene sustento en los resultados del análisis de reclutamiento de SWI/SNF realizado para otro set de sondas (Figura 26), en donde pudimos observar que el grado de reclutamiento del complejo por Gal4-VP16 puede variar al haber distintas extensiones de ADN entre el *core* nucleosomal y el sitio Gal4. Entonces estaría abierta la posibilidad de que la ubicación del sitio Gal4 en puntos internos del *core* (específicamente, la posición -4) comporte un reclutamiento más eficiente del complejo γ SWI/SNF.

Si continuamos haciendo un recorrido tipo cinemático imaginario desde puntos internos del *core* nucleosomal a puntos más alejados de éste, ahora nos encontramos solo con posiciones del sitio Gal4 corriente abajo de la secuencia posicionadora 601, revisando qué ocurre con extensiones de ADN muy cortas entre *core* y sitio Gal4, pero no “introducido” en la secuencia 601 (sondas 0, 5 y 10, con 22 y 27 ya vistas operando como extensiones consideradas medias). Como se observó previamente, el grado de unión de Gal4-VP16 a su secuencia diana es el mismo para todas las sondas en este set, mientras que el reclutamiento del complejo, observado en términos cualitativos, es algo mayor para las sondas 10, 22 y 27 que para las sondas 0 y 5 (Figuras 23 y 26 para unión de Gal4-VP16 y reclutamiento de γ SWI/SNF, respectivamente). Esto nos lleva a sugerir que el grado de unión de Gal4-VP16 para las sondas de este set no influencia particularmente el grado de disociación del nucleosoma.

Al observar en la Figura 28 el grado de *eviction* del octámero de histonas para cada una de estas sondas, observamos que el grado de disociación de nucleosoma presentado por la sonda 22 en esta serie mostró ser bastante mayor que el observado

para la misma sonda en la serie anteriormente analizada (Figura 27, probadores internos -13, -8, -4, 22 y 42). Las condiciones para ambos ensayos son químicamente idénticas y las concentraciones de proteínas, ADN y complejo son las mismas, lo que lleva a sugerir una anomalía técnica en el ensayo mostrado en la figura 27³³. Para ese ensayo, existe la posibilidad que por error técnico o degradación del complejo en uso la actividad de remodelación haya sido en general menor, en cuyo caso el valor de porcentaje de *eviction* de la sonda 22 (única sonda común en los ensayos de Figuras 27 y 28) de la Figura 27 no debería considerarse comparable con el obtenido en el análisis de la Figura 28.

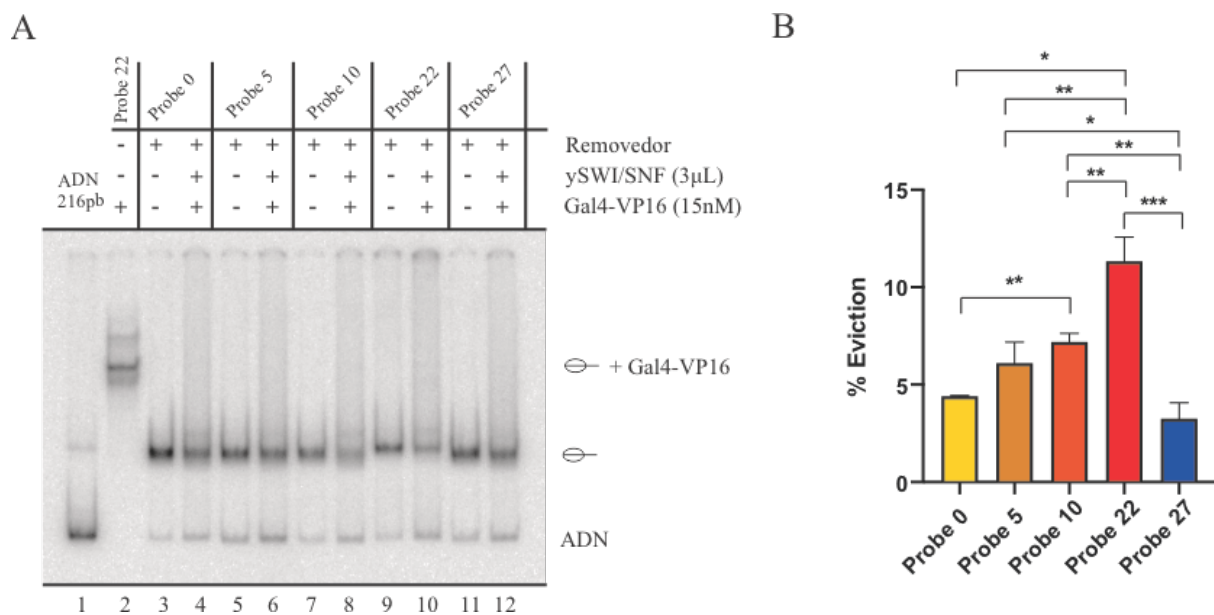


Figura 28: Análisis de remodelación nucleosomal por el complejo ySWI/SNF reclutado por Gal4-VP16 sobre sondas mononucleosomales con distintas extensiones de ADN entre sitio Gal4 y borde del core nucleosomal. A) Ensayo de remodelación. La imagen del gel es representativa de tres ensayos independientes realizados bajo las mismas condiciones. La identidad de las sondas, la presencia de Gal4-VP16, del complejo ySWI/SNF y de mezcla de remoción se indican en la parte superior de la imagen del gel. **ADN 216pb:** sonda 601_22_Gal4 no-reconstituida como mononucleosoma. **ADN:** Migración del ADN libre. La migración del nucleosoma reconstituido se indica de manera esquemática. **Nucleosoma:** Migración de sonda mononucleosomal. **Nucleosoma + Gal4-VP16:** Migración del complejo binario de la sonda mononucleosomal y el factor unido. **B)** Gráfica de la cuantificación y comparación de los porcentajes de desensamble completo del nucleosoma en las

³³ En cuyo caso preliminarmente lo razonable sería considerar sólo los resultados mostrados en la Figura 28 para la sonda 22 debido a que esta serie considera más réplicas experimentales del ensayo.

sondas mononucleosomales. (N=3, media aritmética, dispersión expresada en desviación estándar). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas, de acuerdo a ANOVA seguido de test de Tukey de comparación múltiple ($p = *0.05$, $**0.01$, $***0.001$). Representaciones esquemáticas de estas sondas se pueden encontrar en la Figura 23.

Al volver a las demás distancias consideradas en la serie de ensayos de la Figura 28, observamos una tendencia al aumento en el grado de *eviction* a medida que la extensión de ADN entre sitio Gal4 y borde del *core* nucleosomal se hace mayor, con la excepción de la sonda 27, la cual muestra el menor grado de *eviction* en el set. De todos modos, análisis posteriores comparando nuevamente las extensiones de 22 y 27 pb muestran un nivel de disociación del nucleosoma para la extensión de 27 similar a la extensión de 22 (ver más abajo). Entonces, los resultados de esta serie de experimentos sugieren que a medida que se incrementa la extensión de ADN entre el sitio Gal4 y el borde del *core* nucleosomal, la actividad de *eviction* del complejo se incrementa hasta un límite que estaría en torno a los 22 pares de bases. Este fenómeno podría explicarse por haber en el rango de extensiones de 0 a 10 pb un nivel menos óptimo para la formación del complejo ternario Nucleosoma-Factor de transcripción-Complejo. A esto se sumaría que con extensiones cortas de ADN hay menos flexibilidad de rotación y doblamiento del ADN para acomodar las interacciones entre proteínas asociadas a éste, lo que impediría al sistema adoptar posiciones más favorables para que la reacción inicie de forma óptima.

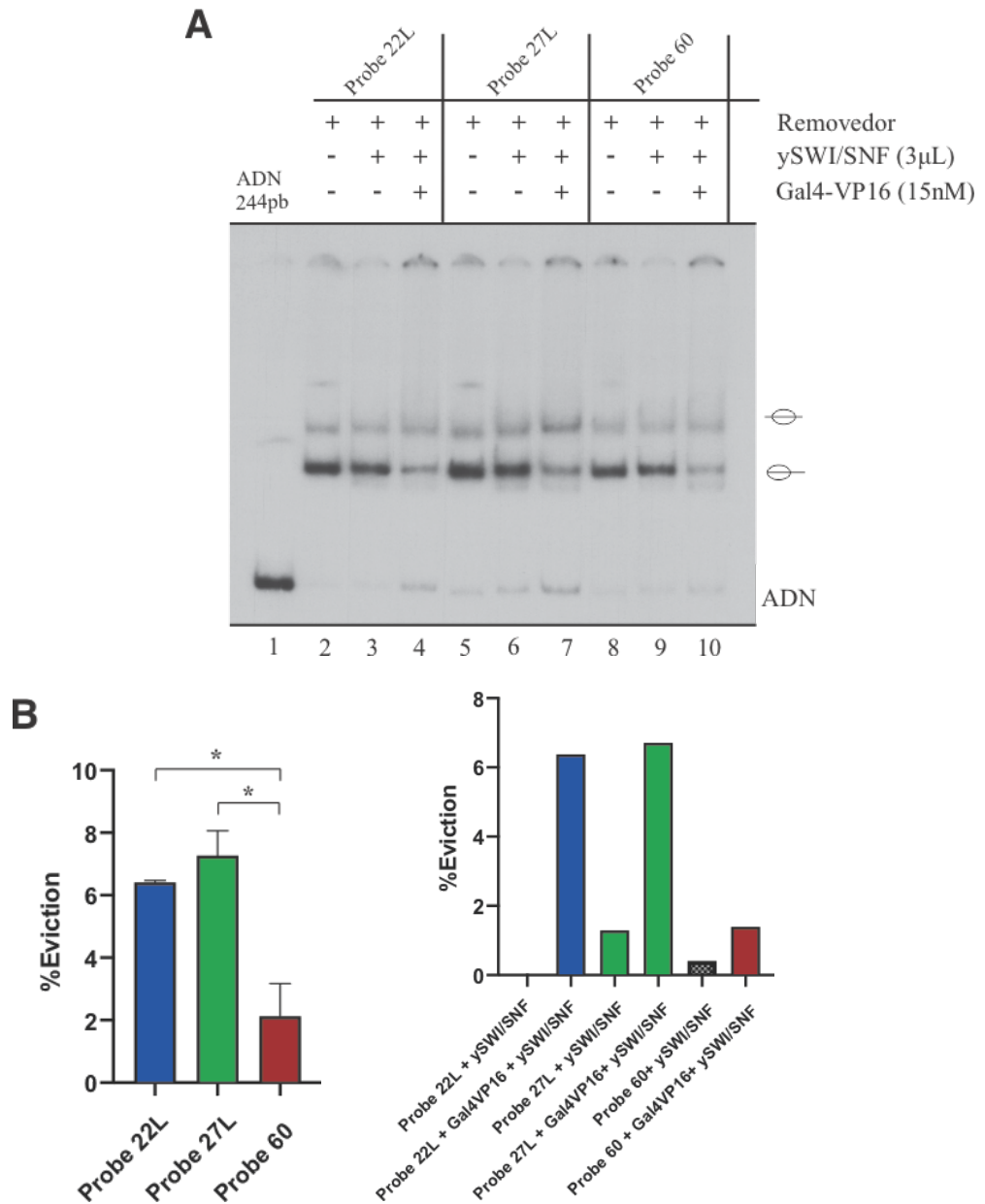


Figura 29: Análisis de remodelación nucleosomal por el complejo ySWI/SNF reclutado por Gal4-VP16 sobre sondas mononucleosomales con diferencias de rango más amplio extensión de ADN entre sitio Gal4 y borde del core nucleosomal. A) Ensayo de remodelación. La imagen del gel es representativa de tres ensayos independientes realizados bajo las mismas condiciones. La identidad de las sondas, la presencia de Gal4-VP16, del complejo ySWI/SNF y de mezcla de remoción se indican en la parte superior de la imagen del gel. **ADN 244pb:** sonda 601_22_Gal4 no-reconstituida como mononucleosoma. **ADN:** Migración del ADN libre. La migración del nucleosoma reconstituido se indica de manera esquemática. **Nucleosoma:** Migración de sonda mononucleosomal. **B)** Gráficas de la cuantificación y comparación de los porcentajes de desensamble completo del nucleosoma en las sondas mononucleosomales. Panel izquierdo: Análisis para la presencia conjunta de Gal4-VP16 y ySWI/SNF (carriles 4, 7 y 10 en “A”; N=3, media aritmética, dispersión expresada en desviación estándar). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas, de acuerdo a ANOVA seguido de test de Tukey de comparación múltiple (* = p 0.05). Panel derecho: Cuantificaciones de un ensayo único en que se incluyó reacciones con presencia de ySWI/SNF y ausencia de Gal4-VP16. Representaciones esquemáticas de estas sondas se pueden encontrar en la Figura 25.

Luego se realizaron ensayos de remodelación de cromatina sobre sondas con un mayor rango de extensión de ADN entre el borde del *core* nucleosomal y el sitio Gal4 (Figura 29, largo total de cada sonda es de 244pb y el ADN *linker* posee una extensión de 97pb en todas las sondas), evaluándose una extensión de 60 pb comparado con las extensiones ya analizadas 22 y 27pb. La sonda con extensión de 60 pb entre *core* nucleosomal y sitio Gal4 fue elaborada con la idea de que en promotores eucariotas los NDRs suelen tener extensiones cercanas a los 120 o 150pb (Clapier 2021), donde el sitio de unión para el factor de transcripción que puede reclutar complejos remodeladores de cromatina se localiza regularmente en el centroide del NDR, independiente de su extensión. Esto lleva a la pregunta ¿Por qué un factor de transcripción no contribuye a que un complejo remodelador despeje la cromatina en una extensión mayor de ADN? Si bien puede haber otros factores que restrinjan el rango en que se da la acción de despejamiento de la cromatina, consideramos que una posibilidad es que una mayor extensión de ADN entre un *core* nucleosomal y el sitio del factor de transcripción que recluta al complejo pudiera implicar una formación menos eficiente del complejo ternario Nucleosoma-Factor de transcripción-Complejo remodelador. La extensión de 60 pb se definió asumiendo un NDR típico para un gen en levaduras de unos 140 pb, pensando en un factor de transcripción posicionado en el centro de esta región, lo que dejaría su sitio de unión con una extensión de ADN cercana a 60pb del borde de cada *core* nucleosomal flanqueante.

En el análisis, en primera instancia observamos que las extensiones de 22 y 27pb no presentan diferencias significativas entre sí en lo que respecta a actividad catalítica del complejo remodelador (Figura 29). Esto es interesante, ya que contrasta con los resultados observados previamente en la Figura 28, donde observamos mayor actividad del complejo con la extensión de 22 pb que con la extensión de 27 pb. Una

posible explicación para esta inconsistencia podría ser que la mayor longitud de ADN linker permita interacciones entre el complejo γ SWI/SNF y el linker que no estén presentes con el linker más corto del ensayo de la Figura 28. El largo de *linker* de sondas de Figura 28 es 69 pb, mientras que es de 97 pb en las sondas de la Figura 29. Sin embargo, no hay descritas interacciones de γ SWI/SNF con ADN linker en el rango de 69 a 97 pb, lo que deja a esta posibilidad como meramente especulativa.

Por otro lado, el análisis muestra con claridad que el nivel de disociación del nucleosoma es marcadamente menor para la extensión entre *core* y sitio Gal4 de 60 pb, comparado con las extensiones de 22 y 27 pb (Figura 29). Ya que el grado de unión de Gal4-VP16 a estas sondas es similar, en lo que respecta a la población nucleosomal con *core* en posición lateral (Figura 25), esta diferencia podría radicar bien en un grado menor de reclutamiento del complejo por parte de Gal4-VP16 o por una acción remodeladora menos eficiente una vez reclutado el complejo.

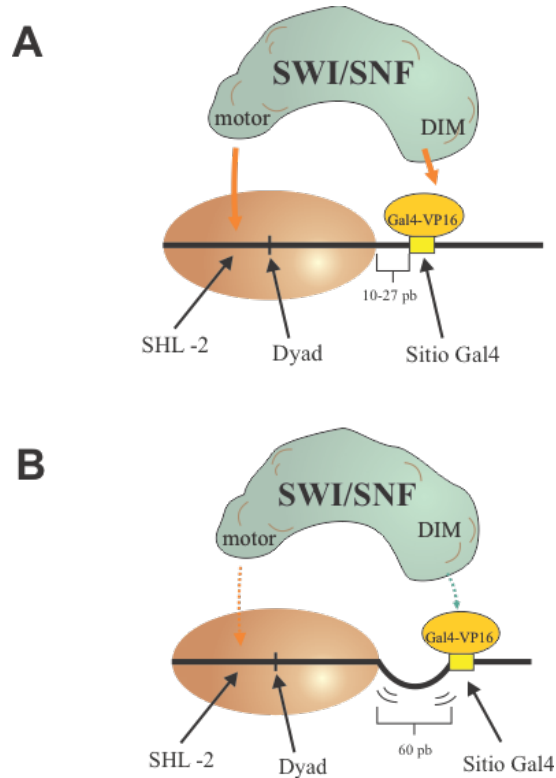


Figura 30: Modelo propuesto para el efecto de la extensión de ADN y otros elementos topológicos en el sistema experimental sobre la actividad de evicción de ySWI/SNF al ser reclutado por un factor de transcripción. A: A extensiones de ADN cortas, compatibles con una extensión de ADN esperada en un NDR ante la invasión o presencia de un nucleosoma, el complejo ySWI/SNF es capaz de localizar los puntos de interacción proteína/proteína y proteína/ADN de una forma estable, sin tensionar estructuralmente el complejo, lo que resulta en una remodelación eficiente. **B:** A mayores extensiones de ADN entre el *dyad* del nucleosoma y el sitio de reclutamiento del complejo, el complejo es tensionado estructuralmente y la disposición entre el sitio catalítico y su sustrato se vuelve menos estable.

Tomados en su conjunto, los análisis de acción conjunta de Gal4-VP16 y ySWI/SNF un funcionamiento del complejo ySWI/SNF que resalta similitudes estructurales y consiguientemente funcionales con el complejo yRSC (Wagner et al, 2020). Por ejemplo, la presencia de un módulo ARP, el cual conecta el dominio que contiene la subunidad catalítica del complejo y que se une al nucleosoma a remodelar con un dominio de unión a ADN linker que se uniría al ADN de salida en ambos complejos, como fue mencionado previamente. El módulo ARP en RSC posiciona al módulo de interacción con el *linker* en el ADN de salida a entre 20 y 30 nucleótidos de distancia del borde del nucleosoma siendo remodelado, por lo que un módulo ARP de similares características y dimensiones en ySWI/SNF explicaría la disminución de actividad del complejo ySWI/SNF en los probadores 42 y 60 comparados con extensiones de ADN más cortas para esta serie de ensayos. Si el módulo ARP es similar en dimensiones y composición entre ambos complejos y en su relación con el DIM, entonces es esperable que la actividad de remodelación de los mismos disminuya si la extensión de ADN entre el dyad del core nucleosomal y el sitio de reclutamiento del complejo es mayor a lo que el módulo permite para una formación de un complejo ternario estable. Esto se observa para los probadores con tramos de ADN más extensos, como los 42 y 60 mencionados previamente (Figura 30).

4.2) Efecto de la presencia y posición relativa del sitio de unión de un factor de transcripción, respecto de la ubicación de un core nucleosomal, sobre la actividad del complejo ISW1a (Objetivo Específico 2).

Continuando en el marco de la idea de que la topología local en un promotor afecta la actividad de complejos remodeladores de cromatina de manera diversa, decidimos analizar el efecto de la ubicación de un sitio de unión para un factor de transcripción relativo a un *core* nucleosomal, ahora dentro del ámbito de factores que puedan interferir con la acción de un determinado complejo remodelador. Como se mencionó en la Introducción, en *S. cerevisiae* se ha observado que factores denominados GRFs posibilitan el establecimiento y mantención de NDRs, pudiendo actuar como barrera para la acción de complejos remodeladores que, como ISW1a, ejercen su acción remodeladora en el sentido de poblar con nucleosomas los NDRs (Parnell y cols. 2015; Clapier, 2021). En este ámbito, estudios recientes en nuestro laboratorio que compararon la capacidad de los principales GRFs de levadura (Reb1, Abf1, Cbf1 y Rap1) para frenar la actividad de *sliding* de ISW1a, han encontrado que solamente Rap1 frena de manera eficiente el *sliding* catalizado por este complejo (Oyarzún, 2022). Con el objeto de profundizar en los mecanismos detrás de este efecto, en la presente tesis se planteó analizar si hay dependencia de la unión de Rap1 a su secuencia diana para ejercer este efecto, así como analizar si el efecto puede variar en función de cambios en la posición relativa de la secuencia blanco de Rap1 respecto del *core* nucleosomal.

4.2.1) Diseño de sondas, plásmidos, marcaje y reconstitución.

Para analizar el efecto que tiene la presencia y posición del sitio de unión de Rap1 respecto de un nucleosoma posicionado sobre la actividad de ISW1a se empleó un sistema que consiste en sondas mononucleosomales marcadas y ensayos de remodelación similares a los descritos previamente, con las modificaciones siguientes: las sondas mononucleosomales utilizadas poseen presencia del sitio de unión para Rap1 o ausencia de éste (presencia de sitio para Abf1 en este último caso). El sitio para Rap1 está ubicado corriente arriba o corriente abajo del *core* nucleosomal, el que se encuentra posicionado por medio de la secuencia 601 (ver Figura 31). Los ensayos de remodelación en este caso apuntan solo a analizar actividad de *sliding* (desplazamiento del octámero en *cis*), ya que ISW1a no posee actividad remodeladora que dé como resultado la disociación completa octámero-ADN del nucleosoma (Clapier y col., 2017). Como se comentó en la Introducción, el complejo ISW1a también posee interacción con ADN *linker*, similar al caso de complejos de la subfamilia SWI/SNF. Sin embargo, en la acción de remodelación los complejos de la subfamilia SWI/SNF alejan al octámero de *linker* con el que interacciona el complejo, mientras que el complejo ISW1a moviliza al octámero hacia el ADN *linker* con el cual interacciona este complejo. A la luz de este fenómeno, se considera que la acción de barrera que haga un factor de transcripción sobre el desplazamiento del octámero mediado por ISW1a puede proceder por unión del factor en el *linker* con el que el complejo interacciona. Los plásmidos con estos diseños se encontraban disponibles en el laboratorio. Su marcaje y reconstitución procedió de la forma en que se describe en Materiales y Métodos y en las secciones 4.1.2 y 4.1.3.

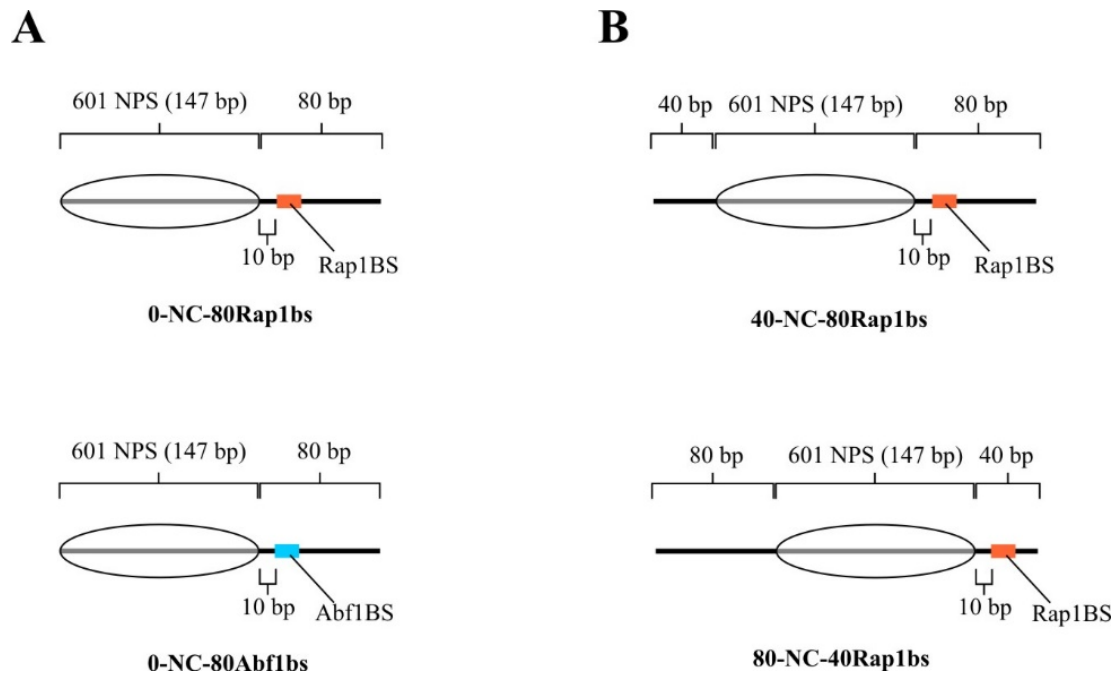


Figura 31: Sondas mononucleosomales diseñadas para sistema Rap1/ISW1a. Sondas mostradas esquemáticamente en su forma reconstituida. 601 NPS: Secuencia posicionadora de nucleosomas 601, Abf1BS y Rap1BS: Sitios de unión para Abf1 y Rap1, respectivamente.

4.2.2) Factor recombinante Rap1 y complejo ISW1a.

Se disponía en nuestro laboratorio de proteína recombinante Rap1 purificada. La proteína fue expresada en bacterias fusionada a epítipo His y purificada por cromatografía de afinidad, obteniéndose con un alto grado de pureza (Oyarzún, 2022). De la misma forma, se disponía en el laboratorio del complejo remodelador ISW1a, el cual fue purificado de la misma forma descrita para los complejos ySWI/SNF y RSC (Amigo y col., 2022).

4.2.3) Ensayos de unión de Rap1 a sondas nucleosomales.

En tanto algunos complejos remodeladores pueden utilizar elementos locales del promotor para “orientar” su acción de remodelación (ver Amigo et al 2023 para el efecto de la secuencia de ADN sobre la dirección y modulación de la actividad de *sliding* del complejo RSC), decidimos probar si la ubicación de un sitio de unión para un factor de transcripción afecta la dirección de remodelación y actividad de los complejos remodeladores de cromatina. Para esto resolvimos utilizar el sistema recién mencionado (Figura 31, sección 4.2.1), con el que se verificó la actividad de *sliding* o desplazamiento en *cis* del octámero catalizado por ISW1a en presencia y ausencia de un factor de transcripción que no es capaz de reclutarlo, pero cuyo sitio de unión se encuentra en el ADN *linker* corriente arriba o corriente abajo del octámero. Los análisis para profundizar en el mecanismo por el que Rap1 bloquea la actividad remodeladora de ISW1a se dividieron en dos aspectos: **1)** Requerimiento de unión de Rap1 al ADN para ejercer este efecto; **2)** Efecto de la ubicación de la secuencia diana de Rap1 relativo al *core* nucleosomal sobre la capacidad de bloqueo.

Los análisis para abordar el primer aspecto recién indicado principalmente tuvieron por objeto descartar que el bloqueo que Rap1 hace sobre la actividad de ISW1a pueda estar mediado por alguna interacción que sea independiente de la unión de Rap1 a su secuencia diana. Para el análisis se usaron las dos sondas descritas en la Figura 30A, una con presencia del sitio de unión para Rap1 y otra con una secuencia para otro factor de transcripción diferente (Abf1). Estas sondas poseen ADN *linker* por solo uno de los bordes del *core* nucleosomal, que es donde se encuentra el sitio de unión de Rap1 (o de Abf1). Al respecto, cabe consignar que se ha descrito que en la interacción de ISW1a con nucleosomas su interacción con ADN *linker* es por el lado

del *core* donde el *linker* sea más extenso, lo que involucra que el octámero será movilizado hacia ese *linker* (Gangaraju y Bartholomew 2007). Primeramente verificamos que el factor de transcripción Rap1 presentara unión a la sonda con su sitio y no a la sonda con sitio Abf1, para lo cual se realizó el ensayo de unión que se muestra en la figura 31A.

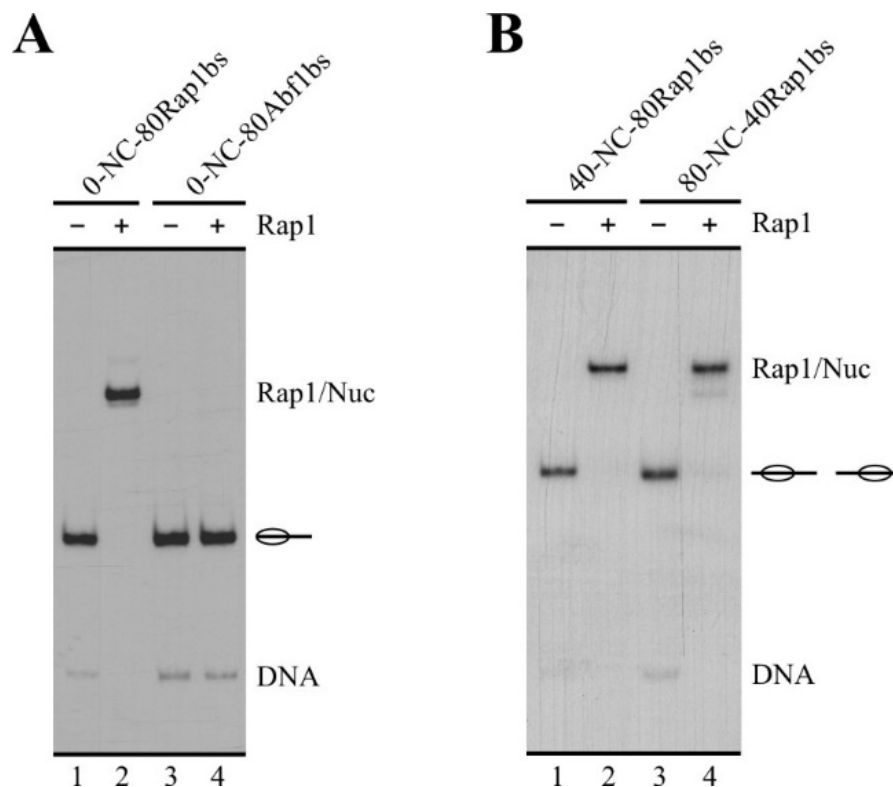


Figura 32: Análisis de unión para el factor regulador Rap1. Sondas mostradas esquemáticamente en su forma reconstituida se presentan en la Figura 30. **DNA:** Migración del ADN desnudo. La migración del nucleosoma reconstituido se indica de manera esquemática. **Nucleosoma con core en posición lateral:** Migración del nucleosoma con core en posición lateral en la sonda. **Nucleosomas con core en posición “semi-central”:** Migración del nucleosoma con core posicionado de forma aproximadamente central. **Rap1/Nuc:** Altura de migración del complejo binario de la sonda mononucleosomal y Rap1 unido. Las imágenes son representativas de tres ensayos independientes realizados en cada caso. La identidad de las sondas y la presencia de Rap1 se indica en la parte superior de cada imagen de gel. **A)** Análisis de unión para presencia o ausencia de sitio Rap1. **B)** Perfil de unión de Rap1 a sondas con su secuencia diana corriente arriba o corriente abajo del core nucleosomal.

El resultado de este análisis demuestra que el sitio específico para Rap1 es requerido para la unión a la sonda y que sitios de unión para otros factores no-relacionados no otorgan unión a Rap1 (Figura 32A).

Los análisis para abordar el segundo aspecto indicado arriba pretendían estudiar si a Rap1 le basta con unirse al ADN en las cercanías de un nucleosoma para bloquear la actividad de ISW1a o si requiere que esa unión se dé específicamente por uno de los *linkers* que flanquean al *core* nucleosomal. Para el análisis se usaron las sondas descritas en la Figura 31B. Estas sondas contienen ADN *linker* por ambos lados del *core* nucleosomal, teniendo ambas sondas un *linker* más extenso que el otro. Ambas contienen el sitio de unión de Rap1, pero una tiene el sitio ubicado en su *linker* largo y la otra tiene el sitio ubicado en su *linker* corto (Figura 31B). Como se mencionó más arriba, en la unión de ISW1a con un nucleosoma su interacción con ADN *linker* es preferencial con el ADN *linker* flanqueante del *core* que sea más extenso, lo que implicará que ISW1a movilice al octámero de histonas hacia ese *linker* más extenso (Gangaraju y Bartholomew 2007). Entonces, en una de las sondas ISW1a movilizará al octámero en dirección al *linker* donde estará unido Rap1 y en la otra sonda movilizará el octámero hacia el *linker* que no tiene unido a Rap1. En el análisis de unión de Rap1 para este set de sondas podemos observar que Rap1 es capaz de unirse con similar eficiencia a ambas sondas, por lo que el grado de unión de Rap1 para los ensayos posteriores de remodelación en presencia de ISW1a es un factor constante para estas sondas, por lo que no debería tener impacto sobre el efecto que Rap1 pueda provocar en la actividad de remodelación producida por el complejo en una sonda o la otra.

4.2.4) Análisis del efecto de Rap1 sobre la actividad de ISW1a.

Los resultados de estos análisis están mostrados en las figuras 33 y 34, donde vemos autorradiografías representativas de la serie de ensayos de remodelación, cuantificación de los grados de sliding y un análisis comparativo para las sondas estudiadas en cada set.

El ensayo mostrado en la figura 33 corresponde al primer aspecto estudiado dentro de este ámbito (requerimiento de unión de Rap1 al ADN para ejercer su efecto de bloqueo de actividad de ISW1a, detallado en sección 4.2.3). Se puede observar que en presencia del sitio de unión de Rap1, este factor bloquea la actividad de sliding en cerca de un 50%. Sugerimos que esta reducción se debe al efecto de “bloqueo” del desplazamiento del octámero que produciría el factor de transcripción unido. A su vez, como se puede observar para la sonda 0-NC-80Abf1bs, la presencia de Rap1 en la reacción es insuficiente para reproducir el efecto, es decir, se requiere que el factor esté unido en su sitio en la sonda para que se observe el efecto, lo que descarta la posibilidad de que Rap1 en solución pueda estar interaccionando con el complejo ISW1a para modular su actividad por medio de interacciones proteína-proteína, por ejemplo.

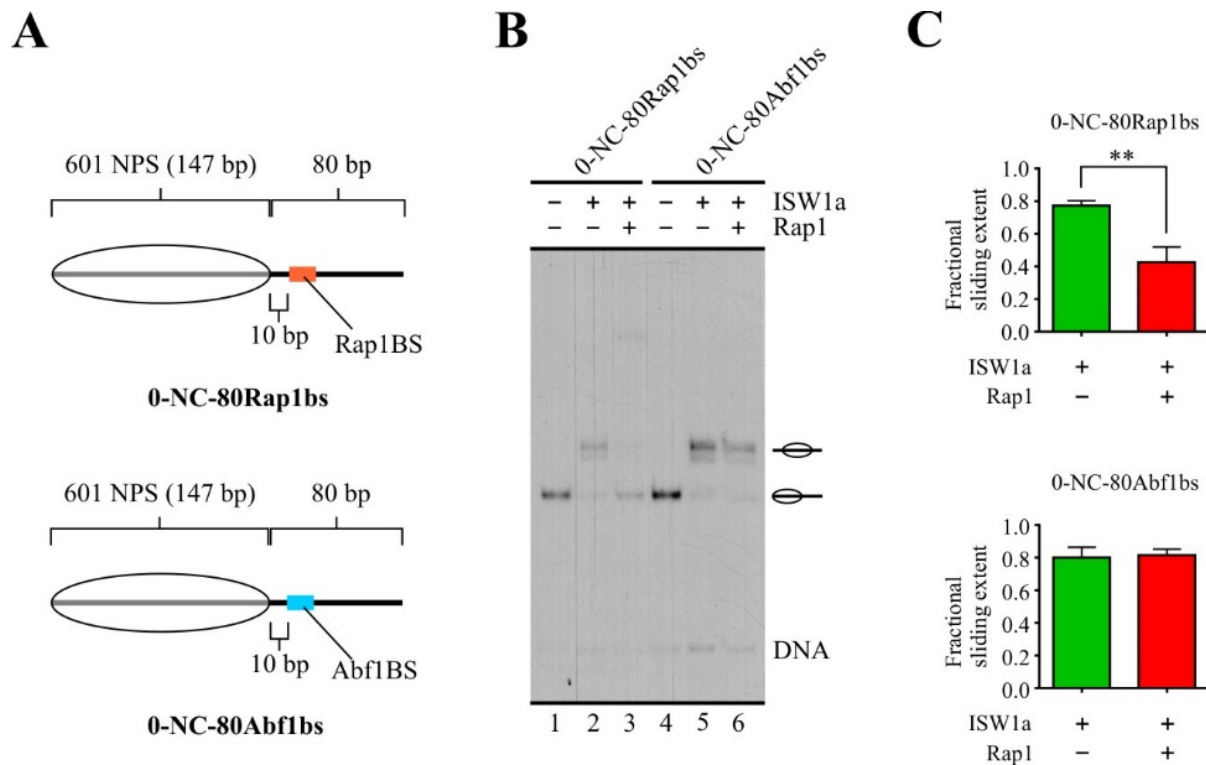


Figura 33: Análisis de requerimiento de la unión de Rap1 a su secuencia diana para su efecto de bloqueo sobre la actividad de remodelación de cromatina ISW1a. **A)** Sondas mostradas esquemáticamente, reproducidas en esta figura para facilidad de interpretación de los ensayos. **B)** Ensayo de remodelación. La imagen es representativa de tres ensayos independientes realizados bajo las mismas condiciones. La identidad de las sondas, la presencia de Rap1 y de ISW1a se indica en la parte superior de la imagen del gel. **DNA:** Migración del ADN desnudo. La migración del nucleosoma reconstituido se indica de manera esquemática. **Nucleosoma:** Migración del nucleosoma con core en posición lateral o central (remodelado) en la sonda. **C)** Análisis comparativo de los grados de sliding obtenidos. El sliding fraccional indicado consiste en la intensidad de la banda correspondiente a nucleosoma remodelado dividido por la suma de intensidades de nucleosoma remodelado y no remodelado.

El ensayo mostrado en la figura 34 corresponde al segundo aspecto estudiado dentro de este ámbito (efecto de la ubicación de la secuencia diana de Rap1 relativo al core nucleosomal sobre la capacidad de Rap1 de bloquear la actividad de sliding de ISW1a, detallado en la sección 4.2.3). En estos ensayos realizados sobre sondas “semi-centrales” (40-NC-80Rap1bs y 80-NC-40Rap1bs, Figura 34A), el efecto esperado para la acción de ISW1a sería que en ambas sondas en ausencia de Rap1

el complejo centralizara el octámero de histonas, dejando aproximadamente igual extensión de ADN extranucleosomal a ambos bordes del *core*. Si observamos los resultados en la Figura 34B, en los carriles 5 y 6, donde vemos la comparación entre la condición ausencia de Rap1 unido y presencia, respectivamente, para la sonda 80-NC-40Rap1bs, observamos que el grado de remodelación producido por ISW1a no se ve alterado por la presencia de Rap1 (ver cuantificación en Figura 34C). El autor interpreta esto como una consecuencia de la acción intrínseca de ISW1a, por medio de la cual el complejo deja extensiones de ADN equivalentes a ambos bordes del octámero (Gangarju y Bartholomew 2007) la cual no se ve impedida por la unión de Rap1 al lado con la extensión de ADN extranucleosomal más corta, que es donde se encuentra el sitio de unión en esta sonda. En este escenario, ISW1a estaría extruyendo ADN nucleosomal hacia el *linker* que contiene Rap1 unido, y la interacción del complejo con el nucleosoma implicaría interacción con el otro *linker* inicialmente más extenso, por lo que la unión del factor a su sitio no impediría la actividad del complejo.

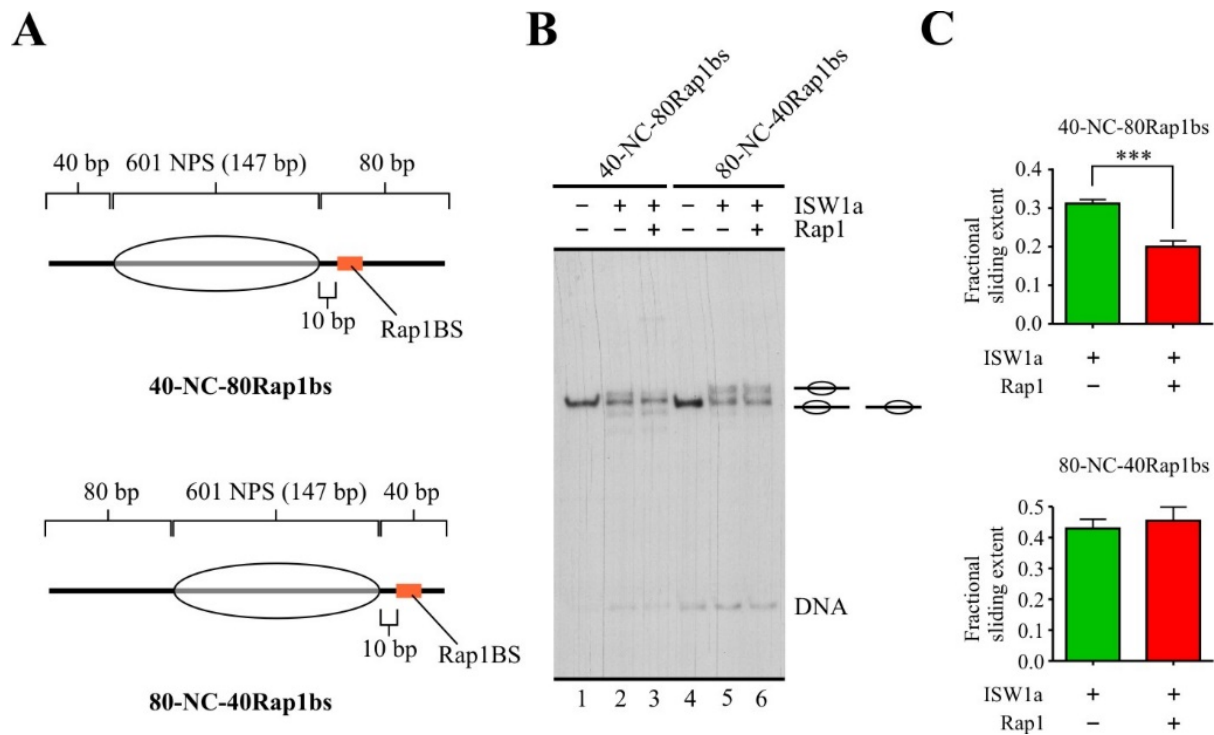


Figura 34: Análisis del efecto de la ubicación de la secuencia diana de Rap1 relativo al core nucleosomal sobre la capacidad de Rap1 de bloquear la actividad de sliding de ISW1a. **A)** Sondas mostradas esquemáticamente, reproducidas en esta figura para facilidad de interpretación de los ensayos. **B)** Ensayo de remodelación. La imagen es representativa de tres ensayos independientes realizados bajo las mismas condiciones. La identidad de las sondas, la presencia de Rap1 y de ISW1a se indica en la parte superior de la imagen del gel. **DNA:** Migración del ADN desnudo. La migración del nucleosoma reconstituido se indica de manera esquemática. **Nucleosoma:** Migración del nucleosoma con core en posición semi-central o central (remodelado) en la sonda. **C)** Análisis comparativo de los grados de sliding obtenidos. El sliding fraccional indicado consiste en la intensidad de la banda correspondiente a nucleosoma remodelado dividido por la suma de intensidades de nucleosoma remodelado y no remodelado.

Si comparamos esto con los carriles 2 y 3 del ensayo (Figura 33B), correspondiente a la sonda 40-NC-80Rap1bs, en estos se observa una marcada reducción de la población nucleosomal que representa el octámero movilizado hacia posición central, la que sería aproximadamente análoga a la población nucleosomal discutida para la sonda 80-NC-40Rap1bs previamente. Para la sonda 40-NC-80Rap1bs la reducción de *sliding* mostrada por el complejo ISW1a es de aproximadamente 40% en presencia de Rap1 unido a la sonda comparado con ausencia de Rap1 unido, por lo que el autor

interpreta que está ocurriendo lo opuesto a lo descrito en la sección anterior. En tanto ISW1a remodelará el nucleosoma intentando centralizar el octámero, en este caso la salida de ADN nucleosomal producto de la remodelación se producirá en dirección opuesta al sitio de unión de Rap1, por lo que al estar unido el factor en el *linker* más extenso a 10pb de distancia del borde desde donde entrará ADN al nucleosoma producto de la remodelación por ISW1a el factor funcionará como una barrera para la remodelación total del nucleosoma, ya sea por impedimento a que este ADN linker pase a formar parte del *core* nucleosomal o por impedimento de la interacción de ISW1a con el *linker* más extenso, ocupado en este caso por Rap1. En tanto la reducción no fue del 100% en el *sliding* en presencia de Rap1, evidentemente estamos observando una fotografía, si se me permite la analogía, de un proceso dinámico, en el que ISW1a será capaz de desalojar al factor unido, logrando un posicionamiento central del nucleosoma en el sistema y habrá poblaciones nucleosomales en las que ISW1a no logre desalojar al factor, lo que se ve reflejado en la reducción en el grado de remodelación observado.

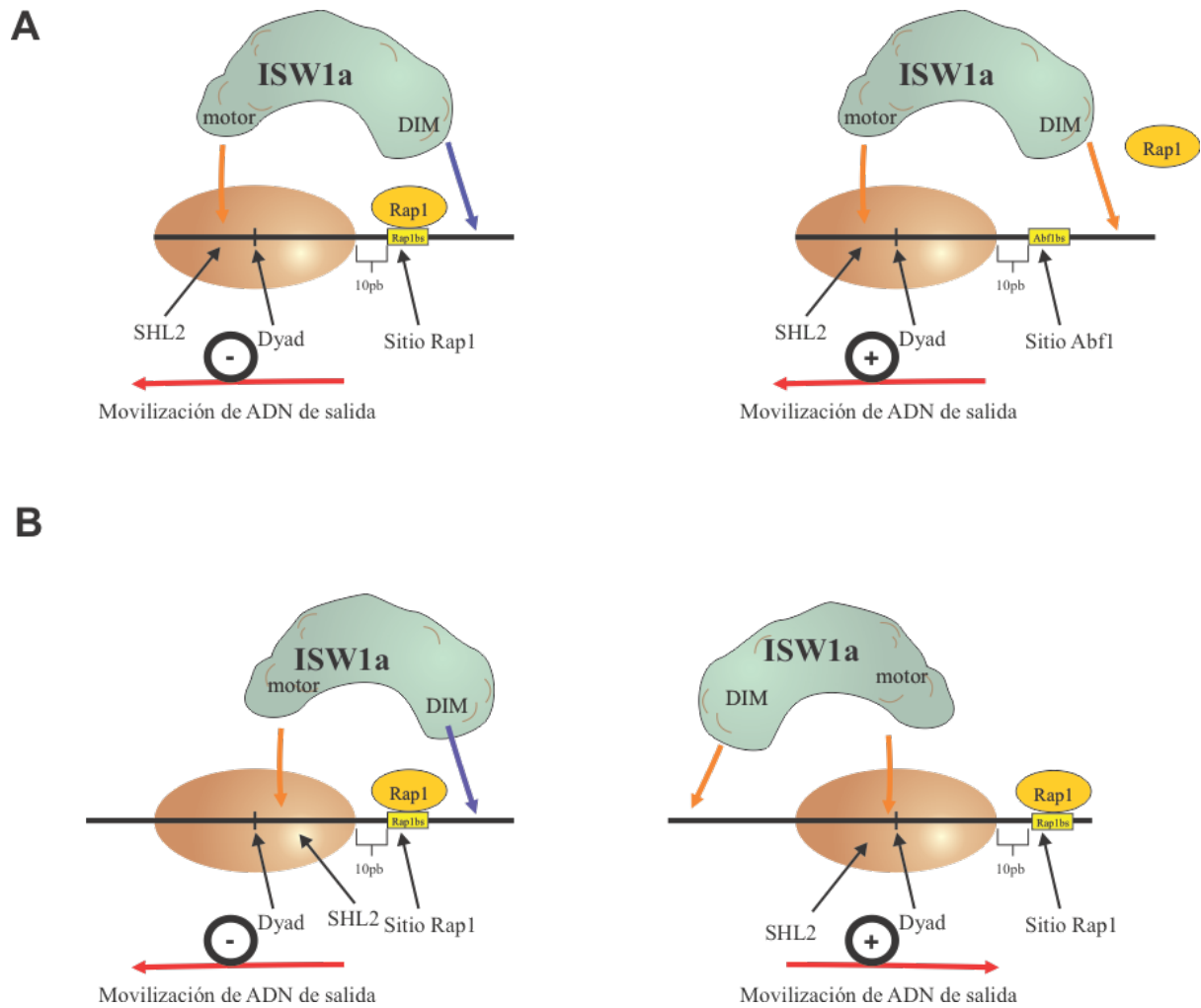


Figura 35: Modelo propuesto para el efecto de bloqueo de la actividad de complejos de la subfamilia ISWI por factores de transcripción unidos a ADN linker **A:** En una sonda mononucleosomal con el core lateralmente posicionado, donde el sitio de unión a ADN (DIM) del complejo sólo tiene un lugar donde anclarse, si hay presente una proteína en ese tramo de ADN, como un factor de transcripción que no recluta al complejo, entonces ésta proteína unida bloqueará la actividad catalítica del complejo. **B:** En una sonda mononucleosomal con el core semi-centralmente posicionado³⁴, el complejo se orientará de tal manera que su DIM interaccione con la extensión de ADN más larga. En este escenario, si un factor de transcripción que no recluta al complejo se encuentra unido al tramo de ADN que quedará como “de entrada”, la actividad del complejo también se verá significativamente disminuida. Color naranja en las flechas indica alta fuerza de unión, magenta indica baja fuerza de unión.

³⁴ Con esto nos referimos a que la extensión de ADN a ambos lados del *core* es diferente.

5. CONCLUSIONES

En base a los resultados presentados en la sección anterior (Resultados y Discusión), las conclusiones derivadas son las siguientes:

- **Para el sistema de ensayos con Gal4-VP16 y ySWI/SNF en general:**

- El grado de unión de Gal4-VP16 fue significativamente menor en un número mínimo de sondas. En todos los casos restantes la unión se observa constante y en rangos de 90%-95% de unión a la sonda marcada. Por esto, salvo en casos puntuales, el grado de unión de Gal4-VP16 parece no afectar las variaciones en la actividad catalítica del complejo ySWI/SNF.

Desde la menor extensión de ADN entre borde del *core* y sitio Gal4 (0 pares de bases entre el nucleosoma posicionado y el sitio de unión para Gal4-VP16) hasta la extensión de 22 pares de bases, la actividad de desensamble del complejo se incrementa. A extensiones mayores (42 y 60 pb) la actividad del complejo remodelador disminuye significativamente, lo que resulta compatible con una posible explicación sobre por qué los complejos remodeladores de la subfamilia SWI/SNF no parecen ser capaces de remodelar nucleosomas que se presentan fuertemente posicionados, como los -1 y +1 en un NDR canónico.

- **Para la sub-serie de ensayos con sondas con sitios para Rap1:**

- En sondas con *core* ubicado en posición lateral (NC-80Rap1bs y NC-80Abf1bs), Rap1 inhibe la actividad de *sliding* del complejo ISW1a, de estar unido el factor a su secuencia diana en el ADN *linker*.

- En sondas con *core* ubicado en posición semi-central (40-NC-80Rap1bs y 80-NC-40Rap1bs) Rap1 inhibe la actividad de *sliding* del complejo ISW1a al estar Rap1 unido a su sitio blanco sólo si su sitio se encuentra presente por el ADN de entrada al nucleosoma durante la reacción catalizada por ISW1a.
- La idea de que un factor de transcripción unido a un promotor pueda afectar la actividad de complejos remodeladores de cromatina no es nueva. Sin embargo, el mecanismo por el cual este fenómeno ocurre en el sistema mostrado con ISW1a implica que no es indiferente la orientación del complejo remodelador con respecto al resto de los elementos topológicos presentes en el sistema, y que esto es debido a la manera en la que los complejos remodeladores orientan sus módulos de unión al ADN extranucleosomal y la dirección en la que su motor ATPasa moviliza el ADN por la superficie del octámero de histonas.

- **En síntesis:**

- Elementos como la extensión de ADN entre un borde del *core* nucleosomal y el sitio de unión de un factor de transcripción, la disposición rotacional de estos elementos, efectos de competición por el mismo tramo de ADN entre estos elementos (e.g., la competición entre un factor de transcripción y un octámero de histonas por ocupar una posición) y la posición de un factor de transcripción con respecto al ADN de entrada o salida de un nucleosoma son elementos de carácter topológico susceptibles de encontrarse en promotores de genes eucariontes que pueden afectar por sí mismos o en conjunto la actividad catalítica de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP. Dentro de este contexto, un factor determinante para

el efecto que pueda tener un factor de transcripción en la actividad de un complejo remodelador será si existe o no interacción física entre el factor y el complejo.

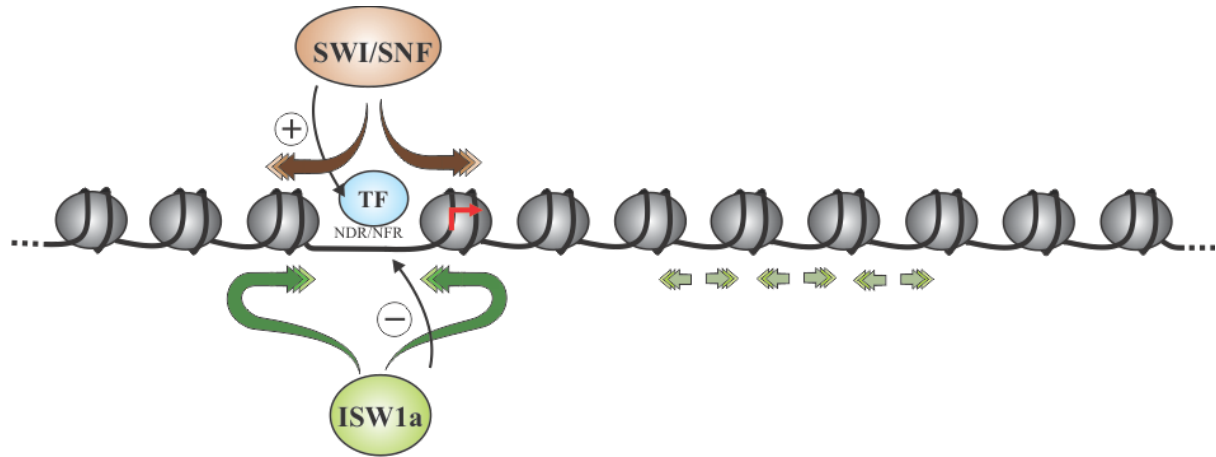


Figura 36: Modelo propuesto para la forma en que factores de transcripción específicos unidos a una región promotora podrían simultáneamente bloquear la actividad de sliding de ISW1a y promover el reclutamiento, actividad y permanencia de complejos capaces de abrir NDRs como los de la subfamilia SWI/SNF (TF: Factor de transcripción con propiedad de unión a una secuencia específica diana en el promotor de un gen, con capacidad de reclutar a SWI/SNF, pero no a ISW1a, +: incremento de la actividad de un complejo, -: disminución de la actividad de un complejo).

6. REFERENCIAS:

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

Amigo, R., Raiqueo, F., Tarifeño, E., Farkas, C. and Gutiérrez, J.L., 2023. Poly (dA: dT) tracts differentially modulate nucleosome remodeling activity of RSC and ISW1a complexes, exerting tract orientation-dependent and-independent effects. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(20), p.15245.

Becker, P.B. and Hörz, W., 2002. ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annual review of biochemistry*, 71(1), pp.247-273.

Cairns, B.R., 2009. The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature*, 461(7261), pp.193-198.

Cairns, B.R., Kim, Y.J., Sayre, M.H., Laurent, B.C. and Kornberg, R.D., 1994. A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, and SNF6 gene products isolated from yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(5), pp.1950-1954.

Cairns, B.R., Lorch, Y., Li, Y., Zhang, M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Du, J., Laurent, B. and Kornberg, R.D., 1996. RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell*, 87(7), pp.1249-1260.

Chen, H., Kharerin, H., Dhasarathy, A., Kladde, M. and Bai, L., 2022. Partitioned usage of chromatin remodelers by nucleosome-displacing factors. *Cell reports*, 40(8).

Chen, K., Yuan, J., Sia, Y. and Chen, Z., 2023. Mechanism of action of the SWI/SNF family complexes. *Nucleus*, 14(1), p.2165604.

Clapier, C.R. and Cairns, B.R., 2009. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual review of biochemistry*, 78, pp.273-304.

Clapier, C.R., 2021. Sophisticated conversations between chromatin and chromatin remodelers, and dissonances in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), p.5578.

Clapier, C.R., Iwasa, J., Cairns, B.R. and Peterson, C.L., 2017. Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. *Nature reviews Molecular cell biology*, 18(7), pp.407-422.

Costanzo, M., VanderSluis, B., Koch, E.N., Baryshnikova, A., Pons, C., Tan, G., Wang, W., Usaj, M., Hanchard, J., Lee, S.D. and Pelechano, V., 2016. A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function. *Science*, 353(6306), p.1420.

Dechassa, M.L., Sabri, A., Pondugula, S., Kassabov, S.R., Chatterjee, N., Kladde, M.P. and Bartholomew, B., 2010. SWI/SNF has intrinsic nucleosome disassembly activity that is dependent on adjacent nucleosomes. *Molecular cell*, 38(4), pp.590-602.

Fenouil, R., Cauchy, P., Koch, F., Descostes, N., Cabeza, J.Z., Innocenti, C., Ferrier, P., Spicuglia, S., Gut, M., Gut, I. and Andrau, J.C., 2012. CpG islands and GC content dictate nucleosome depletion in a transcription-independent manner at mammalian promoters. *Genome research*, 22(12), pp.2399-2408.

Fry, C.J. and Peterson, C.L., 2001. Chromatin remodeling enzymes: who's on first?. *Current Biology*, 11(5), pp.R185-R197.

Gangaraju, V.K. and Bartholomew, B., 2007. Dependency of ISW1a chromatin remodeling on extranucleosomal DNA. *Molecular and cellular biology*, 27(8), pp.3217-3225.

Gavin, A.C., Böschke, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M. and Remor, M., 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, 415(6868), pp.141-147.

Ghassabi Kondalaji, S. and Bowman, G.D., 2022. Reb1, Cbf1, and Pho4 bias histone sliding and deposition away from their binding sites. *Molecular and Cellular Biology*, 42(2), pp.e00472-21.

Grüne, T., Brzeski, J., Eberharter, A., Clapier, C.R., Corona, D.F., Becker, P.B. and Müller, C.W., 2003. Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the remodeling factor ISWI. *Molecular cell*, 12(2), pp.449-460.

Gutiérrez, J.L., Chandy, M., Carrozza, M.J. and Workman, J.L., 2007. Activation domains drive nucleosome eviction by SWI/SNF. *The EMBO journal*, 26(3), pp.730-740.

Han, Y., Reyes, A.A., Malik, S. and He, Y., 2020. Cryo-EM structure of SWI/SNF complex bound to a nucleosome. *Nature*, 579(7799), pp.452-455.

Hartley, P.D. and Madhani, H.D., 2009. Mechanisms that specify promoter nucleosome location and identity. *Cell*, 137(3), pp.445-458.

Hewish, D.R. and Burgoyne, L.A., 1973. Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochemical and biophysical research communications*, 52(2), pp.504-510.

Iyer, V. and Struhl, K., 1995. Poly (dA: dT), a ubiquitous promoter element that stimulates transcription via its intrinsic DNA structure. *The EMBO journal*, 14(11), pp.2570-2579.

Kaplan, N., Moore, I.K., Fondufe-Mittendorf, Y., Gossett, A.J., Tillo, D., Field, Y., LeProust, E.M., Hughes, T.R., Lieb, J.D., Widom, J. and Segal, E., 2009. The DNA-encoded nucleosome organization of a eukaryotic genome. *Nature*, 458(7236), pp.362-366.

Korber, P., 2012. Active nucleosome positioning beyond intrinsic biophysics is revealed by in vitro reconstitution. *Biochemical Society Transactions*, 40(2), pp.377-382.

Kornberg, R.D., 1974. Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA: Chromatin structure is based on a repeating unit of eight histone molecules and about 200 DNA base pairs. *Science*, 184(4139), pp.868-871.

Krietenstein, N., Wal, M., Watanabe, S., Park, B., Peterson, C.L., Pugh, B.F. and Korber, P., 2016. Genomic nucleosome organization reconstituted with pure proteins. *Cell*, 167(3), pp.709-721.

Lai, W.K. and Pugh, B.F., 2017. Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication. *Nature reviews Molecular cell biology*, 18(9), pp.548-562.

Längst, G. and Becker, P.B., 2004. Nucleosome remodeling: one mechanism, many phenomena?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1677(1-3), pp.58-63.

Lee, W., Tillo, D., Bray, N., Morse, R.H., Davis, R.W., Hughes, T.R. and Nislow, C., 2007. A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast. *Nature genetics*, 39(10), pp.1235-1244.

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

Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), pp.251-260.

Mills, R.E., Pittard, W.S., Mullaney, J.M., Farooq, U., Creasy, T.H., Mahurkar, A.A., Kemeza, D.M., Strassler, D.S., Ponting, C.P., Webber, C. and Devine, S.E., 2011. Natural genetic variation caused by small insertions and deletions in the human genome. *Genome research*, 21(6), pp.830-839.

Montgomery, S.B., Goode, D.L., Kvikstad, E., Albers, C.A., Zhang, Z.D., Mu, X.J., Ananda, G., Howie, B., Karczewski, K.J., Smith, K.S. and Anaya, V., 2013. The origin, evolution, and functional impact of short insertion–deletion variants identified in 179 human genomes. *Genome research*, 23(5), pp.749-761.

Mullaney, J.M., Mills, R.E., Pittard, W.S. and Devine, S.E., 2010. Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes. *Human molecular genetics*, 19(R2), pp.R131-R136.

Munshi, A., Shafi, G., Aliya, N. and Jyothy, A., 2009. Histone modifications dictate specific biological readouts. *Journal of Genetics and Genomics*, 36(2), pp.75-88.

Neely, K.E., Hassan, A.H., Brown, C.E., Howe, L. and Workman, J.L., 2002. Transcription activator interactions with multiple SWI/SNF subunits. *Molecular and cellular biology*, 22(6), pp.1615-1625.

Németh, A. and Längst, G., 2004. Chromatin higher order structure: opening up chromatin for transcription. *Briefings in Functional Genomics*, 2(4), pp.334-343.

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

Owen-Hughes, T. and Workman, J.L., 1996. Remodeling the chromatin structure of a nucleosome array by transcription factor-targeted trans-displacement of histones. *The EMBO journal*, 15(17), pp.4702-4712.

Oyarzún, A., 2022. Modificación de la actividad de los Complejos Remodeladores de Cromatina ISW1a y RSC mediado por Factores Regulatorios Generales en *Saccharomyces cerevisiae*, Tesis para optar al título de Bioingeniera. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile.

Parnell, T.J., Schlichter, A., Wilson, B.G. and Cairns, B.R., 2015. The chromatin remodelers RSC and ISW1 display functional and chromatin-based promoter antagonism. *Elife*, 4, p.e06073.

Phelan, M.L., Sif, S., Narlikar, G.J. and Kingston, R.E., 1999. Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Molecular cell*, 3(2), pp.247-253.

Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. and Séraphin, B., 2001. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*, 24(3), pp.218-229.

Richmond, T.J. and Davey, C.A., 2003. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, 423(6936), pp.145-150.

Rossi, M.J., Lai, W.K. and Pugh, B.F., 2018. Genome-wide determinants of sequence-specific DNA binding of general regulatory factors. *Genome research*, 28(4), pp.497-508.

Sander, P., Hamann, H., Drögemüller, C., Kashkevich, K., Schiebel, K. and Leeb, T., 2005. Bovine prion protein gene (PRNP) promoter polymorphisms modulate PRNP expression and may be responsible for differences in bovine spongiform encephalopathy susceptibility. *Journal of Biological Chemistry*, 280(45), pp.37408-37414.

Schones, D.E., Cui, K., Cuddapah, S., Roh, T.Y., Barski, A., Wang, Z., Wei, G. and Zhao, K., 2008. Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell*, 132(5), pp.887-898.

Segal, E. and Widom, J., 2009. What controls nucleosome positions?. *Trends in Genetics*, 25(8), pp.335-343.

Segal, E., Fondufe-Mittendorf, Y., Chen, L., Thåström, A., Field, Y., Moore, I.K., Wang, J.P.Z. and Widom, J., 2006. A genomic code for nucleosome positioning. *Nature*, 442(7104), pp.772-778.

Smith, C.L., Horowitz-Scherer, R., Flanagan, J.F., Woodcock, C.L. and Peterson, C.L., 2003. Structural analysis of the yeast SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Nature structural biology*, 10(2), pp.141-145.

Swanson, M.J., Qiu, H., Sumibcay, L., Krueger, A., Kim, S.J., Natarajan, K., Yoon, S. and Hinnebusch, A.G., 2003. A multiplicity of coactivators is required by Gcn4p at individual promoters in vivo. *Molecular and cellular biology*.

Thoma, F. and Koller, T., 1977. Influence of histone H1 on chromatin structure. *Cell*, 12(1), pp.101-107.

Tirosh, I. and Barkai, N., 2008. Two strategies for gene regulation by promoter nucleosomes. *Genome research*, 18(7), pp.1084-1091.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the national academy of sciences*, 76(9), pp.4350-4354.

Treich, I. and Carlson, M., 1997. Interaction of a Swi3 homolog with Sth1 provides evidence for a Swi/Snf-related complex with an essential function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 17(4), pp.1768-1775.

Utlei, R.T., Owen-Hughes, T.A., Juan, L.J., Côté, J., Adams, C.C. and Workman, J.L., 1996. In vitro analysis of transcription factor binding to nucleosomes and nucleosome disruption/displacement. In *Methods in enzymology* (Vol. 274, pp. 276-291). Academic Press.

Valouev, A., Ichikawa, J., Tonthat, T., Stuart, J., Ranade, S., Peckham, H., Zeng, K., Malek, J.A., Costa, G., McKernan, K. and Sidow, A., 2008. A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. *Genome research*, 18(7), pp.1051-1063.

Wagner, F.R., Dienemann, C., Wang, H., Stützer, A., Tegunov, D., Urlaub, H. and Cramer, P., 2020. Structure of SWI/SNF chromatin remodeller RSC bound to a nucleosome. *Nature*, 579(7799), pp.448-451.

Whitehouse, I. and Tsukiyama, T., 2006. Antagonistic forces that position nucleosomes in vivo. *Nature structural & molecular biology*, 13(7), pp.633-640.

Whitehouse, I., Flaus, A., Cairns, B.R., White, M.F., Workman, J.L. and Owen-Hughes, T., 1999. Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature*, 400(6746), pp.784-787.

Yan, C., Chen, H. and Bai, L., 2018. Systematic study of nucleosome-displacing factors in budding yeast. *Molecular cell*, 71(2), pp.294-305.

Yuan, G.C., Liu, Y.J., Dion, M.F., Slack, M.D., Wu, L.F., Altschuler, S.J. and Rando, O.J., 2005. Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science*, 309(5734), pp.626-630.

Yudkovsky, N., Logie, C., Hahn, S. and Peterson, C.L., 1999. Recruitment of the SWI/SNF chromatin remodeling complex by transcriptional activators. *Genes & development*, 13(18), pp.2369-2374.

Zhang, Z., Wippo, C.J., Wal, M., Ward, E., Korber, P. and Pugh, B.F., 2011. A packing mechanism for nucleosome organization reconstituted across a eukaryotic genome. *Science*, 332(6032), pp.977-980.

Anexos:

Anexo 1: Vectores plasmidiales generados para esta tesis:

Vector plasmidial generado	Vector parental	Secuencia del cassette (hebra líder)	Sitios de restricción usados para la inserción
p601-0-Gal4	pGEM_3Z_601_8n_Gal4	AATTGAGCGGCC TCGGCACC GGGA TTCTCCAGCGGA GGACAGTCCTCC GGGCGGCCGCGT ATCT	Mfel / XhoI
p601-5-Gal4	pGEM_3Z_601_8n_Gal4	AATTGAGCGGCC TCGGCACC GGGA TTCTCCAGGGCG GCGGAGGACAGT CCTCCGCCGCGT ATCT	Mfel / XhoI
p601-27-Gal4	pGEM_3Z_601_22_Gal4	TCGAGCATCGGA CCGGAGGACAGT CCTCCGCTGCA	PstI / XhoI
p601_in13_Gal4	pGEM_3Z_601_CEBPB	AATTGAGCGGCC TCGGCACC GGAG GACAGTCCTCCG GCCGCGTATCT	Mfel / XhoI
p601_in8_Gal4	pGEM_3Z_CEBPB	AATTGAGCGGCC TCGGCACC GGGA CGGAGGACAGTC CTCCGGTATCT	Mfel / XhoI
p601_in4_Gal4	pGEM_3Z_CEBPB	AATTGAGCGGCC TCGGCACC GGGA TTCTCGGAGGAC AGTCCTCCGCT	Mfel / XhoI

pQE-80L- Abf1_BamH1- XmaI	pQE-80L	NA	BamHI/XmaI
pCR-Blunt II- TOPO-Abf1	pCR-Blunt II-TOPO	NA	BamHI/XmaI

Anexo 2: Detalle de sondas mononucleosomales generadas para este trabajo

Sonda	Plásmido de origen	Secuencia de región amplificada	Partidor forward	Partidor reverse
601_13in_Gal4	p601_in13_Gal4	AGGATGTATATATCTGACACGTGCCTGGAGACT AGGGAGTAATCCCCTTGGCGGTTAAAACGCGGG GGACAGCGCGTACGTGCGTTTAAGCGGTGCTAG AGCTGTCTACGACCAATTGAGCGGCCTCGGCAC CGGAGGACAGTCTCCGGCCGCGTATCTCGAG CATCGGATTGCGCAATACCGCGGACCTGCAGGC ATGCAAGCTTGAGTATTCT	ACAGGATG TATATATC TGACACGT GCCTGG	AATACTCA AGCTTGC ATGCCTG CAGGTC
601_8in_Gal4	p601_in8_Gal4	ACAGGATGTATATATCTGACACGTGCCTGGAGA CTAGGGAGTAATCCCCTTGGCGGTTAAAACGCG GGGACAGCGCGTACGTGCGTTTAAGCGGTGC TAGAGCTGTCTACGACCAATTGAGCGGCCTCGG CACCGGGACGGAGGACAGTCTCCGGTATCTC GAGCATCGGATTGCGCAATACCGCGGACCTGCA GGCATGCAAGCTTGAGTATT	ACAGGATG TATATATC TGACACGT GCCTGG	AATACTCA AGCTTGC ATGCCTG CAGGTC
601_4in_Gal4	p601_in4_Gal4	ACAGGATGTATATATCTGACACGTGCCTGGAGA CTAGGGAGTAATCCCCTTGGCGGTTAAAACGCG GGGACAGCGCGTACGTGCGTTTAAGCGGTGC TAGAGCTGTCTACGACCAATTGAGCGGCCTCGG CACCGGGATTCTCGGAGGACAGTCTCCGCTCG AGCATCGGATTGCGCAATACCGCGGACCTGCAG GCATGCAAGCTTGAGTATT	ACAGGATG TATATATC TGACACGT GCCTGG	AATACTCA AGCTTGC ATGCCTG CAGGTC
601_0_Gal4	p601-0-Gal4	ACAGGATGTATATATCTGACACGTGCCTGGAGA CTAGGGAGTAATCCCCTTGGCGGTTAAAACGCG GGGACAGCGCGTACGTGCGTTTAAGCGGTGC TAGAGCTGTCTACGACCAATTGAGCGGCCTCGG CACCGGGATTCTCCAGCGGAGGACAGTCTCC GGCGGCCGCGTATCTCGAGCATCGGACCTGC AGGCATGCAAGCTTGAGTATT	ACAGGATG TATATATC TGACACGT GCCTGG	AATACTCA AGCTTGC ATGCCTG CAGGTC
601_5_Gal4	p601-5-Gal4	ACAGGATGTATATATCTGACACGTGCCTGGAGA CTAGGGAGTAATCCCCTTGGCGGTTAAAACGCG GGGACAGCGCGTACGTGCGTTTAAGCGGTGC TAGAGCTGTCTACGACCAATTGAGCGGCCTCGG CACCGGGATTCTCCAGGGCGGCGGAGGACAGT CCTCCGCCGCGTATCTCGAGCATCGGACCTGCA GGCATGCAAGCTTGAGTATT	ACAGGATG TATATATC TGACACGT GCCTGG	AATACTCA AGCTTGC ATGCCTG CAGGTC
601_10_Gal4	p601-10-Gal4	ACAGGATGTATATATCTGACACGTGCCTGGAGA CTAGGGAGTAATCCCCTTGGCGGTTAAAACGCG GGGACAGCGCGTACGTGCGTTTAAGCGGTGC TAGAGCTGTCTACGACCAATTGAGCGGCCTCGG CACCGGGATTCTCCAGGGCGGCGGAGGACAGT CCTCCGCCGCGTATCTCGAGCATCGGACCTGCA GGCATGCAAGCTTGAGTATT	ACAGGATG TATATATC TGACACGT GCCTGG	AATACTCA AGCTTGC ATGCCTG CAGGTC
601_22_Gal4	pGEM_3Z_601_22_Gal4	ACAGGATGTATATATCTGACACGTGCCTGGAGA CTAGGGAGTAATCCCCTTGGCGGTTAAAACGCG GGGACAGCGCGTACGTGCGTTTAAGCGGTGC TAGAGCTGTCTACGACCAATTGAGCGGCCTCGG CACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCGTATCTC GAGCATCGGAGGACAGTCTCCGCGGACCTGC AGGCATGCAAGCTTGAGTATT	ACAGGATG TATATATC TGACACGT GCCTGG	AATACTCA AGCTTGC ATGCCTG CAGGTC
601_27_Gal4	p601-27-Gal4	ACAGGATGTATATATCTGACACGTGCCTGGAGA CTAGGGAGTAATCCCCTTGGCGGTTAAAACGCG GGGACAGCGCGTACGTGCGTTTAAGCGGTGC TAGAGCTGTCTACGACCAATTGAGCGGCCTCGG CACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCGTATCTC GAGCATCGGACCGGAGGACAGTCTCCGCTGC AGGCATGCAAGCTTGAGTATT	ACAGGATG TATATATC TGACACGT GCCTGG	AATACTCA AGCTTGC ATGCCTG CAGGTC
601_42_Gal4	pGEM_3Z_601_42_Gal4	ACAGGATGTATATATCTGACACGTGCCTGGAGA CTAGGGAGTAATCCCCTTGGCGGTTAAAACGCG GGGACAGCGCGTACGTGCGTTTAAGCGGTGC TAGAGCTGTCTACGACCAATTGAGCGGCCTCGG CACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCGTACG TCGATATCAACTGGTATCTCGAGCATCGGAGGA CAGTCTCCGCGGACCTGCA	ACAGGATG TATATATC TGACACGT GCCTGG	TGCAGGT CCGCGGA GGACTGT
601_60_Gal4	p601-60-Gal4	ACAGGATGTATATATCTGACACGTGCCTGGAGA CTAGGGAGTAATCCCCTTGGCGGTTAAAACGCG GGGACAGCGCGTACGTGCGTTTAAGCGGTGC	ACAGGATG TATATATC	ACGCCAA GCTATTTA GGTGAC

		TAGAGCTGTCTACGACCAATTGAGCGGCCTCGG CACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCGTCTACG TCGATATCAACTGGTATCTCGAGCATCGTGCCA GGACGCTGACCCGGAGGACAGTCTCCGCGGA CCTGCAGGCATGCAAG	TGACACGT GCCTGG	
601_22L_Gal4	p601-22L-Gal4	ACACGTGCCTGGAGACTAGGGAGTAATCCCCTT GGCGGTTAAAACGCGGGGGACAGCGCGTACGT GCGTTTAAAGCGGTGCTAGAGCTGTCTACGACCA ATTGAGCGGCCTCGGCACCGGGATTCTCCAGG GCGGCCGCGTATCTCGAGCATCGGAGGACAGT CCTCCGCGGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGAGT ATTCTATAGTGCACCTAAATAGCTTGCGGT	ACAGGATG TATATATC TGACACGT GCCTGG	ACGCCAA GCTATTTA GGTGAC
601_27L_Gal4	p601-27L-Gal4	ACAGGATGTATATATCTGACACGTGCCTGGAGA CTAGGGAGTAATCCCCTTGGCGGTTAAAACGCG GGGGACAGCGCGTACGTGCGTTTAAAGCGGTGC TAGAGCTGTCTACGACCAATTGAGCGGCCTCGG CACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCGTATCTC GAGCATCGGACCGGAGGACAGTCTCCGCTGC AGGCATGCAAGCTTGAGTATTCTATAGTGT	ACAGGATG TATATATC TGACACGT GCCTGG	ACGCCAA GCTATTTA GGTGAC
NC-80-Abf1bs	p601-10-Abf1- Dir	ACAGGATGTATATATCTGACACGTGCCTGGAGA CTAGGGAGTAATCCCCTTGGCGGTTAAAACGCG GGGGACAGCGCGTACGTGCGTTTAAAGCGGTGC TAGAGCTGTCTACGACCAATTGAGCGGCCTCGG CACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCTTATCGTA TTGCATGATATGGTATGACCGCGGACCTGCAG GCATGCAAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCA	ACAGGATG TATATATC TGACACGT GCCTGG	TGACACT ATAGAATA CTCAAGC
NC-80-Rap1bs	p601-10-Rap1- Dir	ACAGGATGTATATATCTGACACGTGCCTGGAGA CTAGGGAGTAATCCCCTTGGCGGTTAAAACGCG GGGGACAGCGCGTACGTGCGTTTAAAGCGGTGC TAGAGCTGTCTACGACCAATTGAGCGGCCTCGG CACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCTACACCC ATACATTTCCATGGTATGACCGCGGACCTGCA GGCATGCAAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCA	ACAGGATG TATATATC TGACACGT GCCTGG	TGACACT ATAGAATA CTCAAGC
80-NC-40- Rap1bs	p601-10-Rap1- Dir	TCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTGGGAGCTC GGAACACTATCCGACTGGCACCGGCAAGGTGCG CTGTTCAATACATGCACAGGATGTATATATCTGA CACGTGCCTGGAGACTAGGGAGTAATCCCCTTG GCGGTTAAAACGCGGGGGACAGCGCGTACGTG CGTTTAAAGCGGTGCTAGAGCTGTCTACGACCAA TTGAGCGGCCTCGGCACCGGGATTCTCCAGGG CGGCCGCTACACCCATACATTTCCATGGTATG ACCGC	TCGGTACC CGGGGAT	GCGGTCA TCACCAT G
40-NC-80- Rap1bs	p601-10-Rap1- Dir	TATCCGACTGGCACCGGCAAGGTGCGTGTCAA TACATGCACAGGATGTATATATCTGACACGTGCC TGGAGACTAGGGAGTAATCCCCTTGGCGGTTAA AACGCGGGGGACAGCGCGTACGTGCGTTTAAAG CGGTGCTAGAGCTGTCTACGACCAATTGAGCGG CCTCGGCACCGGGATTCTCCAGGGCGGCCGCT ACACCCATACATTTCCATGGTATGACCGCGGA CCTGCAGGCATGCAAGCTTGAGTATTCTATAGT GTCA	TATCCGAC TGGCACC G	TGACACT ATAGAATA CTCAAGC

Anexo 3: Efecto de distintos GRFs sobre la actividad de ISW1a. (Modificado de Oyarzún 2022).

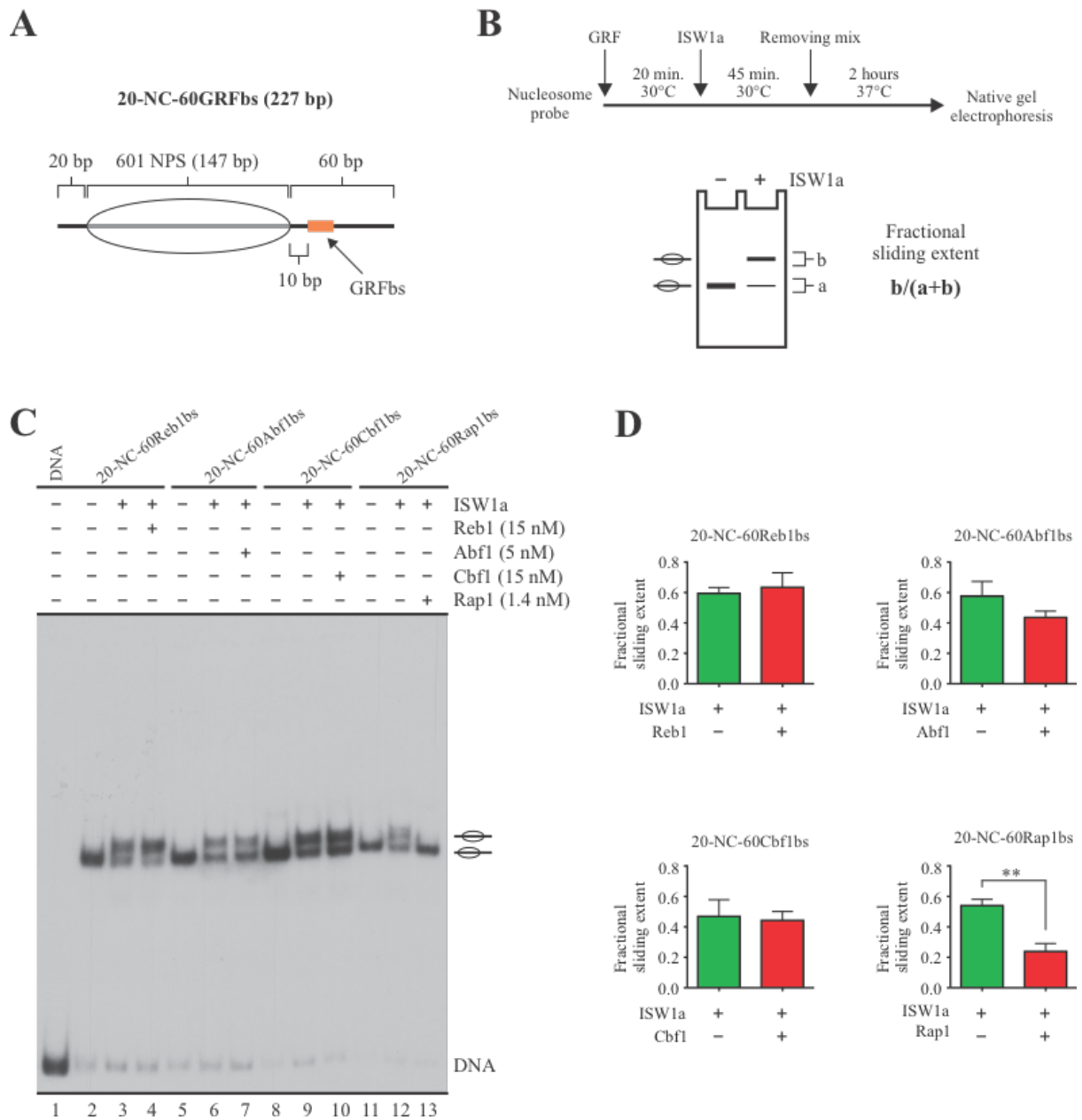


Figura Anexa 1: Efecto de la presencia de diferentes GRFs sobre la actividad remodeladora de cromatina de ISW1a. A: Esquema general de la sonda utilizada en esta serie de ensayos. **B:** Representación gráfica del procedimiento experimental desarrollado para esta serie de ensayos. **C:** Autoradiografía representativa de la serie de ensayos realizados. **D:** Cuantiación densitométrica y análisis estadístico de los resultados experimentales.